

平成 21 年 3 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2008

課題番号：19770082

研究課題名 (和文) 分子量 1300 万ダルトンの巨大粒子ボルトの立体構造決定

研究課題名 (英文) X-ray crystal structural analysis of vault

研究代表者

田中 秀明 (TANAKA HIDEAKI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：40346169

研究成果の概要：本研究において、ボルト (vault) 粒子の回転対称が 39 回回転対称であることを明らかにした。この事実に基づいて構造解析を進めることで 3.5 Å 分解能でボルト粒子外殻の全体構造を決定することに成功した。粒子外殻は 78 個の MVP (Major Vault Protein) で形成されており、粒子長軸が約 670 、胴体部分の最大直径が約 400 であった。MVP には 12 個のドメイン構造があり、そのうちの 1 つが脂質ラフトへの結合に重要であるとされるストマチンと非常によく似た構造を持つことが明らかになった。これにより、ボルトが脂質ラフトに結合する可能性を示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 450,000 | 3,750,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：vault、X 線結晶構造解析、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

ボルトは 1986 年に米国 UCLA の L. H. Rome らの研究グループにより被覆小胞に結合する粒子として偶然に発見された。本粒子は 3 種類の蛋白質と 1 種類の RNA によって構成され、分子量が約 1000 万、粒子長軸の長さが約 700Å、胴体部分の最大直径が約 400 Å で細胞質内に存在する核酸-蛋白質複合体としては最大の粒子である。粒子の発見から 20 年以上もの間、本質的な機能は解明されていなかった。したがって、本研究では、ボルト

ト粒子の全立体構造を X 線結晶構造解析の手法を用いて明らかにし、構造情報から機能解明に迫ることを目的として研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、ボルト粒子の全体構造決定を粒子の機能解明への突破口にすることを目的としている。一般的にボルトの様な巨大な生体超分子複合体の構造情報から機能解明に迫る場合、構成成分やドメインに分けて断

片的な情報を得るのが主流であるが、本研究では、生体内に存在するそのままの状態を見るためにラット肝臓より抽出したボルト粒子を丸ごと結晶化し、粒子の全体構造をX線結晶構造解析によって原子レベルで決定する。

3. 研究の方法

ラット肝臓から抽出したボルト粒子を構成成分にばらさずに丸ごと結晶化し、X線結晶構造解析により粒子の全体構造を決定する。ボルトは、ラット肝臓より3段階の密度勾配遠心分離によって高純度に精製することができる。この試料を用いて結晶化し、X線回折強度データの収集をSPring-8の生体超分子専用ビームラインBL44XUにおいて行う。位相の決定は、クライオ電子顕微鏡モデルを初期位相として用いた分子置換法によって行い、粒子長軸方向にある回転対称を用いて電子密度の平均化を行いながら、位相を拡張する。

4. 研究成果

1) 高分解能回折強度データの収集

ボルトは粒子長軸方向に48回回転対称を持つと言われているので、位相拡張の際には電子密度の平均化が非常に有効である。したがって、通常のタンパク質に比べれば少し低い分解能でもモデル構築が可能な良い電子密度を得られる可能性がある。しかし、それでも最低でも3.5分解能の回折強度データは必要である。我々が研究を開始したのは2002年5月であったが、6月にはラット肝臓由来ボルトの結晶が得られた。その後、結晶化条件と回折実験条件の最適化を行い、約5年の歳月を要して3.5分解能以上の反射が得られる良質な結晶の作成と回折実験条件の最適化に成功した。回折実験の際の結晶の凍結条件においては、結晶に浸透させる抗凍結剤の濃度を1%ずつ上昇させることにより結晶に与える物理的ダメージを極力減らした。また、結晶を最終濃度の抗凍結剤溶液中で一晩放置することで、結晶間の同型性を高めることに成功した。これらの実験条件の確立により、ボルトの回折強度データ収集を効率よく行えるようになった。

