

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 - 2012

課題番号：22570113

研究課題名（和文）26Sプロテアソームの低分解能結晶構造解析による分子様態に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the molecular behavior of the 26S proteasome by a low resolution structure analysis

研究代表者 森本幸生 (MORIMOTO YUKIO)
 京都大学原子炉実験所 教授
 研究者番号 80200450

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では（1）26Sプロテアソームの精製と結晶化（2）本酵素複合体の溶液状態での形状解析と位相計算のためのモデリング、を目的とした。遺伝子改変型酵母株のうち1179株からの精製において微結晶を得ることができ、低分解能（12Å）での回折斑点を得て電子密度を求めた。この時（2）での溶液状態での形状を元に位相計算を行った。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the 26S proteasome, whole particle, was investigated at the (1) purification from gene-modified yeast and crystallization, and (2) small-angle scattering analysis for clarifying a shape of the whole particle and phase calculation in a crystallographic electron density map by the shape function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：蛋白質結晶学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析、プロテアソーム、分子動態

1. 研究開始当初の背景

26Sプロテアソームは20Sの触媒ユニットと19Sの調節ユニットから構成された生命科学史上最も巨大（分子量250万）で複雑な（総サブユニット数約100個）タンパク分解装置であり、ユビキチンで修飾されたタンパク群を適宜かつ選択的に分解する真核生物のATP依存性プロテアーゼ複合体である。1997年R.Huberらによって酵母からの、2002年に申請者らによって哺乳類として初めて牛肝臓からの20Sプロテアソームの結

晶構造が報告され、タンパク分解活性を有する20S粒子内部のサブユニット部位などが明らかになり、各サブユニットの特徴から20S複合体を構成する仕組みも考察することができた。しかしながら両端に結合した調節ユニットの形状や構造は不明であった。

本酵素複合体の研究に残された最大の課題は、この巨大で複雑な酵素複合体の立体構造解析と分子集合機構の解明である。本研究課題は本酵素の細胞内における動態や作動機構の構造学的解明に挑むことを目的とす

る。本研究は多彩な役割を担っているプロテアソームの制御機構に関する立体構造的な情報を得ることを目指すと共に、分解活性の機構やその阻害に関しての情報など、生命活動に必須な他の多くの超分子集合体の構造と機能、形成機構解明のヒントを提供することを目標としている。

2. 研究の目的

上記背景で述べたようにサブユニット約100個からなる分子量250万の全粒子の構造研究を目標とし、そのために遺伝子的個体差が大きい哺乳類（牛など）試料ではなく遺伝子改変・操作が容易である酵母の26S粒子を対象として、

(1) 20S 酵素本体両端に結合する19S 調節ユニット（蓋部および基底部）を、本体サブユニットと遺伝子融合し、融合発現させた26S 粒子として、単離・精製・結晶化を行い、低分解能構造解析を進める、また20S 触媒部分の阻害剤複合体解析を進め、その分解機構を考察する。

(2) 26S 本体および蓋部、基底部の精製試料を得て溶液状態での形状解析を行い、上述の低分解能モデリングの位相計算に供する。

3. 研究の方法

(1) サブユニット融合型酵母株の安定な大量培養方法の確立

26S 基底部サブユニットの一部を20S 本体の α サブユニットに遺伝子融合した発現系の酵母株 (YYS272, 274,676 株) および融合個所を変えた YYS1173,1235 株の大量培養条件の検討を行った。アデニン添加量、初期培養条件の検討を行って進めた。YYS1235 株について1回培養約80gの酵母からの粗抽出試料を得て、精製にはアフィニティー精製およびグリセロール密度勾配法を用い26S 粒子を含む精製試料を得た。

(2) 酵母1235株からの融合型26Sプロテアソームの精製・結晶化

最もサブユニットの融合度合いが高く構造的に安定していると予想される1235株を中心に26S粒子の単離を行った。これら試料には3FLAGタグがついているためフラグアフィニティーカラムによる精製を行った。結晶化にはAls oil を利用した溶液揮発方式（タンパク質溶液濃縮型）の静置バッチ方法を用いた。

