

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：平成 19 年～平成 20 年
 課題番号：19570103
 研究課題名（和文）
 酵母 26S プロテアソームの低分解能結晶構造解析と分子様態に関する研究
 研究課題名（英文）
 Crystallographic and Molecular Studies on Yeast 26S Proteasome
 研究代表者 森本幸生

研究成果の概要：

本研究課題では（1）26S プロテアソームの精製と結晶化（2）溶液状態での両端因子の会合、解離過程を追跡すること、を目的とした。発現系 3 種の酵母株のうち 676 株からの微結晶を得ることに成功し低分解能（35 Å）ながら回折斑点を得ることができた。これとともに脱ユビキチン化酵素（UCH37）の結晶構造解析を進め、20S 本体を形成している α サブユニットリングの形成過程、などの形態解析を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

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との関係は不明であった。

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、生命活動に

必須な他の多くの超分子集合体の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、かつ基底部サブユニットに結合しユビキチンを脱離させる結合酵素など関連タンパク質も含めた結晶構造解析を行う。

(2) 20S 本体サブユニット自身の20S粒子形成過程および両端調節因子(PA28)が結合する過程を追跡し、溶液中での動態、形状などの解析を行う。

3. 研究の方法

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3種の酵母株 (YY5272, 274,676 株) の26S 結晶化に向けた大量培養条件の検討を行った。これとともに融合箇所を変えた YY51173, 1235 株の培養も行った。

酵母676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676株を中心に26S粒子の単離を行った。これら試料には3 FLAG 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。牛肝臓20Sプロテアソームの結晶化条件を参考に、PEGを沈殿剤としてオイルバッチ静置法による結晶化スクリーニングを行った。この際、封入オイルとしてAls oilを用い時間経過とともに徐々に緩衝溶液を揮発させ、タンパク質濃度を上昇させることで結晶析出を促進させた。同様にYY51173, 1235株からの試料も精製し結晶化を行った。

26Sプロテアソーム結合型ユビキチン脱離酵素の大腸菌での発現・精製・結晶化

26S粒子の活性システムに関連するヒト由来脱ユビキチン化酵素 (UCH37) の全長および、N末端、C末端領域の大腸菌での発現と精製および結晶化を行った。また位相決定

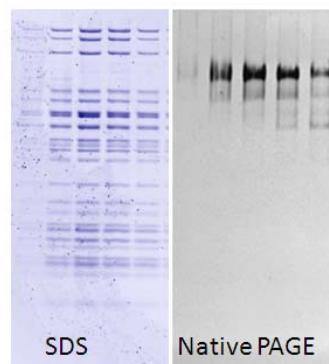
のためのSeMet導入型UCH37の精製、結晶化を行った。

放射光・中性子による回折・散乱実験

上記で得られた26S板状結晶およびUCH37板状結晶を、SPring-8阪大蛋白研ビームラインおよびKEK-PF構造生物ビームラインで回折実験を行った。また20S α サブユニットの会合についてKEK-PF放射光および原研JRR-3M中性子ポートにおいて α 6および α 7サブユニットの単独溶媒での散乱実験、PA28単独での会合解析のための散乱実験を行い、またそれぞれの混合状態での散乱実験を行った。

4. 研究成果

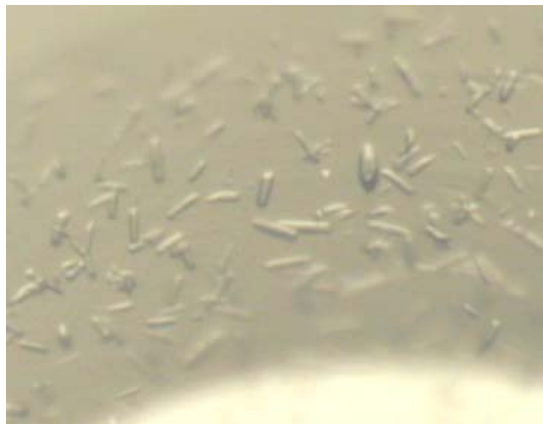
発現酵母株の大量培養に関してアデニン添加量の調製および培養時間、温度などの検討を行って、3種類の発現株についてそれぞれ8L培養から150-200g近い酵母収量を得ることができた。一回の結晶化のために十数gずつ凍結し、以下の精製実験に用いた。酵母破碎後、フラグタグによるアフィニティークロマトグラフィーを行って粗精製試料とした。超遠心分画を行って26S粒子精製試料として結晶化を行った。SDSおよびNative電気泳動において26S粒子に期待される泳動バンドを示し、これを最終精製試料とした。一回のタンパク質精製から得られた結晶化26S試料は約1mgであった。



