

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21227003

研究課題名(和文) X線結晶構造解析による細胞内及び細胞間での物質輸送の研究

研究課題名(英文) X-ray crystallographic studies of intr- and inter-cellular transport

研究代表者

月原 富武 (Tsukihara, Tomitake)

兵庫県立大学・生命科学研究科・特任教授

研究者番号：00032277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 184,900,000円、(間接経費) 55,470,000円

研究成果の概要(和文)：高度に制御された輸送に関わる3種の複合体の構造決定を行った。イクスポーテイン-5:ランGTP:pre-miRNA複合体、イクスポーテイン-5:ランGTP複合体及びイクスポーテイン-5の構造解析によって数百種あるpre-miRNAを他の小さなRNAと区別して核外に輸送する仕組みを解明した。ラット肝臓のボルトに続いて発現系で得たMVP-ボルトが39回対称を持つ事を決定し、長年提唱されて来た48回対称の可能性を完全に排除した。コネキシン26ギャップ結合チャンネルの構造に基づいたホモロジーモデリングと機能解析によって、異なったヘミチャンネルが結合してチャンネルを形成する際の選択性を決める要因を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Three kinds of structural research relating to the transportation were carried out. The first is the nuclear export mechanism of pre-miRNA. The second is structural study of vault that carries materials in the cell. The third is structural-functional studies of gap junction channels. Structures of Exportin-5:RanGTP:Pre-miRNA complex, Exportin-5:RanGTP complex and Exportin-5 were determined at respective 2.9, 3.0 and 3.5 Å resolutions. Comparing structures of exportin-5s in three different states and analyzing interactions between Pre-miRNA and Exportin-5, we elucidated Pre-miRNA transportation mechanism by Exportin-5:RanGTP complex. We have determined the 39-fold symmetry for the MVP-vault in addition to the vault from rat liver. Consequently, the 39-fold symmetry of vault was confirmed. We elucidated docking selectivity rules for hemichannel pairs by homology modeling based on the connexin-26 gap junction channel and functional analyses.

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：X線結晶解析 膜蛋白質 蛋白質 超分子 輸送

1. 研究開始当初の背景

高等な生物では、特定の分子を働くべき場所に輸送する仕組みがあり、そのことによって様々な生命現象が高度に制御されている。我々は核と細胞質間、核近傍と脂質ラフト間、細胞間の輸送に関わるタンパク質の構造に基づいた輸送機構の研究を行って来た。

(1) 核と細胞質間輸送では、我々はインポーターβ：転写因子複合体のX線結晶構造解析によって、細胞質から核内へ転写因子を輸送する際のインポーターβによる転写因子を認識する仕組みを明らかにした。

(2) ボルトは分子量 1000 万の分子で、核近傍と脂質ラフト間輸送に関わると考えられている。この巨大な分子の構造を 3.5 Å 分解能で決定した。その構造はそれまで提唱されていた 48 回対称ではなく 39 回対称であった。そのためボルトの発見者等長年ボルトの研究を行って来た研究者から、蛋白質精製の過程で夾雑物を捉えたのではないかと疑問が出されていた。また 3.5 Å という分解能の制約のために一部の領域でアミノ酸側鎖は未同定であった。

(3) コネキシン 26 (Cx26) ギャップ結合チャンネルを 3.5 Å 分解能で構造決定した。この構造は細胞間を連結する最初の構造であり、Cx6 量体が頭を突き合わせて 12 量体を形成していた。Cx は 4 本の膜貫通ヘリックスと N 末端ヘリックスからなる構造であった。従来提唱されていた構造とは異なった構造であり、N 末端ヘリックスがチャンネルの開閉に関わるという新しい説を提唱した。

2. 研究の目的

輸送に関わる 3 種のタンパク質複合体の X 線結晶構造解析を行って輸送の仕組みを解明することが共通した目的であり、それぞれの具体的な目的は以下の通りである。

(1) 細胞質で RNA 干渉に関わる miRNA は、核内で Pri-miRNA として合成されて、RNA 分解酵素によって分解されて小さい Pre-miRNA になる。Pre-miRNA は数百種存在する。イクスポーター 5：ラン GTP 複合体は、それらを他の RNA と区別して選択的に捕獲して細胞質に輸送する。細胞質では RNA 分解酵素 Dicer によって分解されて miRNA になって RNA 干渉に関わる。イクスポーター 5：ラン GTP：Pre-miRNA 複合体、イクスポーター 5：ラン GTP 複合体及びイクスポーター 5 の X 線結晶構造解析を行って、Pre-miRNA の核外輸送の仕組みを解明する。