(3) 20Sプロテアソーム活性阻害剤複合体の結晶化

26S粒子の活性コア部分である20S粒子について上述融合型酵母株より単離・精製・結晶化を行った。臨床に用いられる化合物および合成阻害剤について共結晶化および浸漬

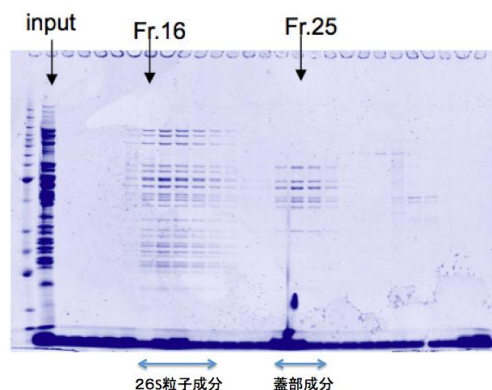
法による阻害剤導入を行い放射光測定用の結晶を得た。

(4) 放射光による回折・散乱実験

上記で得られた26S微結晶および20S複合体結晶を用いて、SPring-8 阪大蛋白研ビームラインで回折実験を行った。また20S本体および26S全体および蓋部、基底部を実験室系X線小角散乱装置を用いて溶液散乱実験を行った。

4. 研究成果

発現酵母株の大量培養に関してアデニン添加量の調製および培養時間、温度などの検討を行って、発現株についてそれぞれ8L培養から80-150g近い酵母収量を得ることができた。一回の結晶化のために約50gずつ凍結し、以下の精製実験に用いた。マルチビーズショッカーによる酵母破碎後、フラグタグによるアフィニティークロマトグラフィーを行って粗精製試料とした。その後Superrose 6によるゲル濾過を行って、26S粒子精製試料として結晶化を行った。下はゲル濾過後のSDS電気泳動の結果である。

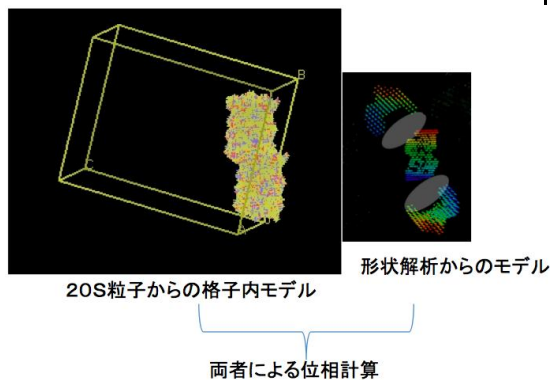


SDS および Native 電気泳動において26S粒子に期待される泳動バンドを示し、これを最終精製試料とした。一回のタンパク精製から得られた結晶化26S試料は約1mgであった。

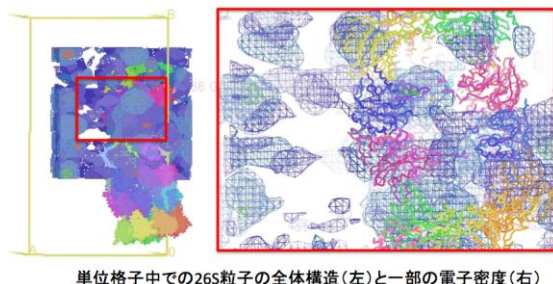
結晶化にはAls oil を用いたオイルバッチ静置法を用いてポリエチレングリコールを沈殿剤として行った。沈殿剤、タンパク濃度および緩衝液のpHなどを変化させ20℃、約2週間で微結晶を得ることができた。

結晶サイズは約0.05mmと非常に小さいため、SPring-8 大阪大学蛋白質研究所超分子ビームラインによって回折実験を行った。分解能は13.5Åと低いものであったが、空間群C2221、格子定数 $a=212$, $b=365$, $c=469$ Åの結晶学的データを得て4220個の独立な反射強度データを得た。この低分解能データには20Sコア部分の構造が含まれているため、20Sコアの座標を元に分子置換法による位相決定を試みた。しかしながら参照データ数が少ないため有為な解は得られなかった。

次に溶液状態での散乱実験から、下(右)に示すような26S全体構造の形状を解析した。これによると、20Sコアの部分を中心において、両端に基底部、蓋部を結合させた全体構造を推察できたが、基底部は構造が全く未知であるため固定形状(回転楕円体)を近似し全体構造・形状とした。



全体粒子の形状因子を上述単位格子中で位置を決定することにより求めた位相によって電子密度図を計算したところ以下のようなになった。



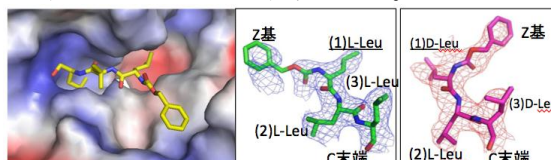
単位格子中での26S粒子の全体構造(左)と一部の電子密度(右)

