

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24687020

研究課題名(和文) 謎の巨大粒子ボルトの全立体構造決定から機能解明への道を切り開く

研究課題名(英文) Elucidation of the Function of Vaults based on its whole structure.

研究代表者

田中 秀明 (Tanaka, Hideaki)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：40346169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円

研究成果の概要(和文)：2009年に報告した3.5Å分解能の構造から、ボルトはウェスト部位(向かい合ったMVP・N末端同士の会合部位)の相互作用が弱く、この部位の電子密度が不明瞭であった。したがって、MVPのN末端にロイシンジッパー(LZ)を導入することでウェスト部位の会合を強固にしたLZ-ボルトの昆虫細胞発現系を構築した。その結果、野生型と比べて15倍以上の収量(1L培養あたり80mg)でボルト粒子が得られるようになり、本試料で得られた結晶を用いてSPring-8のBL44XUにて回折実験を行った結果、2.8Å分解能の反射を確認することができた。現在は多数の結晶を用いてボルトの高分解能回折強度データを収集している。

研究成果の概要(英文)：Vault is the largest cytoplasmic nucleoprotein particle. However we have determined the x-ray structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution in 2009 (Science 323 384-288, 2009), the electron density map around the waist domain (N terminal domain of MVP) was disordered. Thus we added leucine zipper to the N-terminus of MVP (LZ-MVP), and expressed LZ-MVP in the Sf9 insect cell line using a baculovirus vector. We obtained more stable vault particles (LZ-vaults) in high purity and yield (80mg LZ-vaults/1L culture). The crystals of LZ vaults are diffracted up to 2.8 angstrom resolution on beam line BL44XU at SPring-8.

研究分野：生体超分子複合体のX線結晶構造解析

キーワード：ボルト 脂質ラフト 自然免疫 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

1986年に米国 UCLA の L. H. Rome 教授らによって発見された vault (ボルト) は、3 種類のタンパク質 (MVP、VPARP、TEP1) と 1 種類の RNA (vRNA) で構成される分子量約 1000 万の巨大な核酸-タンパク質複合体で、哺乳類など幅広い高等生物が持つことが知られています。しかし、粒子の発見から 30 年近く経った現在も本質的な機能は明らかになっておらず、生物学におけるミステリーと言われていました。

私は、ボルトの全立体構造決定を機能解明の突破口にすべく、2002年にラット肝臓由来ボルトの X 線結晶構造解析を開始し、2008年に 78 個の MVP で構成される粒子外殻の全体構造を 3.5Å 分解能で構造決定することに成功しました (*Science* 323, 384-388 (2009))。構造情報から得られた最も興味深い情報は、MVP のドメイン構造のうちの 1 つ (Shoulder domain) が脂質ラフトへの結合に重要であるとされる Stomatin core domain と類似の構造を持つということでした。この事実は、肺上皮細胞への緑膿菌 (*P. aeruginosa*) 感染の際にボルトが脂質ラフトに集まるというのは米国ハーバード大学の Kowalski らの実験結果 (*Science* 317, 130-132 (2007)) と一致しており、ボルトの自然免疫への関与の可能性を示す大きな証拠となりました。

しかし、粒子内部に存在する VPARP、TEP1 および vRNA については電子密度が確認出来ず、構造決定に至っていませんでした。これらマイナー成分の構造を決定することができれば、機能解明への道をさらに切り開くことが可能となります。また、ボルト粒子外殻の全体構造も 2.8Å 分解能以上の高分解能で構造決定することができれば、アミノ酸側鎖の正確な配向も決まり、より詳細な議論が可能となります。

2. 研究の目的

本研究では、ラット肝臓由来ボルトの全体構造をより高分解能 (2.8Å 分解能以上) で構造決定し、アミノ酸側鎖の配向まで正確に決定することを 1 つの目的とし、それと合わせて昆虫細胞で発現した MVP-VPARP、MVP-TEP1 複合体の結晶構造解析にも並行して取り組み、粒子の全体構造決定からさらなる機能解明に迫る事を目的として研究を進めました。

