



プロテアソーム形成に関わるタンパク質の X 線結晶構造解析

佐藤匡史¹、加藤晃一^{1,2}

1 名古屋市立大学、大学院薬学研究科、2 岡崎統合バイオサイエンスセンター

1. 背景と研究目的

プロテアソームは生命現象の様々な局面で重要な役割を演じており、創薬標的としても注目されている。最近の研究により、真核生物のプロテアソームの 4 次構造形成は自発的な自己組織化ではなく、サブユニット集合を介助する複数の特異的シャペロン分子が関与する極めて複雑なプロセスであることが明らかにされつつある。本研究は、プロテアソームの構造形成がサブユニット集合を介助する一連のシャペロンの関与のもとで進行するプロセスであることに注目し、そのメカニズムを解明することを目指す。特に、これまで捉えることが困難であったプロテアソームの形成中間体を同定し、それらと一過的に結合するシャペロンとの複合体の 3 次元構造を解明することを目的とする。本実験では、プロテアソーム $\alpha 6$ および $\alpha 7$ サブユニットからなる複合体とプロテアソーム集合シャペロンの一つである PAC4 の立体構造解析を目指した。

2. 実験内容

ヒト由来の $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、PAC4 の調製は大腸菌を用いて行った。 $\alpha 6/\alpha 7$ 複合体および PAC4 の結晶は、ハンギングドロップ蒸気拡散法により作製した。結晶の X 線回折強度データは、BL2S1 ビームライン ($\lambda = 1.1200 \text{ \AA}$) を用いて収集した。

3. 結果および考察

X 線回折実験の結果、 $\alpha 6/\alpha 7$ 複合体では明確な回折像を観測することが出来なかった。一方、PAC4 では最高で $3.00 \text{ \AA}$ の分解能の回折強度データを 11.6%の R_{merge} の精度で収集することができた。結晶は斜方晶系で空間群 $F222$ に属し、格子定数は $a=72.4$, $b=149.8$, $c=207.2 \text{ \AA}$ であった。得られた回折強度データを用いて、ホモログである PAC3 (PDB コード: 2Z5E)、Pba3 (2Z5B)、Pba4 (2Z5B) の結晶構造をそれぞれサーチモデルとした分子置換法により初期位相の決定を試みた。しかしながら、アミノ酸の相同性が約 20%と低いことから、初期位相を決定することが出来なかった。以上の結果から、PAC4 の立体構造決定を行うためには、セレノメチオニン置換体結晶を用いた単波長もしくは多波長異常分散法、重原子同型置換法などを行う必要があることが判った。

本実験では、あいちシンクロトロン光センターBL2S1 ビームラインを用いることによって、プロテアソーム形成に関わるタンパク質の結晶による X 線回折能の迅速なスクリーニングおよびデータ収集を行うことが出来た。PAC4 に関しては得られた結果を基に、結晶化条件の最適化、セレノメチオニン置換体結晶の作製、SPRING-8 および PF でのデータ収集等を行い、最終的に $2.40 \text{ \AA}$ の分解能で立体構造決定を行い、論文発表を行った (参考論文 1)。

4. 参考文献

1. Kurimoto E, Satoh T, Ito Y, Ishihara E, Okamoto K, Yagi-Utsumi M, Tanaka K, Kato K, Crystal structure of human proteasome assembly chaperone PAC4 involved in proteasome formation, *Protein Sci.* 26, 1080-1085 (2017).