26S粒子の分子境界などを決定できる可能性は見いだせたが、一方向の電子密度が貧弱であり決定までには至らなかった。これは収集された回折データの中で、ある方向のみのデータが測定できていないためであると考えられる。全方位の回折データを集めるためには複数の結晶を用いた回折データを統合する必要がある。

これに関連して20S阻害剤複合体の共結晶化と回折データ収集を行った。阻害剤にはプロテアソーム阻害剤として市販されているアミノ酸誘導体化合物を用い、これをコントロールとして、その一部をD体アミノ酸に合成したもの、および臨床薬として用いられる薬剤をそれぞれ用いた。複合体構造として比較的分解能が高い(約2.2Å)データからそれぞれの構造を決定した。

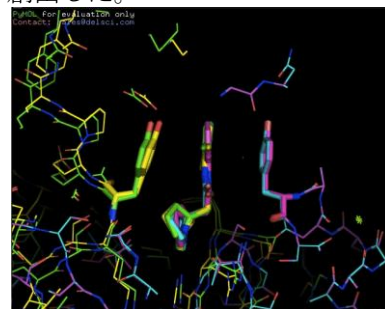
D体阻害剤複合体はその組み合わせにより8種類存在する。それらの構造解析を行い、2、3の複合体においては、粒子内部に結合した新規阻害剤の結合様式、形態を解析できた。以下はその一部である。これによると阻害剤中のD体ロイシン中の周辺アミノ酸へ

の立体障害が見られ、これによって粒子内に存在する6カ所の活性部位の局所的な阻害が行われている事が推察された。



活性部位での阻害剤とLLL,DDL型阻害剤

さらに阻害剤として、臨床で服用される薬剤についての複合体解析を進めた。これはタンパク分解作用の阻害によるプロテアソーム非活性化に伴う抗がん剤としての可能性を創出した。



阻害剤と周辺芳香環アミノ酸の相互作用

複数のサブユニットでの位置を重ね合わせた

複合体解析の結果、薬剤中にある芳香環がサブユニット接触領域に存在する複数の芳香環アミノ酸とスタッキング相互作用をしていることが明らかとなった(論文投稿中)。これについては今後、類似薬剤および活性部位選択による副作用低減効果を目的とした機序作用、構造解析を進める。

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9件)

(1) A.Yamaoka, Y. Ozawa, Y. Ueno, Y. Morimoto, A. Urushiyama, D. Ohmori, T. Imai, *Cyanidioschyzon melorae* ferredoxin: a high resolution crystal structure analysis and its thermal stability. FEBS Letters, 585, 1299-1302 (2011) 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.020.

(2) T. Chatake, T. Ishikawa, Y. Yanagisawa, T. Yamada, I. Tanaka, S. Fujiwara and Y. Morimoto, High-resolution X-ray Study of Effects of Deuteration on Crystal Growth and Crystal Structure of Proteinase K, Acta Cryst., F67, 1334-1338 (2011) 査読有 DOI: 10.1107/S1744309111031903

(3) K. Nishio, K. Ogasahara, Y. Morimoto, T. Tsukihara, S. J. Lee and K. Yutani, Large

conformational changes in the *Escherichia coli* tryptophan synthase $\beta 2$ subunit upon pyridoxal 5'-phosphate binding, FEBS Journal, 277, 2157-2170 (2010) 査読有 doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07631.x.

(4) Y. Yanagisawa, T. Chatake, K. Chiba-Kamoshida, S. Naito, T. Ohsugi, H. Sumi, I. Yasuda and Y. Morimoto, Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiment of nattokinase from *Bacillus subtilis natto*. Acta Cryst.. F66, 1670-1673 (2010) 査読有 doi: 10.1107/S1744309110043137

(5) A. Kovalevsky, T. Chatake, N. Shibayama, S.-Y. Park, T. Ishikawa, M. Mustyakimov, Z. Fisher, P. Langan, Y. Morimoto, Direct Determination of Protonation States of Histidine Residues in a 2Å Neutron Structure of deoxy-Human Normal Adult Hemoglobin and Implications for the Bohr Effect, J.Mol.Biol., 398, 276-291 (2010) 査読有 doi: 10.1016/j.jmb.2010.03.016

(6) A. Kovalevsky, T. Chatake, N. Shibayama, S.-Y. Park, T. Ishikawa, M. Mustyakimov, S. Z. Fisher, P. Langan and Y. Morimoto, Protonation states of histidine and other key residues in deoxy-human normal adult hemoglobin by neutron protein crystallography, Acta.Cryst., D66, 1144-1152 (2010) 査読有 doi: 10.1107/S0907444910025448

(7) T. Chatake, G. Sazaki, T. Kikkou, S. Fujiwara, T. Ishikawa, O. Matsumoto and Y. Morimoto, An approach to DNA crystallization using the thermal reversible process of DNA duplexes, Crystal Growth & Design, 10, 1090-1095 (2010) 査読有 doi: 10.1021/cg9007075

(8) K. Nishio, S.-W. Kim, K. Kawai, T. Mizushima, T. Yamane, J. Hamazaki, S. Murata, K. Tanaka and Y. Morimoto, Crystal structure of the deubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain, BBRC 390, 855-860 (2009) 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.062.

