

新明 洋平

(熊本大学大学院生命科学研究部神経分化学分野)

draxin functions in neural circuit formation

Yohei Shinmyo (Department of Developmental Neurobiology, Faculty of Life Science, Kumamoto University, Honjo 1-1-1, Kumamoto 860-8556, Japan)

プロテアソーム複合体形成シャペロンの構造と作用機構

1. はじめに

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を特異的に分解することにより、タンパク質の寿命を制御し、細

胞周期をはじめとするさまざまな生命現象の調節を行っている。プロテアソームはプロテアーゼ活性を有する20Sプロテアソームに19S制御因子複合体が会合し、26Sプロテアソームとしてユビキチン化修飾されたタンパク質を分解する。26Sプロテアソームは33種類、66個のサブユニットから構成される分子量250万の巨大な複合体である。そして、20Sプロテアソームはそれぞれ異なる7種類の $\alpha$ と $\beta$ サブユニットが $\alpha 1 \sim \alpha 7$ と $\beta 1 \sim \beta 7$ の $\alpha$ と $\beta$ リングを形成し、 $\alpha\beta\alpha$ の順に積み重なった中空樽状の構造をとる。19S制御因子複合体は生化学的にbase(基底部)とlid(蓋部)に区分されるサブ複合体とサブユニットRpn10から形成されており、baseは6種類のATPase活性を有するサブユニット(Rpt1~Rpt6)とRpn1, 2, 13, lidはRpn3, 5~9, 11, 12, 15からなる<sup>1)</sup>(図1)。26Sプロテアソームはこれら66個のサブユニットが厳密に配置することにより選択的分解活性を有する複合体を形成する。本稿では

