

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770094

研究課題名(和文)細胞で膜切断を担うESCRT-III複合体線維の構造基盤研究

研究課題名(英文)Structural basis of the filament formation of ESCRT-III proteins

研究代表者

帯田 孝之(OBITA, TAKAYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：30578696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：酵母及び古細菌のESCRT-IIIタンパク質をクローニングし、各タンパク質の発現系を構築した。野生型及び種々の変異体を精製し、結晶化を試みたが現在までに立体構造決定可能な高分解能の反射を示す結晶は得られていない。また、ESCRT-IIIタンパク質と相互作用するCdvAの結晶を得ることができ、その立体構造決定に成功した。さらに電子顕微鏡を用いた解析結果と合わせ、CdvAがとる線維状構造の構造基盤について明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We have cloned several ESCRT-III genes from Yeast or Archaea and made plasmids for protein expression. Although we have purified wild-type and mutants and tested crystallization, we have not got the good diffracting crystals, yet. We have determined the crystal structures of Archaeal CdvA, which interact with ESCRT-III proteins, and revealed that CdvA forms the filament structure. We have also shown the filament structure of CdvA using electron microscopy. Taken together, we have succeeded to show the structural basis of the filament structure of CdvA.

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：構造生物学 細胞分裂 ESCRT 古細菌

## 1. 研究開始当初の背景

ESCRT(エンドソーム輸送必須複合体: Endosomal Sorting Complex Required for Transport)複合体は、エンドソーム分解系のタンパク質として同定された。続いて、HIV-1等のレトロウイルスが細胞から出芽する際にも、さらに、細胞質分裂(Cytokinesis)にも重要な役割を果たしている事が示された(Carlton et al, Science, 2007)。一見すると、これらは全く異なる働きを持っているようにも思えるが、それらは全て細胞質から外側へと出芽する膜が切り離される機構と捉えることが出来る。ESCRT複合体は、主にESCRT-0、-I、-II、-III等のサブ複合体からなり、それぞれが異なる役割を果たしている。近年、Hurleyらのグループにより、*in vitro*の再構成実験から、ESCRT複合体によるエンドソーム内腔小胞形成メカニズムについての明快なモデルが提案されている(Wollert and Hurley, Nature, 2010)。すなわち、ESCRT-I&-II複合体が膜を曲げ、さらにESCRT-III複合体がその膜を切断して、その結果小胞が形成するというモデルである。ESCRT-III複合体は、酵母では6個のタンパク質から形成され、それぞれのタンパク質間の相同性は非常に高い。それらは、200~250アミノ酸残基のタンパク質で、コアドメインとC末にフレキシブルな領域からなると考えられている。C末領域では、Vps4などの他のタンパク質と相互作用する例がいくつか報告されている(Obita et al, Nature, 2007; Stuchell-Brereton et al, Nature, 2007)。一方、N末のコアドメインは、膜に対して親和性があることと、ある条件下では線維状構造をとることが知られている。このESCRT-III複合体線維が膜上で旋状に配置し、膜を絞るように引っ張ることで膜が切れるのではないかと考えられているが、このESCRT-III複合体線維については不明な点も多く存在している。

## 2. 研究の目的

酵母のエンドソーム分解系におけるESCRT複合体の役割が最も精力的に研究されており、いくつかの知見が蓄積されている。その中の一つとして、ESCRT-II複合体がESCRT-III複合体を膜へとリクルートし、ESCRT-III複合体による線維が形成されると考えられている。こ

の際に、ESCRT-II複合体のサブユニットの一つであるVps25が、ESCRT-IIIタンパク質の一つであるVps20と結合することがわかっている。このVps25(ESCRT-II)とVps20(ESCRT-III)の相互作用を解析することで、ESCRT-III複合体線維がどのように形成されるのか、その「きっかけ」を解明したい。その後、Vps20(ESCRT-III)が順に他のESCRT-IIIタンパク質と(Vps20 Snf7 Vps24 Vps2 Did2 Vps60)相互作用することで、ESCRT-III複合体線維が伸長すると考えられる。しかしながら、現在までにESCRT-IIIタンパク質同士のヘテロ複合体については、その詳細は全く明らかとなっていない。そこで、ESCRT-IIIタンパク質間のヘテロ複合体の立体構造を解析し、ESCRT-III複合体線維がどのように伸展するのかを明らかにすることを目的とする。一方、これまでに、古細菌(Crenarchaea)にもESCRT複合体(Vpa4/ESCRT-III)が存在し、かつ細胞分裂に重要な役割を果たしていることを示している(Samson, Obita et al, Science, 2008; Samson, Obita et al, Mol Cell, 2011)。この古細菌(Crenarchaea)には、普遍的に保存されているアクチン(収縮環形成)やチューブリン(中央紡錘体形成)のホモログ分子等は保存されておらず、非常にユニークな細胞分裂メカニズムを持つと考えられる。この古細菌(Crenarchaea)においては、これまでに4つのESCRT-IIIタンパク質が同定されており、既に我々のグループがそれらの相互作用について明らかにしている。さらに近年第三のESCRT分子としてCdvAが同定されている。このように、ESCRT-III複合体がヒトから古細菌まで保存されており、細胞分裂の最後のステップに重要な働きを持っていることは、非常に興味深いと言える。この、最も単純と考えられる古細菌のESCRT-III複合体について、そのESCRT-IIIタンパク質間のヘテロ複合体の立体構造を解析し、何としてもESCRT-III複合体線維についての知見を得たいと考えている。ESCRT-III複合体線維はヒトから古細菌まで保存されている。すなわち、ESCRT-IIIタンパク質が多量体を形成することで線維となり、かつその線維が膜を切断するという非常にユニークな役割を、ESCRT-IIIタンパク質は担っている。X線結晶構造解析やNMRを用いて原子レベルの視点で、1) ESCRT-II&ESCRT-III複合体の立体構造を決定

すること、2) ESCRT-IIIヘテロ複合体の立体構造を決定すること、3) CdvAの立体構造を決定し、その役割を明らかにすることを主な目的としている。これらESCRT-IIIタンパク質を介した相互作用を明らかにすることで、この重要でユニークなメカニズムを解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

酵母及び古細菌の ESCRT-III タンパク質、及び古細菌 CdvA タンパク質のクローニングを行い、精製、結晶化を行う。様々な発現ベクターや、変異体等の作成を行い、良好な結晶を得て立体構造解析を行う。必要に応じて、セレノメチオニン置換体等を作成し、X線結晶構造解析時の位相の解決に用いる。酵母 ESCRT-II&Vps20(ESCRT-III) 複合体、及び Vps25&Vps20 複合体を結晶化し、立体構造決定を行う。ESCRT-II と ESCRT-III の相互作用は、それぞれのサブユニットの一つである、Vps25(ESCRT-II)と Vps20(ESCRT-III)の直接の相互作用であることがわかっている。しかしながら、この両者を混合すると、溶解度が著しく低下し結晶化に必要な濃度（～10mg/ml）では沈殿を生じてしまい、複合体を可溶性分画に得ることが出来ない。そこで Vps20(ESCRT-III)の様々な位置にアスパラギン酸単変異を導入し、可溶性の ESCRT-II&Vps20(ESCRT-III) 複合体を得ることに成功している。さらに様々な位置にアスパラギン酸単変異を追加導入し、もしくは、複数個のアスパラギン酸変異を導入することで、結晶化・構造解析を行う。

### 4. 研究成果

酵母および古細菌の ESCRT-III 遺伝子を計 11 種類クローニングして、His-tag、GST-tag、Lipoyl-tag など様々なタグを用いて精製するために各種ベクターに組み込んだ。また、それぞれの遺伝子の共発現ベクターも作成した。その後、BL21(DE3)や C41(DE3)など複数種の大腸菌を用いてタンパク質の発現を行い、全ての ESCRT-III タンパク質について精製を行った。その中でいくつかのタンパク質は、高純度で精製することに成功し、結晶化を行ったが最終的に構造決定可能な結晶は得られなかった。また、フレキシブルな領域を予想するなどし、タンパク質の長さの最

適化を行うことや、変異体を作成することで、良好な結晶を得ようと試みたが、それらに関しても現在までに構造決定可能な結晶は得られなかった。

古細菌には、ESCRT-III タンパク質と相互作用する CdvA が存在している。本研究の経過に伴って、CdvA が ESCRT-III 複合体と相互作用し、細胞分裂に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた (Samson et al, Mol. Cell, 2011)。本研究では、この CdvA の発現、精製結晶化を行い、高分解能の結晶構造を得ることに成功した(図 1)。さらに、電子顕微鏡を用いた解析から、この CdvA が ESCRT-III タンパク質と同様の線維状構造をとることを明らかにし、その原子レベルでの詳細な構造を得ることに成功し、その線維形成メカニズムについて明らかにすることに成功した。このことから、CdvA は ESCRT-III 複合体と同様の線維構造を形成しながらお互いが協同的に細胞分裂へ関与していることが示唆される。また、CdvA は DNA との結合も示唆されており、細胞分裂時の DNA の分配にどう関与しているのか等、非常に興味深い。今後は速やかに論文として発表することを予定している。



図 1 ; CdvA の結晶構造

研究開始時より酵母 ESCRT-II&Vps20(ESCRT-III) 複合体、及び Vps25&Vps20 複合体を結晶化し最適化を行った。しかしながら、これまでに良好な反射を示す結晶を得られておらず、構造決定には至っていない。

### 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. [A role for crenarchaeal ESCRT system in cell division].

Obita T.  
Seikagaku. 2014 Feb;86(1):59-62. Review.  
Japanese. 査読無し

2. Hadders MA, Agromayor M, Obita T,  
Perisic O, Caballe A, Kloc M, Lamers MH,  
Williams RL, Martin-Serrano J.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Oct  
23;109(43):17424-9. 査読有り

〔学会発表〕(計 1件)

第1回生命分子科学研究会、2014年3月  
17日、北海道ホテルニセコ甘露の森、帯田  
孝之「古細菌の細胞分裂を担うESCRTタンパ  
ク質CdvAの構造基盤研究」

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phypha2/index-j.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

帯田 孝之 (OBITA TAKAYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・  
准教授  
研究者番号：30578696

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：