(9) Yukio Morimoto, Structural Insights on the Mammalian Supra-Macromolecular Complex and its Subunit Exchanges (in Japanese) Viva origino 37 66 – 72, (2009) 査読有 <http://www.origin-life.gr.jp/3704/3704066/3704066.pdf>

[学会発表] (計 10 件)

(1) T. Maekawa, K. Nishio, U. Bahrudin, I. Hisatome, Y. Saeki, K. Tanaka, H. Yamaguchi, and Y. Morimoto, Crystal structure of the yeast 20S proteasome in complex with new inhibitor. 20S プロテアソームの機能阻害と X 線結晶構造解析, 日本生物物理学会年会 (2012) <http://www.aeplan.co.jp/bsj2012/program.html>

(2) Y. Morita, T. Matsumoto, A. Yamano and Y. Morimoto, Structural investigation of the yeast 26S proteasome in an aqueous solution by a small-angle X-ray scattering, X 線小角散乱法による酵母 26S プロテアソームの構造研究, 日本生物物理学会年会 (2012) <http://www.aeplan.co.jp/bsj2012/program.html>

(3) Y. Ueno, A. Sando, H. Tokiwa, Y. Morimoto, Y. Kato-Yamada and T. Imai, Thermal stability of a [2Fe-2S] ferredoxin from *Cyanidioschyzon merolae* can be modified by a single amino acid substitution, Extremophiles, 9th international congress (2012) <http://congreso.us.es/extremophiles/>

(4) Y. Morita, K. Nishio, T. Inobe, M. Sugiyama, and Y. Morimoto, A liberal structure of the yeast 26S proteasome by small-angle scattering analysis, Neutrons in Biology and Biotechnology (2011) <http://www.ill.eu/nib2011/>

(5) 西尾 和也、佐伯 泰、田中 啓二、森本 幸生 耐熱性酵母プロテアソームの機能・構造解析に向けた取り組み Towards a structure-function analysis on thermotolerant yeast proteasome、日本蛋白質科学会 (2011) <http://www.aeplan.co.jp/pssj2011/>

(6) T. Maekawa, K. Nishio, U. Bahrudin, I. Hisatome, Y. Saeki, K. Tanaka, H. Yamaguchi, and Y. Morimoto, Structural Insights of the S1 Pocket in the Yeast 20S Proteasome, IUCr2011, Congr. Int. Union of Cryst., Acta.Cryst. A67 C223 (2011) <http://www.iucr2011madrid.es/>

(7) 前川拓摩・西尾和也・Udin Bahrudin・久留一郎・佐伯泰・田中啓二・山口宏・森本幸生、新規プロテアソーム阻害剤の構造学的考察、日本結晶学会 (2011) <http://regulus.sci.hokudai.ac.jp/crsj2011/>

(8) 西尾 和也、金 相佑、河合 健太郎、水島 恒裕、山根 隆、濱崎 純、村田 茂穂、田中 啓二、森本 幸生、脱ユビキチン化酵素 UCH37 触媒ドメインの結晶構造解析、日本蛋白質科学会 (2010) <http://www.aeplan.co.jp/pssj2010/>

(9) M.sugiyama, E.Kurimoto, Y.Morimoto, K.Ito, K.Mori, T.Fukunaga and K.Kato, SANS Investigation of Packing Structure of Proteasome Activator 28 with Deuterated Subunit, SAS2009, Oxford, (2009)
http://iopscience.iop.org/1742-6596/247/1/011001/pdf/1742-6596_247_1_011001.pdf

(10) 杉山正明、森本幸生、森一広、伊藤恵司、福永俊晴、加藤晃一、栗本英治、平井光晴、G.Zacca, プロテアソーム複合体におけるサブユニットキネティクスの研究、日本中性子科学会 (2009) <http://www.jsns.net/jp/>

[その他]

ホームページ等

<http://www.rri.kyoto-u.ac.jp/morimotola bo.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 幸生 (MORIMOTO YUKIO)

京都大学・原子炉実験所・教授

研究者番号：80200450