

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 5月31日現在

機関番号：13201
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22890071
 研究課題名（和文）古細菌の細胞分裂における ESCRT の役割の理解を目指した構造生物学的研究
 研究課題名（英文）A structural study towards the understanding of the roles of Archaeal ESCRT in cell division.
 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

研究成果の概要（和文）：CdvA タンパク質について結晶化を行い、βドメイン、ヘリカルドメインの結晶構造を得ることに成功した。βドメインはPRCバレルドメイン構造をとっており、ヘリカルドメインは、三本のヘリックスからなる新規のドメイン構造をとっていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We have determined the structure of the beta domain and the helical domain of CdvA, and have found that the beta domain forms PRC barrel fold and the helical domain forms a novel structure fold.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

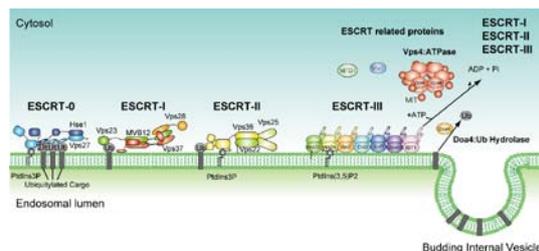
科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：ESCRT、細胞分裂、X線結晶構造解析、NMR、古細菌

1. 研究開始当初の背景

ESCRT (エンドソーム輸送必須複合体) は、エンドソーム・リソソーム経路によるタンパク質の分解、HIV-1等のウイルスの細胞からの出芽、および、細胞分裂の際に重要な役割を果たしている。これらの役割は全く独立しているようにも見えるが、膜リモデリングという観点から共通性を持っている。ESCRTタンパク質は、必要に応じて膜上へとリクルートされ、膜を曲げ、最終的には膜を切り離す (Membrane fission) 役割を持ち、非常に

ダイナミックに制御されているタンパク質群である。

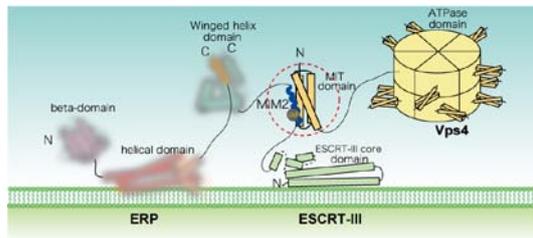


酵母のESCRTの概略図

真核生物においてESCRTタンパク質は、約30個のタンパク質から構成され、大きくは

ESCRT-0、-I、-II、-III の4つサブ複合体、および、その他の関連タンパク質 (Vps4 など) から構成される。一方、ある種の古細菌 (*Sulfolobus* 種) においては、現在までに ERP、ESCRT-III、Vps4 の3種類の ESCRT タンパク質が同定されている (Samson, *Obita et al, Science, 2008, Lindas et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2008*)。

興味深いことには、この古細菌 (*Sulfolobus* 種) において ESCRT タンパク質 (ESCRT-III と Vps4) が細胞分裂に重要な役割を果たし、一方普遍的に存在している細胞分裂に重要な Actin/Tubulin 等の細胞骨格因子を欠いていることが示された。



古細菌の ESCRT のモデル図

2. 研究の目的

古細菌 (*Sulfolobus* 種) の第3の ESCRT タンパク質である CdvA (別名 ERP) に対象を絞って研究を行う。既に CdvA は細胞分裂に機能していることが示唆されているものの、その詳細な役割は明らかとなっていない。そこで、分子生物学および構造生物学的手法を用いて、CdvA の機能を理解することを目的とする。

CdvA は、大きくは2つのドメインと、C 末端のフレキシブルな領域からなると考えられている。申請者らは既に予備的実験を行っており、幾つかの知見を得ている。1) CdvA は、C 末領域を介して ESCRT-III タンパク質と結合する。2) CdvA のヘリカルドメインは、古細菌の細胞膜と結合する。3) CdvA は、細胞分裂の際に二つの娘細胞の間に局在し、またその過剰発現により細胞分裂に障害を来す (Oxford 大学 Bell 教授との共同研究)。これらの結果を元に、申請者は X 線結晶構造解析を進めており、既に "CdvA"-ESCRT-III 複合体の結晶を得ている (4 Å 程度の分解能の異なる2つの空間群の結晶)。また、CdvA のヘリカルドメイン単独でも結晶を得てお

