

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12061

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23770107

研究課題名（和文） Rab と SNARE の局在化メカニズムの構造基盤

研究課題名（英文） Structural analysis of the Rab and SNARE localization

研究代表者

伊藤 桜子（ITO SAKURAKO）

東京大学・放射光連携研究機構・特任助教

研究者番号：60597152

研究成果の概要（和文）：RabとSNAREは、真核生物の膜系の融合を制御する因子である。Rabは翻訳後に付加される脂質基によって膜に挿入されるが、この膜挿入をGDFという膜タンパク質が触媒すると言われている。本研究では、GDFとSNARE（VAMP2）が相互作用するという報告に基づき、X線結晶構造解析によりGDFとSNAREの協働機構を解明することを目指した。これまでに、GDFの結晶化に成功し、現在は分解能を向上させることを目指している。また、GDFとVAMP2が複合体を形成する条件も並行して検討している。

研究成果の概要（英文）：In eukaryotic cells, Rab and SNARE regulate the fusion of membrane compartments. Rabs are inserted into membranes via the prenylated moieties which are post-translationally attached. A membrane protein called GDF is proposed to catalyze the membrane insertion of Rab. As GDF and VAMP2, one of the SNARE protein, is shown to interact with each other, we are trying to reveal the structural basis of GDF-SNARE cooperation. So far, we have succeeded in the crystallization of GDF, and now trying to improve the diffraction quality of crystals. Also, we are trying to prepare GDF-VAMP2 complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：X線結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

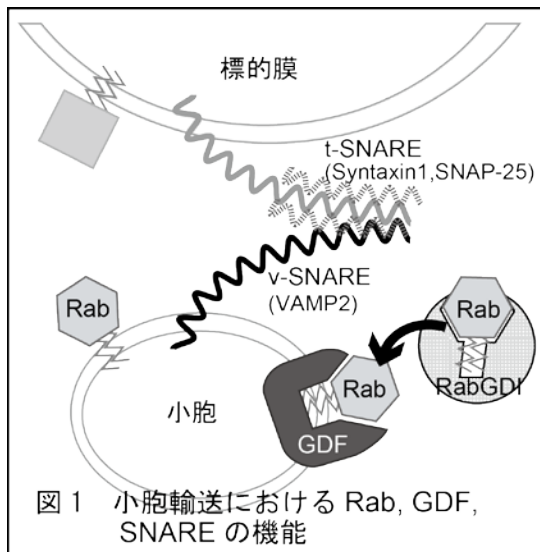
真核生物の細胞内では、積み荷を積んだ多数の小胞が複雑に行き来しており、それぞれの小胞は自身の標的膜を正確に認識し、それを目指して移動している。小胞と標的膜との融合は、小胞膜上に存在する v-SNARE タンパク質と標的膜上の t-SNARE タンパク質が、SNARE 複合体を形成することによって起こる

（図1）。低分子量GTPaseであるRabファミリータンパク質は、小胞や標的膜の目印として機能しており、小胞や細胞小器官の種類に対応して異なる種類のRabが膜表面に局在している。RabとSNAREが協働することによって、正確な小胞、標的膜の認識と融合が制御されていると考えられている。

Rabは、翻訳後修飾で付加されたプレニル

基を持ち、細胞質中では脂質基を RabGDI と呼ばれるタンパク質に結合させて可溶性タンパク質として存在している。膜上に存在している GDF というタンパク質が、RabGDI から Rab を解離させて、Rab の脂質基を膜に挿入することによって Rab を膜に局在化させる機能を持つと提唱されている。その後、膜上の Rab に対して GEF が機能して GDP 結合型 Rab を GTP 結合型 Rab へと変換すると、Rab エフェクターと呼ばれる諸因子が膜上に誘導されて、Rab エフェクターが SNARE を介した融合を促進する。興味深いことに、GDF と v-SNARE である VAMP2 が結合するというデータがあり、この相互作用は Rab と SNARE の協働機構を直接的に示していると考えられる。

GDF はまた、ヒト/サル免疫不全ウイルスの gp41 タンパク質や、ロタウイルスの VP4 タンパク質、また、EB ウイルスにコードされた腫瘍性タンパク質 LMP1 と相互作用することが知られており、Rab を膜に局在させる機能以外にも複数の機能に関わっている可能性が示唆されている。



## 2. 研究の目的

本研究では、X線結晶構造解析法を用いて、GDF と VAMP2 の複合体の立体構造を解明することを目的として研究を行った。GDF-VAMP2 複合体の立体構造が明らかになれば、Rab を膜に局在させると同時に SNARE を近傍に局在させるという機構が初めて可視化されることになる。また、GDF-VAMP2 複合体は、2つの膜タンパク質が膜上で相互作用すること

によってシグナルを伝達している場を捉えた立体構造という点でも意義深い。

## 3. 研究の方法

### (1) GDF の調製と結晶化

GDF は 4 回膜貫通と予測される膜タンパク質である。GDF は、バキュロウイルスを用いた発現系によって昆虫細胞で発現させた。膜面分を分画後に、界面活性剤を用いて膜から GDF を含む膜タンパク質を抽出し、アフィニティカラムとゲルろ過カラムを用いて GDF を精製した。

