

平成 23 年 5 月 20 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770111

研究課題名 (和文) 巨大タンパク質-核酸複合体ボルトの結晶構造解析

研究課題名 (英文) The Structural Analysis of Ribonucleoprotein complex vault

研究代表者

加藤 公児 (Kato Koji)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任助教

研究者番号：30452428

研究成果の概要 (和文)：昆虫細胞-バキュロウイルス大量発現系を構築し、結晶化条件を再検討することにより、良質の結晶が得られており、SPring-8 のビームライン BL44XU において、最高で 2.9Å 分解能の回折点を確認することができた。これらの結果は、今後、高分解能でボルトの全体構造を解析し、ボルトの生体内における機能を解明する上で重要な足がかりになると期待される

研究成果の概要 (英文)：A good quality crystal was obtained by improving the crystallization condition, and it diffracted up to 2.9 Å resolution at beam line BL44XU of SPring-8. It is expected that the high resolution structure become an important footholds for clarifying the function of the vault in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：vault、核酸-タンパク質複合体、生体超分子複合体、X線結晶構造解析、

## 1. 研究開始当初の背景

1986年に米国 UCLA の Rome L. H.らのグループによってラット肝臓より単離されたボルト (vault) は 3 種類の蛋白質と 1 種類の RNA によって構成されており、分子

量約 1300 万 Da でサイズが約 40×70nm という今日までに報告されている中では最大の RNA-蛋白質複合体である。このような生体超分子複合体については、各構成成分によって巧妙に機能制御されている事が多

く、ボルト粒子全体の立体構造決定は機能解明のための大きな突破口を開くことになるであろう。

ボルトの生理的役割については、ボルトの一部が核膜孔複合体周辺に存在することと核内で機能するサブユニットを持つことから核-細胞質間の物質の輸送への関与 (*J. cell Sci.*, 106, 23-29 (1993))、ボルトが多剤耐性癌細胞で、高発現していることとボルトの持つ RNA が抗がん剤と結合することから多剤耐性癌細胞における耐性獲得への関与 (*Nat. med.* 1, 578-582(1995))、ボルトが細胞の増殖や分化を調節するいくつかのリン酸化酵素と相互作用することからのシグナリングへの関与 (*J. Cell Biol.*, 144, 1163-1172 (1999))、そして人の肺上皮細胞が緑膿菌に感染した際に、免疫反応の第一段階として多数のタンパク質と同様に MVP も脂質ラフト(細胞膜上のスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ領域)に迅速に集まることが知られているが、MVP を knock down した細胞では脂質ラフトに集合するその他のタンパク質の量が劇的に減少することから、自然免疫への関与 (Michael et al., *science* (2007) 317. 130) など、多くの機能が報告されているが、ボルトの本質的な機能はまだ分かっていない。

私たちは 2003 年からボルトの全立体構造解明に向け、ラット肝臓由来ボルトの X 線結晶構造解析をスタートし、構成成分にばらすことなく、生体内に存在するそのままの状態ですぐと結晶化することに成功した。その後、改良を重ねることにより、ボルトの外殻構造を 3.5Å 分解能で決定した。私たちの結晶がほかのサブユニットと RNA を含んでいることは SDS-PAGE と RT-PCR で定性的に確認しており、実際にまだアミノ酸をアサインしていない電子密度マップもある。ボ

ルトの外殻構造は 39 量体の MVP がリング状に配置されることにより、ボルト粒子の半分を形成し、それら 2 つが合わさることによって 78 量体の MVP が D39 の対称を持った樽状の構造を形成していることが分かった (図 1)。立体構造をもとにしたホモロジーサーチを行ったところ、脂質ラフトに局在する膜タンパク質である stomatin に高い相同性を示した。それは自然免疫に関与するという機能を強く示唆している。

