

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460051

研究課題名(和文) プロテアソームリング構造をベースとしたタンパク質集積法の開発

研究課題名(英文) Accumulation of proteins utilizing the ring-structure formed by alpha6 and alpha7 subunits of human 20S proteasome

研究代表者

栗本 英治 (KURIMOTO, EIJI)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：90234575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：モデルタンパク質としてGFPを7のそれぞれN、C末端に融合したGFP-7、7-GFPとも、単独ではリングが形成されることが判明した。そこで、6にGFPを融合してヘテロリング形成を試みた。その結果、GFP-6は単量体状態の7と効率的にヘテロリングを形成するが、リング状態の7とはリング形成しなかった。一方、6-GFPは7の状態に関わらず効率的にヘテロリングが形成されることが判明した。また、GFP-6-GFPと単量体型7とのヘテロリング形成から、集積度向上の可能性が示唆された。以上、7、6によるヘテロリングの活用によりリング上へのタンパク質集積化手法を確立することできた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is accumulation of proteins based on the homo-double ring formed by alpha7 subunits of human 20S proteasome. GFP, employed as model protein, was fused at N- or C-terminus of alpha7. Resultant proteins did not show ring-formation. Therefore, hetero-ring formation using alpha6 subunit fused with GFP at the N- or C-terminus was attempted. GFP-alpha6 formed hetero-ring efficiently with monomeric form of alpha7, but did not with alpha7 homo-double ring. On the other hand, alpha6-GFP easily formed hetero-ring both with monomeric or oligomeric alpha7. Moreover, GFP-alpha6-GFP formed hetero-ring with monomeric alpha7, indicating that such fusion is effective for higher accumulation of proteins on the ring.

研究分野：生物物理

キーワード：タンパク質 集積化 プロテアソーム リング

1. 研究開始当初の背景

タンパク質とリガンドの結合において、多価相互作用は親和性向上に極めて効果的である。例えば、タンパク質に修飾された糖鎖と各種レクチンとの相互作用において、分岐した糖鎖の複数末端を同時に認識することにより全体の親和性が強められると考えられる。タンパク質が集積される際に、特異的な配向で空間的に近接させることにより機能が発揮されることも知られている。例として、ポリユビキチン鎖の形成において、リガーゼと結合したユビキチンの配向によりユビキチン間の結合様式の特異性が決まることなどが明らかとなっている。人工的な応用として MHC のオリゴマー化が挙げられる。ビオチン-アビジンの強固な結合を利用した MHC テトラマーは、T 細胞との相互作用アッセイの高感度化に利用されている。さらに、コイルドコイルを利用した MHC の 5 量体化も報告されている。

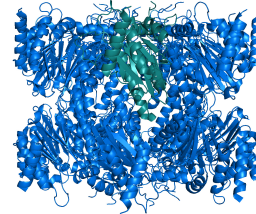
このように、タンパク質の集積化は、親和性を高めるために有効な手法であるほか、特異的な配向により複合的な反応を効率的に行う場を与えることも考えられ、種々の手法の開発が望まれている状況である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトプロテアソームの α リングを構成するサブユニットの一つである $\alpha 7$ サブユニットが形成するホモダブルリングをベースとした、タンパク質集積化手法の開発である。

プロテアソームのコア粒子である 20S プロテアソームは、それぞれ 7 種類のサブユニットからなる α リング、 β リングが α - β - β - α の順に積み重なった円筒の構造からなる。20S プロテアソームの形成は α リングの形成から開始されると考えられているが、その過程は自発的には起こらず、複数の分子シャペロンの関与が必要であることが明らかと

なっている。ところが、 α リングを構成する 7 種類のサブユニットのうち、 $\alpha 7$ は単独でホモダブルリングを形成することが知られている (図 1)。このリング形成の生物学的役割は不明であるが、これが α リング形成の鋳型となり、他のサブユニットとの交換により α リング形成が進行する可能性も考えられている。



PDB: 5DSV

図 1 $\alpha 7$ が形成するホモダブルリング (14量体) の結晶構造

$\alpha 7$ が形成するホモリングは安定であり、 $\alpha 6$ サブユニットと相互作用してヘテロダブルリングを形成することも知られている。本研究では、このような $\alpha 7$ 、 $\alpha 6$ サブユニットが形成するリングを構造ベースとして、様々なタンパク質集積の手法の開発を目指す。リングは 14 個のサブユニットで構成されるため高い集積度が期待されるほか、異なるタンパク質を交互に並べる集積化など様々な応用を図る。

