

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650020

研究課題名(和文) ボルトの立体構造情報を基盤としたナノカプセルの開発

研究課題名(英文) Development of structure-based Nanocapsule using vault particles.

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ボルトは78個のMVPが39回対称で配置することによって形成される樽型粒子で、粒子内部には大きな空間がある。本研究では、ボルト粒子の構造情報に基づいた新規ナノカプセルの開発を目指した。MVPのN末端にロイシンジッパーを付加することで安定化したLZ-ボルトの結晶は、SPring-8のBL44XUで2.8Å分解能の反射を示した。また本粒子は、溶液条件を変化させることでVPARP_INTを取り込んだ。

研究成果の概要(英文)：Vaults are large barrel-shaped ribonucleoprotein particles and are found in numerous eukaryotic species. A vault particle shell is composed of 78 MVP (Major Vault Protein) chains with 39-fold dihedral symmetry, and has a large cavity. In this study, I developed novel Nanocapsules using vault particles based on its structural information.

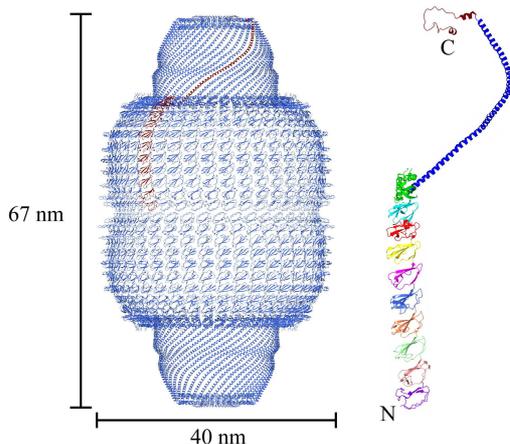
研究分野：蛋白質結晶学、構造生物学

キーワード：ボルト ナノカプセル X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

幅広い真核生物が持つ分子量約 1000 万の巨大粒子ボルトは、主成分である MVP (Major Vault Protein) が 78 個集まることで樽型中空の特徴的な基本骨格を形成する。本粒子は、強酸性条件下では卵を割るように半分に割れることが知られており、この特性を活かして pH 依存で粒子の開閉を制御することができるようなナノカプセルを開発することができれば、DDS (Drug Delivery System) などの新規材料としても期待できる。本研究では、X 線結晶構造解析による詳細な立体構造情報に基づいて新規ナノカプセルを開発することを目指した。

我々は、2009 年にラット肝臓から抽出したボルトの全立体構造を X 線結晶構造解析によって決定することに成功した (*Science* 323, 384-388 (2009))。その結果、ボルトは、これまでにない非常にユニークな形を持つことが明らかになった。ボルトは縦長の珍しい形をした MVP (Major Vault Protein) と呼ばれるタンパク質が 39 個集まってお椀型の半分のボルトを形成し、2 つの半分のボルトが、お椀の縁と縁を合わせるようにして (それぞれの N 末端を付き合わせるようにして) 会合することで、完全なボルト粒子を形成する (図 1)。しかし、向かい合った MVP 間の相互作用は N 末端 4 残基から成る分子間シートと 1 つのイオン結合のみと非常に弱く、粒子内部に物を詰め込むのに不向きであった。よって、我々は、MVP・N 末端にロイシンジッパーを導入することにより、2 つの半分のボルトがより強固に会合するのではないかと考え、昆虫細胞による大量発現系を構築した。その結果、非常に安定なボルト (以下、LZ ボルト



と呼ぶ) が野生型ボルトと比較して約 15 倍以上という高収量で得られるようになった (特願 2012-253031)。

図 1. ボルトと MVP の立体構造

2. 研究の目的

LZ-ボルトは、粒子のウェスト部位が安定していることから、高品質の結晶を得るためにも適した試料であり、既に SPring-8 の BL44XU での回折実験で最大で 2.8 分解能の回折点を得る事に成功している。よって、複数個の

結晶を用いて長時間露光によって収集した部分的な高分解能データを足し合わせる事で 2.8 分解能のフルデータセットを収集し、分子置換法によって構造決定する。構造情報からロイシンジッパーを含めた MVP 全体の分子間相互作用を原子レベルで明らかにし、LZ ボルトの詳細な立体構造を基盤として改変粒子を作成し、pH 依存で開閉制御が可能な新規ナノカプセルの開発を目指す。

3. 研究の方法

1) LZ ボルトの 2.8Å 分解能以上の構造決定を目指した研究

ボルトのウェスト部位をロイシンジッパーで固定した LZ ボルトの大量発現系では、昆虫細胞 1L 培養あたり約 80mg の安定で均一なボルトを得ることができ、精製条件や結晶化条件を幅広く検索することができた。これまでの研究で、LZ ボルトの良質な結晶が得られ、放射光施設 SPring-8 での回折実験で 2.8Å 分解能の回折点を得られていた。ボルトの様な巨大な蛋白質複合体の結晶は、放射線照射によるダメージが大きく、1 つの結晶でフルセットの回折強度データを収集することは不可能なので、複数個の結晶を用いて長時間露光による回折強度データを収集し、それらを 1 つにまとめることで 2.8Å 分解能以上の完全な回折強度データ収集を目指した。

2) 原子レベルの立体構造情報に基づいた改変粒子の作成と蛍光化合物の取り込み実験

LZ ボルトでは、ロイシンジッパーと MVP の間にグリシン 6 残基から成るリンカーを挿入している (図 2)。このリンカーを構成するアミノ酸の種類や数を調整することで、蛇腹のように伸縮する粒子を作成する。導入するアミノ酸側鎖や最適なリンカーの数は得られた構造情報をもとに検討した。

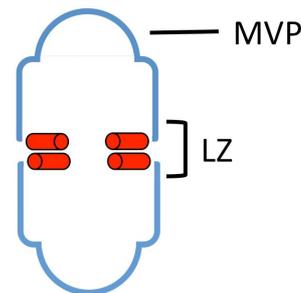


図 2. LZ ボルトの概略図

粒子内部に化合物等が内包できたかどうかは、蛍光化合物 (ローダミン) と蛍光タンパク質 (mCherry) を用いて行った。化合物取り込み量の変化を比較するため、野生型 MVP で形成される粒子 (W ボルト) と、LZ ボルトの両方を用いて実施した。まず、ボルトと蛍光物質 (もしくは蛍光タンパク質) の混合液を透析チューブに入れる。これを酸性条件下の蛍光物質溶液に対して透析した後、中性条件下で透析する。透析チューブ内の液をシヨ糖密度勾配遠心分離にかけると、ボルトに取り込まれた蛍光物質は 40-45%シヨ糖画

分に集まるので、この画分の蛍光強度を測定することで、粒子内部への蛍光物質の取り込み量を確認した。

4. 研究成果

1) LZ ボルトの 2.8Å 分解能以上での構造決定を目指した研究

野生型ボルトでは、2 つの半分のボルトが会合するウェスト部位の相互作用が弱く、粒子が不安定であったが、MVP の N 末端に LZ を導入したことにより非常に均一で安定な粒子を大量に得られるようになった(動的散乱測定の結果、粒子径の分散の幅は 10%以下であった)。本粒子を用いて結晶化することにより、SPring-8 の BL44XU での回折実験で最大で 2.8 分解能の回折点を得る事に成功し、この結晶を多数用いて長時間露光によって回折強度データを収集することで 4 分解能のフルセットデータを得た。目標とする 2.8 分解能の回折強度データ収集には至っていないが、今後より多くの結晶を用いてデータ収集することで高分解能回折強度データを得られる見通しが立った。

2) 原子レベルの立体構造情報に基づいた改変粒子の作成と蛍光化合物の取り込み実験

LZ と MVP の間に様々な長さのリンカーを持つ LZ ボルトについて、蛍光化合物ローダミンの粒子内への取り込み実験を行った。その結果、リンカーの長さに関係なくローダミンを取り込むことが分かった。また、粒子内部で MVP の repeat domain³⁻⁴ に結合する約 160 残基のタンパク質、V_{PARP}_INT についても溶液条件を変化させることで粒子内への取り込みが可能であることが確認された。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

1) Hideaki Tanaka, Toward a high resolution structure determination of the vault. International Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins, Seoul National University, Korea, December 4-5 2015 (invited talk).

2) Haruka Iwasaki, Yousuke Nishikawa, Momoko Inatomi, Hideaki Tanaka and Genji Kurisu. レジストリーの異なるダイニンストーク領域の二次構造解析、第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学角間キャンパス(石川県金沢市) 2015 年 9 月 13 日-15 日

3) 久保田(河合)寿子、武藤梨沙、Setif Pierre、Marc Nowaczyk、Matthias Rogner、池上貴久、田中秀明、栗栖源嗣、光化学系 I-

フェレドキシンの電子伝達複合体構造から読み解く電子伝達の動的メカニズム、第 15 回日本蛋白質科学会年会、あわぎんホール(徳島県徳島市) 2015 年 6 月 24 日-25 日

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-13 日

5) Risa Mutoh, Hisako Kubota-Kawai, Marc Nowaczyk, Matthias Rogner, Hideaki Tanaka, Takahisa Ikegami and 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、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 2014 年 9 月 24 日-27 日、

6) 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-3 日

7) 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 5.1 Å 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-29 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 1 件)

名称: Artificial Bioparticle and Method of Manufacturing the Same.

発明者: Hideaki Tanaka

権利者: JST

種類: 特許

番号: PCT/JP2013/080219

出願年月日: 2015 年 3 月 23 日

国内外の別: 国外(米国、ヨーロッパ、中国、韓国、台湾)

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.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