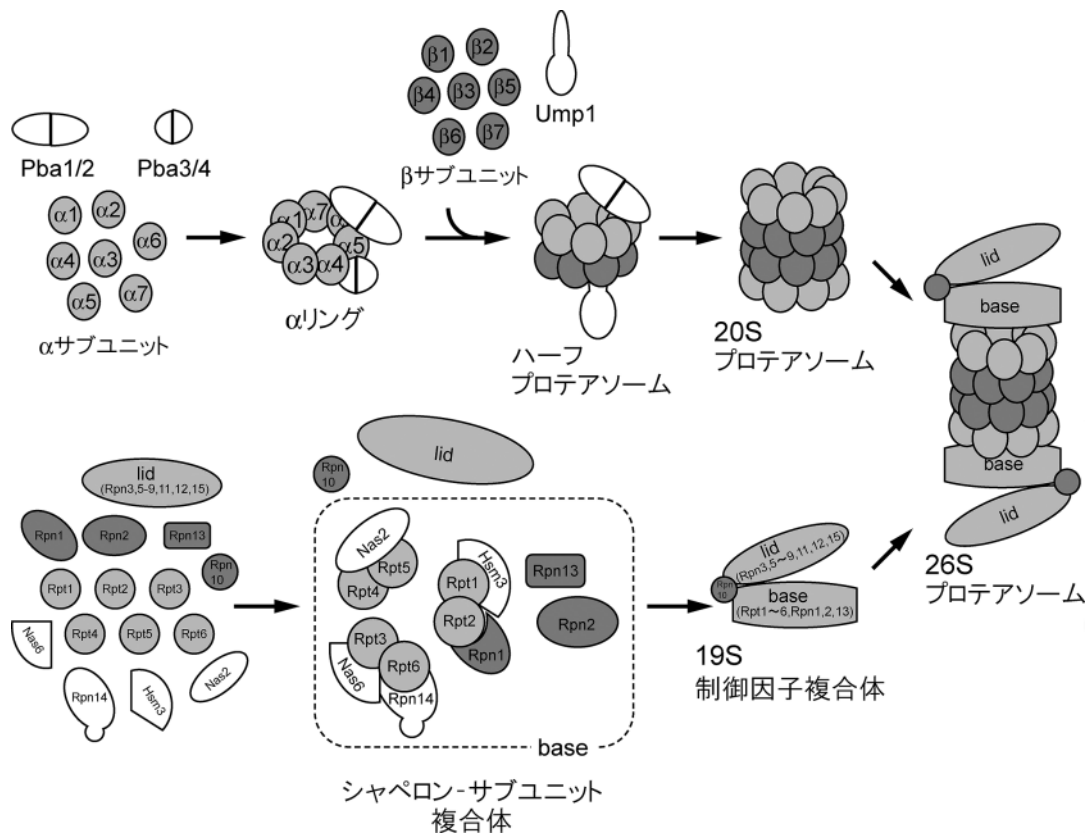


図1 プロテアソーム複合体と分子集合経路

(上段) 酵母20Sプロテアソームはそれぞれ異なる7種類の $\alpha$ と $\beta$ サブユニットから構成される。複合体形成にはUmp1, Pba1-Pba2, Pba3-Pba4の3組の専用シャペロンを必要とする。

(下段) 酵母19S制御因子複合体は二つのサブ複合体(base, lid)からなり、base複合体の形成にはNas6, Nas2, Hsm3, Rpn14の4組の専用シャペロンを必要とする。

26S プロテアソームの複合体形成に関わる専用シャペロンの構造及び機能解析, そしてその作用機構について我々の研究成果を中心に紹介する.

## 2. プロテアソーム複合体形成シャペロン

それぞれ1種類の $\alpha$ と $\beta$ サブユニットからなる古細菌20S プロテアソームは自発的に形成される. 真核生物のプロテアソーム複合体も自発的に分子集合して形成されると考えられてきた<sup>2)</sup>. しかし, その後の研究から真核生物の20S プロテアソームの複合体形成には専用のシャペロンや $\beta$ サブユニットのプロペプチドが必須であることが明らかとされた. 酵母20S プロテアソームの複合体形成は Ump1, Pba1-Pba2, Pba3-Pba4 の3組のシャペロンを必要とすることが報告されている. そして, Pba1-Pba2, Pba3-Pba4 は $\alpha$ リング形成, Ump1 は $\alpha$ リング形成後の経路に関わることが示された<sup>3)</sup>(図1). また近年, 酵母19S 制御因子複合体の形成に関わる専用シャペロンとして Nas6, Nas2, Hsm3, Rpn14 の4分子が見いだされ, これらはすべて19S 制御因子複合体の base 形成に関与していることが報告された<sup>4-7)</sup>. 19S 制御因子複合体はこれらのシャペロンを含む Rpt3-Rpt6-Nas6-Rpn14, Rpt4-Rpt5-Nas2, Rpt1-Rpt2-Rpn1-Hsm3 の3種類のサブ複合体を形成した後 base 複合体を形成し, lid と結合することで19S 制御因子複合体となる(図1).

### 3. 20S プロテアソーム複合体形成シャペロンの構造

20S プロテアソームの複合体形成は, 専用のシャペロンやプロペプチドを必要とする. その過程においてシャペロンはどのような作用メカニズムにより複合体形成に関与しているか, またシャペロンを必要とする理由を理解することを目的として, シャペロンの構造と機能の解析が行われている.

20S プロテアソームシャペロンの構造に関してこれまでに酵母 Pba1-Pba2 及び Pba3-Pba4 複合体と酵母 Pba3 に相当するヒト PAC3 の結晶構造が決定されている<sup>8,9)</sup>. Pba1-Pba2 複合体は20S プロテアソームに結合した状態で構造が報告されている(図2A). Pba1-Pba2 は, 互いに類似した立体構造をとりヘテロ二量体を形成することで, 20S プロテアソームの $\alpha$ サブユニットに19S 制御因子結合側から結合していた. その結合部位は $\alpha$ リングの $\alpha 5$ と $\alpha 6$ の位置であり,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$ との接触も見られた. そして, Pba1-Pba2 の役割として(1)相互作用による $\alpha$ サブユニットの配置, (2)不適切な $\alpha$ リング二量体形成の阻害, (3) $\alpha$

サブユニットのN末端領域からなる $\alpha$ リングのゲート形成の補助, (4)不完全状態での制御因子結合の阻害, 以上四つの可能性が示唆された.