(2) ボルトの C 末端領域にはアミノ酸側鎖が同定されていない領域が有り、これらの領域の構造を確定するために分解能を向上させた構造解析を行う。それとともに主成分である MVP を発現系で調製して、再構成して 39 回対称の構造が形成される事を確認する。

(3) Cx26 は難聴や皮膚病等の遺伝病に関係する変異体が多く有る。これらの病気の原因を明らかにするためにより高い分解能

で構造解析を行う。Cx26 ギャップ結合チャンネルの構造に基づいて、他の Cx ギャップ結合チャンネルや変異体のギャップ結合チャンネルの構造予測を行い、機能研究と合わせてチャンネルの形成機構を解明する。

3. 研究の方法

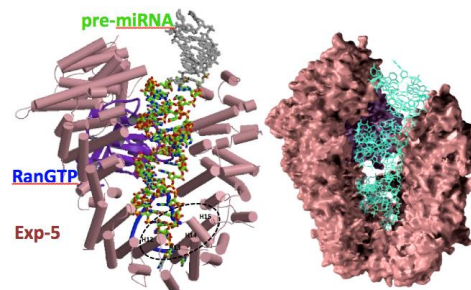
(1) イクスポートイン 5、ラン GTP、Pre-miRNA それぞれを別々に調製し、それらを混ぜ合わせてイクスポーター 5：ラン GTP：Pre-miRNA 複合体、イクスポーター 5：ラン GTP 複合体の結晶化を行った。イクスポーター 5 単独でも結晶化した。最初に 3 者複合体の構造決定を重原子同型置換法によって行い、その構造を用いて 2 者複合体及びイクスポーター 5 単独の構造決定を行った。

(2) ボルトの高分解能の構造を得るために、昆虫細胞を利用した発現系で MVP を大量発現・精製・結晶化を行い、MVP ボルトの対称性を決定した。既に得られているラット肝臓由来の結晶の 3.5 Å 分解能の回折強度データに基づいて、別のグループによって高分解能で解析された 2 つの N 末ドメインの構造を利用して構造の精密化を行った。

(3) Cx26 ギャップ結合チャンネルの高分解能の構造を得るために新たに発現系を構築して、結晶化を行った。3.5 Å 分解能の構造を利用してホモロジーモデリングによって種々のギャップ結合チャンネルの予測構造を構築して、電気生理学的研究と合わせて、チャンネルの働きや構造形成の仕組みを解明した。

4. 研究成果

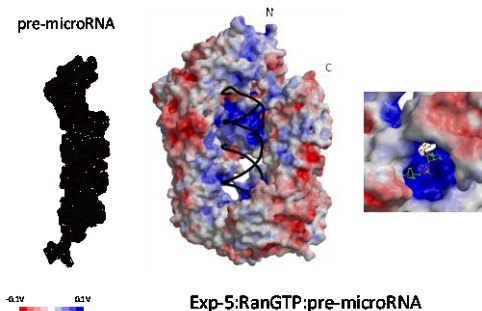
(1) Pre-miRNA の核外輸送機構、イクスポーター 5：ラン GTP：Pre-miRNA 複合体、イクスポーター 5：ラン GTP 複合体及びイクスポーター 5 の X 線結晶構造解析をそれぞれ 2.9 Å、3.0 Å、3.5 Å 分解能で行った。第 1 図は 3 者複合体の構造である。イクスポ



第 1 図 Exp-5:RanGTP:Pre-miRNA

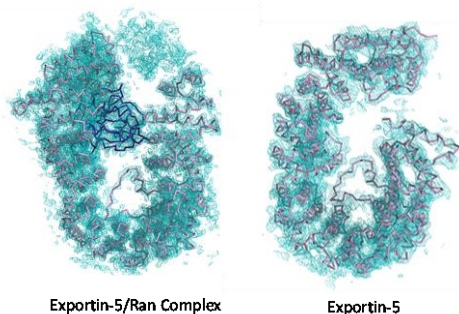
ーター 5：ラン GTP 複合体は野球のファーストミットのような構造をしており、ミットの内側に Pre-miRNA を包み込むようにして捉えている。この 3 者複合体の構造によって核内において無数にある小さな non-coding RNA

のうち数 100 種ある Pre-miRNA が特異的に認識・捕獲される仕組みが明らかになった。静電ポテンシャルを計算すると、ミットの内側は正に帯電している。負に帯電している Pre-miRNA の 2 重ラセン領域を包み込んでいるが、強固なイオン対形成は見られない。塩基対を形成していない 3' 末端の 2 塩基は、



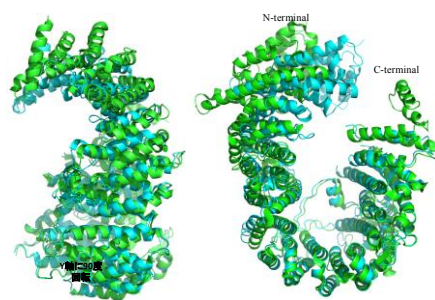
第 2 図 分子表面の静電ポテンシャル

ミットのそこにあるトンネルの中に入り込んでアミノ酸残基と水素結合やイオン対を形成して、イクスポーティン-5 に強固に結合している (第 2 図)。一方 5' 末端が 2 重ラセン構造を取っていない RNA がトンネル内に入ることができるかどうかを RNA のモデル構造を複合体構造に当てはめて検証したとこ



第 3 図
2 者複合体 (左) と単独 (右) の構造

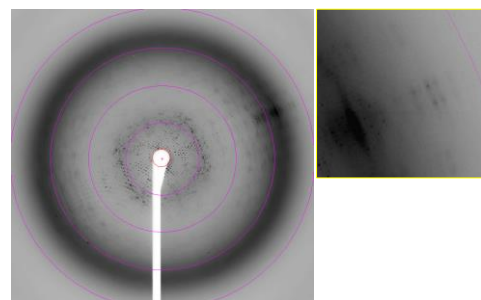
ろ、挿入できない事が明らかになった。第 3 図は 2 者複合体とイクスポーティン-5 単独の電子密度とそれらに重ねた構造である。2 者複合体の構造は 3 者複合体中の構造と変



第 4 図
2 者複合体中 (緑) と単独 (水色) の構造

わりない。イクスポーティン-5 単独の構造は N 末端側がミットを閉じる方法にシフトして、よりコンパクトな構造になっている (第 4 図)。即ち、ラン GTP が結合する事によってミットが開いて RNA を受け入れる事の出来る構造になる。

(2) ボルト. フレキシブルな MVP・N 末端に酵母 GCN4 由来のロイシンジッパー (LZ) を付加することで、39 量体間の結合を強固にした。そのことによって安定で均一なボルト粒子 (LZ-ボルト) を高収量で得る事が可能になった。LZ-ボルトの発現量は、野生型と比較して約 15 倍以上 (昆虫細胞 1L 培養あたり 80mg) と大幅に増加した。MVP の N 末端と LZ の間に 1~6 残基のグリシンリンカーを挿入したところ、グリシン残基が 3 個以上 (特に 6 個) で、より均一な粒子が大量に得られることが分かった。発現系で得られた LZ-ボルトの結晶の対称性をラット肝臓のボルトの構造解析と同様な方法で決定したところ、ラット肝臓のものと同じ 39 回対称であった。この事によって、長年信じられて来た電子顕微鏡観察に基づいた 48 回対称の可能性は完全に無くなり、ようやく 39 回対称が定着した。本年 3 月には、この 39 回対称構造がタンパク質結晶学の専門誌 Acta Crystallographica D の表紙になった。LZ-ボルトの Cryo-EM マップは、粒子ウェスト部位くびれが明瞭になり、その内側に固く結ばれたロイシンジッパーと思われる構造も見えて来た。MVP・N 末端をロイシンジッパーで固定できたことで、より良質の結晶作成が期待できる。目視で 2.9 Å 分解能の反射を確認できるところまで向上して来た (第 5 図)。



第 5 図 MVP ボルトの結晶の回折像

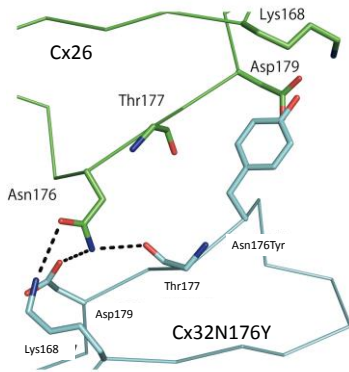
(3) ギャップ結合チャネル (その 1) . 3.5 Å 分解能で構造決定したヒト由来の Cx26 ギャップ結合チャネルの構造は 4 本の膜貫通ヘリックス、2 つの細胞外ループと短い N 末端ヘリックスで構成されている。我々はこの構造は、21 種のヒト Cx ギャップ結合チャネルに共通した構造であると主張している。この考えに基づいてホモロジーモデリングを行ってヘミチャネル間の結合について検討した。2 つのヘミチャネルが互いに違った Cx によって構成されているものをヘテロタイプックチャネルという。ホモロジーモデリングによってチャネル形成が可能な Cx の分類する事が出来た (第 1 表)。Cx26

