

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657113

研究課題名(和文) 分子シャペロン機能を有するシャトル型プロテアソーム活性化因子の同定と構造機能解析

研究課題名(英文) Identification and structural-functional analysis of shuttle-type proteasome activator exhibiting molecular chaperone activity

研究代表者

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センター・教授

研究者番号：20211849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のプロテアソームは、自発的に形成されるのではなく、アッセンブリーシャペロンの介助を受けて段階的に形成される。一方、古細菌のプロテアソームはサブユニットの自発的集合により形成される。最近、ゲノム解析からプロテアソームアッセンブリーシャペロンの古細菌ホモログとしてPbaBが見出された。しかし、古細菌のプロテアソーム形成におけるアッセンブリーシャペロン様タンパク質の役割は明確ではなかった。本研究を通じて、PbaBはプロテアソーム活性化因子として働くことを突き止めることができた。さらに、PbaBと20Sプロテアソームからなる超分子複合体の作動メカニズムを解明するための糸口を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Assembly of the eukaryotic 20S proteasome is not spontaneous self-organization but an ordered process involving several assembly chaperones, whereas that of the archaeal 20S proteasome involves spontaneous self-assembly. Recent genomic analysis identified archaeal homologs of the assembly chaperones, PbaA and PbaB. However, it remains unclear how such assembly chaperone-like proteins play an indispensable role in assembly of the proteasome subunit in archaea. This study revealed that PbaB actually functions as a proteasome activator. Furthermore, our integrative biochemical and biophysical approach including X-ray crystallography, electron microscopy, NMR spectroscopy, and small-angle neutron scattering provided mechanistic clues to the molecular action of the active complex formed between the PbaB homotetramer and 20S proteasome.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：プロテアソーム 4次構造 活性化因子 シャペロン 古細菌

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは、細胞内でタンパク質分解を司る巨大なプロテアーゼ複合体である。真核細胞において本複合体の活性中心を担う20Sプロテアソームは14種類28個のサブユニットから構成されており、それらはいくつかのアッセムブリーシャペロンの介助を受けて最終的な4次構造を形成していることが明らかとなってきた。また、完成した20Sプロテアソームは、PA28 (7量体) や19S制御因子基底 (6量体) などの活性化因子とさらなる複合体を形成することでその機能が調節されている。これまでに知られているプロテアソーム活性化因子はいずれも環状構造をしており、各サブユニットのC末端に存在する疎水性-チロシン-X 残基 (HbYX) モチーフを介して20Sプロテアソームの α サブユニット7量体と相互作用している。一方、古細菌の20Sプロテアソームは2種類のサブユニットのみからなり、それらは自発的に集合して4次構造形成を完成することが知られている。

本研究で対象とする古細菌の新規プロテアソーム結合タンパク質 PbaB は、ゲノム解析によって、哺乳類のプロテアソームのアッセムブリーシャペロン PAC2 のホモログとして同定されたものである [Kusmierczyk *et al.* (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 622-629]。しかしながら、自発的に4次構造を形成する古細菌プロテアソームは本来アッセムブリーシャペロンの補助を必要としないものと考えられる。それでは、PbaB は古細菌細胞中でいかなる機能を担っているのであろうか？

2. 研究の目的

これまでに、古細菌20Sプロテアソームは自発的に4次構造が形成されることが報告されているが、なぜその古細菌においてアッセムブリーシャペロンと相性の高いタンパク質が存在しているのか興味を持たれる。そこで、本研究ではプロテアソーム系におけるアッセムブリーシャペロン様タンパク質の役割を明らかにするために、古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の PbaB の多角的な構造機能解析を行った。

3. 研究の方法

古細菌 PbaB が、分子シャペロンとしての機能を有するプロテアソーム活性化因子であることを実証し、その作動メカニズムを解明するために、多面的な構造機能解析を展開する。具体的には、X線結晶構造解析、NMR分光法、X線・中性子小角散乱法、電子顕微鏡法を駆使して、PbaBの高次構造およびそのダイナミクス、基質およびプロテアソームとの動的相互作用を徹底解明する。一方、様々

なモデル基質タンパク質を用いて PbaB の変性タンパク質に対するシャペロン活性とプロテアソーム分解促進機能を詳細にキャラクタライズする。

4. 研究成果

(1) PbaB のシャペロン活性とプロテアソーム分解促進機能の解明：

PbaB が ATP 非依存的に9残基からなるモデルペプチド基質および140残基の天然変性タンパク質 α -シヌクレインのプロテアソーム分解を促進することを明らかにした (図1)。また、その活性化促進は20Sプロテアソームとの結合モチーフであるC末端部分を介して担われていることを示した。さらに、PbaB はシャペロン活性 (変性タンパク質の凝集阻害能) を有し、その機能はやはりC末端部分に担われていることを突き止めた。

