

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870631

研究課題名(和文) 巨大分解酵素複合体プロテアソームと活性・分子集合に関わるPI31の複合体構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of proteasome and PI31, a regulator of the activity and the molecular assembly of proteasome.

研究代表者

高木 賢治 (Takagi, Kenji)

兵庫県立大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：90647322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PI31はプロテアソームの複合体形成及びその基質分解活性の制御に関与する。PI31によるプロテアソームの調節機構の詳細を明らかにすることを目指し、両者の複合体獲得のための発現法及び精製法の検討、PI31の機能を補完する20S CP 7N末端変異体の結晶構造解析を行った。20S CP 7N末端変異体は野生型と比較して1N末端構造に違いが見られた。PI31は7に作用することで1末端の構造変化を誘導し機能に影響していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：PI31 plays regulatory roles of proteasome subunit assembly and substrate degradation activity. To elucidate the details of proteasomal regulation by PI31, we carried out studies on expression and purification of PI31, and structural analysis of 20S CP 7 N mutant, which complement PI31 defection. Based on the revealed structure we looked at working mechanism of PI31. In the 20S CP 7 N, N-terminal peptide differs from it in wild type structure. This difference is thought to change the 1 orientation and affect its proteasome function.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 細胞内タンパク質分解 プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

26S プロテアソームは 33 種 66 個のサブユニットからなる巨大な分解酵素複合体であり、特異的タンパク質分解を介して、細胞周期や DNA 修復など真核細胞内で起こる多くの生命現象を制御している。26S プロテアソームは 20S プロテアソーム(20S CP)と 19S 制御因子複合体(19S RP)から構成され、19S RP は基質の認識、20S CP の活性化を担い、20S CP は基質を分解する。また、プロテアソームは免疫反応時に免疫型プロテアソームを形成することが報告されている。

プロテアソームには数多くの相互作用タンパク質が存在し、プロテアソームの機能の補助などを行う。活性の調節機構や複合体形成機構を介して、プロテアソームを間接的に制御することは創薬的な観点からも重要であり、プロテアソーム相互作用タンパク質群の研究は国内外を問わず活発に進められている。本研究課題である PI31 は機能的に重要なプロテアソーム相互作用タンパク質であり、*in vitro*において 20S CP のペプチド分解活性を低下させることから、プロテアソーム特異的なインヒビターとして見いだされた。しかし、最近のショウジョウバエを用いた研究から、PI31 が 26S プロテアソームの活性を亢進することが示されており、PI31 は活性化と阻害の両方に関与するとしてその機能発現のメカニズムが注目されている。さらに、PI31 はウイルス感染時に産生される免疫型プロテアソームの分子集合において、複合体形成の一つの関門となる活性化プロペプチドの切断を阻害し、20S CP の形成を抑制していることが報告された。これらのことから、PI31 はプロテアソームの分解活性及び複合体形成に関与する、これまでに例を見ない相互作用タンパク質であると考えられる。

2. 研究の目的

PI31 作用メカニズムの解析

PI31 は 20S CP の活性阻害、26S プロテアソームの活性化、免疫型 20S CP の複合体形成といった複数の機能を有する重要な相互作用因子であるが、個々の機能を発現する分子メカニズムや、これらを同時に調節可能とする PI31 の構造的特徴は明らかにされていない。本研究では PI31 と 20S CP の複合体結晶構造解析を行い、これら PI31 によるプロテアソーム制御メカニズムを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 20S CP、PI31 発現・精製法の確立

20S CP 及び PI31 に精製用のタグを付加した発現系を構築し、それぞれ安定な精製法を検討した。

研究開始までに 20S CP の精製系は構築しており、種々の解析に使用可能なサンプルの獲得法確立を目指した。酵母 PI31 (yPI31)

は単独状態での精製中に非特異的な切断が見られたため、発現宿主の検討や、プロテアーゼ阻害剤の使用など精製法の検討を行った。

(2) PI31C 末端ペプチド発現系の構築

PI31 の 20S CP 機能阻害は C 末端ドメインに起因することが報告されている。PI31 全長と 20S CP の複合体構造決定が本来の目的ではあるが、C 末端ドメインは二次構造予測からランダムコイルを形成していると考えられることから、全長での解析が困難であることが予想された。そこで、安定な構造を持つユビキチンに PI31 の C 末端部位(プロテアソーム結合性の HbYX モチーフ)をつなげた発現系の構築を行った。