3. 研究の方法

(1) 各種タンパク質の発現および調製

$\alpha 7$ 、 $\alpha 6$ サブユニットおよび蛍光タンパク質融合型変異タンパク質は大腸菌により発現させ、Ni affinity column、DEAE sepharose column により粗精製した後、陰イオン交換 HPLC、ゲルろ過 HPLC により精製した。

(2) ゲルろ過クロマトグラフィー

カラムに Superdex 200 Increase および Superose 6 Increase (GE healthcare) を用い、それぞれ流速 0.75 mL/min、0.5 mL/min で行い、280 nm における吸光度によって検出した。

(3) CD による熱安定性の解析

測定サンプル濃度を 0.1 mg/mL とするよ

うに調製した。CD 分光計は JASCO J-725 を用い、測定波長は 222 nm、温度勾配を 1 °C/min に設定して 20°C から 100°C まで温度を上昇させた。

4. 研究成果

(1) $\alpha 7$ が形成するホモダブルリングの熱安定性

本研究におけるタンパク質集積化のベースとなる $\alpha 7$ が形成するホモダブルリングの熱安定性を CD を用いて解析した。その結果、図 2 に示すように、その変性温度は 95°C 程度であり、リング構造は極めて安定であることが認められた。

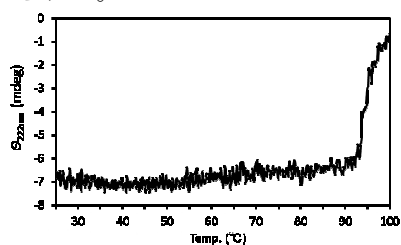


図 2 $\alpha 7$ ホモダブルリングの熱安定性

(2) $\alpha 7$ の N-, C-末端への GFP 融合体におけるリング形成能の解析

リング上へのタンパク質集積化を行うため、モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (GFP) を取りあげた。まず、 $\alpha 7$ サブユニットの N 末端および C 末端に GFP を融合したコンストラクトを作成し、大腸菌により発現させた。その結果、C 末端に GFP を融合させた $\alpha 7$ -GFP は、封入体を形成してしまい調製することができなかった。一方、N 末端に融合させた GFP- $\alpha 7$ は、上清分画に発現した。しかし、得られた GFP- $\alpha 7$ は一部が単量体として存在し、大部分はダブルリングより分子量の小さなピークとして溶出された (図 3)。この結果より、GFP- $\alpha 7$ は一定の分子量を示す会合体を形成するものの、ホモダブルリングは形成しないことが判明した。GFP- $\alpha 7$ がダブルリング構造を形成しない要因として、融合した GFP が立体障害的に働いている可能性が考えられた。そこ

で、より分子量の小さなタンパク質 (Emp46cE303K : 12kDa) を融合したコンストラクトについても同様な解析を行ったが、ホモダブルリングの形成は認められなかった。以上の結果から、 $\alpha 7$ サブユニット単独では、タンパク質融合による集積化は困難であると考えられた。

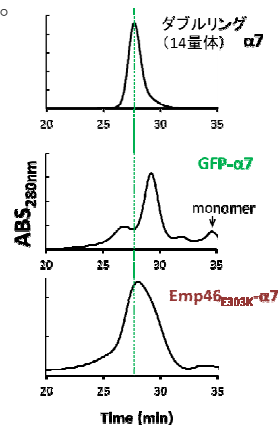


図 3 $\alpha 7$ の N 末端へのタンパク質融合体のゲルろ過 HPLC

(3) N 末端に GFP を融合した $\alpha 6$ サブユニットと $\alpha 7$ によるヘテロリング形成の解析

$\alpha 7$ のホモダブルリングに $\alpha 6$ サブユニットを添加すると、一旦ダブルリングがシングルリング (中間複合体) に開裂し、その後、徐々に $\alpha 6$ と $\alpha 7$ のヘテロダブルリングが形成される (図 4)。そこで、GFP を N 末端に融合した GFP- $\alpha 6$ を作成し、 $\alpha 7$ とのヘテロリング形成について解析した。

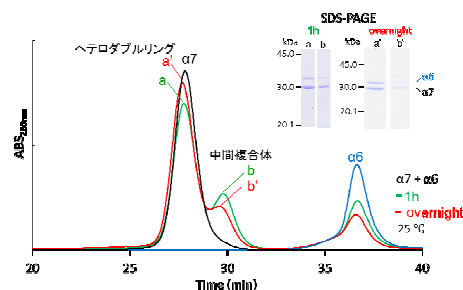


図 4 $\alpha 7$ ダブルリングへの $\alpha 6$ サブユニット添加によるヘテロダブルリング形成

$\alpha 7$ のダブルリングに GFP- $\alpha 6$ を加えると、シングルリングへの開裂が生じ (図 5: peak b)、その後、 $\alpha 7$ と GFP- $\alpha 6$ を含む複合体 (peak c) が徐々に形成された。しかし、溶出位置からこの複合体はヘテロダブルリングではないと考えられた。