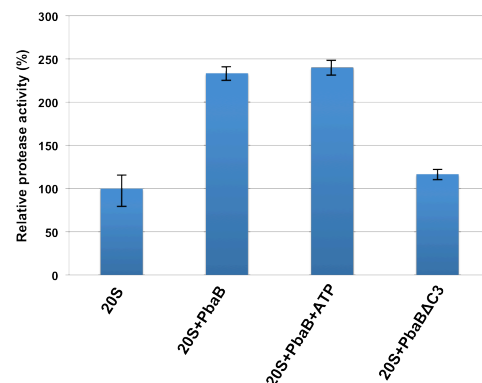


図1: PbaB 存在下および非存在下における20Sプロテアソームによる α -シヌクレインの分解活性 (左から1番目: 20Sプロテアソームのみ、2番目: PbaB 存在下、3番目: PbaB および ATP 存在下、4番目: HbYX モチーフが欠損した PbaB 存在下)

(2) PbaB のシャトル型プロテアソーム活性化機能の実証：

基質タンパク質との結合を契機に PbaB がプロテアソームに高親和性を獲得するの可否を検討した。PbaB との結合が確認された α -シヌクレインをモデル基質タンパク質として、基質存在下および非存在下における PbaB と20Sプロテアソーム (不活性型) とのプルダウンアッセイを行った。その結果、少なくとも α -シヌクレインの PbaB への結合は、PbaB と20Sプロテアソームの相互作用に対して影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(3) プロテアソーム活性化因子 PbaB の作動メカニズムの解明：

X線結晶構造および電子顕微鏡解析により、PbaB はホモ4量体構造を形成しており、触手のように伸びたC末端部分を介して成熟型20Sプロテアソームに結合することを見出し

た(図2)。以上の結果に基づき、一部のC末端を介して20Sプロテアソームの両端に結合したPbaBが、残りのサブユニットのC末端部分で変性タンパク質を捕捉し、プロテアソームへ導くことによりその分解を促進するというモデルを提唱した。

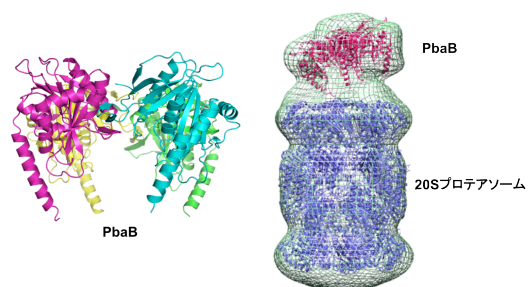


図2: PbaBの結晶構造(左)、PbaB-20Sプロテアソーム複合体の電子顕微鏡画像(右)

(4) PbaBの基質認識機構の解明:

PbaBが基質タンパク質を認識する相互作用様式をNMR分光法および中性子小角散乱法を利用して捉えることを試みた。PbaBのモデル基質として天然変性タンパク質である α -シヌクレインを用いた。中性子小角散乱の解析の結果、 α -シヌクレインはPbaBに捕捉されることにより、慣性半径が単独の状態と比べ有意に小さくなることが明らかになった(図3)。また、 α -シヌクレインは分子の一部に僅かながら α ヘリックス構造を有しているが、PbaBの結合に伴いこの構造が崩れることも見出した。

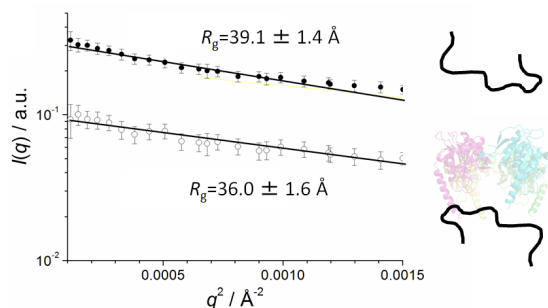


図3: ギニエプロットから導かれた α -シヌクレイン単独およびPbaBとの複合体中の α -シヌクレインのみ慣性半径(R_g)を示す。

●PbaB非存在下、○PbaB存在下

一方、NMR解析により、 α -シヌクレインは主にN末端付近の残基(37-42番目)を介してPbaBと相互作用していることが明らかとなった(図4)。興味深いことに、この α -シヌクレイン上のPbaB結合部位は、分子中でわずかに α ヘリックスを形成している領域と一致していた。このように中性子小角散乱とNMR分光法の連携を通じて、PbaBとの結合に伴う α -シヌクレインの構造変化を捉えるこ

