STRUCTURAL INSIGHTS ON THE MAMMALIAN SUPRA-MACROMOLECULAR COMPLEX AND ITS SUBUNIT EXCHANGES

Yukio Morimoto
Research Reactor Institute, Kyoto University
Kumatori, Osaka 590-0494, JAPAN
morimoto@rri.kyoto-u.ac.jp
Tel & Fax +81-72-451-2371
(Received December 22, 2009; Accepted January 8, 2010)

(Abstract)
How a mechanism of the subunit exchange in a supra-molecular complex does to be a suitable and reasonable form? It seems like to be existing a simple exchange in a complex. However, there are generally so many restrictions on the tertiary structure of the protein folding, for examples hydrogen bonds, hydrophobic and ionic interactions. A mammalian proteasome has two-types complexes, one is constitutive and other immunologic. The immuno-proteasome has six different subunits than constitutive-proteasome, when living cells are in an immune response. How do exchange occur in the complex particle? How and what characteristics in the tertiary structure of the proteasome are existing. We investigated it that contributions of hydrogen bonds among subunits control and form suitable complex by comparing a bovine liver and yeast proteasome, having immune response and no one, respectively.

Contrary to our expectation, yeast proteasome has much hydrogen bonds even if an incorrect subunit exists, rather than a bovine proteasome. The resultant shows bovine proteasome has strict recognition mechanism for incorrect subunits than yeast ones, which may supply possibilities on exchanges of subunits when the immune response occurs in our living cells.

(Keywords)
X-ray Structure Analysis, Neutron Scattering, Proteasome, Supra-molecular complex

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

森本幸生
京都大学原子炉実験所
590−0494 大阪府熊取町朝代西２丁目
Tel & Fax 072-451-2371

1. はじめに

生命活動の基本であるタンパク質は細胞内外で単独で機能する場合も多く，ほとんどが機能性タンパク質として電子伝達，シグナル伝達，タンパク質分解などの機能を有している．しかしながら，それと同数あるいはそれ以上に他のタンパク質分子，あるいは自己集合による複合体を形成して機能発現する場合も多く，それは当然機能を発揮するための相手方（基質）との相互作用が必要であることを示し，かつより複雑な機能を保有するために自己集合するものである．一般にこれらの会合体は，自己・非自己あるいは高い選択性により相手分子を認識し結合することで形成される．そもそも相手方を認識する相互作用とはいかなる手順で進むのであろうか？　はじめから混合する溶質を選択する in vitro の実験では，良くも悪くもホスト・ゲストを決めて２者混合あるいはそれ以上の混合系を調整するが，生体内，細胞内ではほぼ無限に近い相手方との相互作用は，一番初めは自由拡散・衝突によるものであろう．このときの相互作用は，マクロな静電相互作用，疎水性相互作用が最も大きな作用力として記述できる．問題はそのあとで，ホスト・ゲストとして相互認識を行うためには，近づいてくる力以上にお互いの特徴（表面物性）を認識しなくてはならない．タンパク質のみにこのことを考えてみると，アミノ酸の一次配列から構成されるタンパク質分子が上記のような表面物性を持ちうるのは，アミノ酸の鎖が織りなす分子とその立体構造にほかならない．

タンパク質分子は，その何の意味も見えない無機的なアミノ酸配列が，結果的には３次元の折りたたみを経て非常に合目的に立体構造を形成している．ここでは原子ひとつひとつの存在意味が最も美しく結実している空間となる．従ってアミノ酸の並びは，この合目的な立体構造形成のための必須条件であり，これが塩基配列からアミノ酸配列，立体構造形成までをつないだ Anfinzen のセントラルドグマである．確かに立体構造を眺めて，その機能を考察するとき，そこには納得できるアミノ酸が配置され，周辺アミノ酸との相互作用を持って機能している．アミノ酸の一本の鎖からなるひとつの分子の中では，このようなアミノ酸相互作用あるいは主鎖同士の水素結合網による立体構造形成は，進化の過程でその分子種のみが淘汰されたと考えると（分子進化）ある程度理