左は精製時フラクションのSDSおよびNative電気泳動である。同一粒子内に20数個のサブユニットが存在していることがわかる。

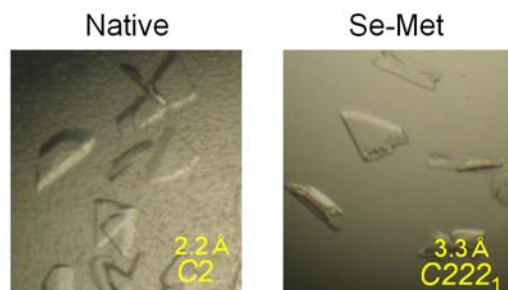
結晶化にはAls oilを用いたオイルバッチ静置法を用いてポリエチレングリコールを沈殿剤として行った。沈殿剤、タンパク濃度および緩衝液のpHなどを変化させ20℃、2週間で以下に示す微結晶を得ることができた。

上記結晶化バッチでは複数の菱形状微結晶が得られたため、SPring-8蛋白研BLにおいて回折実験を行った。通常は観測されない非常に低分解能領域で露出時間2分によって分解能35Å近辺に数個の反射点を得ることに成功した。今後残りの結晶の回折実験を行うと共にさらに良質の結晶を得ることを目標とした。また融合箇所を変えた発現酵



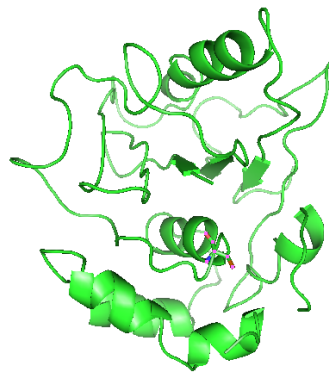
母株 YYS1173,1235 株からの 26S 試料も上記同様の菱形微結晶が得られている。

これに関連して 26S 基底部サブユニットに結合し、ユビキチンの再利用を司るヒト由来酵素 UCH37 の結晶解析を進めた。GST タグを遺伝子配列に組み込んだ試料を大腸菌で発現させ、アフィニティーカラム、タグ切断、イオン交換、ゲルろ過を行って結晶化を行い板状結晶を得ることができた。ただし回折実験からこの板状結晶は、単結晶ではなく複数の板状結晶が張り付いたものであると判断され、結晶系を変えるため種々の結晶化スクリーニングを行った。その結果、数種類の空間群による結晶が得られたが、その中でも空間群 C2221 および C2 の 2 種類の比較的良好な結晶を得ることができた、分解能はそれぞれ 3.3 Å、2.2 Å であった。



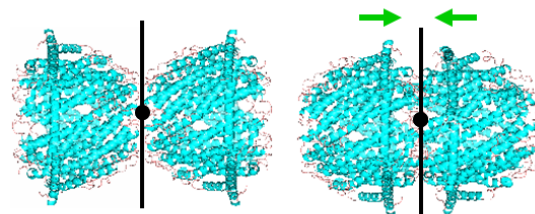
類似構造である同種の UCH 酵素をモデルに分子置換法を適用したが構造決定には至らなかった。従って新たに Se-Met 型タンパク質の構築、発現を行って Se-Met 型 UCH37 結晶を得た。SPRING-8 蛋白研 B L においてセレンの吸収端による多波長異常分散法によってセレン位置を同定し初期位相を決定した。この電子密度を元に本酵素モデルを構築し、異常分散データの分解能 3.2 Å でのモデルを決定した。

初期位相を基にした主鎖モデル構築のあと、比較的分解能が高い C2 空間群でのアミノ酸側鎖決定を行って現在 R 値 39%, FreeR 値 43% である。この構造は 329 残基からなる全領域の N 末端領域(1-228)のみを発現させ決定したものであり、脱ユビキチンを行う活