とができた。

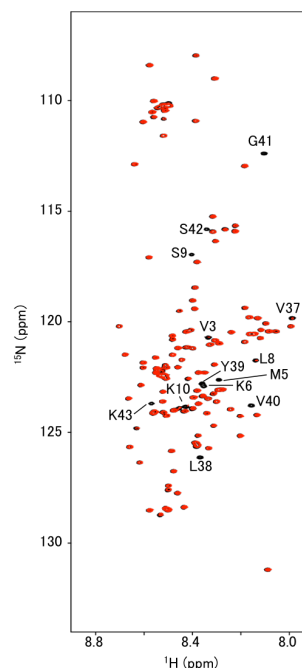


図4: PbaBと α -シヌクレインのNMR相互作用解析。PbaB非存在下(黒)および存在下(赤)における ^{15}N 標識 α -シヌクレインの ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル。

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7件)

1. T. Satoh, Y. Saeki, T. Hiromoto, Y.-H. Wang, Y. Uekusa, H. Yagi, H. Yoshihara, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, K. Tanaka, and K. Kato
Structural basis for proteasome formation controlled by an assembly chaperone Nas2
Structure, in press (2014). 査読有
DOI: 10.1016/j.str.2014.02.014
2. T. Doi, M. Yoshida, K. Ohsawa, K. Shin-ya, M. Takagi, Y. Uekusa, T. Yamaguchi, K. Kato, T. Hirokawa, and T. Natsume
Total synthesis and characterization of thielocin B1 as a protein-protein interaction inhibitor of PAC3 homodimer
Chem. Sci. **5**, 1860-1868 (2014). 査読有
DOI: 10.1039/C3SC53237B
3. M. Sugiyama, H. Yagi, T. Yamaguchi, K. Kumoi, M. Hirai, Y. Oba, N. Sato, L. Porcar, A. Martele, and K. Kato
Conformational characterization of a protein complex involving intrinsically disordered protein by small-angle neutron scattering using

- the inverse contrast matching method: a case study of interaction between α -synuclein and PbaB tetramer as a model chaperone
J. Appl. Cryst. 47, 430–435 (2014). 査読有
DOI:10.1107/S1600576713033475
4. K. Kumoi, T. Satoh, K. Murata, T. Hiromoto, T. Mizushima, Y. Kamiya, M. Noda, S. Uchiyama, H. Yagi, and K. Kato
An archaeal homolog of proteasome assembly factor functions as a proteasome activator
PLoS ONE, 8, e60294 (2013). 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0060294
 5. M. Sugiyama, H. Sahashi, E. Kurimoto, S. Takata, H. Yagi, K. Kanai, E. Sakata, Y. Minami, K. Tanaka, and K. Kato
Spatial arrangement and functional role of α subunits of proteasome activator PA28 in hetero-oligomeric form
Biochem. Biophys. Res. Commun., 432, 141-145 (2013). 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.071.
 6. S. Kim, A. Nishide, Y. Saeki, K. Takagi, K. Tanaka, K. Kato, and T. Mizushima
New crystal structure of the proteasome-dedicated chaperone Rpn14 at 1.6 Å resolution
Acta Cryst. F68, 517-521 (2012). 査読有
DOI: 10.1107/S1744309112011359.
 7. K. Takagi, S. Kim, H. Yukii, M. Ueno, R. Morishita, Y. Endo, K. Kato, K. Tanaka, Y. Saeki, and T. Mizushima
Structural basis for specific recognition of Rpt1, an ATPase subunit of the 26 S proteasome, by the proteasome-dedicated chaperone Hsm3
J. Biol. Chem. 287, 12172-12182 (2012). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M112.345876.
- [学会発表] (計 18 件)
1. 加藤晃一
生命分子の揺らぎと秩序形成
独)日本学術振興会 分子系の複合電子機能第 181 委員会、2014 年 2 月 25 日、国際高等研究所 (京都)
 2. K. Kato
Mechanistic Insights into Dynamic Orchestration of Proteasomes
Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON) 2014、2014 年 1 月 8 日、Khon Kaen (Thailand)
 3. K. Kumoi, T. Satoh, K. Murata, T. Hiromoto, T. Mizushima, Y. Kamiya, M. Noda, S. Uchiyama, M. Sugiyama, H. Yagi, and K. Kato
An archaeal homolog of proteasome assembly chaperone forms a homotetramer and functions as proteasome activator
6th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science : Experiments and Simulation、2013 年 11 月 27 日、岡崎コンファレンスセンター (愛知)
 4. T. Satoh, H. Yagi, Y-H. Wang, Y. Uekusa, T. Hiromoto, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, and K. Kato
Structural basis for proteasome formation mediated by assembly chaperone Nas2
6th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science : Experiments and Simulation、2013 年 11 月 27 日、岡崎コンファレンスセンター (愛知)
 5. Y-H. Wang, T. Satoh, T. Hiromoto, Y. Uekusa, H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, Y. Saeki, K. Tanaka, and K. Kato
Interaction mode of a proteasome assembly chaperone Nas2 with the proteasome Rpt5 subunit
山田研究会・統合バイオサイエンスシンポジウム、2013 年 11 月 20 日 (伊良湖)
 6. T. Satoh, Y. Uekusa, T. Hiromoto, H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, Y. Saeki, K. Tanaka, and K. Kato
Mechanistic insights into the proteasome orchestration by a proteasome assembly chaperone Nas2
7th International Conference on Structural Genomics (ICSG2013-SLS)、2013 年 8 月 1 日 (札幌)
 7. T. Satoh, Y. Uekusa, T. Hiromoto, H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, Y. Saeki, K. Tanaka, and K. Kato
Structural insights into proteasome orchestration mechanism through a proteasome assembly factor Nas2
8th Asian Biophysics Association Symposium (ABA Jeju 2013)、2013 年 5 月 27 日 (Jeju, Korea)
 8. 佐藤匡史、植草義徳、廣本武史、矢木宏和、矢木真穂、水島恒裕、佐伯 泰、田中啓二、加藤晃一
プロテアソームの分子集合における集合因子 Nas2 の機能発現機構
第 77 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2013 年 5 月 25 日 (名古屋)
 9. 加藤晃一
生命分子のダイナミクスと自己組織化
国際高等研究所研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」第 1 回研究会、2013 年 4 月 21 日、国際高等研究所 (京都)
 10. 佐藤匡史、植草義徳、廣本武史、矢木真穂、矢木宏和、水島恒裕、佐伯 泰、田

