

# 巨大で複雑なタンパク分解装置の動態と作動機構

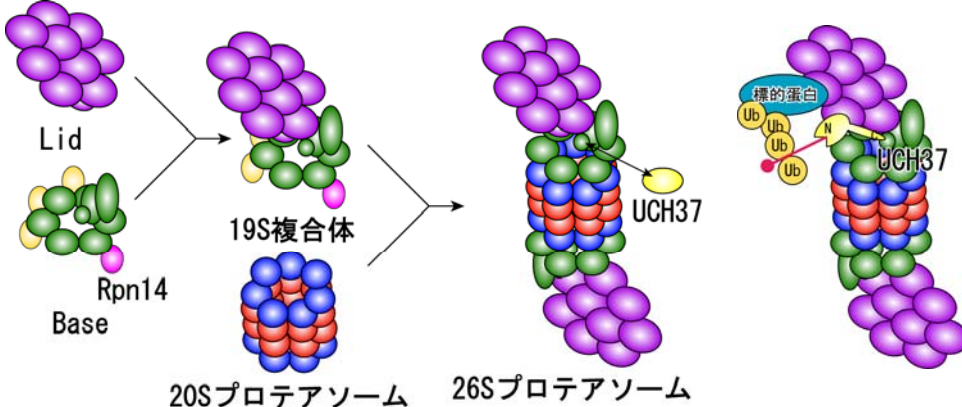
## -26Sプロテアソームの複合体形成機構とプロテアソーム相互作用分子群の構造解析-

水島恒裕<sup>1</sup>、金相佑<sup>1</sup>、西尾和也<sup>2</sup>、佐伯泰<sup>3</sup>、加藤晃一<sup>1,4</sup>、森本幸生<sup>2</sup>、田中啓二<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>名市大・院薬・生命分子、<sup>2</sup>京大・原子炉、<sup>3</sup>臨床研・先端センター、<sup>4</sup>岡崎統合バイオ・生命環境)

### 概要

「巨大で複雑なタンパク分解装置の動態と作動機構」では(1)超分子複合体26Sプロテアソームの立体構造解析、(2)プロテアソームの複合体形成機構解析、(3)プロテアソーム相互作用分子群(Proteasome Interacting Proteins: PIPs)の網羅的同定と分子構造を基盤とした作動機構の解明の3課題を設定して研究に取り組んでいる。これらの課題の中から最新の研究成果である、制御タンパク質19Sの複合体構築機構に関与するシャペロンタンパク質Rpn14の構造解析結果、プロテアソーム相互作用分子群の研究からはプロテアソームに結合することで活性化される脱ユビキチン化酵素UCH37の構造解析から得られている知見に関して紹介する。

### 26Sプロテアソームの複合体形成と相互作用分子群

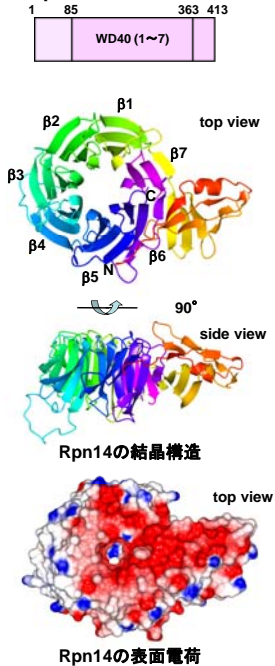


26Sプロテアソームは20Sの触媒ユニットと19Sの調節ユニットから構成された分子量250万、総サブユニット数約100個からなる超分子複合体である。19S複合体は6個のATPase活性を有するサブユニットを中心とした基底部(Base)とnon-ATPaseから成る蓋部(Lid)の2つのサブコンプレックスに区分される複合体を形成しており、基底部の複合体形成においてシャペロンとしての役割が考えられる分子群(Rpn14, Nas6)が報告されている。また、完成した26Sプロテアソームはプロテアソーム相互作用分子群(PIPs)と総称される様々なタンパクの活動の舞台となっており、分子間相互作用のネットワークを介してタンパク分解装置としての秩序立った機能を発揮している。PIPsの一つであるUCH37はプロテアソームサブユニットRpn13と複合体を形成することにより活性化しユビキチン化された標的タンパク質からユビキチンを除去し、分解へと導く役割を果たしている。

### 26Sプロテアソームの複合体形成シャペロンRpn14の構造解析

真核生物では20Sプロテアソームに19S制御タンパク質複合体が結合し26Sプロテアソームとして機能する。この時19S複合体は分解すべきタンパク質として標識されたユビキチン鎖の認識、ユビキチン鎖の除去、タンパク質のアフォールディングなど多くの役割を果たしている。しかし19S複合体の形成機構はこれまでほとんど分かっていない。本研究課題では19S複合体の相互作用分子の解析、19S複合体と相互作用することからシャペロンとしての役割が推定されるRpn14のX線結晶構造解析を行い、Rpn14の立体構造を決定した。