(3) PI31-20S CP 複合体の作製

(1),(2)より決定した発現系及び精製条件を用い、酵母、大腸菌の両大量発現系から 20S CP、PI31 を精製し、相互作用解析を行った。

タンパク質精製には AKTA クロマトグラフィシステムを用い、イオン交換クロマトグラフィ、ゲルろ過クロマトグラフィにより目的タンパク質の分画を行った。

複合体形成の解析は Ni-セファロースによるブルダウンアッセイと、Superdex200 を用いたゲルろ過クロマトグラフィにより行った。

(4) 20S CP $\alpha 7N$ 末端変異体結晶構造解析

共同研究者によりプロテアソーム $\alpha 7$ サブユニットの N 末端欠損が PI31 の機能を相補する可能性が示唆されたことから、PI31 の機能の理解をめざし、20S CP $\alpha 7N$ 末端変異体(20S CP $\alpha 7\Delta N$)の結晶構造解析を行った。作製した結晶は大型放射光施設 SPring8 にて X 線回折実験を行った。データ収集後、既知の 20S CP 構造を探索モデルとした分子置換法により位相決定を行い、マニュアル操作による構造精密化を繰り返し、20S CP $\alpha 7\Delta N$ の構造を決定した。

(5) PI31 機能解析

得られた 20S CP $\alpha 7\Delta N$ 結晶構造をもとに PI31 の作用メカニズムを考察した。20S CP には 19S RP によって引き伸ばされた基質を取り込む孔があり、この孔を封鎖しているゲートが α サブユニットの N 末端によって形成されている。PI31 の 20S CP への結合がゲートの構造に影響することを予想し、立体構造に基づき考察を行った。

4. 研究成果

(1) 20S CP、PI31 発現・精製法の確立

PI31 は C 末端ドメインにプロテアソーム結合性の HbYX モチーフを保持しており、本モチーフを介して複合体を形成していると考えられる。しかし、従来の PI31 精製法では C 末端の切れた複数種の分子量のタンパク質が確認された。そこで、この原因をタン

パク質の発現不良と非特異切断の両面から考察し、発現方法の最適化とプロテアーゼ阻害剤を用いることで、切断物を抑えたタンパク質の精製条件を確立した。

yPI31 のタンパク質発現では C 末端の切断物が確認されたため、大腸菌 BL21(DE3) により、ヒト PI31 (hPI31)、マウス PI31 (mPI31) の精製を yPI31 と同様にを行い、SDS-PAGE により得られた目的タンパク質の状態を調べた (Fig.1)。mPI31 及び hPI31 は完全長の目的タンパク質の他に C 末端を欠損した多くの切断体のバンドが確認された。酵母、ヒト、マウスのいずれの PI31 においても C 末端を保持しない PI31 が混入していた。

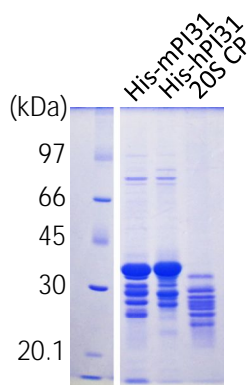


Fig.1 mPI31, hPI31 の精製

プロリンリッチドメインを持つ PI31 の発現には BL21(DE3) では不適切であると考え、レアコドンの翻訳を促進するために、宿主を Rosetta に変えて目的タンパク質の発現を確認した。この際 BL21 で C 末端切断物が多く確認された hPI31, mPI31 についても同様に発現確認を行った (Fig.2)。この結果、yPI31 では発現不良の抑制が見られた。しかし、hPI31, mPI31 では多くの切断物が確認されたことから、プロテアーゼ阻害剤及びプロテアソーム阻害剤を用いて、PI31 のさらなる安定化を試みた。