Pba3-Pba4 複合体はシャペロン単独状態及び複合体形成中間体である $\alpha 5$ サブユニットを含んだ Pba3-Pba4- $\alpha 5$ として構造を決定した(図2B). Pba3-Pba4 複合体はそれぞれの分子で $\alpha 5$ サブユニットを特異的に認識しており, 3者複合体構造と20S プロテアソームの立体構造をもとに作製した Pba3-Pba4- $\alpha$ リングモデルより Pba3-Pba4 複合体は $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ サブユニットの配置を規定し,  $\alpha$ リング形成における起点を形成する役割を果たしている可能性を示した(図1, 2A, 2C).

### 4. 19S 制御因子複合体形成シャペロンの構造

19S 制御因子複合体形成シャペロンの立体構造は機能が未知の段階で Nas6 と Rpt3 サブユニットのC末端ドメインの複合体の構造<sup>10)</sup>が報告されていた. その後, 複合体形成機構の解明を目指し Rpn14 及び Hsm3 のX線結晶構造解析を行い, その立体構造の決定に成功した<sup>11-13)</sup>.

Rpn14 は配列中に WD40 リピートを持つ分子量 46,000 のタンパク質であり, プロテアソームの Rpt6 サブユニットのC末端ドメイン(Rpt6-C)と相互作用する. Rpn14 の結晶構造は WD40 リピート配列により形成された, 7枚の羽からなる $\beta$ プロペラ構造と約80残基からなるN末端ドメインから形成されていた(図3A).  $\beta$ プロペラ構造はタンパク質間相互作用に関わることが示されており,  $\beta$ プロペラの中央部分で結合タンパク質と相互作用することから, Rpn14 も同様に $\beta$ プロペラ領域で Rpt1 と結合することが予想された. さらに, Rpn14 及び Rpt6-C モデルの分子表面電荷の解析より, Rpn14 は $\beta$ プロペラ領域に特徴的な酸性電荷の領域を有しており, 塩基性の電荷を持つ Rpt6-C と相補的に結合することが示唆された(図3A). また, この相互作用は Rpn14 と Rpt6-C の予想された結合部位変異体による相互作用と遺伝学的な解析より確かめられ, Rpn14 と Rpt6 は電荷的な相補性により特異的に結合していることが示された.

Hsm3 は HEAT リピート配列を含む分子量 56,000 のタンパク質であり, プロテアソームの Rpt1 サブユニットのC末端ドメイン(Rpt1-C)と相互作用する. 我々は Hsm3 単独(図3B)と Hsm3 と Rpt1-C 複合体の結晶構造解析に成功した(図3C). Hsm3 は23本の $\alpha$ ヘリックスからなる11個のHEATリピートがC字形に連なった全体構造を形成し, Hsm3 を形成する個々のHEATリピートは一般的