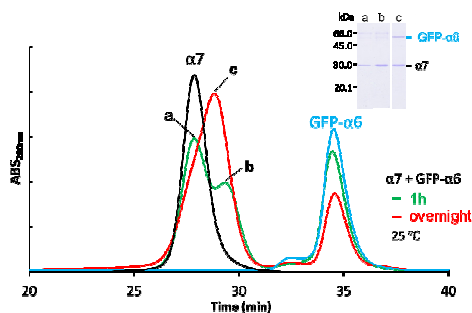


図5 $\alpha 7$ ダブルリングとGFP- $\alpha 6$ との相互作用解析

$\alpha 7$ ダブルリングとGFP- $\alpha 6$ によるヘテロダブルリングが形成されない理由として、リング状態の $\alpha 7$ とGFP- $\alpha 6$ との相互作用が生じ難いことが予想された。そこで、ヘテロリング形成能を保持しつつ、単独では単量体となる $\alpha 7$ の作成を試みた。 α リングの結晶構造から、 $\alpha 7$ の配列のうち隣接するサブユニット間の相互作用に関与すると考えられるN末端から22残基を特定し、それを削除したコンストラクトを作成した。この変異型 $\alpha 7$ を大腸菌により発現させた結果、 $\alpha 7(\Delta N_{22})$ は単独では単量体として存在することが明らかとなった(図6)。

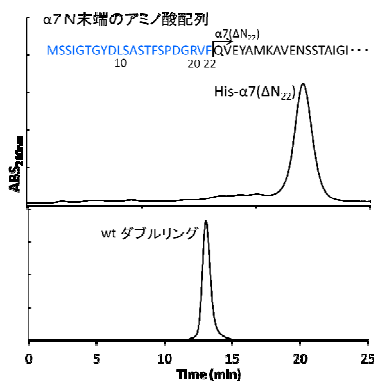


図6 $\alpha 7$ のN末端部分削除による単量体化

単量体型 $\alpha 7$ と $\alpha 6$ の相互作用を解析した結果、両者は速やかにヘテロダブルリングを形成することが明らかとなった(図7)。

次に、単量体型 $\alpha 7$ とGFP- $\alpha 6$ との相互作用を解析した。その結果、単量体型 $\alpha 7$ はGFP- $\alpha 6$ とも効率よくヘテロダブルリングを形成することが判明した(図8)。

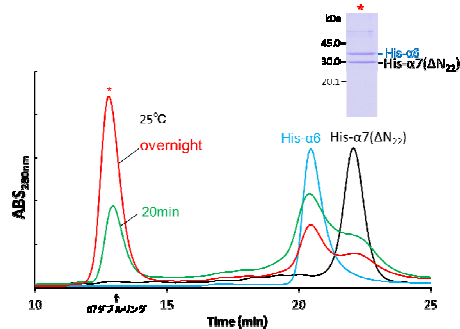


図7 単量体型 $\alpha 7$ と $\alpha 6$ によるヘテロダブルリング形成

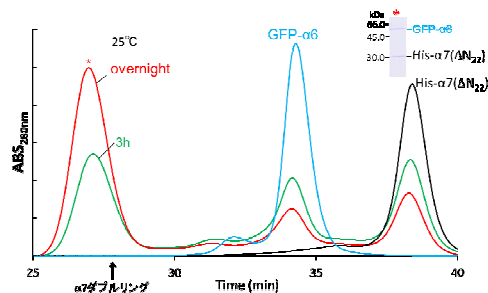


図8 単量体型 $\alpha 7$ とGFP- $\alpha 6$ によるヘテロダブルリング形成

$\alpha 7$ のダブルリングを塩酸グアニジンで変性させて解離させた後、refoldingを行うと、まず単量体としてrefoldし、その後、徐々にダブルリングが形成された。そこで、refolding直後のサンプルにGFP- $\alpha 6$ を添加し、単量体の状態の野生型 $\alpha 7$ との相互作用を解析した。その結果、単量体状態の $\alpha 7$ はGFP- $\alpha 6$ と効率よくヘテロダブルリングを形成することが明らかとなった(図9)。

