

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657080

研究課題名（和文） 真核細胞プロテアソームの試験管内再構成

研究課題名（英文） In vitro reconstitution of eukaryotic proteasome

研究代表者

水島 恒裕 (MIZUSHIMA TSUNEHIRO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：90362269

研究成果の概要（和文）：

真核生物の 20S プロテアソームは 28 個のサブユニットから形成され、 $\alpha(1-7)\beta(1-7)\beta(1-7)\alpha(1-7)$  から成る 4 層の円筒型構造をとる。真核生物の 20S プロテアソームを試験管内で再構築することにより、複合体形成機構の理解とその利用を目指し、構成サブユニットの発現、精製系の構築および複合体の再構成を行った。その結果 20S プロテアソームは  $\alpha$  サブユニットだけでは安定なリング構造を形成せず、 $\beta$  サブユニットが結合することにより  $\alpha$  リングが安定化することが示された。また、プロテアソーム 19S 制御因子複合体の分子集合に関わる専用シャペロン Hsm3、Hsm3-Rpt1-C 複合体、Rpn14 E384A の X 線結晶構造解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

The eukaryotic 20S proteasome is composed of 28 subunits arranged in a cylindrical particle as four heteroheptameric rings,  $\alpha(1-7)\beta(1-7)\beta(1-7)\alpha(1-7)$ . To elucidate the mechanisms of proteasome assembly, we performed in vitro reconstitution experiments using separately purified subunits. In the result, we showed that the  $\alpha$ -ring is stabilized by the binding of  $\beta$  subunits. Furthermore, we determined the crystal structures of the Hsm3, Hsm3-Rpt1-C complex and Rpn14 E384A mutant, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：分子認識及び相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

生体内には多くの超分子複合体タンパク質が存在しており、それらは複合体を形成することにより単独では発現不可能な高度な機能を獲得している。そして、その複合体の形成には専用シャペロンタンパク質が関与するなど、生体内にはタンパク質に機能を与える高度なシステムが存在している。

酵母 20S プロテアソームは 14 種類 28 個のサブユニットが決まった位置に配置した複合体を形成することにより機能を獲得する超分子複合体タンパク質である。プロテアソ

ームは、その複合体形成過程において複数の専用のシャペロンタンパク質を必要とすることが報告され、研究代表者らは X 線結晶構造、作用機構の研究を行ってきた。

また、真核生物においてプロテアソームは必須タンパク質であるため特定部位の変異は致死となり、さらにサブユニットの数や多様性のため発現系を構築することができない。さらに、複数のサブユニットが集合し形成されるタンパク質複合体は完成することにより安定となることから、単純で高い対称性を持ったファージなどを細胞外で構築す

ることは可能であるが、真核生物プロテアソームのように 10 種類を超えるサブユニットからなる複合体を細胞外において正しく配置することはこれまでになされていない。

## 2. 研究の目的

14 種類 28 個のサブユニットからなるプロテアソームを細胞外で構築することにより、生体超分子の複合体形成過程を理解すると共に、人工的解析が困難な複合体タンパク質解析システム構築の基盤構築を目指す。さらに、プロテアソームの細胞外での構築と共に専用シャペロンとプロテアソームサブユニットの複合体状態での X 線結晶構造解析により、分子集合における専用シャペロンの作用機構の理解を行う。それにより得られた知見は今後プロテアソームへの変異導入、解析、一般的な超分子複合体の分子集合機構の理解および細胞外タンパク質作製系構築につなげる。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞外での 20S プロテアソーム複合体構築のための  $\alpha$  リング再構築

上記研究のため、1. 各サブユニット、シャペロンタンパク質の大腸菌発現系構築。2. 各タンパク質の精製および、 $\alpha$  サブユニットを用いた生体外での  $\alpha$  リング構築。3.  $\alpha$  リング形成における中間生成物の解析を行い、複合体形成経路の解析を行う。