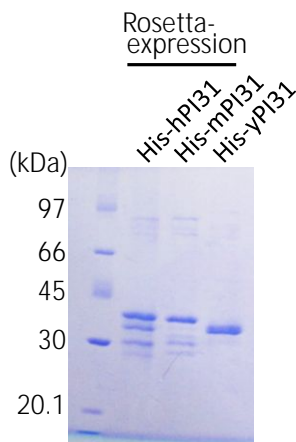


Fig.2 発現宿主の検討

プロテアーゼ阻害剤カクテル及びプロテ

アソーム阻害剤を用いて、yPI31 精製時のタンパク質分解の抑制効果を検討した。いずれの阻害剤存在下でも PI31 の断片と考えられるバンドが電気泳動により確認されたため、宿主による発現不良が PI31 の断片化の主な原因であると考えられる。

(2) PI31C 末端ペプチド発現系の構築

PI31 は C 末端にプロテアソーム結合性の HbYX モチーフを持つことから、この部分を持たない不良 PI31 はプロテアソームとの結合が大きく抑制されると考えられる。そこで、安定なタンパク質として精製が容易なユビキチン (Ub) の C 末端にプロテアソーム結合性の HbYX ペプチドを付加した発現系を作製した。大腸菌による目的タンパク質の培養・精製の結果、Ub-PI31 ペプチドとして C 末端 HbYX モチーフを得ることができた。

(3) PI31-20S CP 複合体の作製

(1),(2)より得られた yPI31 及び Ub-PI31 ペプチドと、20S CP の相互作用解析 (プルダウンアッセイ) を行った (Fig.3)。His-yPI31 に結合する 20S CP の各サブユニットは SDS-PAGE によってわずかに確認できる程度であり、精製した PI31 と 20S CP は強く結合していないと考えられた。

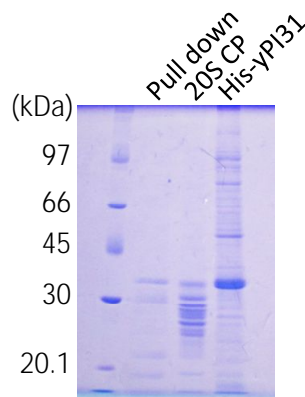


Fig.3 yPI31-20S CP 相互作用解析

HbYX モチーフを持つプロテアソーム専用シャペロン Pba1-Pba2 複合体は、20S CP との安定な複合体形成が、塩濃度に依存することが報告されている。相互作用解析の際の塩濃度等の条件を検討し、20S CP と PI31 の複合体形成を試みた。この結果、PI31 に対する 20S CP の結合量は塩濃度に依存しないことが明らかになった。

PI31 と 20S CP の複合体形成を検出できなかったため、C 末端の HbYX モチーフの結合状態を調べるために、Ub-PI31 ペプチドを用いて 20S CP との相互作用解析を行った (Fig.4)。しかし、ゲルろ過クロマトグラフィーによる相互作用解析では、20S CP と Ub-PI31 ペプチドの複合体形成は確認されなかった。PI31 と 20S CP の結合には PI31 全長が必要であると考えられる。

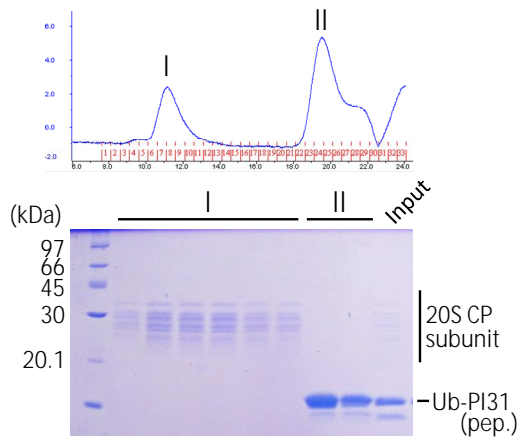


Fig.4 20S CP-Ub-PI31 pep.相互作用解析

(4) 20S CP $\alpha 7N$ 末端変異体結晶構造解析
 20S CP $\alpha 7\Delta N$ の結晶化条件の検討を行い (Fig5)、放射光を用いた X 線回折実験により分解能 3.15 Å のデータを収集した。

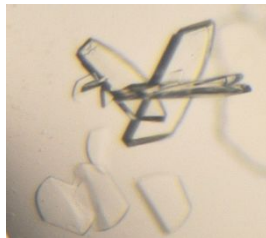


Fig.5 $\alpha 7N$ 末端変異型 20S CP 結晶

20S CP $\alpha 7\Delta N$ 結晶の X 線回折データは、野生型 20S CP の構造を用いた分子置換法により位相決定を行い、Rwork/Rfree = 17.3%/24.2%となるまで構造精密化を繰り返した。