© 2009 by SSOEL Japan

解できる．しかし，これを一歩進めて，分子同士の相互作用を考えると，そのアミノ酸配列からの因果関係を考えるのは非常に困難である．おそらく前段で述べたように，個々の分子が出来上がった後に自由拡散・衝突によって接触し相互作用機能を持つもの，のみが淘汰されてきた，と考えるのが自然であろう．接触領域では，分子内の相互作用と同様，原子レベルでの制御が行われている．そうなると，このような接触，会合を与えるのは，主には分子表面にあるアミノ酸の分布による表面物性（静電的，疎水的）によるものであり，かつ間違わずに相手方を認識するために厳密に組みつけられた構造をもっていることが条件となる．タンパク質分子同士の相互作用は，このような解離・会合を正確に繰り返しながら，生理機能を維持・発揮している．

一方，はじめから相互作用を持って複合体を形成して機能を発揮しているものも多い．この場合も先と同じく，厳密なサブユニット分子表面のアミノ酸によって組み合わされる相手方を認識し複合体を形成している．ここで興味深いことに一度形成された複合体が最後までその複合体を維持している場合の他に，動物体内での種々の生体反応に応じて複合体の構成サブユニットを入れ替えて機能するものも見られることである．典型的な例として，哺乳類プロテアソームは免疫応答系で機能する場合，免疫型のサブユニットに置き換わり機能することが知られている．そこでこれらプロテアソーム複合体に見られる立体構造の特徴とサブユニット交換の可能性について考察することによって，高次構造を形成し維持する仕組みついて考えてみたい．

2. ２０Ｓプロテアソーム

真核細胞のプロテアソームは，１４種２８個のサブユニットからなる複合体であり，分子量は約７５万である．その構造は両端調節因子部分を除いて，図１のような外形をしている。
これは７種のサブユニットがリング状に会合し，それらが２段に重なりかつ粒子内対称によってもう２段分会合し，全体で４段に重なった構造をしている．粒子内中心部分は図２のように大きく３か所の中空部分が存在し，活性中心は粒子中心の中空部分である．この複雑な粒子を形成するために２８個のサブユニットが「うまく」会合している．この複合体の生理機能，酵素としての活性機構の詳細は本稿では省き，もっぱら構造形成について述べる．

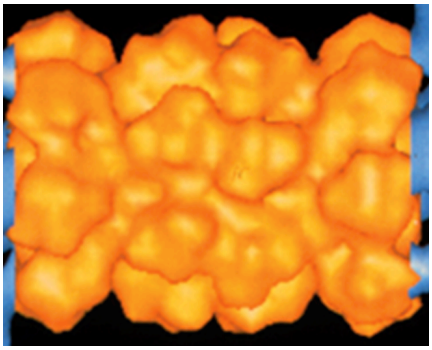

図１　２０Ｓプロテアソーム部分の電子顕微鏡

この「うまく」会合している状態，ということを定量的にあらわす最も精度の高い方法は結晶構造解析による原子レベルでの座標モデルとその解釈である．本研究課題のテーマである蛋白質複合体のサブユニットの交換について考察するとき，架空のモデルの可能性ではなく実際の構造に基づいた考察を行うため，ここでは免疫応答性のある哺乳類のプロテアソームを例にとりその複合体サブユニットの交換の可能性や特徴について考察する．

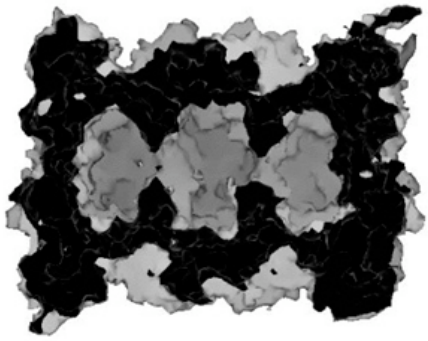

図２　牛肝臓２０Ｓプロテアソーム解析から得られた座標に基づいて表示した分子充填図

3. 牛肝臓２０Ｓプロテアソームの単離，精製，結晶化

成熟牛から摘出した肝臓１Ｋｇを用いて，肝臓破砕，ホモジナイズ，イオン交換，ヘパリンアフィニティー，ゲル濾過クロマトグラフィーなどを用いて単離し，最終的にショ糖密度勾配超遠心分離によって８ｍｇの活性を保持した２０Ｓ粒子を得た．牛脳を用いた場合は約４ｍｇである．結晶化には２メチル２，４ペンタンジオールを沈殿剤として，下に示したような六角板状あるいは菱形板状結晶が得られた(1,2).
Ｘ線回折データは，解析当初はつくば放射光施設（ＰＦ）あるいは欧州放射光施設（ＥＳＲＦ）を用い，後半は播磨大型放射光施設ＳＰｒｉｎｇ－８阪大蛋白質研究所ＢＬを利用した．当時としては非常に大きな結晶格子であり実験室設置のＸ線測定装置ではデータ収集ができず上記のような大型放射光施設の利用が不可欠であった．Ｘ線回折像の一部を図４に示す．

4. ２０Ｓプロテアソームの立体構造

我々が牛肝臓プロテアソームを解析しているほぼ同時期に MaxPlank 生化学研究所の R.Huber らが酵母の２０Ｓプロテアソームの立体構造を発表した(3)．従って当初より研究のモチベーションであったサブユニット交換機構を，免疫性のない酵母蛋白複合体と免疫応答を起こしうる牛の肝臓の蛋白複合体の立体構造を比較することでその考察を進めた．

２０Ｓプロテアソームの立体構造は図５で示したように主鎖のＣα原子のみのトレースで表示しても非常に複雑である(4,5).
この主鎖を２次構造で分類し全体を模式的に記述したものを図６に示す．

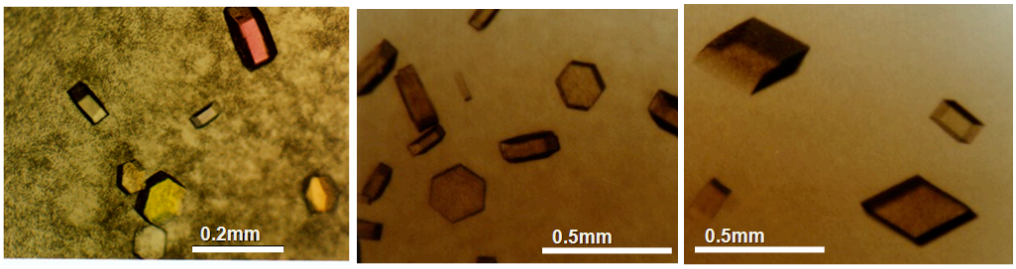

図３　牛肝臓２０Ｓプロテアソーム結晶

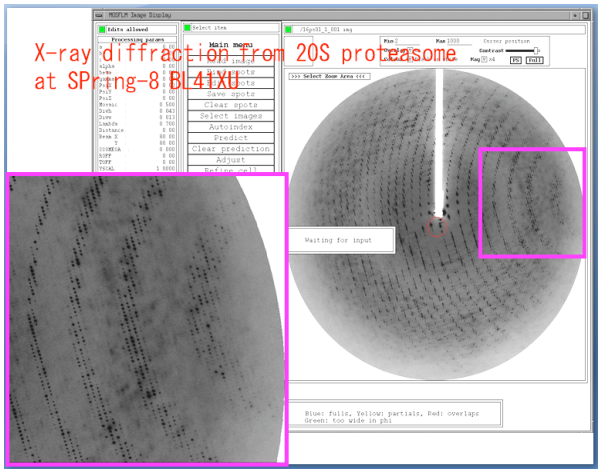

図４　ＳＰｒｉｎｇ－８ビームラインによって得られた回折写真

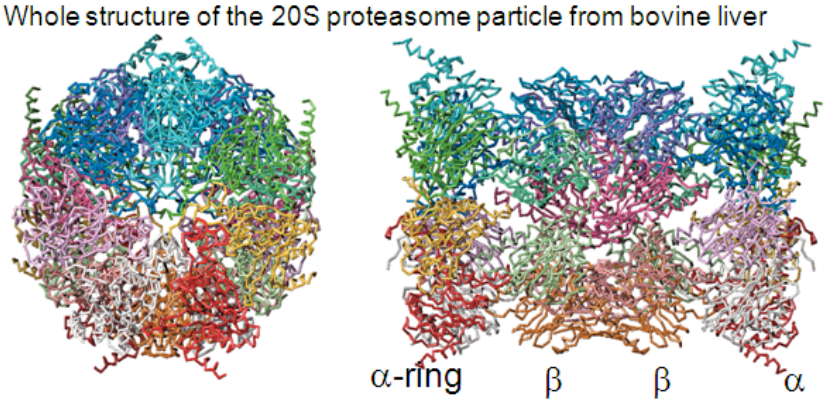

図５　牛肝臓２０Ｓプロテアソームの立体構造（Ｃαトレース図）

サブユニットは大きく分けて２種類あり（α１からα７までの７種，およびβ１からβ７まで７種），α，βサブユニット内の相同性は約４０％，α，β間の相同性は約２０％である．またこのフォールディングの特徴は図６左に示したように，５本のβストランドからなる逆平行βシートが互いに向かい合ったβサンドイッチ構造をとっていることである．その２枚の逆平行βシートをさらに外側から挟みつけるようにして，それぞれ２本と３本のαヘリックスが位置している．興味深い点は，図の左右，つまりサンドイッチ構造の片方はNおよびC末端側ドメインとなり，他方は一次構造の中間部分ドメインとなっていることである．結果としてβシートの構成が両者で異なっている．このようなサブユニットが非常にうまく組み合わさって，プロテアソームという特異的な粒子を形成したといえる．図６右に全体構造の模式図を示した．α，βサブユニットの立体構造がよく似ている結果，図中，左端のαサブユニットがそのまま中央右のβサブユニットに並

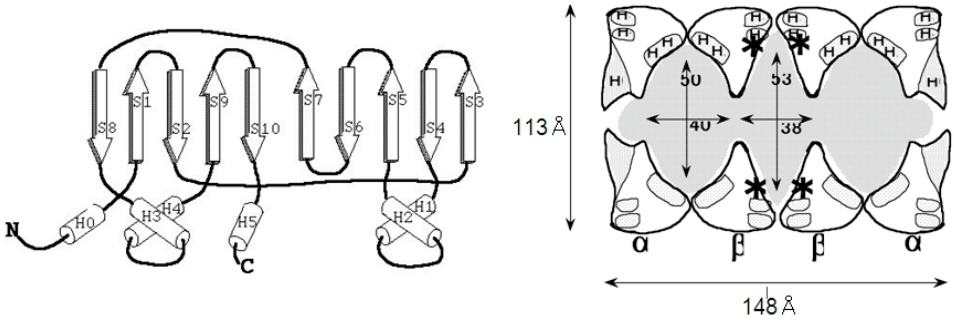

図６　左：トポロジー図：αヘリックスを筒状，βストランドを矢印で示してある．
右：粒子全体を模式的に表示：Hはヘリックス部分，＊は活性中心である．

進した格好になっている．粒子の中央には側面から垂直に局所的な２回回転軸があるため，Ｈ２，Ｓ５間のループが粒子中心に突き出ることにより形成されるゲートが４カ所できることになり，結果としてプロテアソーム粒子内に３つの空洞ができている．αサブユニットに特徴的なＨ０ヘリックスはβサブユニットには存在しないため，中央の空洞は両端の空洞よりも広い空間を持っている．Ｈ０ヘリックスの詳しい機能は明らかになっていないが，Ｎ末端側３５残基を削除したαサブユニットおよびβサブユニットはともに７量体リング構造を形成しないことから，７量体リング構造を維持するものではないかと考えられている．さらに興味深い点は，この構造は古細菌から酵母，牛肝臓ともほぼ同じであることであり，プロテアソームの機能の本質はこの立体構造のフォールディングと組み合わせにあると言える．

5.　２０Ｓ粒子を形成した複合体のサブユニットの立体構造の特徴

原核，真核の種を問わずプロテアソームは，７個のサブユニットがリング構造をとり，それが４段積み重なった粒子構造をとっている．リングが積み重なる，ということはそれを構成している各サブユニットは，隣接サブユニットはもとより上下の他のリングのサブユニットとも相互作用を繰り広げていることになる．ここで牛肝臓と酵母の典型的な例を図７に示す．

これはαリング，βリングの中のサブユニットから突出した構造をもっている部分を示したものである．βリングからの突出部分は粒子全体に２回軸があるため，βリングβリングと２段になるためお互いのリング構造に食い込むようになる．興味深いことは，酵母の構造の方が，リングから他のリングへ食い込むようにペプチド主鎖が伸びていることである．一方牛肝臓ではこの突出した部分が欠損しているか，あるいは弱い相互作用で接触している程度である．このことは牛肝臓の方がサブユニットの離脱・組入れを容易にするものと想像できる．構造から眺めたその特徴をどのように定量的に評価すれば，サブユニット交換メカニズムを具体的に示すことができるのか？

ここでさらに，実際に生体内で起こっているサブユニット交換の可能性について考察する．牛肝臓をはじめヒトに至るまで，免疫応答時あるいはインターフェロンγの投与によって免疫型のプロテアソームが産生される．これは図５（これは構成型プロテアソームと名付けられている）で言うところのβ１，β２，β５サブユニットであり，模式的に描くと図８のようになって，ちょうど２０Ｓ粒子の中ほどのサブユニットが置換されることになる．

ここでその交換機構を考えてみると，最も考えやすいことは一度構成型が産生され免疫型サブユニットが産生されると，それらが置き換わるということである．ダルマ落としのごとく玉突き状に置き換わる可能性があるのかどうか，を検証するために酵母と牛肝臓の該当サブユニットの特徴

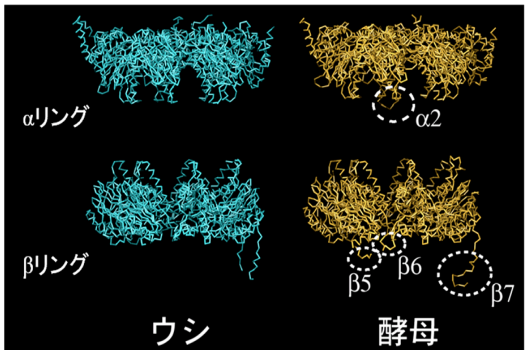

図７　牛肝臓と酵母のαおよびβリングを横から見た図．点線で囲われた部位は，他のリング会合体へ食い込むように突出している(5).

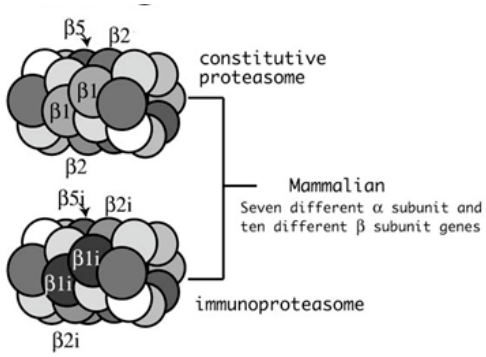

図８　構成型および免疫型プロテアソームの置換されるサブユニット位置．
各サブユニットを球で示した．

表１　各サブユニットの水素結合数

Number of Hydrogen bonds among respective subunits

Bovine liver						Yeast				
	α7	α1	β7	β2	Total	α7	α1	β7	β2	Total
β1	4	2	11	11	28	4	3	5	11	23
β1*	2	4	5	0	11	3	1	4	10	18
β1i	4	2	8	6(β2i)	20					