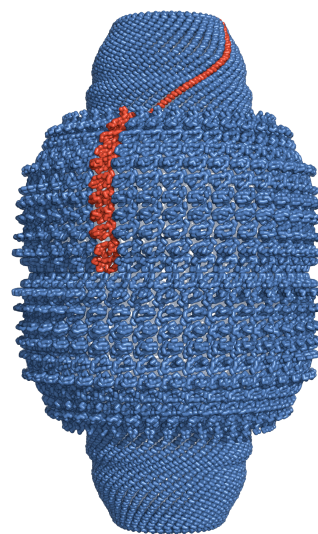


図 1 ラット肝臓由来ボルトの全体構造  
赤色は MVP モノマーを示す。

## 2. 研究の目的

私たちの決定した構造から、これまでにはっきりとしなかったボルトの機能の一端が解明できるのではないかと考えている。そのためには、ボルトが脂質ラフトの主成分であるコレステロールと結合するのか、そしてそれは MVP のどの部分かを決定したい。また MVP 以外のサブユニットや RNA は、MVP とはコピー数が異なり 39 回の非結晶学的対称 (NCS) を用いた電子密度の平均化を利用することができないため、非常に弱い電子密度マップしか得られていない。

これらの構造を決定するためにさらに高分解能の回折データを収集して、ボルトの全体構造を決定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

我々は、すでにボルト粒子の良質な結晶を得ており、SPring-8 のビームライン BL44XU における回折実験で 3.5 Å 分解能 ( $R_{\text{merge}} = 19.3\%$ ) の回折データを得た。さらに、39 回の非結晶学的対称 (NCS) を用いた平均化や溶媒領域の平滑化によって位相を 3.5 Å 分解能まで拡張した。上記の通り、ボルトは対称性が高いので NCS による平均化を用いて、3.5 Å 分解能でもボルトの主要成分である MVP の原子レベルでの構造決定できた。したがって、現在の結晶化条件を用いてコレステロールとの共結晶またはネイティブ結晶へのコレステロールの浸潤により、ネイティブデータと同型性の高いデータを収集し、D 合成によりコレステロールの結合サイトを決定する。また、結晶化条件や測定条件をさらに最適化することにより、高分解能での全立体構造を決定することを目指した。

現在、構造解析に用いている結晶は空間群 C2、格子定数  $a = 702.2 \text{ \AA}$ 、 $b = 383.8 \text{ \AA}$ 、 $c = 598.5 \text{ \AA}$ 、 $\beta = 124.7^\circ$  で、これだけ格子定数が大きいと結晶も物理的に弱く、同型性の高い回折データを得るには大量のサンプルを必要とする。ラット肝臓からのボルトの精製、結晶化と平行して、ボルトの外殻を形成しているサブユニット MVP の昆虫細胞—バキュロウイルス発現系を構築することにした。

また、他のサブユニットや RNA の構造を決定するためには、高分解能での構造解析が必要である。したがって、既存の結晶を用いて測定条件を改善すること、また、新たな結晶化条件検索することの両面から

分解能の向上を目指した。既存の結晶では、アニーリングやシュリンク等の手法によって結晶の改質を目指した。

### 4. 研究成果

既存の結晶化条件を用いて、ネイティブ結晶へのコレステロールの浸潤により、ネイティブデータと同型性の高いデータを収集し、D 合成によりコレステロールの結合サイトを決定した。MVP のショルダードメイン (Pro520-Val646) にロイシン、フェニルアラニンそしてトリプトファン残基からなる疎水性ポケットがあり、その部分にコレステロールと思われる電子密度マップが確認された。この部分は先に述べた stomatin と同じモチーフを持っており、MVP (vault) がこのドメインを利用して脂質ラフトに直接結合することが示唆された。現在の分解能ではその詳細な結合様式までは確認できず、今後さらに高分解能での構造解析が必要である。

また高分解能でのボルトの全体構造を決定においては、結晶化条件や結晶凍結条件を再検討する必要がある、大量のサンプルを必要とする。現在の様にラット肝臓から天然のボルトを精製するという方法では困難であるため、外殻を形成しているサブユニット MVP の昆虫細胞—バキュロウイルス発現系を構築することにした。MVP を発現、精製し、電子顕微鏡を用いてその粒子を観察したところ、組換え体 MVP は天然のボルトと同様にラグビーボールのような構造を形成していた (図 2)。