(5) PI31 機能解析

(4)の結果を基に PI31 の調節機構の考察を行った。20SCP の $\alpha 3N$ 末端欠損体 (20S CP $\alpha 3\Delta N$) ではゲートが開放されるが、20S CP $\alpha 7\Delta N$ では野生型と類似した非活性型構造をとっていた (Fig.6)。また、野生型では $\alpha 7N$ 末端が分子表面に突出し、 $\alpha 1N$ 末端はプロテアソーム分子表面に沿うようにして位置している。これに対して 20S CP $\alpha 7\Delta N$ では $\alpha 1N$ 末端が突出した構造をとっていることが明らかとなった (Fig.7)。本結果は PI31 が $\alpha 7N$ 末端に作用することで $\alpha 1N$ 末端の配向に影響することを示唆した。また、 $\alpha 1N$ 末端は他のサブユニットとの相互作用を促進することで、PI31 必須なタンパク質の分解を活性化している可能性が示唆された。

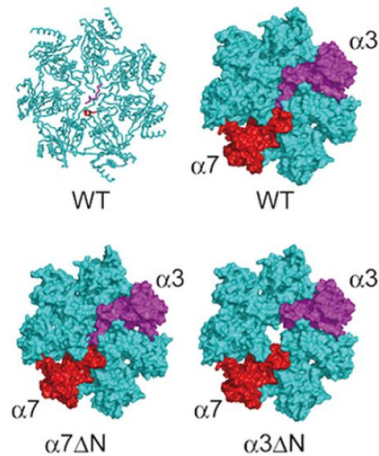


Fig.6 20S CP $\alpha 7N$ 末端変異体構造

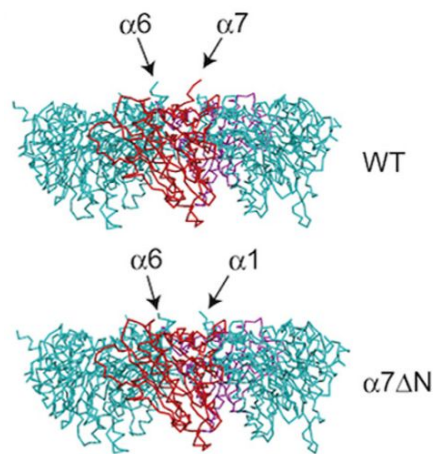


Fig.7 $\alpha 1N$ 末端が突出した 20S CP $\alpha 7N$ 末端変異体

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 8 件)

(1) Hideki Yashiroda, Yousuke Toda, Saori Otsu, Kenji Takagi, Tsunehiro Mizushima, and Shigeo Murata, N-Terminal $\alpha 7$ Deletion of the Proteasome 20S Core Particle Substitutes for Yeast PI31 Function. *Mol. Cell. Biol.*, 査読有, **35** (2015) 141-152
 DOI: 10.1128/MCB.00582-14

(2) Minsoo Kim, Ryota Otsubo, Hanako Morikawa, Akira Nishide, Kenji Takagi, Chihiro Sasakawa and Tsunehiro Mizushima, Bacterial effectors and their functions in the ubiquitin-proteasome system: insight from the modes of substrate recognition, *Cells*, 査読有, **3** (2014) 848-864
 DOI: 10.3390/cells3030848

(3) Kenji Takagi, Yasushi Saeki, Hideki Yashiroda, Hirokazu Yagi, Ai Kaiho, Shigeo Murata, Takashi Yamane, Keiji Tanaka, Tsunehiro Mizushima, Koichi Kato, Pba3-Pba4 heterodimer acts as a molecular matchmaker in proteasome a-ring formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, **450** (2014) 1110-1114
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.119

(4) Alf Håkon Lystad, Yoshinobu Ichimura, Kenji Takagi, Yinjie Yang, Serhiy Pankiv, Yumi Kanegae, Shun Kageyama, Mariko Suzuki, Izumu Saito, Tsunehiro Mizushima, Masaaki Komatsu, Anne Simonsen, Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B positive structures, *EMBO rep.*, 査読有, **15** (2014) 557-65
DOI: 10.1002/embr.201338003