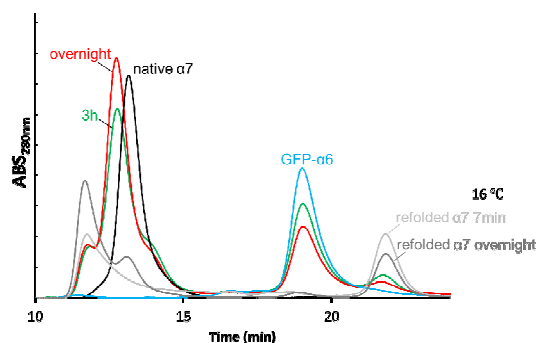


図9 Refolded $\alpha 7$ とGFP- $\alpha 6$ によるヘテロダブルリング形成

以上の結果から、GFP- $\alpha 6$ は、リングを形成した状態の $\alpha 7$ とは相互作用するがヘテロリングを形成しないのに対し、単量体の状態の $\alpha 7$ とは効率的にヘテロダブルリングを形成することが明らかとなった。

(4) GFP- $\alpha 7$ と GFP- $\alpha 6$ との相互作用解析

GFP- $\alpha 7$ は一部単量体として存在するほか、リングではない会合体を形成する。これに GFP- $\alpha 6$ を添加した結果、単量体型の GFP- $\alpha 7$ は GFP- $\alpha 6$ と速やかに相互作用して消失し、それに伴い効率よくヘテロダブルリングが形成されることが判明した (図 10)。一方、GFP- $\alpha 7$ の会合体も GFP- $\alpha 6$ と相互作用するが、中間的な複合体 (図 10: peak b) が形成され、ヘテロリング形成の効率は低いものであった。これに対し、GFP- $\alpha 6$ と GFP- $\alpha 7$ を大腸菌体内で共発現させた結果、*in vitro* の実験で認められた会合体形成が抑制され、効率よくヘテロダブルリングが得られることが判明した (図 11)。これは、菌体内において GFP- $\alpha 7$ の会合体形成が抑制されているためと考えられる。

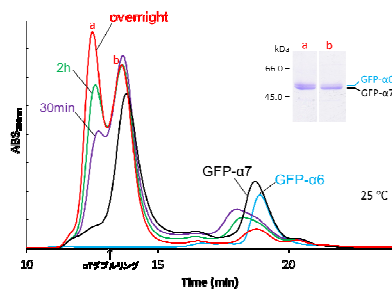


図 10 GFP- $\alpha 7$ と GFP- $\alpha 6$ によるヘテロダブルリング形成

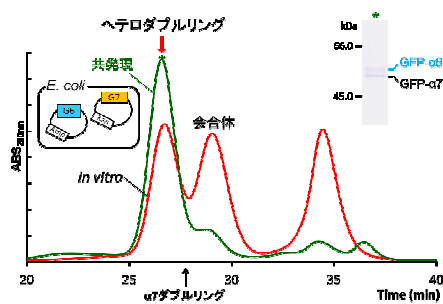


図 11 GFP- $\alpha 7$ と GFP- $\alpha 6$ の共発現によるヘテロダブルリング形成

(5) C 末端に GFP を融合した $\alpha 6$ によるヘテロリング形成の解析

$\alpha 6$ の C 末端に GFP を融合した $\alpha 6$ -GFP を作成し、単量体型およびリング状態の $\alpha 7$ との相互作用解析を行った。その結果、 $\alpha 6$ -GFP は、単量体型の $\alpha 7$ と速やかにヘテロ

ダブルリングを形成する他、リング状態の $\alpha 7$ に対しても相互作用し、効率よくヘテロダブルリングを形成することが判明した (図 12,13)。

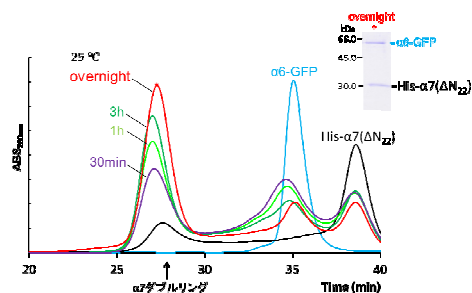


図 12 $\alpha 6$ -GFP と単量体型 $\alpha 7$ によるヘテロリング形成

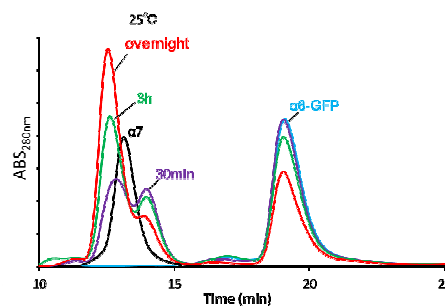


図 13 $\alpha 7$ ホモダブルリングと $\alpha 6$ -GFP とによるヘテロリング形成

次に、 $\alpha 6$ -GFP と GFP- $\alpha 7$ との相互作用を解析した。その結果、GFP を C 末端に融合した場合、GFP- $\alpha 6$ と比べてより効率的にヘテロダブルリングを形成することが明らかとなった (図 14)。