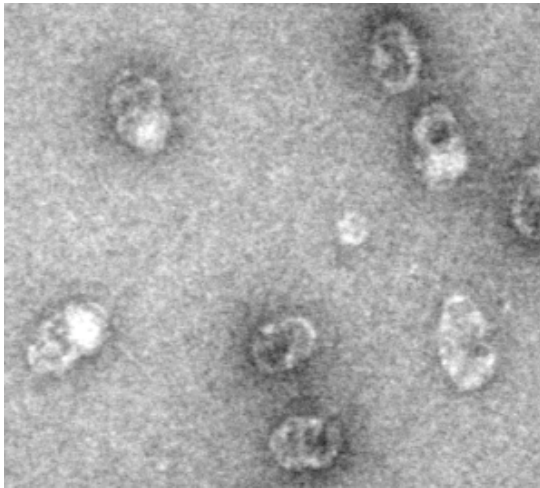


図2 組み換え体 MVP の負染色電子顕微鏡像

この精製したサンプルを用いて結晶化したところ、天然のボルトと同じ条件で、同様の結晶が得られている(図3)。さらに結晶化条件を再検討することにより、良質の結晶が得られており、SPring-8のビームライン BL44XUにおいて、最高で2.9Å分解能の回折点を確認することができた。これらの結果は、今後、高分解能でボルトの全体構造を解析し、ボルトの生体内における機能を解明する上で重要な足がかりになると期待される。

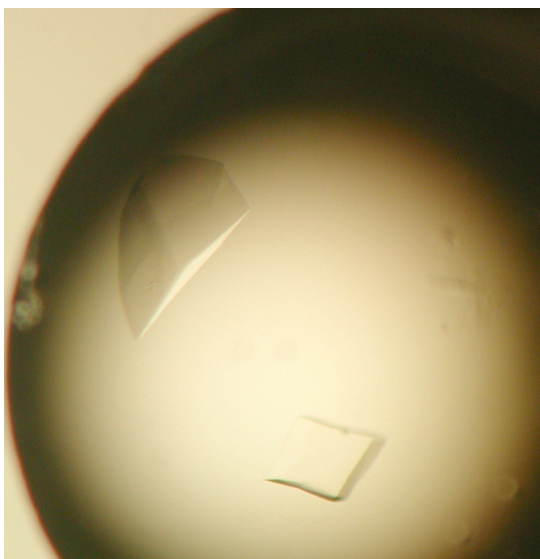


図3 組み換え体 MVP の結晶

## 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,  
加藤公児、田中秀明  
Structure of Rat Liver Vault at 3.5 Å Resolution  
SPring-8 Research Frontiers  
査読有り  
2009年、28-29

2,  
山下栄樹、加藤公児、田中秀明  
分子量が1000万にも及ぶ生体巨大粒子に対する構造解析  
放射光学会誌  
査読有り  
Vol. 22 2009年、284-291

3,  
加藤公児、田中秀明  
細胞内にある巨大な核酸-蛋白質複合体 vault の X線結晶構造解析  
タンパク質、核酸、酵素  
査読有り  
Vol. 51 2009年、1159-1165

4,  
住澤知之、加藤公児、田中秀明  
ラット肝由来の巨大な核酸タンパク質複合体 vault の X線結晶構造  
実験医学  
査読有り  
Vol. 27 2009年、1751-1754

5,  
田中秀明、加藤公児、山下栄樹  
分子量約1000万の巨大粒子 vault の X線結晶構造解析  
結晶学会誌  
査読有り  
Vol. 51 2009年、189-194

[学会発表] (計4件)

1,  
加藤公児  
The structure of rat liver vault at 3.5Å resolution  
第10回アジア結晶学会  
2010年11月1日  
プサン、韓国

2,  
加藤公児  
巨大な超分子を見る  
第10回日本蛋白質科学会年会

2010年6月16日  
北海道

3,  
加藤公児  
The structure of rat liver vault at 3.5Å  
resolution  
第47回日本生物物理学会年会  
2009年10月30日  
徳島県

4,  
加藤公児  
The structure of rat liver vault at 3.5Å  
resolution  
The 3<sup>rd</sup> International Congress of  
Nanobiotechnology and Nanomedicine  
2009年6月22日  
San Francisco, USA

[その他]  
ホームページ等

[http://www.protein.osaka-u.ac.jp/  
olabb/tsukihara/mvp/index.html](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/olabb/tsukihara/mvp/index.html)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
加藤 公児 (Kato Koji)

研究者番号 : 30452428