

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13201  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26840018  
研究課題名(和文)細胞膜の切断を担うESCRT複合体の構造基盤研究

研究課題名(英文)Structural basis of Archaeal ESCRT complex

## 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酵母や古細菌に存在するESCRT-IIIタンパク質について結晶化を行い、スルフォロブス属の古細菌に存在する新規ESCRT-II様タンパク質について、*S. acidocaldarius*由来と*S. solfataricus*由来のそれぞれで約1.6 および約1.7 の分解能で構造に成功した。その結果、どちらも基本フォールドはウイングドヘリックス構造を持っており、さらに二つのヘリックスが追加された構造をとっていることがわかった。また、この古細菌ESCRT-II様タンパク質が、DNAと結合することを新規に同定した。

研究成果の概要(英文)：We have determined the structure of two archaeal ESCRT-II like proteins, one is from *S. acidocaldarius* and the other is from *S. solfataricus*. Both proteins have winged-helix domain fold with additional two helices, but the structures are quite different from human ESCRT-II proteins. We have also showed that the archaeal ESCRT-II like proteins bound to DNA. These results show that ESCRT proteins may have unique roles in archaea.

研究分野：構造生物学

キーワード：細胞質分裂 ESCRT 構造生物学

## 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。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らのグループはin vitroの再構成実験を行い、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を提案している。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、その結果内腔に小胞が形成され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。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螺旋状に配置し、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、応募者らはこれまでに、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。この古細菌には、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。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、細胞質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複合体についても、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。また、これまでに古細菌には ESCRT-II 複合体は見つかっていなかったが、応募者らのグループは、その候補となり得る分子を同定している。これらの分子は、真核細胞の ESCRT-II 複合体と同様にウイングド・ヘリックスドメインを持つことが予想され、その相互作用ネットワークに興味を持たれる。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、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の解明を目的としている。

### 3. 研究の方法

#### ・ X線結晶構造解析

これまでに酵母 ESCRT-II&Vps20(ESCRT-III) 複合体について、結晶を得ることに成功している。また、Vps25&Vps20 複合体の結晶化も行っているが、現在までに得られている結晶は十分な大きさであるとはいえない。そこで、これらの結晶を最適化することをまず行う。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。そこで様々な位置にアスパラギン酸単変異を追加導入し、結晶化・構造解析を行う。同様に、Vps25(ESCRT-II)もまた、アスパラギン酸単変異を導入することで、溶解度を改良することに成功している。今後は、ESCRT-II、Vps25(ESCRT-II)、Vps20(ESCRT-III)のそれ

ぞれのコンストラクトに細かく改良を加えることで、より良い結晶を得ることを目指す。古細菌に新たに見ついている複数の ESCRT-II 分子について、結晶の最適化、初期的な反射データの取得を行う。まず、それぞれの ESCRT-II 分子の単独での構造決定を行い、その後 ESCRT-II 複合体での構造決定を行う予定である。また、これらの ESCRT-II 分子が、古細菌の他の ESCRT タンパク質とどのように相互作用するのも詳しく解析する予定である。

#### ・ 相互作用解析

得られた立体構造を基に、NMR や BIAcore、蛍光分光光度計等を用いて in vitro における相互作用解析を行う。800MHz の高磁場 NMR があり、それを用いることにより詳細な原子レベルでの相互作用解析を行うことが出来る。また、BIAcore を用いて、タンパク質をビオチン化して固定し、変異体等の相互作用解析を行う。また、タンパク質を Flash 蛍光色素で修飾することにより、非常に微量なサンプルで相互作用解析を行う。これらの様々な分光光度計を状況に応じて利用することで、解析を進めていく予定である。

### 4. 研究成果

酵母や古細菌に存在する 10 個の ESCRT-III タンパク質について、発現系作成・タンパク質精製・結晶化を行った。そのうち複数のコンストラクトで高純度で精製を行うことに成功したが、現在までに良好な結晶は得られていない。また、スルフォロブス属の古細菌に存在する新規 ESCRT-II 様タンパク質について、*S. acidocaldarius* 由来と *S. solfataricus* 由来のそれぞれで約 1.6 および約 1.7 の分解能で構造に成功した。その結果、どちらも基本フォールドはウイングドヘリックス構造を持っており、さらに二つのヘリックスが追加された構造をとっていることがわかった。結晶中において *S.*

*acidocaldarius* 由来 ESCRT-II 様タンパク質は二量体を、*S. solfataricus* 由来 ESCRT-II 様タンパク質は単量体構造をとっていた。ヒト ESCRT-II タンパク質複合体は、八量体構造をとり、それらとは全く似ていない構造であった。また、この古細菌 ESCRT-II 様タンパク質が、DNA と結合することを新規に同定した。古細菌の ESCRT 複合体オペロンの制御に関わっているのではないかと考えて、現在 DNA 認識の特異性についても研究を進めている。古細菌の ESCRT-II 様タンパク質が DNA と結合することは、ヒトの ESCRT 複合体のもつ機能とは全く異なるものであり、進化の過程で ESCRT-II タンパク質が新たな機能を獲得していったことを示しているのかもしれない。

#### 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 5 件)

1. Kojima R, Obita T, Onoue K, Mizuguchi M. J Mol Biol. 2016 Apr 10. [Epub ahead of print] 査読有り

2. Watanabe Y, Kawaguchi K, Okuyama N, Sugawara Y, Obita T, Mizuguchi M, Morita M, Imanaka T.

FEBS Lett. 2016 Jan;590(2):242-50. 査読有り

3. In silico and pharmacological screenings identify novel serine racemase inhibitors.

Mori H, Wada R, Li J, Ishimoto T, Mizuguchi M, Obita T, Gouda H, Hirono S, Toyooka N. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Aug 15;24(16):3732-5. 査読有り

4. Transient  $\alpha$ -helices in the disordered RPEL motifs of the serum response factor coactivator MKL1.

Mizuguchi M, Fujii T, Obita T, Ishikawa M, Tsuda M, Tabuchi A. Sci Rep. 2014 Jun 9;4:5224. 査読有り

5. Mutations in the PQBP1 gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15 kD.

Mizuguchi M, Obita T, Serita T, Kojima R, Nabeshima Y, Okazawa H. Nat Commun. 2014 Apr 30;5:3822. 査読有り

[学会発表](計 1 件)

第 2 回生命分子科学研究会、2015 年 3 月 14 日、北海道小樽朝里クラッセホテル、帯田孝之「Vps4 による ESCRT-III タンパク質の認識に関する研究」

[図書](計 1 件)

「Essential タンパク質科学」津本 浩平 (翻訳), 植田 正 (翻訳), 前仲 勝実 (翻訳) 南江堂 (第 6 章翻訳: 帯田孝之)、451 ページ

[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：