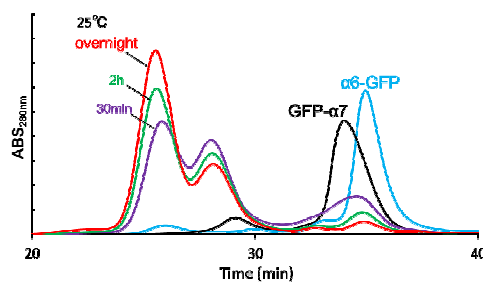


図 14 GFP- $\alpha 7$ と $\alpha 6$ -GFP とによるヘテロリング形成

以上の結果から、 $\alpha 6$ の N 末端に融合した GFP は、リング状態の $\alpha 7$ および会合状態の GFP- $\alpha 7$ との相互作用の際に、立体障害的に働くためヘテロリング形成が抑制されるのに対して、C 末端側に融合した GFP はそのような障害とならないことが考えられた。こ

れより、リング上への効率的なタンパク質集積には、 $\alpha 6$ サブユニットの C 末端側への融合体を利用することが有効であることが明らかとなった。

(6) $\alpha 6$ の N 末端、C 末端の両方に GFP を融合した GFP- $\alpha 6$ -GFP によるヘテロリング形成の解析

$\alpha 6$ を利用してさらなるタンパク質集積度の向上を行うため、 $\alpha 6$ の N-および C-末端の両方に GFP を融合したコンストラクトを作成し、 $\alpha 7$ とのリング形成能を解析した。その結果、GFP- $\alpha 6$ -GFP は、単量体型の $\alpha 7$ と相互作用し、ゆっくりとではあるが、ヘテロダブルリングを形成することが明らかとなった (図 15)。

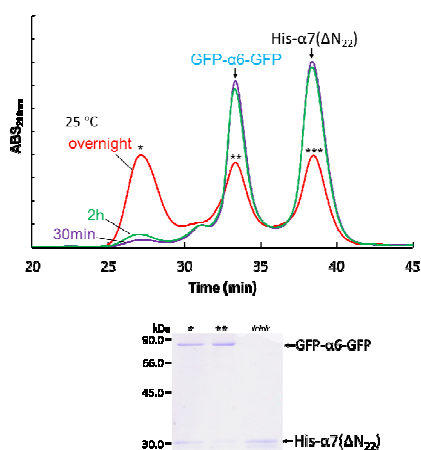


図 15 単量体型 $\alpha 7$ と GFP- $\alpha 6$ -GFP によるヘテロリング形成

以上、 $\alpha 7$ のホモダブルリングのみでは、タンパク質融合によるリング上への集積化は困難であるが、 $\alpha 6$ サブユニットを利用することにより、ヘテロダブルリング上へのタンパク質集積化が可能であることが明らかとなり、そのリング形成の詳細な過程も判明した。本研究で確立された $\alpha 7$ 、 $\alpha 6$ サブユニットによるヘテロリング形成手法により、今後、様々なタンパク質の集積化の進展が期待される。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

① 栗本英治、神藤彩加、橋本友佳、小田彰史: ヒトプロテアソーム $\alpha 6$, $\alpha 7$ サブユニットにより形成されるリングを応用したタンパク質の集積化

日本薬学会第 137 年会

平成 29 年 3 月 25 日 (仙台)

② 神藤彩加、石原利紗、小田彰史、栗本英治: ヒトプロテアソーム $\alpha 6$, $\alpha 7$ サブユニットにより形成されるリングをベースとしたタンパク質の集積化

第 62 回日本薬学会東海支部総会・大会

平成 28 年 7 月 9 日 (名古屋)

③ 角田 潤、藤井理紗、高木悠里、栗本英治: *In vitro* における 20S プロテアソーム α リング形成過程の解析

第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会

平成 27 年 7 月 4 日 (名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗本 英治 (KURIMOTO, Eiji)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号: 90234575