

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22121003

研究課題名（和文）小胞輸送の制御に関わる分子複合体群のX線結晶構造解析

研究課題名（英文）X-ray crystallography of molecular complexes regulating vesicular trafficking

研究代表者

深井 周也（Fukai, Shuya）

東京大学・放射光連携研究機構・准教授

研究者番号：10361792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 178,900,000円

研究成果の概要（和文）：真核細胞は脂質二重膜によって仕切られる様々な細胞小器官で構成される。そのため、細胞小器官や細胞膜への物質輸送は膜小胞を介して行われる。細胞の運動や形態変化、極性の形成などの「細胞の形と機能」に関わる多くのプロセスにおいて小胞輸送は必須な役割を担う。本研究では、小胞輸送の制御に関わる分子複合体群のX線結晶構造解析を行い、複雑かつ精密に制御された複合体構築の原理と機能メカニズムの解明を通して小胞輸送制御のメカニズムの一端を原子の精度で明らかにした。また、本研究を通じて得られた複合体研究の技術基盤を活用した共同研究を展開して、複合体によるその他の細胞機能制御機構の解明に役立てた。

研究成果の概要（英文）：Eukaryotic cells are composed of various organelles, which are compartmentalized by lipid bilayer. Therefore, transport between spatially separated organelles is mediated by membrane vesicles. Vesicular transports play critical roles in cellular processes including cell motility, deformation and polarization. In this research project, we revealed some of the regulatory mechanisms for vesicular transport at the atomic resolution level by X-ray crystallography of molecular complexes that are involved in vesicular transport. Moreover, technology platform that has been developed through this project was applied to collaborative researches to elucidate protein complex-mediated regulatory mechanisms for other cellular functions.

研究分野：構造生物学

キーワード：分子認識 シグナル伝達 タンパク質複合体 X線結晶構造解析 構造生物学 小胞輸送 低分子量GTPase

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞は、脂質二重膜によって仕切られる様々な細胞小器官で構成される。そのため、細胞小器官や細胞膜への物質輸送は膜小胞を介して行われる。小胞輸送によるタンパク質や脂質の適切かつ正確な配置は、細胞の運動や形態変化、極性の形成などの「細胞の形と機能」に関わる多くのプロセスにおいて決定的に重要な役割を果たす。この細胞の形と機能」の獲得において重要な役割を担う小胞輸送の制御に関わるさまざまな分子複合体群が知られているが、小胞と標的膜をつなぎとめる繫留因子複合体、一回膜貫通領域をC末端にもつ膜タンパク質(TAタンパク質)を小胞体膜に埋め込むGET複合体、細胞小器官の目印となる低分子量GTPase Rabの埋め込みに関わるとされるGDFタンパク質の立体構造はほとんど未決定であり、原子レベルで詳細な作動機構は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、繫留因子複合体 Exocyst, TAタンパク質の膜挿入複合体 GET, Rabの局在を制御することが示唆されているGDFのX線結晶構造解析を行い、複雑かつ精密に制御された複合体構築の原理と機能メカニズムの解明を通して小胞輸送制御のメカニズムを原子の精度で明らかにすることを目的とした。また、これらの研究を通じて得られる複合体研究の技術基盤を活用した共同研究を展開することで、複合体による様々な細胞機能制御機構の解明に役立てることを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、X線結晶構造解析により対象とする複合体(および複合体の構成タンパク質)の立体構造を決定することを目指した。結晶化と立体構造決定に成功した試料については、三次元構造情報に基づいて複合体を形成して機能するメカニズムを推測し、そのメカニズムを裏付けるための部位特異的変異体を作成して、表面プラズモン共鳴(SPR)分光測定、あるいは、蛍光標識した試料の蛍光偏向測定による相互作用解析を行った。SPR測定には、GEヘルスケア社のBiacore T200を、蛍光偏向測定にはパーキンエルマー社のマルチラベルプレートリーダーEnvisionを用いた。さらに、実際の細胞での機能に与える影響を調べることで、細胞レベルでの裏付けも行った。