	α1	α2	β1	β3	Total	α1	α2	β1	β3	Total
β2	6	5	11	22	44	10	9	11	24	54
β2*	0	3	3	3	9	1	7	8	9	25
β2i	6	6	6 (β1i)	24	42					

	α4	α5	β4	β6	Total	α4	α5	β4	β6	Total
β5	10	11	4	11	36	4	6	9	13	32
β5*	5	1	4	6	16	2	6	10	15	33
β5i	10	7	7	7	31					

β* : incorrect subunit
βi : immuno subunit

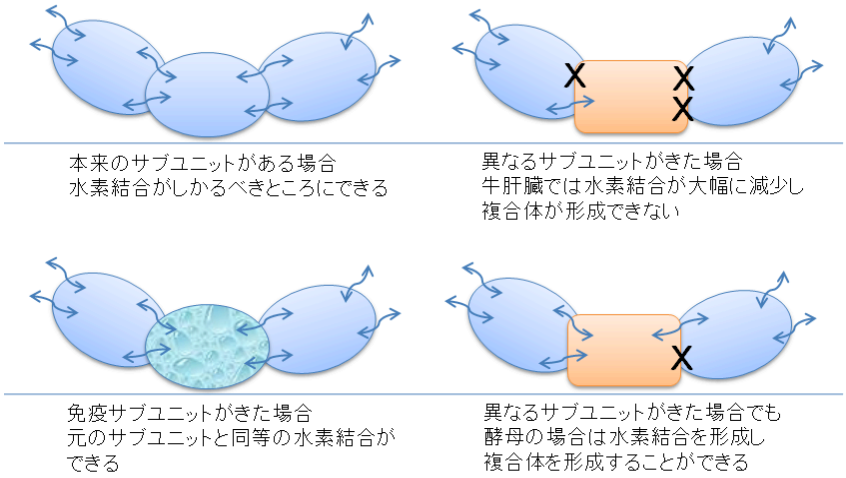

図 10

を調べた．また複合体を形成するには，一度に全部のサブユニット（２８個）が一斉に組みつけられるとは考え難いため順次組みつけられるものと仮定した．そこで組みつけられる「度合」を見積もるためその指標をサブユニット間の水素結合の位置と数に求めた．

表１では牛肝臓の免疫型および構成型と酵母プロテアソームの，β１，β２，β５サブユニットについて，複合体形成時に接触する相手方サブユニット（表の横軸）との間にできる水素結合の数を示している．この表で incorrect subunit と表記してあるのは，本来のサブユニットではなく，間違った（リング構造を１サブユニット分回転させた）サブユニットを複合体中にあてはめた場合にできる水素結合の数を示している．例えば表の上段ではβ１サブユニットについて，その正常に接触するα７，α１，β７，β２サブユニットに対する水素結合数を牛肝臓，酵母のプロテアソームについて示してある．またこのβ１が間違ったサブユニットβ１＊に置き換えた場合のそれぞれ対応する数，さらに免疫型β１ｉサブユニットに置き換わった場合の数を示している．これを他の免疫型２種のサブユニットβ２ｉ，β５ｉについて示したものである．牛肝臓と酵母を比較すると，元々あるサブユニット同士では水素結合数に大きな違いはない（黄色部分）．しかしながら間違ったサブユニットにした場合，牛肝臓の場合の方が適応できる水素結合の数が大きく減少するが，酵母の場合はその減少数はそれほど多くない（ピンク部分）．一方牛肝臓の場合に考えられる免疫型サブユニットに置き換えた場合は，間違ったサブユニットの場合に比べて，元の（正常な）サブユニットと同等の水素結合を有する（薄黄色部分）．このことは何を意味するのであろうか？