#### s.c. Rpn14



Rpn14はN末端側ドメインと7個のWD40モチーフから形成された $\beta$ プロペラ構造をとる。Rpn14は19S複合体の形成過程において基底部を形成するサブユニットの一つであるRpt6のC末端領域と相互作用することが確認されている。本研究により決定された立体構造からRpn14は分子表面に負電荷を持っていることが明らかになった。19S複合体にはRpt6と共に基底部を形成するRpt3サブユニットが静電相互作用により相互作用分子Nas6と結合することから、Rpn14は $\beta$ プロペラによりRpt6と相互作用し、複合体形成に関与していると考えられる。

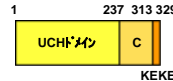
#### 回折データおよび精密化の統計値

	Native I	Se-Met
X-ray source	SPring-8 BL44XU	
Data collection		
Space group	$P6_4$	$P6_4$
Unit-cell parameters		
a (Å)	73.28	78.39
b (Å)	73.28	78.39
c (Å)	102.44	110.06
Wavelength (Å)	0.90000	Peak 0.97914 Remote 0.96417
Distance (mm)	350	500
Exposure time (sec.)	1	1
Resolution range (Å)	34.50-2.00 (2.11-2.00)	67.88-2.70 (2.80-2.70)
No. of total reflections	158070	223156
Completeness (%)	97.0 (95.9)	96.3 (99.6)
Rmerge (%)	7.0 (45.7)	9.2 (38.7)
I/sigma	19.5 (5.3)	23.2 (6.9)
Redundancy	7.5	11.2
Refinement		
Resolution (Å)	63.50-2.00	
No. of working reflections	22015	
No. reserved to evaluate	1487	
R <sub>work</sub> (%) / R <sub>free</sub> (%)	23.5 / 28.7	
Rmsd bond lengths (Å)	0.024	
Rmsd bond angles (°)	2.42	
No. of protein atoms	3262	
B-factors (Å <sup>2</sup> ) of all atoms	32.18	

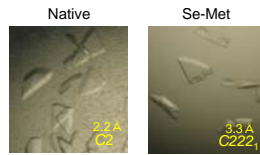
### プロテアソーム相互作用分子UCH37の構造解析

ユビキチン・プロテアソームシステムにおいて、標的タンパク質に付加されたユビキチン鎖は26Sプロテアソームによる分解の指標となる。標的タンパク質が分解された後に残されたユビキチン鎖は、そのままでは他の標的タンパク質認識の邪魔になる事やユビキチンの再利用の為、ユビキチン鎖を個々の分子へとばらす必要がある。脱ユビキチン化酵素であるUCH37は、ユビキチン鎖の端からユビキチンを一分子ずつ遊離させて再利用できるようにする動きを持つ。本酵素のN末端ドメインはユビキチン切断の触媒活性を、またC末端ドメインはKEKEモチーフにより哺乳類プロテアソームのhRpn13を介して26SプロテアソームのRpn2と相互作用する機能を司る。本酵素はプロテアソームと相互作用することで初めてユビキチン鎖の切断活性を発現するという特徴があり、この特別な仕組みを立体構造を元に解明する事を目指している。

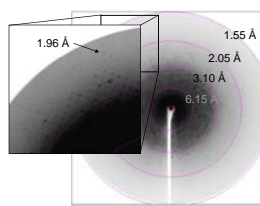
#### H.s. UCH37



#### N末端ドメインの結晶



#### Native結晶の回折パターン



UCH37はN末端ドメインとKEKEモチーフを含むC末端ドメインから成る。全長およびN末端ドメイン、C末端ドメインをそれぞれ大腸菌内で過剰に発現させ、精製を行った。N末端ドメインに関しては単結晶が得られ、X線回折データの収集を行った。さらに、立体構造の計算に必要な位相情報を得る事を旨とし、Se-Met誘導体及びその結晶の作製を行った。現在Se-Met誘導体結晶を用いて、多波長異常分散法による位相決定を試みるとともに、UCH37全長およびC末端ドメインの結晶化条件の検討を行っている。

#### NativeおよびSe-Met結晶の回折データの統計値

	Native	Se-Met
X-ray source	SPring-8 BL44XU	SPring-8 BL41XU
Data collection		
Space group	C2	C222 <sub>1</sub>
Unit-cell parameters		
a (Å)	67.58	63.39
b (Å)	57.06	69.79
c (Å)	48.74	98.12
Wavelength (Å)	0.9	Peak 0.97944 Remote 0.96518
Distance (mm)	300	500
Exposure time (sec.)	10	1
Resolution range (Å)	50.00-3.30 (3.42-3.30)	50.00-4.00 (4.14-4.00)
No. of total reflections	30491	27098
Completeness (%)	91.61	34.65
Rmerge (%)	97.8 (95.9)	99.2 (100.0)
I/sigma	11.0 (40.9)	8.9 (53.2)
Redundancy	3.4 (2.9)	7.8 (6.2)

### まとめ

- 1) 酵母の19S複合体形成のためのシャペロンRpn14の立体構造をX線結晶構造解析により分解能2.0Åで決定した。
- 2) Rpn14はC末端側に $\beta$ プロペラ構造を持ち、表面に酸性の電荷を持つことが明らかになった。
- 3) PIPsの一つである脱ユビキチン化酵素ヒトUCH37の触媒活性ドメイン(UCHドメイン)の結晶化に成功し、分解能2.2Åで回折データを収集した。
- 4) UCH37のSeMet置換体結晶を作製し回折データ収集を行った。