(5) Toshiaki Fukutomi, Kenji Takagi, Tsunehiro Mizushima, Noriaki Ohuchi and Masayuki Yamamoto, Kinetic, Thermodynamic, and Structural Characterizations of the Association between Nrf2-DLGex Degron and Keap1, *Mol. Cell. Biol.*, 査読有, **34** (2014) 618-631
DOI: 10.1128/MCB.01191-13

(6) 高木賢治, 水島恒裕, プロテアソーム複合体形成シャペロンの構造と作用機構, *生化学*, 査読無, **85** (2013) 789-794
URL: <http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2014/06/85-09-08.pdf>

(7) Yoshinobu Ichimura, Satoshi Waguri, Yu-shin Sou, Shun Kageyama, Jun Hasegawa, Ryosuke Ishimura, Tetsuya Saito, Yinjie Yang, Tsuguka Kouno, Toshiaki Fukutomi, Takayuki Hoshii, Atsushi Hirao, Kenji Takagi, Tsunehiro Mizushima, Hozumi Motohashi, Myung-Shik Lee, Tamotsu Yoshimori, Keiji Tanaka, Masayuki Yamamoto, Masaaki Komatsu, Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy, *Mol. Cell*, 査読有, **51** (2013) 618-631
DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.003

(8) Akira Nishide, Minsoo Kim, Kenji Takagi, Ai Himeno, Takahito Sanada, Chihiro Sasakawa, Tsunehiro Mizushima, Structural Basis for the Recognition of Ubc13 by the Shigella flexneri Effector

OspI. J. Mol. Biol., 査読有, **425** (2013) 2623-2631
DOI: 10.1016/j.jmb.2013.02.037

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 高木賢治, Kim Minsoo, 笹川千尋, 水島恒裕
赤痢菌エフェクターIpaH9.8 基質認識ドメインの X 線結晶構造解析, 新学術領域研究「ユビキチン制御」平成 26 年度領域班会議, 2014 年 12 月 3 日~5 日, ホテルたつき (愛知県蒲郡市)

(2) Kenji Takagi, Akira Nishide, Tsunehiro Mizushima
Structure and substrate recognition mechanism of IpaH9.8 LRR, Symposium for young ubiquitin researchers in Japan "New Era in the Ubiquitin Research", 2014 年 11 月 11 日~12 日, 国際高等研究所 (京都府木津川市)

(3) 高木賢治, 水島恒裕
赤痢菌エフェクターIpaH9.8 基質認識ドメインの X 線結晶構造解析, 平成 26 年度結晶学会, 2014 年 11 月 1 日~3 日, 東京大学農学部 (東京都文京区)

(4) Kenji Takagi, Ayaka Kishimoto, Aya Amano, Keisuke Sakurai, Tsunehiro Mizushima, Hideo Shimada
Heme as scaffold for substrate binding coupled active site structuring in cytochrome p450cam, 1st International Picobiology Institute Symposium, 2014 年 1 月 7 日~8 日, 兵庫県立大学(兵庫県赤穂郡)

(5) 高木賢治, 西出 旭, Kim Minsoo, 笹川千尋, 水島恒裕
脱アミド化 Ubc13 の構造解析による赤痢菌感染機構の考察, 新学術領域「ユビキチン制御」平成 25 年度 第 2 回領域会議, 2013 年 12 月 11 日~13 日, 熱海ニューフジヤホテル (静岡県熱海市)

(6) Kenji Takagi
Structural basis for specific recognition of Rpt1 by proteasome-dedicated chaperone Hsm3, THE 35th Naito Conference on the Ubiquitin-Proteasome system : from Basic mechanisms to Pathophysiological roles, 2013 年 7 月 9 日~12 日, シャトラーゼガトーキングダム札幌 (北海道札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

(1) Kenji Takagi, Tsunehiro Mizushima
Academic press (Elsevier), Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging, (2013), 35-44, Mechanisms of Regulation of p62 in

Autophagy and Implications for Health
and Diseases

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木賢治（兵庫県立大学・生命理学研究
科・助教（客員教員））

研究者番号：90647322