結晶構造解析の具体的な手順は、以下の通りである。まず、大腸菌、昆虫細胞 Sf9 あるいはヒト培養細胞 FreeStyle293F でタンパク質試料を発現させる。発現したタンパク質試料を抽出・回収し、液体クロマトグラフィーシステム(GEヘルスケア社製 Akta Purifier および Akta Prime)により精製する。精製には、アフィニティーカラム、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを試料に応じた組み合わせ

で用いた。精製した試料を数 g/L から数十 g/L の濃度に濃縮し、微量自動結晶化装置(TTP LabTech 社製 Mosquito 2-way)を用いて約 500 種類の結晶化条件をスクリーニングした。結晶が生成した条件を最適化し、最適な条件下で成長した結晶を用いて、X線回折データセットを収集した。X線回折データセットの収集は、大型放射光施設 SPring8 および PF で行ない、プログラムパッケージ HKL2000 と CCP4 を用いてデータを処理した。位相決定は、プログラム MOLREP を用いて、構造既知のホモログ分子をサーチモデルとした分子置換法、または、セレノメチオニン置換体をもちいた異常分散法により行った。原子モデルの構築および修正にはプログラム COOT を用いた。構築した原子モデルをプログラム PHENIX または REFMAC5 を用いて精密化した。

### 4. 研究成果

#### (1) Exocyst 複合体

Exocyst 複合体は、開口放出における膜融合過程で、分泌小胞と細胞膜とを選択的に繋ぎ留め、融合特異性を保証し、融合効率を高める複合体全体の分子量は約 75 万で Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84 の 8 つの異なるサブユニットで構成される。本研究では、複合体全体の構造解析を第一の目標として、解析に適する試料調製方法を検討した。Exocyst 複合体サブユニットのいくつかは単独での発現が困難なため、パキユロウイルスに複数の遺伝子を導入して共発現させることの可能な MultiBac システムを利用して複合体全体を調製することを試みた。ショウジョウバエとマウスの遺伝子を組込んだ発現系を構築し、すべてのサブユニットが発現していることは確認できたが、質と量ともに構造解析に適する試料を得ることはできていない。サブユニット間での発現のばらつきが大きいと、さらなる工夫が必要で

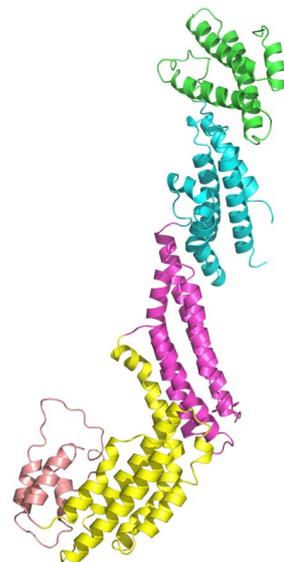


図1. M-Sec の結晶構造

ある。

複合体の試料調製を進めるのと並行して、各サブユニットの構造解析も進めた。N末端側の構造が未知である Sec6 サブユニットのホモログである M-Sec の結晶構造を 3.0 Å 分解能で決定した(図 1)。M-Sec は Exocyst 複合体と共に tunneling nanotube (TNT) と呼ばれる細胞同士を物理的につなげる細いチューブ状の細胞構造の形成を誘導する。M-Sec の N 末端領域はディスオーダーにより電子密度を確認できなかったが、特徴的に保存された塩基性アミノ酸残基のクラスターが脂質との結合に関与すると予測し、実際に phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) や phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate に *in vitro* で結合することを明らかにした。さらに、TNT に局在するイノシトールリン脂質を調べた結果、PI(4,5)P<sub>2</sub> が集積していることから、細胞内においては、M-Sec は PI(4,5)P<sub>2</sub> と特異的に結合して細胞膜に局在すると結論づけた。一方、M-Sec の C 末端側のドメインにも保存された塩基性残基が集まっている領域が見つかった。N 末端領域とは異なり、C 末端側ドメインの塩基性残基は脂質との相互作用には関与していなかったが、変異によって TNT 形成に必要な Ral-Exocyst 複合体との相互作用が失われ、TNT 形成誘導能が消失した。最終的に、M-Sec は N 末端領域で PI(4,5)P<sub>2</sub> と相互作用することで細胞膜に局在し、さらに、C 末端側のドメインで Ral-Exocyst 複合体をリクルートすることで TNT 形成を誘導するという機能モデルを提唱した(論文改訂中)。また、構造未知である Sec10 サブユニットについて、変異を導入することで結晶を改良し、4.0 Å 分解能の回折データを収集した。相互作用する低分子量 GTPase との複合体の結晶化も行った。