精製した GDF を用いて、蒸気拡散法または LCP 法 (脂質キュービック相法) による結晶化条件の探索を行った。得られた結晶の X 線回折データ収集は大型放射光施設 SPring-8 において行った。結晶の分解能を向上させるためには、まず、界面活性剤の検討やコンストラクトの検討、GDF のソース生物種の検討などを行った。また、結晶化しやすい各種タンパク質と融合タンパク質化させることによっても、結晶の分解能向上を目指した。更に、GDF に対するモノクローナル抗体を作製し、結晶化に適すると考えられる抗体を選別した上で、その抗体の Fab 断片と GDF の複合体の結晶化も目指した。

### (2) VAMP2 の調製

GDF が昆虫細胞で安定に発現することがわかったので、GDF と VAMP2 を昆虫細胞で共発現させることを試みた。4 種類の長さの VAMP2 コンストラクトと GDF とをポリシストロニックにベクターに組み込んで共発現を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) GDF の調製と結晶化

GDF を大量発現させた昆虫細胞の膜面分を分画後に、界面活性剤を用いて膜から GDF を含む膜タンパク質を抽出し、アフィニティカラムとゲルろ過カラムを用いて GDF を精製したところ、結晶化に適した純度の GDF が十分な収量得られた (図 2)。精製した GDF を用いて、蒸気拡散法による結晶化条件の探索を行ったところ図 3 の様な結晶が得られた。

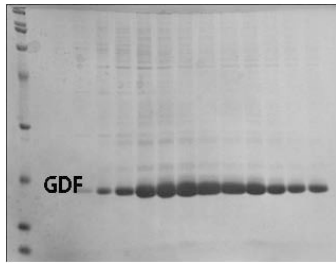


図2 GDFの精製

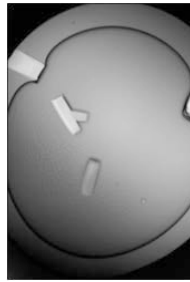


図3 GDFの結晶

大型放射光施設 SPring-8 において、得られた結晶に対してX線を照射したところ7 Å程度の反射を得た。そこで、分解能を向上させるために以下に示すような色々な工夫を行った。

\*界面活性剤の検討：GDFの可溶化やその後の調製に用いる界面活性剤の種類を8通り検討した。殆どの界面活性剤において結晶は得られたが、分解能の向上には至らなかった。

\*GDF コンストラクトの検討：N末端やC末端の切り詰めなどによって11種類のGDF コンストラクトを作製して、高分解能結晶の調製を目指した。これも、殆どのコンストラクトにおいて結晶は得られたものの、分解能の向上には至らなかった。

\*生物種やホモログの検討：GDFのソース生物種を変えたり、GDFのホモログを試したりしたが、結晶を得ることはできなかった。

\*融合タンパク質の調製：結晶化しやすい各種タンパク質(T4リゾチームやシトクロームbのRILタンパク質、実際の結合相手であるRab5など)とGDFとの融合タンパク質を調製することにより、パッキングが密な結晶を得ることができるのではないかと考えた。パートナータンパク質を挿入する部位の検討も含めて、多くの融合タンパク質を調製することに成功したが、これまでに結晶は得られていない。

\*GDFに対するモノクローナル抗体の利用：GDFに対するモノクローナル抗体を作製し、GDFとの結合が強く、GDFの立体構造を認識していると期待できる抗体を数種類選別することに成功した。GDFとモノクローナル抗体の複合体を調製することができたので、結晶化条件のスクリーニングを行っているが、これまでに結晶は得られていない。

\*LCP法：膜タンパク質を界面活性剤のミセル中ではなく脂質環境で結晶化する方法であり、近年LCP法での膜タンパク質の立体構

造決定例が非常に多く、また、界面活性剤存在下での蒸気拡散法と比較して高分解能の結晶が多く得られている。そこで、LCP法を用いた結晶化により結晶を得ることを目指しているが、まだLCP法による結晶は得られていない。

今後は、これらの方法を組み合わせることなどによって、立体構造解析可能な結晶を得ることを目指す。

## (2) VAMP2の調製

4種類の長さのVAMP2コンストラクトとGDFとをポリシストロニックにベクターに組み込んで、昆虫細胞における共発現を試みたが、発現は見られなかった。これまでに、GDFは昆虫細胞で、VAMP2は大腸菌で発現させることによって調製可能ながわかってるので、今度はそれぞれを精製後に複合体を構築することを目指す。

## 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3件)

① Get1 stabilizes an open dimer conformation of get3 ATPase by binding two distinct interfaces.

Kubota K, Yamagata A, Sato Y, Goto-Ito S, Fukai S.

J Mol Biol. 2012 Sep 21;422(3):366-75. doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.045. Epub 2012 Jun 7.

査読有

② Molecular basis of Lys-63-linked polyubiquitination inhibition by the interaction between human deubiquitinating enzyme OTUB1 and ubiquitin-conjugating enzyme UBC13.

Sato Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Kubota K, Miyamoto R, Nakada S, Fukai S.

J Biol Chem. 2012 Jul 27;287(31):25860-8. doi: 10.1074/jbc.M112.364752. Epub 2012 Jun 7.

査読有

③ Differentiating analogous tRNA methyltransferases by fragments of the methyl donor.

Lahoud G, Goto-Ito S, Yoshida K, Ito T,  
Yokoyama S, Hou YM.  
RNA. 2011 Jul;17(7):1236-46. doi:  
10.1261/rna.2706011. Epub 2011 May 20.  
査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 桜子 (ITO SAKURAKO)

東京大学・放射光連携研究機構・特任助教

研究者番号：60597152

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし