

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21687012

研究課題名（和文）自然免疫反応に関与する分子量 1000 万の巨大粒子ボルトの構造生物学的研究

研究課題名（英文）X-ray structural analysis of the vault with a molecular weight of 10 MDa.

研究代表者

田中 秀明 (TANAKA HIDEAKI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：40346169

研究成果の概要（和文）：ラット肝臓から抽出したボルト、昆虫細胞で大量発現した MVP のみで構成されるボルトの両方について良質な結晶を得ることに成功し、SPRing-8 の BL44XU での X 線回折実験において 2.8 Å 分解能の回折点を得ることに成功しました。今後、結晶の凍結条件や回折実験条件をより最適化することで、高分解能回折強度データ収集ができる見通しが立ちました。

研究成果の概要（英文）：I have obtained high quality crystals of the vault which diffracted x-rays at 2.8 Å resolution on beam line BL44XU at the SPRing-8.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	21,300,000	6,390,000	27,690,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ボルト、X 線結晶構造解析、自然免疫、脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

ボルトは 1986 年に米国 UCLA の L. H. Rome らの研究グループにより被覆小胞に結合する粒子として偶然に発見されました。本粒子は 3 種類の蛋白質 (MVP, VPARP, TEPI) と 1 種類の RNA (vRNA) によって構成され、分子量が約 1000 万、粒子長軸の長さが約 700 Å、胴体部分の最大直径が約 400 Å で細胞質内に存在する核酸-蛋白質複合体としては最大の粒子です。粒子の発見から 25 年以上経ちますが、現在もなお本質的な機能は解明されておりません。我々は 2008 年にラット肝臓から抽出したボルトの 3.5 Å 分解能での構造決定に成功しました (*Science* **323**,

348-388 (2009))。その結果、ボルト外殻を形成するタンパク質 MVP (Major vault protein) のドメイン構造のうちの 1 つが脂質ラフトへの結合に重要であると言われる Stomatin と類似の構造を持つことが明らかになりました。この事実は、2007 年に米国・Harvard 大学の研究グループによって報告された「ボルトが自然免疫反応に関与する」という結果を強力に支持するものでありました (*Science* **317**, 130-132 (2007))。

2. 研究の目的

本研究では、まだ構造決定できていないマイナー成分 (VPARP, TEPI, vRNA) も全て含

んだ、完全なボルト粒子の全体構造決定を本粒子の機能解明への突破口にすることを目的としました。

3. 研究の方法

ラット肝臓から抽出したボルト粒子を構成成分にばらばらに丸ごと結晶化し、X線結晶構造解析により粒子の全体構造を決定します。また、昆虫細胞で発現させた MVP のみで構成されるボルト粒子の結晶化も合わせて行い、2.8Å 分解能以上の高分解能で構造決定します。

4. 研究成果

ラット肝臓由来ボルト、昆虫細胞で大量発現した MVP のみで構成されるボルトともに SPring-8 の BL44XU での X 線回折実験において 2.8Å 分解能の回折点を得ることに成功しました。高分解能の回折点を得るために、精製方法など、様々な条件検討を行いました。最も効果的だったのは、結晶凍結の際に使用する抗凍結剤の濃度をゆっくりと上昇させる点でした。今後、結晶の凍結条件や回折実験条件をより最適化することで、高分解能回折強度データ収集ができる見通しが立ちました。

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 8 件)

- 1) 田中秀明、加藤公児、住澤知之、山下栄樹 ミニレビュー「全立体構造決定から切り開く謎の巨大粒子ボルトの機能解明」 *生化学* **83**, 392-395 (2011) 査読無し
- 2) 山下栄樹、加藤公児、田中秀明 「分子量が 1000 万にも及ぶ生体内巨大分子に対する構造解析」 *日本放射光学会誌*, **22**, 284-291 (2009) 査読無し
- 3) 田中秀明、加藤公児 最近の研究から「分子量約 1000 万の巨大粒子 vault の X 線結晶構造」 *日本結晶学会誌* **51**, 189-194 (2009) 査読無し
- 4) 加藤公児、田中秀明 Short Review 「細胞内にある最大の核酸-蛋白質複合体 vault の X 線結晶構造」 *蛋白質 核酸 酵素* **54**, 1159-1165 (2009) 査読無し
- 5) 住澤知之、田中秀明 カレントトピックス「巨大粒子 vault の形から見えてきたこと」 *実験医学* **27**, 1751-1754 (2009) 査読無し
- 6) 田中秀明 トピックス 新進気鋭シリーズ

ズ 「分子量約 1000 万の巨大粒子 vault の全体構造決定から機能解明に迫る」 *生物物理* **49**, 302-303(2009) 査読無し

7) Tanaka H, Kato K, Yamashita E, Sumizawa T, Zhou Y, Yao M, Iwasaki K, Yoshimura M and Tsukihara T. The Structure of Rat Liver Vault at 3.5 Angstrom Resolution, *ANNUAL REPORT OF OSAKA UNIVERSITY 2008-2009*, 100 Selected Papers, 67 (2009). 査読無し

8) Kato K, Tanaka H and Tsukihara T. The Structure of Rat Liver Vault at 3.5 Angstrom Resolution, *SPring-8 Research Frontiers 2009*, 28-29 (2009). 査読無し

[学会発表] (計 7 件)

- 1) Tanaka H, Structure determination of rat vault, a large nucleoprotein complex at 3.5Å resolution. 日本生物物理学会第 49 回年会、兵庫県、2011 年 9 月 17 日.
- 2) Tanaka H, The mechanisms of self-assembly of the vault, the largest cytoplasmic ribonucleo-protein complex. XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2011), Madrid, Spain 23 -24 August, 2011
- 3) The self-assembly mechanism of the vault. 藤田千鶴子、田中秀明、月原富武 第 11 回日本蛋白質科学会年会、大阪府 2011 年 6 月 7 日
- 4) The mechanisms of self-assembly of the vault: the largest cytoplasmic ribonucleoprotein complex. Tanaka H, Pacificchem 2010, Hawaii, USA, December 17, 2010.
- 5) 田中秀明、謎の巨大分子ボルトの全立体構造情報の利用 ~機能解明と DDS への応用を目指して~ SENRI (Seminar for Enchaining of Research & Industry) の会、大阪府、2010 年 12 月 24 日.
- 6) Tanaka H, X-ray crystal structure of rat vault, a large nucleoprotein complex at 3.5Å resolution. International Symposium at Chungbuk National University, Chungbuk, Korea, November 17-18 2010.
- 7) 田中秀明, 分子量約 1000 万の核酸-タンパク質複合体 vault の X 線結晶構造解析、日本結晶学会年会、兵庫県、2009 年 12 月 3 日

〔その他〕
ホームページ等
ボルトのイメージ図、ムービーなど _
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography/mvp/>

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・助教
研究者番号：40346169