## (2) GET 複合体

GET 複合体は、3 つのサブユニット (GET1-3) で構成される複合体で、SNARE タンパク質などの C 末端に一回膜貫通ヘリックスをもつ膜タンパク質 (Tail-anchored proteins; TA タンパク質) と選択的に結合し、ATP の加水分解を伴って小胞体膜に挿入する ATPase である GET3 が TA タンパク質と結合し、小胞体膜上に存在する GET1-GET2 複合体と相互作用して、TA タンパク質を膜に埋め込む。そのメカニズムを明らかにすることを目的として、まず、ADP 結合型およびヌクレオチド非結合型 GET3 の結晶構造を 3.0 Å および 2.8 Å 分解能で決定した (Yamagata *et al.*, *Genes Cells*, 2010)。GET3 は、ヌクレオチド結合ドメインとヘリカルドメインで構成され、ADP 結合型、ヌクレオチド非結合型共に、亜鉛イオンを介した head-to-head のホモ二量体を形成し、開状態の構造をしていた。架橋実験により閉状態に構造変化することで ATP の加水分解が起きることを示した。また、ATP の加水分解は TA タンパク質の解離

と連動していると予測した。さらに、モデル TA タンパク質 Sec22 の TMD との共発現に基づいた結合実験によって、GET3 のヘリカルドメインと Sec22 の TMD が直接相互作用することを示した。

次に、ADP が結合した GET3 と GET1 の細胞質ドメインとの複合体の開状態および半開状態の結晶構造を、それぞれ 3.0 および 4.5 Å 分解能で決定した(図 2) (Yamagata *et al.*, *J.*

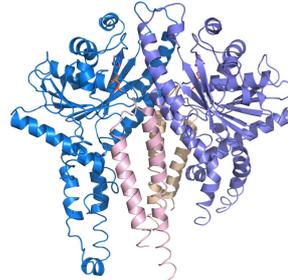


図 2 . GET1-GET3 複合体の結晶構造

*Mol. Biol.*, 2012)。結晶構造と生化学的な解析は、GET1 が二つのインターフェースを介して GET3 の開状態を安定化することを示唆していた。一つのインターフェースが GET1 と GET3 との結合に十分であること、また、もう一つのインターフェースが GET3 の開状態を安定化することを提案した。また、GET 複合体による TA タンパク質の膜埋め込み経路において、TA タンパク質の品質管理の役割を担う共シャペロンタンパク質である Bag6 の TA タンパク質結合領域を同定し、その結晶構造を決定した(論文準備中)。

## (3) GDF タンパク質

低分子量 GTPase の Rab ファミリーは、C 末端のプレニル化によって膜に固定され、各アイソフォームは、特定のオルガネラの特定の領域に局在し、輸送されてきた小胞と標的オルガネラとの融合を制御する。GDF タンパク質は、細胞質中でグアニンヌクレオチド解離阻害因子 (GDI) との複合体として存在する Rab を GDI から解離させ、特定のオルガネラ膜に固定する役割を担う。最近では、この役割を Rab の活性化因子であるヌクレオチド交換因子 (GEF) が担うとする説が有力になりつつあるが、確定には至っていない。本研究では、GDF としての役割が予想されている Yip/Pral ファミリーの構造決定により、GDF あるいはそれ以外の機能を明確にすることを目的として結晶化を行った。いくつかの Yip/Pral ファミリータンパク質で結晶を得ることができた。しかしながら、Rab や抗体の Fab 断片との複合体も含む結晶の改善の試みにも関わらず、構造決定に必要な分解能の結晶を作成することができなかった。

## (4) シナプス関連タンパク質など

公募班の植村(信州大)との共同研究により、シナプスを誘導する膜受容体様接着分子複合体の結晶構造を決定した (Yamagata *et al.*,

Nat. Commun., 2015; Sci. Rep., 2015). また, コピキチンシグナルに関連して, コピキチンとの複合体の構造機能解析を行った (Sato *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2011; Sato *et al.*, Nat. Struct. Mol. Biol., 2015 など).