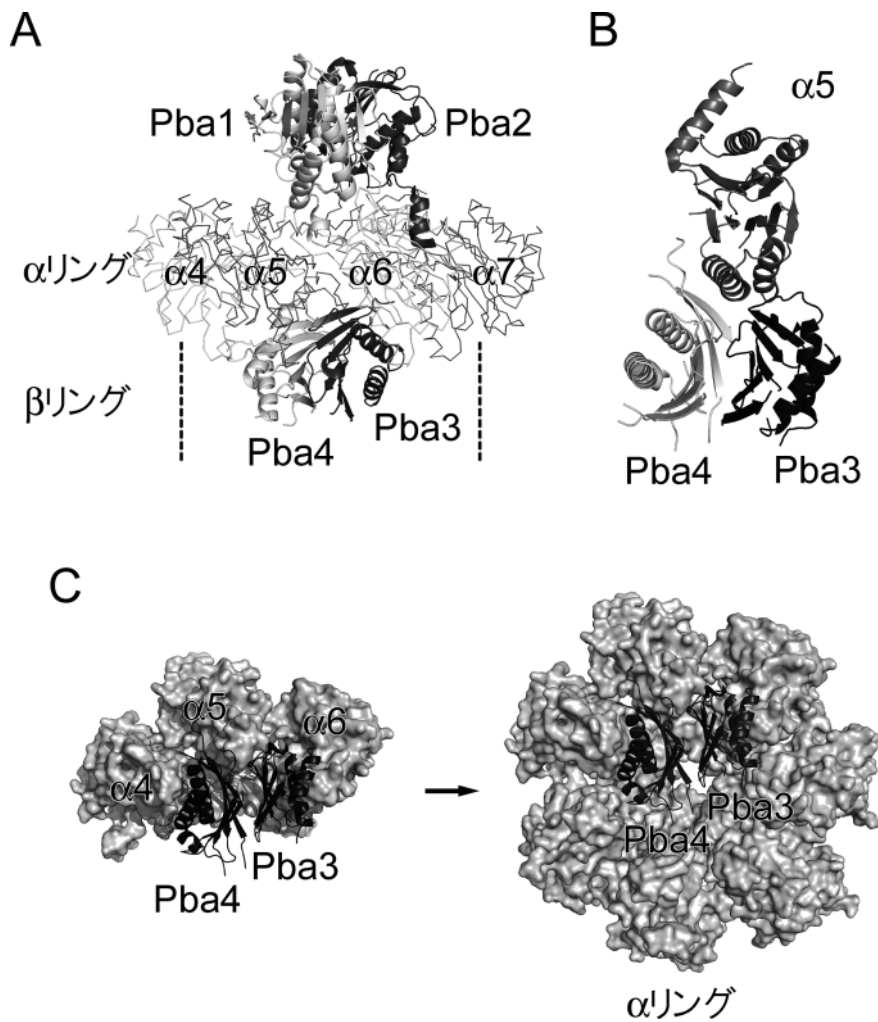


図2 20Sプロテアソーム形成シャペロンの構造

(A) Pba1-Pba2, Pba3-Pba4と $\alpha$ リングの複合体モデル構造. Pba1-Pba2は20Sプロテアソームの制御因子複合体側から, Pba3-Pba4は $\beta$ リング側から結合する.

(B) Pba3-Pba4と $\alpha 5$ サブユニット複合体結晶構造. Pba3とPba4は複合体の界面で $\alpha 5$ と結合する.

(C) Pba3-Pba4による $\alpha$ リング形成機構. Pba3-Pba4は $\alpha 5$ サブユニットと共に $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ と相互作用することにより, 正しいサブユニットの配置を規定する.

な立体構造であるが, これまでに立体構造の報告されたタンパク質中に全体構造の類似するものは見つからなかった.

Hsm3-Rpt1-Cの解析ではHsm3-Rpt1-C結晶の分解能が $3.8\text{\AA}$ と低かったことからセレンメチオン誘導体結晶を作製し, セレンの異常散乱効果を利用することで, 正確なモデル構築を行うメチオンマーキング法を利用し, 立体構造を決定した. Hsm3-Rpt1-CはC字形のHsm3の中央部分にRpt1-Cが結合し複合体を形成していた. また, Rpt1-

Cと結合したHsm3の全体構造は単独状態のものとよく似ていたが, 複合体を形成することによりC字形の中央の空間が小さくなる構造変化(穴の直径が $43\text{\AA}$ から $38\text{\AA}$ に変化)が観測された. 一方, Rpt1-Cの構造は, これまでに立体構造の報告されたRpt3サブユニットのC末端ドメイン(Rpt3-C)やRptサブユニットと同じ $\text{AAA}^+$ -ATPaseファミリーに属するPANやHsiIUのC末端ドメインとよく似た全体構造をとっていた. Hsm3とRpt1-Cの結合にはHsm3のGlu157, Thr190, Asp230, Leu232とRpt1-Cの