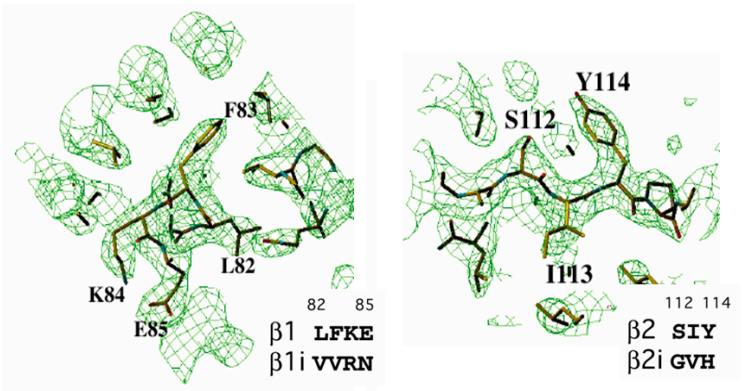

図１１　免疫型に相当する構成型のサブユニット電子密度：免疫型に置き換わった場合でも電子密度の中に収まるように置換が可能である.

牛肝臓の場合は, 間違ったサブユニットが来ると水素結合網が大幅に減少し複合体を維持しにくくなるが, 酵母の場合は間違ったサブユニットがきても複合体を形成しうる可能性が高くなることを示し, また牛肝臓で免疫型に置き換わってもサブユニットが間違っているほどの差は生じない, ということを示している. 言い換えると免疫型のサブユニットは複合体形成を邪魔しないアミノ酸置換にとどまっている, ということである. 実際図１１に示したように置換されたアミノ酸でも, その電子密度の嵩高さは同じような大きさを持ち, 大きく構造変化を誘導するような置換は行われていない.

図１１は構成型と免疫型のβ１およびβ２サブユニットの, それぞれ置換される部位を示している. これをみるとアミノ酸が置換されても大きく構造変化を促したり, 隣のサブユニットとぶつかったりするようなことはないように見える. 免疫型サブユニットに置き換わった際のプロテアソームの活性機構は維持し, しかもその特徴的な分解活性（内在性抗原の選択的切り出し）を発揮するような部位のアミノ酸置換が起こっていると言える.

以上見てきたように, 複合体を構成するサブユニットの水素結合の場所, 数を検討することにより, その交換, 置換に対してその可能性などを検討することができる. この水素結合網をサブユニットごとに詳細に検討することにより, 複合体が形成されサブユニットが組みつけられていく順序も考察することも可能であるかもしれない. 図１２には, 最初ばらばらのサブユニットが, どのようにして２重リングを形成し始めて, そこから全粒子を形成するのかを, 上述した水素結合の解析から模式的に考察したものである.

6. サブユニットの組み込み・交換をどのように検証するか

結晶構造解析は今まで見てきたような原子レベルでの水素結合様式などを明らかにできる唯一の強力な方法であるが, 図１２のような動的な, 変化しつつある状態を解析することは不可能である. はじめから構成サブユニットを単独で用意し, 溶液中で順次継ぎ足していってリング構造形成, その後の複合体形成を追跡できれば上述のサブユニット交換過程も追跡できるであろう. この時に有力な方法のひとつに溶液散乱実験がある. これは溶質の散乱因子と溶液の散乱因子の差を利用して, その散乱強度から溶質（粒子）の大きさ, 形状を解析できる手法である. この散乱原理, 実験の詳細は他所にゆずり, ここではその差を軽水・重水の散乱長にもとめ, 中性子を利用した散乱実験とその解析を紹介する.

図１３には, この手法を用いてプロテアソーム調節因子（上述の２０Ｓプロテアソームの両端に結合する分子量２０万程度の複合体であり, α, βサブユニット会合により６量体ｘ２の複合体を

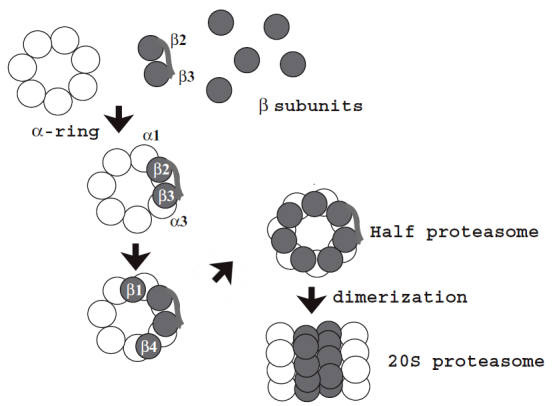

図１２　プロテアソームサブユニットが複合体を形成する過程の予想図

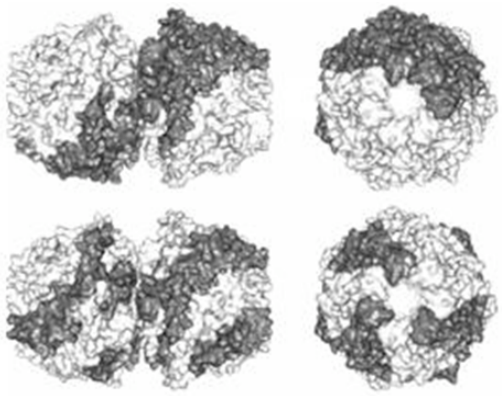

図１３　プロテアソーム活性化因子複合体のサブユニット分布図

形成している）の粒子内サブユニット解析について示した. 粒子内でαあるいはβサブユニットが, 粒子のどちら側にどのくらいの数, またそれがどのように点在するのか, について解析したものである.

得られたモデルと調節因子としての生理機能について現在検討を行っている．これとは別に, 調節因子単独では６量体ｘ２の構造している複合体が２０Ｓプロテアソームが混在すると解離し，その両端に再結合する様子を解析している. この方法により各サブユニットが組みつけられる仕組みを解析できると期待している.

7. おわりに

以上, 複数のサブユニットからなる複合体の構造研究において, その結合状態を水素結合の場所, 数によって交換反応の可能性あるいはその意味などを考察した. これは化学量論的に規程された複合体形成の機構解明につながるのみならず, 定量的ではない会合体，凝集体の形成についても, その機能性を考察する上で有効な方法である. 免疫反応に応答する哺乳類複合体では, 下等動物に比べより厳密に相互作用, 水素結合網が非常に多く選択性が高い機構が存在するように思えるがそれほどの厳密さはなく, ある程度置き換わる余地「余裕」を立体構造が持っているのかもしれない. またこれとともに実際の複合体を形成する過程を追跡する手法として, 溶液散乱についてのべ結晶構造解析とともに全体形状解析, あるいは構成サブユニットの局在解析についても紹介し複合体形成解明に有効な手段であることを示した. このような手法を駆使して複合体の高次構造形成機構を明らかにしたい．なお本研究の一部は, プロテアソーム結晶解析について現在茨城大フロンティア応用原子科学研究センターの海野昌喜博士，粒子本体，調節因子溶液散乱解析は京都大学原子炉実験所杉山正明博士らとともに行ったものでありここで感謝したい.

参考文献

1. Morimoto,Y., Mizushima, T., Yagi, A., Tanahashi, N., Tanaka, K., Ichihara, A. and Tsukihara, T. Ordered structure of the crystallized bovine 20S proteasome, J. Biochem. 117, 471-474 (1995).
2. Tomisugi, Y., Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tanahashi, N., Tanaka, K., Tsukihara, T. and Yasuoka, N. New crystal forms and low resolution structure analysis of 20S proteasomes from bovine liver, J. Biochem. 127, 941-943 (2000).
3. Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution, Nature 386, 463–471 (1997).
4. Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N. and Tsukihara, T. Structure determination of the constitutive 20S proteasome from bovine liver at 2.75Å resolution, J. Biochem. 131, 171-173 (2002).
5. Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N. and Tsukihara, T. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75Å resolution, Structure 10, 609-618 (2002),
6. Sugiyama, M., Kurimoto, E., Morimoto, Y., Sahashi, H., Sakata, E., Hamada, K., Itoh, K., Mori, K., Fukunaga, T., Minami, Y. and Kato. K. Assembly state of proteasome activator 28 in an aqueous solution as studied by small-angle neutron scattering, J. Phys. Soc. Jpn 78, 124802-1 – 124802-6, (2009).