り、今後早期に結晶構造を得る可能性が十分にあると考えている。

以上の予備的な結果を踏まえて、今後、CdvA タンパク質についての構造生物学的解析を行っていく。具体的には、"CdvA"-ESCRT-III 複合体の立体構造から、その相互作用がどのような認識によるものなのか、また細胞分裂にどのように重要なかを調べていく。一方、CdvA のヘリカルドメインの構造解析から、その膜認識はどのようなものであるかを調べ、*in vitro* のリポソーム再構成実験などをもちいて、その重要性を確かめていく。構造的知見をもとに、Oxford 大学 Bell 教授との共同研究により実際に古細菌でどのような作用があるのかを確かめていくことで、その重要性を確認していく。

3. 研究の方法

- CdvA と ESCRT-III の複合体結晶の最適化
現在得ている結晶は、*Sulfolobus* 種のうち、*Sulfolobus Acidocaldarius* (Saci)由来のタンパク質であるが、*Sulfolobus Solfataricus* (Sso)を平行して用いて結晶化を行う。現在の分解能を少しでも向上させるとともに、セレノメチオニン置換体等を用いた結晶を用いることで、MAD 法等による構造決定を行う。必要に応じて、変異体の作成や、NMR を用いたコンストラクトのデザインを行うことにより、結晶化および最適化を行っていく。

- CdvA のヘリカルドメインの結晶の最適化および蛍光を用いての脂質との相互作用解析

現在までに、予備的な実験から、ヘリカルドメインが古細菌の膜分画と結合することが、沈降実験によりわかっている。これを更に詳しく解析する為に、CdvA のヘリカルドメインを蛍光色素 (Lumio Green) で標識し、相互作用解析を行う。同時に、既に得ているヘリカルドメインの結晶の最適化も行う。

- CdvA のβドメインの構造解析、および相互作用解析

これまでにβドメインを用いて、古細菌の可溶性分画に対してプルダウンアッセイを行い、幾つかの相互作用候補タンパク質を同定している。それらのタンパク質のクローニン

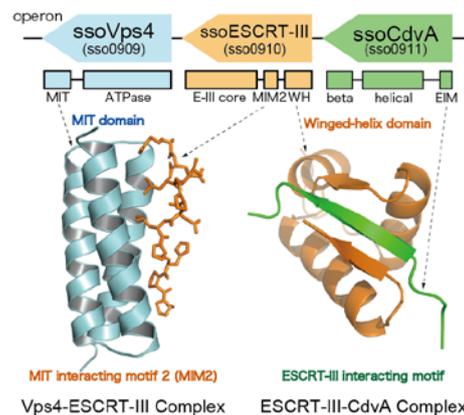
グも終了しており、今後は蛍光光度計や、NMR を用いて相互作用を解析していく。また、 β ドメインの立体構造解析も、NMR とX線の両方を用いて行っていく予定である。

4. 研究成果

古細菌のESCRTは1つのオペロンを形成しているが、それぞれが相互作用するかどうかを調べた。その結果、GSTプルダウン解析や酵母ツーハイブリッド解析からCdvAがESCRT-IIIと結合するという結果を得たが、CdvAとVps4との相互作用はみられなかった。ESCRT-IIIは細胞膜結合能をもつコアドメインと、Vps4に結合するMIM2モチーフ、および、C末端にウイングドヘリックス様ドメインをもつ。種々の変異体を用いた蛍光結合解析の結果、ESCRT-IIIのC末端のウイングドヘリックス様ドメインとCdvAのC末端領域(220~238残基、以下、E3Bペプチド)とが相互作用に必要十分であることがわかった(解離定数Kdは $6\mu\text{M}$)。また、*S. acidocaldarius*には合計4つのESCRT-III相同体が存在するが、そのうちの1つだけがウイングドヘリックス様ドメインをもちCdvAに結合することがわかった。