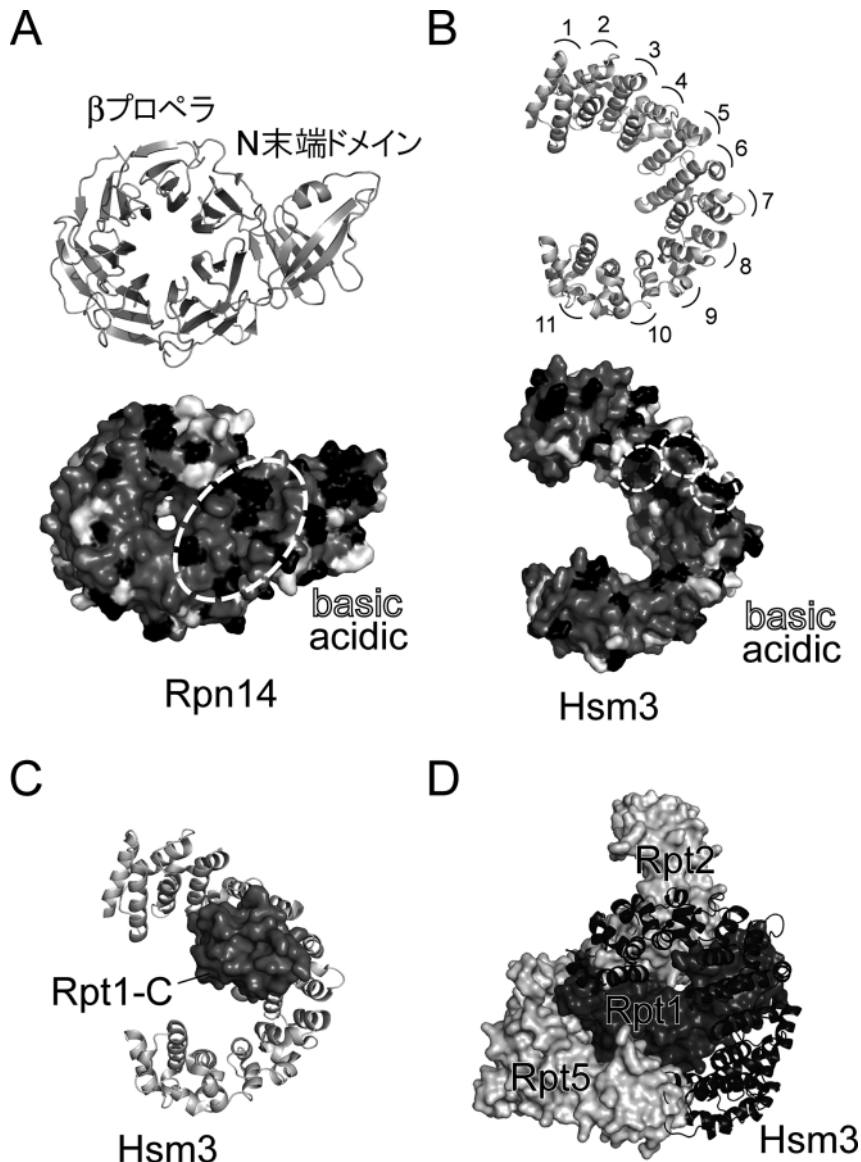


図3 19S 制御因子複合体形成シャペロンの構造

(A) Rpn14 結晶構造. リボンモデル (上) と表面電荷分布 (下) (黒: acidic, 白: basic). Rpn14 は  $\beta$  プロペラ構造と N 末端ドメインからなり,  $\beta$  プロペラ領域には特徴的な酸性電荷領域 (点線で囲んだ部分) を有する. この領域は Rpt6 の C 末端ドメインの塩基性の領域と特異的に結合すると考えられる.