3. 研究の方法

本研究では、全ての成分を含んだ分子量約 1000 万の完全なボルトの全立体構造を X 線結晶構造解析により 2.8Å 分解能以上の高分解能で決定し、得られた立体構造情報に基づいて機能解明を目指します。結晶化の試料としては、以下のものを用います。

1) ラット肝臓由来ボルト

ボルトの場合、結晶に浸透させる抗凍結剤 PEG400 の濃度を 0~34%まで 1%ずつ上

昇させますが、この各ステップでの浸透時間を長くし、温度を厳密に制御することで 2.9Å 分解能の回折点が得られます。この浸透条件のさらなる最適化に加え、結晶凍結時に液体窒素周辺の冷えた気流を除去して、結晶を液体窒素中で急速に凍結させるハイパークエンチング法も試みるなど、あらゆる手法を駆使して 2.8Å 分解能以上の回折強度データ収集が可能な実験条件の確立を目指します。

2) 昆虫細胞発現系による組み換えボルト (MVP と MVP-VPARP、MVP-VPARP-TEP1 複合体)

昆虫細胞で発現させた MVP-VPARP、MVP-VPARP-TEP1 複合体の X 線結晶構造解析にも取り組みます。これら発現系による組み換えボルトの構造解析に取り組む一番の目的は、より高分解能での全立体構造決定であります。しかし、もし 4-5Å 程度の低分解能のデータでも得る事ができれば、それぞれの電子密度の差を見る事で、マイナーサブユニットの数や粒子内での配置を決めるための大きな助けとなります。したがって、1) のラット肝臓ボルトと並行して進めます。

4. 研究成果

1) ボルト外殻の全体構造を高分解能で構造決定する研究では、当初ラット肝臓を出発材料として用いていました。しかし、昆虫細胞発現系を用いてより安定なボルト粒子を大量に得る技術の確立に成功し (産業財産権参照) それ以降は後者を結晶化の試料として用いることになりました。

我々が 3.5Å 分解能で構造決定したボルトの構造では、ボルトのウェスト部分の電子密度が非常に乱れていました。これは、向かい合った MVP による会合が短い分子間水素結合と 1 つのイオン結合だけという非常に弱い相互作用であるためで、これが原因でラット肝臓から精製したボルトでは、高分解能の回折強度データを与える良質な結晶が得られないのであろうと考えました。そこで、MVP の N 末端に酵母 GCN4 由来のロイシンジッパーを導入した LZ-ボルトの昆虫細胞発現系を構築しました。その結果、昆虫細胞 1L 培養あたり 80mg (従来比 15 倍以上の収量) でボルトを得ることが可能になりました (図 1)。

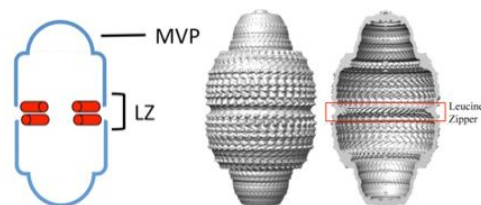


図 1. LZ ボルトの概略図と cryo-EM による単粒子解析像

本粒子は、動的散乱測定による粒子径分布の幅が3%(15%以下なら単分散で均一とされる)と非常に均一で、得られた良質な結晶はSPring-8・BL44XUでの回折実験で2.8Å分解能の回折点を示しました(図2)。今後は、抗凍結剤の浸透条件をさらなる最適化と、高圧条件下での結晶凍結を試みることでより高分解能の回折強度データが得られる条件の探索を行います。また、現在の条件で複数個の結晶を用いて2.8Å分解能のデータ収集にも取り組んでいます。