全ての回折強度データ収集は、SPring-8のBL44XUにおいて行った。通常の小さなタンパク質結晶の回折実験では、数秒の露光で十分であるが、vaultのように大きな粒子の結晶は格子定数が大きいいため回折強度が弱いので高分解能のデータを得るために長時間露光を行った。露光時間を30~60秒に延ばすことで最高3.2分解能の回折強度データを得る事ができた。しかし、長時間露光では結晶が受けるダメージは大きく、1カ所あたり

5枚程度しかデータ収集することが出来なかった。よって、複数個の同型結晶を用いてデータ収集することにより、この問題点を克服した。最終的には39個の同型結晶を用いて3.5分解能のネイティブデータを得る事ができた。分解能が低いことや、同型性がないなどの理由でデータ収集に使用できなかった結晶も含めると、1つのネイティブデータセットを収集するために要した結晶の数は数百個以上にのぼった。

2) ボルトの回転対称の決定

これまで、粒子長軸方向には48回回転対称があると信じられてきた。我々も当初は、48回回転対称を用いた電子密度の平均化を行いながら位相を拡張していたが、48回回転対称での平均化では電子密度が乱れてしまい、モデル構築はできなかった。したがって、独自の方法でボルト粒子の回転対称を決定する必要があった。我々は、クライオ電顕モデルを用いた分子置換により30分解能で初期位相を決定し、粒子長軸方向に2~48回まで全ての回転対称を仮定して非結晶学的対称を用いた電子密度の平均化を行いながら、10分解能まで位相拡張した。そして、各回転対称での F_0-F_c 間のR-factorと相関係数を比較することにより粒子の回転対称を決定する方法を開発した。この手法では、正しい回転対称が決まれば、 F_0-F_c 間のR-factorは低くなり、相関係数は高くなるはずである。結果は非常に明瞭で、3, 13, 39回回転対称で電子密度を平均化した時に大きな差が見られた。これにより、粒子の回転対称がこれまでに報告されていた48回回転対称ではなく、39回回転対称であることを明らかにすることができた。ボルト粒子の正しい回転対称の決定は大きなブレイクスルーとなり、その後、構造解析は飛躍的に前進した。

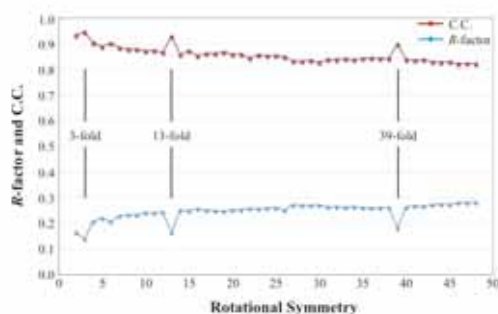


図1. 粒子回転対称の決定

3) ボルト外殻全体構造の決定

上記の事実に基づいて構造解析を進めることで3.5 Å分解能でボルト粒子外殻の全体

構造を決定することに成功した。ボルト粒子は39個のMVPが環状に集まってお椀型の半分のボルトを形成し、それらが2回回転対称の関係で会合して78個集まることによって鳥かご状の構造を形成していた。粒子の大きさは、長軸が約670、胴体部分の最大直径が約400であった。ボルト外殻を構成するMVPは縦長に伸びた非常に特徴的な形をしており、N末端から9つの繰り返し構造があり、ショルダードメイン、キャップヘリックスドメイン、キャップリングドメインと全部で12個のドメイン構造から成っていた。