さらに詳細に結合様式について調べるため、ESCRT-IIIのウイングドヘリックス様ドメインとCdvAのE3Bペプチドとの結晶化を行ったところ、2.15Åの反射を示す良好な結晶を得て複合体の立体構造を決定することに成功した(PDB ID: 2XVC)。その結果、CdvAのE3Bペプチドが β ストランド構造をとり、ESCRT-IIIのウイングドヘリックス様ドメインの2本の β ストランド構造のあいだにはまり込むことで分子間 β シート構造を形成するという非常にユニークな立体構造であることが明らかになった。典型的なウイングドヘリックスドメインは3本の逆並行 β ストランド構造からなる β シート構造をもち、最後の2本の逆並行 β ストランド構造がいわゆる“wing(羽)”を形成する。一方、ESCRT-III-CdvA複合体は3本の β ストランド構造のうちESCRT-IIIが外側の2本を形成し、その2本の内側にCdvAの β ストランド構造がはまり込むかたちとなっていた。これはいわば、ESCRT-IIIがもつ“壊れかけた羽”をCdvAが修復しているような、とても珍しいウイングドヘリックスドメインというこ

とができる。CdvAのE3Bペプチドは*Sulfolobus*目のほかの古細菌でも高度に保存されている。また、Val232、Lys233、Val234の3つのアミノ酸残基がESCRT-IIIとの結合に強く関与していることが立体構造から示唆され、それらは蛍光結合実験により相互作用に重要であることが示された。真核生物においてESCRT-II複合体はウイングドヘリックスドメインが8つ結合したかたちをしており、さらに、ESCRT-IIIを細胞膜へとリクルートする役割を担っている。古細菌ではESCRT-IIの相同体はみつからないが、古細菌のESCRT-IIIがウイングドヘリックス様ドメインをもつということは、あたかもESCRT-IIとESCRT-IIIとが合体したようなタンパク質であるといえる。進化の過程を考えると、2億年の時の流れのなかで、ESCRT-II複合体がESCRT-III複合体から独立して新たな役割を担うようになったのかもしれない(Samson, Obita et al, Mol Cell, 2011)。



次に、CdvAの二つのドメインのうち、 β ドメインについて結晶構造を得ることに成功した。これはPRCバレル構造をもち、ダイマーを形成していることがわかった。次に、CdvAのヘリカルドメインの結晶化を行い、様々なコンストラクトを検討することで、良質な結晶を得ることに成功した。最終的に、ヘリカルドメインの結晶構造の決定に成功し、3本のヘリックスからなる新規ドメイン構造であることがわかった。また、結晶中でヘリカルドメイン同士はらせん状に相互作用しており、そのらせんの直径は約90Åと、電子顕微鏡を用いて既に報告されているCdvA線維の直径と一致していた。このことより、CdvAは膜上でらせん状の線維構造を形成していること

が考えられ、そのことが CdvA の機能にとって重要であると考えられる。今後は、CdvA のら旋状繊維構造が細胞分裂においてどのように働いているのかを調べていく予定である。

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1件)

Samson RY, Obita T, Hodgson B, Shaw MK, Chong PL, Williams RL, Bell SD. *Molecular Cell*, 41(2), 186-196, 2011、査読有り

[学会発表] (計2件)

発表者名：帯田孝之、
発表課題：古細菌の細胞分裂における ESCRT の役割の構造基盤研究
学会名：蛋白研セミナー
発表日：2011年1月12日
場所：大阪大学蛋白質研究所
招待講演

発表者名：帯田孝之
発表課題：Structural studies of the interaction between Vps4 and ESCRT-III
学会名：神戸大学 GCOE セミナー
発表日：2010年7月21日
場所：神戸大学
招待講演

[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：