#### 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 11 件)

Yamagata, A., Sato, Y., Goto-Ito, S., Uemura, T., Maeda, A., Shiroshima, T., Yoshida, T. and Fukai, S. “Structure of Slitrk2-PTP $\delta$  complex reveals mechanisms for splicing-dependent *trans*-synaptic adhesion”, *Sci. Rep.*, **5**, 9686 (2015), 査読有, doi: 10.1038/srep09686

Yamagata, A., \*Yoshida, T., Sato, Y., Goto-Ito, S., Uemura, T., Maeda, A., Shiroshima, T., Iwasawa-Okamoto, S., Mori, H., Mishina, M. and Fukai, S. “Mechanisms of splicing-dependent *trans*-synaptic adhesion by PTP $\delta$ -IL1RAPL1/IL-1RAcP for synaptic differentiation”, *Nat. Commun.*, **6**, 6926 (2015), 査読有, doi: 10.1038/ncomms7926

Sato, Y., Goto, E., Shibata, Y., Kubota, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Kubota, K., Inoue, J., Takekawa, M., Tokunaga, F. and Fukai, S. “Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 222-229 (2015), 査読有, doi: 10.1038/nsmb.2970

Kubota, K., Yamagata, A., Sato, Y., Goto-Ito, S. and Fukai, S. “Get1 stabilizes an open dimer conformation of Get3 ATPase by binding two distinct interfaces” *J. Mol. Biol.*, **422**, 366-375 (2012), 査読有, doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.045

Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D.G., Kohno, T., Maturana, A.D., Ito, K. and Nureki, O. “Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export.”, *Nature*, **474**, 235-238 (2011), 査読有, doi: 10.1038/nature09980

Sato, Y., Fujita, H., Yoshikawa, A.,

Yamashita, M., Yamagata, A., Kaiser, S. E., Iwai, K., Fukai, S. “Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 20520-20525 (2011), 査読有, doi: 10.1073/pnas.1109088108

Yamagata, A., Mimura, H., Sato, Y., Yamashita, M., Yoshikawa, A. and Fukai, S. “Structural insight into the membrane insertion of tail-anchored proteins by Get3.”, *Genes Cells*, **15**, 29-41 (2010), 査読有, doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01362.x

##### [学会発表](計 10 件)

深井周也, 「マルチサブユニット繫留因子複合体の全体構造決定へのアプローチ」, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜(横浜市)

深井周也, 「コピキチン鎖による炎症シグナル制御の構造基盤」, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 15 日, 国立京都国際会館(京都市)

深井周也, 「中程度の分解能での結晶構造解析」, 第 14 回日本蛋白質科学会年会 2014 年 6 月 27 日, ワークピア横浜(横浜市)

Fukai, S., “Structural basis for selective cleavage of M1- and K63-linked polyubiquitin chains by a CYLD deubiquitinase”, Cold Spring Harbor Laboratory 2013 meeting - The Ubiquitin Family, 2013 年 5 月 14 日, Cold Spring Harbor (米国)

Fukai, S., “Structural basis of ubiquitin chain recognition by NZF domains for NF- $\kappa$ B activation”, TNF2011 (第 13 回国際 TNF 会議), 2011 年 5 月 18 日, 淡路夢舞台国際会議場(淡路市)

深井周也, 「繫留複合体による膜融合制御の構造基盤」, BMB2010, 2010 年 12 月 10 日, 神戸ポートピアアイランド(神戸市)

##### [図書](計 2 件)

深井周也, 植村 健, 吉田 知之 実験医学, 32 巻(10号)「シナプス形成を誘導する膜受容体の機能と構造」, 92-97 頁, 2014 年

##### [その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深井 周也 (FUKAI SHUYA)  
東京大学・放射光連携研究機構・准教授  
研究者番号：10361792

(2) 連携研究者

山形 敦史 (ATSUSHI YAMAGATA)  
東京大学・放射光連携研究機構・助教  
研究者番号：20463903

(3) 連携研究者

佐藤 裕介 (SATO YUSUKE)  
東京大学・放射光連携研究機構・助教  
研究者番号：50568061