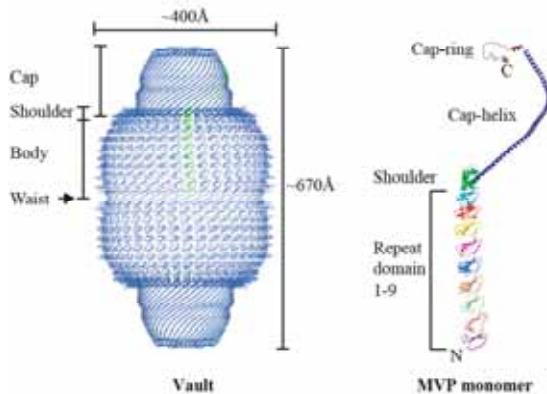


図2．ボルトの構造 左：ボルト粒子全体、右：ボルトの構成成分であるMVP

4) ボルト外殻構造情報からの機能探索

粒子外殻を形成する蛋白質であるMVPには12個のドメイン構造があり、そのうちの1つであるショルダードメインが脂質ラフトへの結合に重要であるとされるストマチンと非常によく似た構造を持つことが明らかになった。

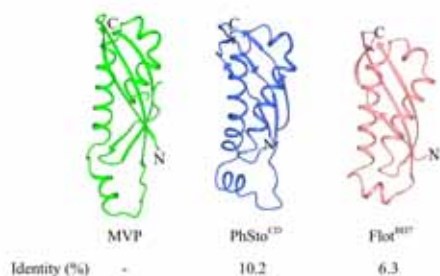


図3．MVPのショルダードメインの構造はストマチンのコアダメインと類似している。

これにより、ボルトが脂質ラフトに結合する可能性が示すことができた。この事実は、2007年に報告された「ボルトが自然免疫反応に関与する」という内容の論文と一致している(M. P. Kowalski *et al.*, *Science* 317, 130-132 (2007))。Kowalskiらは、緑膿菌が肺

上皮細胞に感染する際、ボルトが上皮細胞の脂質ラフトへ急速に集まり、自然免疫反応を効率的に行うための手助けをしているという内容を報告している。我々の得た構造情報はこうした事実と一致しており、ボルトの自然免疫反応への関与を示す大きな証拠となった。現時点では、自然免疫反応におけるボルトの詳細な役割は解明されていないが、ボルトが脂質ラフトで働くことを生化学的・分子生物学的実験と、構造生物学的実験の両方から示す事ができたことは、ボルトの機能解明に向けた大きな前進であると言える。

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Tanaka H, Kato K, Yamashita E, Sumizawa T, Zhou Y, Yao M, Iwasaki K, Yoshimura M and Tsukihara T, The structure of rat liver vault at 3.5 Angstrom resolution. *Science* 323, 384-388 (2009). 査読有り

Kato K, Tanaka H, Sumizawa T, Yoshimura M, Yamashita E, Iwasaki K and Tsukihara T, A vault ribonucleoprotein particle exhibiting 39-fold dihedral symmetry. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 64, 525-531 (2008). 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

田中秀明、加藤公児、住澤知之、山下栄樹、吉村政人、周勇、姚閔、岩崎憲治、月原富武 X-ray structure of the vault purified from rat liver. 日本製物物理学会、福岡県福岡市(福岡国際会議場)・2008年12月3～5日

Kato K, Tanaka H, Sumizawa T, Yamashita E, Yoshimura M, Zhou Y, Yao M, Tanaka I, Iwasaki K and Tsukihara T, Structure of vault purified from rat liver. IUCr (International Union of Crystallography) 2008, 大阪府大阪市(大阪国際会議場)・2008年8月23日～28日

Wada Y, Tanaka H, Yamashita E, Ichiki-Uehara T, Omura T and Tsukihara T, The structure of melon necrotic virus determined at 2.8 Å resolution. IUCr (International Union of Crystallography) 2008, 大阪府大阪市(大阪国際会議場)・2008年8月23日～28日

〔その他〕

ホームページ等

ボルトのイメージ図、ムービーなど
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crysta>

Illography/mvp/ (公開)

ポルトに関する報道試料など
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/olabb/tsukihara/houdou/> (非公開)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 秀明 (TANAKA HIDEAKI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：40346169

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者