と Cx32 はヘテロタイプックチャンネルとして

Cxs	26	30	32	46	50	30.3	37	40	43	45
26	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
30		+	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
32			+	+	+	-	-	-	-	-
46				+	+	(-)	(-)	-	-	(-)
50					+	(-)	(-)	-	-	(-)
30.3						+	+	+	+	+
37							+	+	+	+
40								+	+	+
43									+	+
45										+

第 1 表 ホモロジーモデリングによるチャンネル形成の可能性と実験結果

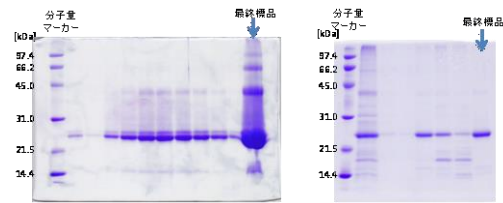
機能するが、細胞外ループにある Cx32 の Asn175 を Tyr に変換するとチャンネルの機能を失う。ホモロジーモデリングによると Cx32 の Tyr175 が Cx26 の Lys168 及び Asp179 の側鎖との間で立体障害を起こす (第 6 図)。そのためにチャンネルを形成されない。遺伝病に



第 6 図 Cx26:Cx32N176Y の予測構造

関わる変異体には、細胞外ループの 168, 175, 179 番目のアミノ酸に関わるものが多く、それらはチャンネル形成が阻害される。そこでホモロジーモデリングによって立体障害を取り除く変異体を予測して、その変異体を使ってチャンネル形成能を回復させる事が出来た。遺伝病の治療戦略の一つの指針を示す事が出来た。

(4) ギャップ結合チャンネル (その 2) . これまで結晶化に成功した Cx ギャップ結合チャンネルは Cx26 ギャップ結合チャンネルのみである。しかし、この構造も分解能が 3.5 Å と低く、チャンネルの働きの仕組みの理解を深めるためにはより高い分解能の構造が不可欠である。これまでの最終標品には分子量がわずかに大きい夾雑物が残っている。この事が分解能の向上を妨げていると考えられるので、Cx26 の開始メチオニンの上流の塩基配列を改変して分子量が揃った Cx26 が発現される系を構築した (第 7 図)。良形の結晶も得られて、回折実験のための凍結条件を検討している。Cx26 ギャップ結合チャンネルの 3.5 Å 分解能の構造解析では、細胞内ループと C 末端ループの構造を決める事が出来ていない。一方、低角側の R 値が極めて悪い。このことは構造未同定の領域は揺らぎは大きいが一定の構造を持っている事を強く示唆してい



元のコンストラクト(左)と新しいコンストラクト(右)を用いて調製したCx26ギャップ結合チャンネルのSDS-page

第 7 図 新 (左) 旧 (右) のコンストラクトによる標品の SDS-PAGE

る。動力的シミュレーションを導入した構造精密化の方法を考案して、揺らぎの大きい領域の構造決定を行っている。

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 22 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, 2013 1054-1061 doi: 10.1107/S0907444913004472. 査読有
- ② Gong, X. Q., Nakagawa, S., Tsukihara, T. and Bai, D. A gap junction docking mechanism revealed by functional rescue of a human disease-linked connexin mutant. *J Cell Sci* 126, (2013)3113-3120 doi:10.1242/jcs.123430 査読有
- ③ Tanaka H, Tsukihara T. Structural studies of large nucleoprotein particles, vaults. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012, 88, 416-33. 査読有
- ④ Xin L, Nakagawa S, Tsukihara T, Bai D. Aspartic Acid Residue D3 Critically Determines Cx50 Gap Junction Channel Transjunctional Voltage-Dependent Gating and Unitary Conductance. *Biophysical Journal* 2012, 102, 1022-1031 DOI:10.1016/j.bpj. 査読有
- ⑤ Nakagawa S, Gong XQ, Maeda S, Dong Y, Misumi Y, Tsukihara T, Bai D. Asparagine175 of connexin32 is a critical residue for docking and forming functional heterotypic gap junction channels with connexin26. *J Biol Chem.* 286 2011 286, 19672-19681 DOI:10.1074/jbc.M110.204958 査読有
- ⑥ Maeda S, Tsukihara T. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell Mol Life Sci.* 68 2011, 1115-29 DOI:10.1007/s00018-010-0551-z 査読有