(2) 再構築した  $\alpha$  リングを用いた 20S プロテアソームの再構築

(1) の結果をもとに、 $\beta$  サブユニットを加えた 20S プロテアソームの再構築を行う。

(3) プロテアソームサブユニットと複合体形成シャペロンの構造解析

(1) により構築した発現系を用い、プロテアソームサブユニット、分子集合シャペロンの X 線結晶構造解析を行い、その作用機構を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 20S プロテアソーム  $\alpha$  リング再構築

20S プロテアソームを形成する各サブユニット、専用シャペロンの発現系構築を行った。発現系は各サブユニットに適した可溶性のタグを検討し構築した。

精製した  $\alpha 1$ - $\alpha 7$  の 7 サブユニットに専用シャペロン Pba1-Pba2 複合体、Pba3-Pba4 複合体を混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用い複合体状態を解析した結果、いくつかの  $\alpha$  サブユニットを含んだ不均一な複合体と、複合体を形成していない単独の  $\alpha$  サブユニットが検出され、 $\alpha$  リングはこれらのサブユニットのみでは形成されないことが示された。

次に本研究結果より、 $\alpha$  サブユニットはリング形成後、 $\beta$  サブユニットの結合により安定なリング構造を形成すると考え、 $\alpha 1$ - $\alpha 7$  サブユニット、Pba1-Pba2 複合体、Pba3-Pba4 複合体に  $\beta 2$ 、 $\beta 3$  サブユニットを加え、複合体状態の解析を行った結果、全  $\alpha$  サブユニットを含み  $\alpha$  リングと考えられる複合体を検出した。

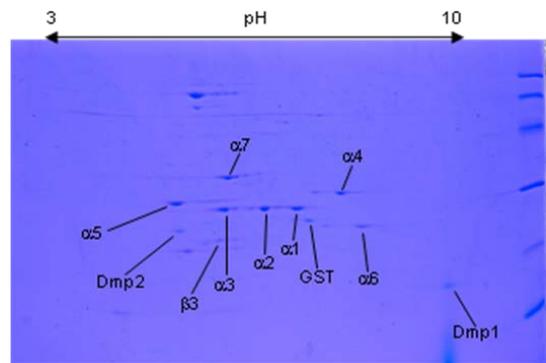


図 1. 再構築したプロテアソームの 2 次元電気泳動。再構築したサンプルを用いゲルろ過した後、複合体を形成したピークの 2 次元電気泳動を行った。

(2) 20S プロテアソームの再構築

(1) の結果をもとに各  $\beta$  サブユニットを加え、再構築を試みた。しかし、全てのサブユニットを含んだ 20S プロテアソームは現段階では確認できていない。

(3) プロテアソームサブユニットと複合体形成シャペロンの構造解析

○プロテアソームの分子集合に関わる専用シャペロン Hsm3 の X 線結晶構造解析

プロテアソーム 19S 制御因子複合体の分子集合に関わるシャペロン Hsm3 の単独および、結合サブユニット Rpt1 の C 末ドメインとの複合体 (Hsm3-Rpt1-C) の X 線結晶構造解析を行い、それぞれ 2.0 Å、3.4 Å 分解能で立体構造を決定した。決定した Hsm3 の構造は HEAT リピート構造から成る C 字型の全体構造をとり、C 字型の中央部分で Rpt1-C と結合していることが示された。

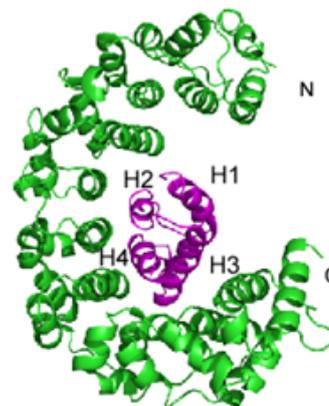


図 2. Hsm3(緑)-Rpt1-C(紫) 複合体の結晶構造

○分子集合シャペロン Rpn14 E384A 変異体の X 線結晶構造解析

Rpn14 は 19S 制御因子複合体の Rpt6 サブユニットに結合することで、分子集合に関与するシャペロンタンパク質である。Rpn14 は分子表面に特徴的な酸性領域を有している。Rpn14 において分子表面に位置する Asp384 の Ala 変異体の X 線結晶構造解析を行い、野生型より高分解能な 1.6Å 分解能で立体構造を決定した。

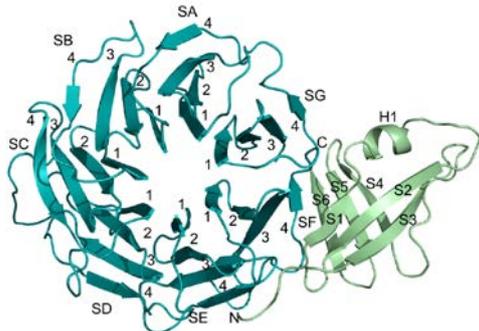


図 3. Rpn14 E384A の結晶構造

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Kim, S., Nishide, A., Saeki, Y., Takagi, K., Tanaka, K., Kato, K., Mizushima, T. New crystal structure of proteasome-dedicated chaperone Rpn14 at 1.6 Å resolution. *Acta Cryst F* 68: 517-21. (2012) (査読有)

DOI: 10.1107/S1744309112011359

(2) Takagi K., Kim S., Yukii H., Ueno M., Morishita R., Endo Y., Kato K., Tanaka K., Saeki Y., Mizushima T. Structural basis for specific recognition of Rpt1, an ATPase subunit of the 26S proteasome, by a proteasome-dedicated chaperone Hsm3. *J. Biol. Chem* 287: 12172-82. (2012) (査読有)

DOI: 10.1074/jbc.P112.345876

(3) Tanaka, K., Mizushima, T., Saeki, Y. The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol. Chem* 393: 217-34. (2012) (査読有)

DOI: 10.1515/hsz-2011-0285

(4) 水島恒裕, 西尾和也 構造から見るプロテアソームの機能、*実験医学 増刊*, 29: 1875-81. (2011) (査読無)

[学会発表] (計 8 件)

① 水島恒裕, プロテアソーム複合体構造とシャペロンによる形成機構、第85回日本生化学会大会、2012年12月14日～16日、福岡国際会議場(福岡) 招待講演

② 高木賢治、金相佑、加藤晃一、田中啓二、佐伯泰、水島恒裕、プロテアソーム19S制御因子複合体形成シャペロンHsm3の構造解析、第12回日本蛋白質科学会年会、2012年6月20日～22日、名古屋国際会議場(愛知)

③ Tsunehiro Mizushima, Studies of the structure and molecular mechanisms of the proteasome assembly. The Annual Review Conference of the Global COE program of University of Hyogo, Feb. 13, 2012, Center for Advanced Science & Technology HYOGO (Hyogo, Japan)

④ 高木賢治、金相佑、佐伯泰、田中啓二、加藤晃一、水島恒裕、プロテアソーム19S複合体の分子集合を支援する新規シャペロンHsm3の構造とメカニズム、平成23年度 日本結晶学会、2011年11月24日、北海道大学学術交流会館(北海道)

⑤ 水島恒裕、金相佑、西出旭、佐伯泰、田中啓二、加藤晃一、プロテアソーム分子集合シャペロンRpn14 E384A変異体の結晶構造解析、平成23年度 日本結晶学会、2011年11月24日、北海道大学学術交流会館(北海道)

⑥ 水島恒裕、不要なタンパク質を分解する装置の構造、第4回兵庫県立大学シンポジウム、2011年9月13日、神戸市産業振興センター(兵庫)

⑦ 高木賢治、プロテアソーム複合体形跡における専用シャペロンの構造と役割、グローバルCOEプログラム生命科学若手研究者発表会、2011年6月30日、兵庫県立先端科学技術支援センター(兵庫)

⑧ 水島恒裕、ユビキチン-プロテアソーム経路による特異的なタンパク質分解機構、グローバルCOEプログラム生命科学若手研究者発表会、2011年6月30日、兵庫県立先端科学技術支援センター(兵庫)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島 恒裕 (MIZUSHIMA TSUNEHIRO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：90362269

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

加藤 晃一 (KATO KOICHI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構・岡崎共通研究施設・岡崎統合バイオサイエンス・教授

研究者番号：20211849

矢木 宏和 (YAGI HIROKAZU)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：70565423