(B) Hsm3 結晶構造. リボンモデル (上) と表面電荷分布 (下) (黒: acidic, 白: basic). Hsm3 は 11 組の HEAT リピードからなる. 点線で囲んだ酸性電荷領域で Rpt1-C と結合する.

(C) Hsm3-Rpt1-C 複合体構造. Hsm3 はリボン, Rpt1-C は空間充填モデルで表示した.

(D) base 形成中間体モデル. Hsm3 は Rpt1 と共に Rpt2 と結合することにより正しい中間体形成を促す.

Arg390, Arg403, Arg409, Leu410, Leu444 が関わっており Hsm3 の Glu157 と Rpt1-C の Arg403 間で形成された塩橋など相補的な電荷による相互作用と疎水性相互作用によ

り複合体が形成されていた. 電荷的相互作用は結合界面の表面電荷の解析より Hsm3 は酸性, Rpt1-C は塩基性であった (図 3B). また, 複合体構造を基に, 電荷的な特徴

を示すアミノ酸残基の部位特異的変異体 (Hsm3 E157A, T190A, D230A, Rpt1-C R390A, R403A, R409A) を作製し、大腸菌及び無細胞系を用いた共発現により相互作用の解析を行った結果、Rpt1-C の R403A と R409A, Hsm3 の E157A と D230A 変異体において複合体形成に減少が見られた。さらに、*rpt1 R403A/R409A*, *hsm3 E157A/T190A/D230A* 変異酵母において温度感受性が見られると共に、細胞中の 26S プロテアソーム量の減少が観測された。これらの結果より Hsm3 と Rpt1 の結合において電荷的な相補性が重要な役割を果たしていることが示された。

これまでに base 形成に関わるシャペロン Nas6 の構造が報告されており、Hsm3, Rpn14, Nas6 の立体構造を比較することにより、個々のシャペロンによる Rpt サブユニットの認識特異性を考察した。Nas6, Hsm3 はそれぞれ Rpt3-C, Rpt1-C との複合体として構造が報告されており、構造比較から各シャペロンは Rpt サブユニットの C 末端ドメインのよく似た領域を認識しているが、その認識において一次構造の異なる部位と結合し、電荷的な分布の違いを認識することで特異性を獲得していることが示された。本結果より 3 種類のシャペロンは Hsm3 では分子表面に存在する三つの酸性領域、Nas6 は二つの酸性領域と一つの塩基性領域、Rpn14 は全体的に分布する酸性領域によりそれぞれに対応する Rpt サブユニットを識別していると考えられる (図 3A, 3B)。

## 5. プロテアソーム複合体形成におけるシャペロンの働き

Hsm3 は Rpt1 サブユニットと結合すると共に base 形成において、Rpt1-Rpt2-Rpn1-Hsm3 サブ複合体を形成する。このサブ複合体形成過程における Hsm3 の役割の理解を目指し、base 複合体の形成中間体モデル [Rpt (1-6)-Hsm3] を作製した。中間体モデルは立体構造既知の AAA<sup>+</sup>-ATPase HslU と PAN の立体構造を基に Rpt (1-6) リング複合体モデルを構築し、ATPase の C 末端ドメインに Rpt1-C を重ねることにより作製した。6 種類の Rpt サブユニットの配置はこれまでに報告されており<sup>10)</sup>、本モデルより Hsm3 は Rpt1 サブユニットと結合すると共に Rpt1 の両隣に位置する Rpt2, Rpt5 と相互作用する可能性が示唆された (図 3D)。次に Hsm3 は Rpt1-Rpt2-Rpn1-Hsm3 サブ複合体を形成すること、また、中間体モデルより Rpt5 との相互作用が示唆されたことから、Hsm3 単独状態におけるこれらのサブユニット (Rpt2, Rpn1, Rpt5) に対する結合を、無細胞発現系を用いた相互作用解析により検証した。その結果、Hsm3 は単独状態で Rpt1 以外に Rpt2 と結合す

ることが示された。しかし、中間体モデルで示された Rpt5 との結合は見られなかった。これらの結果は Hsm3 を含む複合体形成中間体状態と一致しており、Hsm3 は Rpt1 と Rpt2 を正しく配置する役割を担うことが示唆された。また、Hsm3 と Rpt5 との相互作用面は Hsm3-Rpt2 に比べ小さいことから、本構造解析において示された C 字形をとる Hsm3 の立体構造の柔軟性により立体障害を回避し、base 複合体形成におけるシャペロンとして働いていると考えられる。分子集合における Hsm3 の役割は立体構造の類似した 6 種類の Rpt サブユニットを正確に配置するために必要な機能である (図 1, 3D)。

## 6. おわりに

超分子複合体タンパク質の分子集合は、高い対称性を持つことで各サブユニットが配置するウイルスや RNA、細胞膜のようなサブユニット間の相互作用に制限を与える要素により、正しく分子集合する機構が知られていた。また近年、プロテアソームのように対称性を持たずに複合体を形成するタンパク質の分子集合機構において、専用シャペロンを必要とすることが見いだされた。そして、本研究により専用シャペロンは立体構造の類似したサブユニット間の相互作用を補助することで、サブユニットの正確な配置を保証する役割を果たしていることを明らかにした。また、専用シャペロンは鋳型として複合体形成の起点を形成する可能性が示唆された。今後は、立体構造及び反応機構未知なプロテアソーム専用シャペロンの構造及び機能の解析を行うことで、一般的な超分子複合体タンパク質の分子集合機構の理解につなげていきたい。

- 1) Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., & Finley, D. (1998) *Cell*, 94, 615-623.
- 2) Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., & Huber, R. (1995) *Science*, 268, 533-539.
- 3) Murata, S., Yashiroda, H., & Tanaka, K. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 104-115.
- 4) Funakoshi, M., Tomko, R.J., Jr., Kobayashi, H., & Hochstrasser, M. (2009) *Cell*, 137, 887-899.
- 5) Le Tallec, B., Barrault, M.B., Guerois, R., Carre, T., & Peyroche, A. (2009) *Mol. Cell*, 33, 389-399.
- 6) Roelofs, J., Park, S., Haas, W., Tian, G., McAllister, F.E., Huo, Y., Lee, B.H., Zhang, F., Shi, Y., Gygi, S.P., & Finley, D. (2009) *Nature*, 459, 861-865.
- 7) Saeki, Y., Toh-e, A., Kudo, T., Kawamura, H., & Tanaka, K. (2009) *Cell*, 137, 900-913.
- 8) Stadtmueller, B.M., Kish-Trier, E., Ferrell, K., Petersen, C.N., Robinson, H., Myszkka, D.G., Eckert, D.M., Formosa, T., &

- Hill, C.P. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 37371–37382.
- 9) Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., & Tanaka, K. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 228–236.
- 10) Nakamura, Y., Umehara, T., Tanaka, A., Horikoshi, M., Padmanabhan, B., & Yokoyama, S. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **359**, 503–509.
- 11) Kim, S., Saeki, Y., Fukunaga, K., Suzuki, A., Takagi, K., Yamane, T., Tanaka, K., Mizushima, T., & Kato, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 15159–15166.
- 12) Takagi, K., Kim, S., Yukii, H., Ueno, M., Morishita, R., Endo, Y., Kato, K., Tanaka, K., Saeki, Y., & Mizushima, T. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 12172–12182.
- 13) Kim, S., Nishide, A., Saeki, Y., Takagi, K., Tanaka, K., Kato, K., & Mizushima, T. (2012) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **68**, 517–521.
- 14) Tomko, R.J., Jr., Funakoshi, M., Schneider, K., Wang, J., & Hochstrasser, M. (2010) *Mol. Cell*, **38**, 393–403.