性部位を有した領域であり、分子内中央ヘリックス先端に存在するユビキチン脱離反応に関与する Cys 位置が明瞭である。今後ヒト由来同種酵素と比較した構造機能解明が期待できる。

20S および 26S 複合体の形成に関して、20S 粒子を形成している $\alpha 6$ および $\alpha 7$ サブユニットを単独で発現、精製し、それぞれが本来 20S 粒子で形成する 7 個からなるリング構造体を形成する過程を放射光、中性子による溶液散乱法によって形態解析を行った。この時重水置換したサブユニットを用いることで、コントラスト変調法によるサブユニットの組み合わせに関して考察を行った。これとともに 20S プロテアソーム両端に結合する 11S 調節因子(PA28)についても同様の形態解析を行った。その結果、PA28 は単独では 7 量体からなるひとつの複合体を形成しているが、溶液中ではこれらがふたつ会合し、dimer of heptamer を形成していることが明らかになった。



さらにこの 7 x 2 量体形成は、本来 20S 粒子に結合する接合面がお互いに接触するように会合 (上図右) していると判断された。細胞内で通常このような会合状態をしている場合、20S 粒子に結合する時には一度解離し、20S 両端で再度結合する必要がある。これらについて今後、3 者複合体形成の混合系を調製し解析を進める。

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 5 件)

- (1) M.Sugiyama, K.Hamada, K.Kato, E.Kurimoto, K.Okamoto, Y.Morimoto, S.Ikeda, S.Naito, M.Furusaka, K.Itoh, K.Mori and T.Fukunaga.
SANS Simulation of Aggregated Protein in Aqueous Solution
Nuclear Inst. And Methods in Physics Research A, , 600, 272-274 (2009) 査読有
- (2) M.Sugiyama, N.Fujii, Y.Morimoto, S.Kurabayashi, M.Vigild, T.Sato, T.Nakazawa, K.Itoh, K.Mori and T.Fukunaga, Structural evolution of human recombinant alphaB-crystallin under UV irradiation.,
Biomacromolecules., 9, 431-434 (2008) 査読有
- (3) T.Ishikawa, T.Chatake, Y.Morimoto, M.Maeda, K.Kurihara, I.Tanaka and N.Niimura.
An Abnormal pKa value of internal histidine of the insulin molecule revealed by neutron crystallographic analysis.
BBRC, 376, 32-35 (2008) 査読有
- (4) A.Y.Kovalevsky, T.Chatake, N.Shibayama, S.-Y. Park, T.Ishikawa, M.Mustyakimov, S.Z.Fisher, P.Langan and Y.Morimoto
Preliminary time-of-flight neutron diffraction study of human deoxyhemoglobin.
Acta.Cryst., F64, 270-273 (2008) 査読有
- (5) K.Nishio, K.Kawai, S.Kim, T.Mizushima, T.Yamane, J.Hamazaki, S.Murata, K.Tanaka and Y.Morimoto
The crystallographic study of the Deubiquitinating Enzyme UCH37 N-terminal Domain.
KURRI Prog.Rep. 2007, P216 (2008) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 森本幸生
哺乳類タンパク複合体に見られるサブユニット交換と立体構造の特徴
第34回生命の起原および進化学会
2009. 3. 18 熊取
- (2) K.Nishio, K.Kawai, S.W.Kim, T. Mizushima, T. Yamane, J. Hamasaki, S. Murata, K. Tanaka and Y. Morimoto
The crystallographic study of the deubiquitinating enzyme UCH37 N-terminal domain 国際結晶学連合会 2008.8.26.

Osaka

- (3) 西尾和也、河合健太郎、金相佑、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 UCH37N 末端ドメインの結晶学的研究
日本蛋白質科学会, 2008. 6. 11 東京,
- (4) M.Sugiyama, Y.Morimoto, K.Itoh, K.Mori, T.Fukunaga, K.Hamada, T.Sato, H.Sahashi, E.Sakata and K.Kato.
SANS study of Proteasome Activator 28 in an aqueous solution.
Neutron in Biology, 2007.7.10. Oxford

[その他]

ホームページなど

<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

(研究協力者)

西尾 和也 (NISHIO KAZUYA)
京都大学・原子炉実験所・特定助教
杉山 正明 (SUGIYAMA MASA AKI)
京都大学・原子炉実験所・准教授