- 中啓二、加藤晃一
プロテアソーム集合因子 Nas2 を介した
プロテアソームの分子集合機構の構造
基盤
日本薬学会 第 133 回年会、2013 年 3
月 29 日、パシフィコ横浜（神奈川）
11. 加藤晃一
NMR と SANS によるタンパク質の動的
構造解析
中性子連携研究会、2013 年 3 月 13 日、
京都大学東京オフィス（東京）
12. 大川慶祐、矢木宏和、植草義徳、矢木真
穂、水島恒裕、佐藤匡史、佐伯 泰、田
中啓二、加藤晃一
プロテアソームを構成するサブユニッ
トとその集合因子 Umplp の相互作用解
析
日本生物物理学会中部支部講演会、2013
年 2 月 19 日、名古屋大学（愛知）
13. 加藤晃一
生命分子複合体の動態解明への実験的
アプローチ
京都大学原子炉実験所 粒子線基礎物性
研究特別講演会、2013 年 2 月 12 日、京
都大学原子炉実験所（大阪）
14. 加藤晃一
ATP 非依存性シャペロンの構造ダイナ
ミクスと機能発現メカニズム
新学術領域「揺らぎと生体機能」「水と
と ATP」合同公開シンポジウム「ゆら
ぎと水ー生命のエネルギーと分子機構
を探る」、2012 年 9 月 14 日、大阪ガー
デンパレス（大阪）
15. 加藤晃一、杉山正明
重水素化標識を用いたタンパク質複合
体の 4 次構造ダイナミクスの研究
J-PARC プロジェクト課題「生体高分子
の構造ーダイナミクス相関の解析」キッ
クオフ会議、2012 年 7 月 19 日、J-PARC
センター（茨城）
16. 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、名古屋国際会議場（愛知）
17. 雲井健太郎、佐藤匡史、矢木宏和、廣本
武史、水島恒裕、内山 進、野田勝紀、
村田和義、神谷由紀子、加藤晃一
新規プロテアソーム活性化因子 PbaB の
構造と機能
第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年
6 月 20 日、名古屋国際会議場（愛知）
18. 雲井健太郎、佐藤匡史、廣本武史、水島
恒裕、神谷由紀子、野田勝紀、内山 進、
村田和義、矢木宏和、加藤晃一
古細菌タンパク質 PbaB による ATP 非

依存的プロテアソーム活性化機構の構
造基盤

第 76 回日本生化学会 中部支部例会・シ
ンポジウム、2012 年 5 月 26 日、岡崎コ
ンファレンスセンター（愛知）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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
イエンスセンター・教授
研究者番号：20211849

(2) 連携研究者

山口 拓実 (YAMAGUCHI, Takumi)
分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究
領域・助教
研究者番号：60522430

矢木 真穂 (YAGI, Maho)
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
イエンスセンター・特任助教
研究者番号：40608999

佐藤 匡史 (SATO, Tadashi)
名古屋市立大学
・薬学研究科(研究院)・准教授
研究者番号：80532100