- ⑦ Lee SJ, Jiko C, Yamashita E, Tsukihara T. Selective nuclear export mechanism of small RNAs. *Curr Opin Struct Biol* ,21, 101-8
DOI:10.1016/j.sbi.2010.11.004 査読有
- ⑧ Lee SJ, Jiko C, Yamashita E, Tsukihara T. Selective nuclear export mechanism of small RNAs. *Current Opinion in Structural Biology* 21 2011, 101-108
doi:10.1016/j.sbi.2010.11.004. 査読有
- ⑨ Nakagawa S1, Maeda S, Tsukihara T. Structural and functional studies of gap junction channels. *Current Opinion in Structural Biology* 20 2011, 423-430 doi: 10.1016/j.sbi.2010.05.003. 査読有
- ⑩ Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T. A high resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* 32 2009, 1275-1279
doi: 10.1126/science.1178705. 査読有

[学会発表] (計 73 件)

- ① 複雑さと精緻さを追求する構造生命科学/Structural life science (招待講演) 月原 富武 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
- ② X線結晶構造解析による生体超分子の構造形成と作動機構の研究 月原富武 2012年度 内藤記念科学振興財団 贈呈式 日本工業倶楽部(東京都千代田区) 2013年3月19日
- ③ Structure, functions and structural organization of gap junction channels (招待講演) Tomitake Tsukihara Nagoya Symposium *Frontiers in Structural Physiology* 名古屋大学 豊田講堂 (愛知県名古屋市) 2013年 1月22日-24日、発表日:1月22日
- ④ Attempt to study structural analysis of disordered region using the low resolution data Kiyohito Kihira, Jiyoung Kang, Shoji Maeda, So Nakagawa, Yuko Misumi, Michihiro Suga, Eiki Yamashita, Masaru Tateno, Tomitake Tsukihara AsCA12/ CRYSTAL28 Adelaide Convention Centre, Adelaide, Australia, December 2-6, 2012
- ⑤ Structural organization of gap junction channels So Nakagawa, X. Q. Gong, Shoji Maeda, Yuko Misumi, Kiyohito Kihira, Donglin Bai and Tomitake Tsukihara AsCA12/ CRYSTAL28 Adelaide Convention Centre, Adelaide, Australia 2-6 December, 2012
- ⑥ Structure and Functions of Gap Junction Channels (招待講演) Tomitake Tsukihara 2012 Proceedings of Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea Leadership of Pharmaceutical Scientists for Human Prosperity AW Convention Center, Seoul Korea October 23-24, 2012 発表日 10月23日
- ⑦ Structural Studies of Macromolecular Assemblies Playing Roles in Transportation Assemblies (招待講演) Tomitake Tsukihara XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2011) PALACIO MUNICIPAL DE CONGRESOS Madrid, Spain August 22-30, 2011 発表日: 8月23日
- ⑧ Structural studies of connexin-26 gap junction channel (招待講演) Tomitake Tsukihara 36th FEBS CONGRESS, Lingotto Conference Centre, Torino Italy June 25-30, 2011 発表日: 6月26日
- ⑨ ギャップ結合チャネルの構造とその働き (特別講演) 月原富武 日本生化学会北陸支部 第29回大会 2011年5月28日 金沢大学 角間キャンパス (石川県金沢市)
- ⑩ Structure and functions of the gap junction channel (招待講演) Tomitake Tsukihara Cold Spring Harbor Conferences Asia, Membrane Proteins: Structure and Function the Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou China May 16-20, 2011 発表日: 5月18日
- ⑪ The mechanisms of self-assembly of the vault:the largest cytoplasmic ribonucleoprotein complex. 田中秀明 Pacificchem 2010 2010年12月17日 Hawaii Convention Center Hawaii USA
- ⑫ 生体超分子の構造と機能の解明 月原富武 日本結晶学会 60周年記念 (特別講演) 大阪大学コンベンションセンター MO ホール (大阪府吹田市) 2010年12月4日
- ⑬ The structure of rat liver vault at 3.5 Å resolution. 加藤公児 The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association Bexco, Busan, Korea 2010年10月31日-11月3日
- ⑭ X-ray crystal structure of rat vault, a large nucleoprotein complex at 3.5 Å resolution. 田中秀明 (招待講演) Proceedings of the International Symposium on New Drug Development Chungbuk National University, Chungcheongbuk-do Korea Nov. 18, 2010

- ⑮ タンパク質合成を抑制する小さなRNAを輸送する仕組みの解明 山下栄樹
第2回SPring-8合同コンファレンス(招待講演)東京ステーションコンファレンス(東京都千代田区)2010年11月4日
- ⑯ Structure and function of Connexin26 gap junction channel Tomitake Tsukihara Gordon Research Conferences, Ligand Recognition & Molecular Gating. Il Ciocco Hotel and Resort, Lucca, Barga Italy May 18, 2010
- ⑰ Structure and function of gap junction channels Shoji Maeda Gordon Research Conferences, Ligand Recognition & Molecular Gating Il Ciocco Hotel and Resort, Lucca (Barga), Italy May 16-21, 2010
- ⑱ Structure of the Gap Junction Channel and its Implications on its Biological Functions. Tomitake Tsukihara EMBO Conference Series, Catalytic mechanisms by biological systems: at the interface between chemistry and biology EMBL Hamburg, Germany May 5, 2010
- ⑲ Structural insight into heterotypic channel compatibility among connexins by homology modeling So Nakagawa International gap junction conference Sedona, Arizona USA July 25-30, 2009
- ⑳ Structure of human gap junction channel International Gap Junction Conference 2009 Shoji Maeda Sedona, Arizona USA July 25-30, 2009
- ㉑ The structure of rat liver vault Tomitake Tsukihara AsCA '09 Joint conference of the Asian crystallographic society and Chinese crystallography society Jingyi Hotel, Beijing, China Oct. 22-25, 2009
- ㉒ The structure of human connexin 26 gap junction channel Shoji Maeda AsCA '09 Joint conference of the Asian crystallographic society and Chinese crystallography society Jingyi Hotel, Beijing, China Oct. 22-25, 2009

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

<WEB>

- ① 月原研究室ホームページ
http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/GCOE/japanese/pico_intro/tsukihara/index.html
- ② 平成23年度ターゲットタンパク研究プ

ログラム公開シンポジウム講演公開
2012年3月12日:

<http://youtu.be/6bxAhPQ7m24>

- ③ ボルトに関する研究紹介:
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/olabb/tsukihara/mvp/index.html>

<新聞掲載>

- ① 朝日新聞(朝刊)2010年6月1日「波」
①たんぱく質 命を支える精緻な構造
- ② 朝日新聞(朝刊)2010年6月8日「波」
②たんぱく質 結晶作り 難しいけど感動的
- ③ 朝日新聞(朝刊)2010年6月15日「波」
③たんぱく質 X線照射 構造解明コツコツと
- ④ 朝日新聞(朝刊)2010年6月22日「波」
④たんぱく質 エネルギー作る「要」見つけた
- ⑤ 神戸新聞(朝刊)2009年11月27日「RNA捕捉の仕組み解明」
- ⑥ 読売新聞(夕刊)2009年11月28日「タンパク質抑制のRNA・ミットでキャッチ」
読売新聞
- ⑦ 日刊工業新聞 2009年11月27日「MiRNA輸送過程解明」
- ⑧ 日経産業新聞 2009年11月27日「核外輸送仕組み解明」

<公開行事>

- ① 平成23年度ターゲットタンパク研究プログラム公開シンポジウム ターゲットタンパク研究プログラムから見える未来5月原富武 2012年3月12日学術総合センター(東京都千代田区)参加者数:約500名
- ② タンパク質の構造研究ひとすじ45年月原富武 大阪・愛媛クラブ2月例会2011年2月8日 リーガロイヤルホテル(大阪市北区)参加者数:30名
- ③ 大阪府立豊中高等学校(スーパーサイエンスハイスクールSSH)講義 月原富武「Spring-8の研究への応用」2010年12月23日(大阪府豊中市)参加生徒:約40名

6. 研究組織

(1) 研究代表者

月原 富武 (TSUKIHARA, Tomitake)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任教授

研究者番号: 00032277

(2) 研究分担者

山下 栄樹 (YAMASHITA, Eiki)
大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号: 00294132

(3) 研究分担者

田中 秀明 (TANAKA, Hideaki)
大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号: 40346169