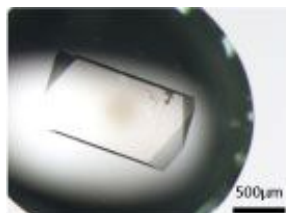


図2. LZ ボルトの結晶写真

2) MVP-VPARP、MVP-VPARP-TEP1 複合体の昆虫細胞発現系は現在のところ得られておりません。当初の予定では、MVP-VPARP および MVP-VPARP-TEP1 の複合体を昆虫細胞で発現し、マイナー成分がボルト粒子内部に取り込まれた形で構造決定する予定にしていました。しかし、ラット肝臓由来ボルトを用いた実験から、粒子内部に存在するマイナー成分の構造を決定することは困難であると推測できました。よって、今後は、VPARP、TEP1 共に MVP のドメインとの複合体として発現・精製し、結晶化に取り組む予定にしています。具体的には、VPARP は MVP の repeat domain 3-4 と会合することが知られていますので、VPARP-MVP domain3-4 複合体として発現・精製および結晶化に取り組みます。また、TEP1 は Cap-ring domain と会合することが知られており、我々の3.5Å分解能の電子密度でもその一部が確認できておりますので、TEP1-MVP cap-ring domain 複合体として発現・精製および結晶化に取り組みます。

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2件)

1) Casanas A, Querol-Audí J, Guerra P, Pous J, Tanaka H, Tsukihara T, Verdaguer N, Fita I, New features of vault architecture and dynamics revealed by novel refinement using the deformable elastic network approach. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **69**, 1054-1061(2013). doi:10.1107/S0907444913004472.

2) Tanaka H and Tsukihara T, Structural studies of large nucleoprotein particles, vaults. *Proc. Jpn.*

Acad., Ser. B, **88**, 416-433(2012).

〔学会発表〕(計7件)

1) 河合(久保田)寿子、坂本由佳、和田元、田中秀明、栗栖源嗣、Crystal Structure of Photosystem I from *Synechocystis* sp. PCC6803 at 5.1Å resolution. 日本化学会第95回春季年会、日本大学理工学部船橋キャンパス、千葉県船橋市(2015年3月26日~2015年3月29日)

2) 河合(久保田)寿子、武藤梨沙、池上貴久、Marc Nowaczyk、Matthias Rogner、田中秀明、栗栖源嗣、光化学系Iとフェレドキシンが形成する電子伝達複合体の構造基盤、平成26年度日本結晶学会年会、東京大学農学部 東京都文京区(2014年11月1日~2014年11月3日)

3) Risa Mutoh, Hisako Kubota-Kawai, Marc Nowaczyk, Matthias Rogner, Hideaki Tanaka, Takahisa Ikegami, Genji Kurisu, X-ray structure and NMR analysis of the electron transfer complex between photosystem I and ferredoxin. 第52回日本生物物理学会年会、2014年9月25日~2014年9月27日(札幌コンベンションセンター 北海道札幌市)

4) 武藤梨沙、久保田(河合)寿子、田中秀明、池上貴久、栗栖源嗣、光化学系I-フェレドキシン複合体の構造解析、第22回光合成セミナー2014:反応中心と色素系の多様性、名古屋工業大学 愛知県名古屋市(2014年7月12日~2014年7月13日)

5) 河合(久保田)寿子、武藤梨沙、池上貴久、Marc Nowaczyk、Matthias Rogner、田中秀明、栗栖源嗣、光化学系IとFdが形成する電子伝達複合体の構造基盤、第5回日本光合成学会年会、近畿大学農学部 奈良県奈良市(2014年5月30日~2014年5月31日)

6) 田中秀明、藤田千鶴子、岩崎憲治、月原富武、ロイシンジッパー付加によるボルト粒子の安定化と発現量の向上、第13回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館 鳥取県鳥取市(2013年6月12日~2013年6月14日)

7) 田中秀明、生体粒子ボルトを利用したナノカプセルの開発、第1回ネイチャーインダストリーアワード~若手研究者からの発信~、大阪科学技術センター 大阪府大阪市(2012年11月20日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:人工生体粒子およびその製造方法
発明者:田中秀明

権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：日本国内特許および国際特許
番号：特願 2012-253031、PCT/JP2013/080219
出願年月日：2012 年 11 月 19 日
国内外の別：国内および国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography/
LabHP/HOME.html](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography/LabHP/HOME.html)

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・准教授

研究者番号：40346169