高木 賢治, 水島 恒裕  
 (兵庫県立大学大学院生命理学研究科  
 ピコバイオロジー研究所)

Structure and functional mechanisms of proteasome dedicated chaperones

Kenji Takagi and Tsunehiro Mizushima (Department of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori, Akoh, Hyogo 678-1297, Japan)

## 構造が解き明かすがんおよび自己免疫疾患に関わるユビキチンリガーゼ Cbl のリン酸化による活性化機構

### 1. ユビキチン修飾系

ユビキチン修飾系は、ユビキチン活性化酵素 (E1), ユビキチン結合酵素 (E2), ユビキチン転移酵素 (E3) の3種の酵素群により、ユビキチンをATP依存的に標的タンパク質に結合させる翻訳後修飾系である。最初に、E1によってATP依存的にユビキチンのC末端が活性化される。次に、活性化されたユビキチンがE1からE2に移動する。最後に、E3によってユビキチンが標的タンパク質に受け渡される。ユビキチン化は多くの場合連続的に起こり、標的タンパク質はポリユビキチン化される。ポリユビキチン鎖はプロテアソームによる分解の識別シグナルとなっており、ポリユビキチン化された標的タンパク質は選

択的に分解される。

E1, E2, E3の一連の酵素群の中で、標的タンパク質を認識するのは最も下流に位置するE3であり、E3がユビキチン修飾系の中核を担う。E3はそのドメイン構造から、HECT型とRING/U-box型に大別される。HECT型E3はユビキチンと直接チオエステル結合を形成した後に基質へユビキチンを受け渡す。一方、RING/U-box型E3はユビキチンとは直接結合せず、E2および基質の両方に結合することでユビキチン化における足場として働く。

### 2. Cblの機能と構造

Cblは、がん遺伝子 *v-Cbl* のがん原遺伝子として同定された。その産物であるCblタンパク質は、RING型E3の一種である。Cblタンパク質にはc-Cbl, Cbl-b, Cbl3の3つのパラログ遺伝子産物が存在する。c-CblとCbl-bのN末端領域の配列相同性は高く(アミノ酸の完全一致で86%)、この領域に存在するTyrosine Kinase Binding (TKB) ドメイン, Helix linker およびRINGドメインがE3としての機能に重要な役割を果たす(図1a)。TKBドメインは、リン酸化チロシンを認識して標的タンパク質と結合する。一方、Helix linker上には二つのチロシン残基が存在しており、これらのうちc-CblではY371, Cbl-bではY363がリン酸化されることでE3としての機能が活性化され<sup>1)</sup>、RINGドメインはE2と結合し、基質のユビキチン化を促進する。

Cblタンパク質はチロシンリン酸化により活性化されたEGFR(上皮成長因子受容体), PDGFR(血小板由来成長因子受容体)をはじめとする成長因子受容体をユビキチン化し、その分解を促すことでシグナル伝達を負に制御している<sup>2)</sup>。そのため、Cblタンパク質のE3機能の欠如はがんの発症に関与していることが知られている<sup>3-5)</sup>。実際、*v-Cbl*におけるドメイン欠損や、N末領域におけるCblの変異はがん変異として報告されている。

Cblタンパク質の中でもCbl-bはT細胞のシグナル伝達にも関与しており、TCRやZAP-70をユビキチン化することでT細胞アネルギーを制御している<sup>6)</sup>。Cbl-bのノックアウトマウスは全身性の自己免疫疾患を発症することが明らかになっている<sup>7)</sup>。また、ヒトにおいてもCbl-bの変異とI型糖尿病との関連が明らかになっている<sup>8)</sup>。

c-CblのTKB-Helix linker-RING領域の非リン酸化体の立体構造は、E2であるUbcH7および基質であるZAP-70のCbl結合領域のペプチドとの三者複合体としてZhengらにより決定された<sup>9)</sup>。しかし、この立体構造中では活性化に