

博士論文審査報告書

論文題目：プロテアソーム複合体形成シャペロンHsm3とPba3-Pba4の構造解析による分子集合機構の研究

申請者：高木 賢治

1. 論文内容の要旨

26S プロテアソームは、生体内において不要となったタンパク質をユビキチン修飾を目印として特異的に分解することにより、生体内の様々な機能調節に関与している。また、本酵素は触媒活性部位を有する 20S プロテアソームと 19S 制御因子複合体から形成された分子量 250 万、総サブユニット数 66 個から成る超分子複合体タンパク質であり、その複合体形成のためには専用のシャペロンタンパク質を必要とすることが報告されている。しかし、分子集合過程において複合体形成シャペロンタンパク質を必要とする詳細な理由および、その反応機構は不明であり、それらを明らかにするためには立体構造の研究が不可欠である。そこで、19S 制御因子複合体の分子集合に関わる複合体形成シャペロンタンパク質である Hsm3 の立体構造の決定と機能解析、20S プロテアソームシャペロンである Pba3-Pba4 の機能解析を行った。

Hsm3 の構造解析は単独状態および複合体形成時に結合するプロテアソームサブユニット Rpt1 との複合体状態で行い、Hsm3 は 11 個の HEAT リピートから形成された C 字型の全体構造をとり、その中央部分で Rpt1 の C 末ドメインと結合していることを示した。また、複合体構造より明らかとなった、相互作用アミノ酸残基変異体タンパク質を用いた解析から、Hsm3 は表面電荷の相補性により Rpt1 と結合することが確認された。さらに、Hsm3 と複合体を形成する、Rpt1 の持つ Hsm3 に相補的な結合界面残基は構造の類似した 6 種類の Rpt サブユニット(Rpt1-6)間で保存されておらず、Hsm3 は Rpt1 の特異的な領域を認識していることが示された。複合体構造をもとに作製した 19S 制御因子複合体形成中間体モデル(Hsm3-Rpt1-6)をもとに行った解析より、Hsm3 は Rpt1 サブユニットと共に Rpt2 サブユニットと相互作用することが示されたことから、Hsm3 は Rpt1 を特異的に認識すると共に Rpt2 と結合することで、Rpt1 と Rpt2 の位置を規定する役割を果たす分子集合モデルを提案した。Pba3-Pba4 機能解析ではこれまでに立体構造の報告された Pba3-Pba4- $\alpha 5$ サブユニット複合体構造と 20S プロテアソーム構造をもとに Pba3-Pba4- α リング中間体モデルを作製し、相互作用解析を行うことにより、Pba3-Pba4 の作用機構を明らかにした。Pba3-Pba4- α リング中間体モデルより Pba4 と $\alpha 4$ サブユニット間に結合が示され、相互作用解析の結果より、 $\alpha 4$ - $\alpha 5$ 間の結合が Pba3-Pba4 により強化されていることが明らかとなった。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた $\alpha 4$ サブユニットの解析から、 $\alpha 4$ は単独では凝集しやすい性質を持ち、Pba3-Pba4- $\alpha 5$ 複合体と共に四者複合体(Pba3-Pba4- $\alpha 4$ - $\alpha 5$)を形成することで、凝集が抑制されることが示された。これらの結果よりプロテアソーム専用シャペロンは分子間の相互作用を補助することにより、複合体形成の起点を形成する作用機構を提案した。

2. 論文審査結果

本論文では、超分子複合体タンパク質 26S プロテアソームの複合体形成に関わる、専用シャペロンタンパク質の立体構造を X 線結晶構造解析法により明らかにした。また得られた立体構造情報に基づいた機能解析により本複合体形成の反応機構を提案した。これまで複合体タンパク質の分子集合は、高い対称性により構成サブユニットが集合するウイルスや、RNA や膜のような鑄型がサブユニット間の相互作用を限定して空間的秩序の形成に関わるリボソームや膜タンパク質の例が知られていた。26S プロテアソームはそれらの超分子複合体とは異なり、専用の分子集合シャペロンの働きにより複合体が形成される。プロテアソーム専用シャペロン Hsm3 と Hsm3-Rpt1 複合体の X 線結晶構造解析、機能解析、Pba3-Pba4 複合体の機能解析により明らかにされた、サブユニットの認識機構およびサブユニット間の結合を仲介する働きは、プロテアソーム複合体形成に関わる専用シャペロンの反応機構の研究を前進させたものである。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 24 年 4 月 19 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：水島 恒裕 印

副査：樋口 芳樹 印

：西谷 秀男 印

：森本 幸生 印

（京都大学原子炉実験所、教授）