

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

1. はじめに

1986年、米国 UCLA の L.H. Rome らの研究グループは、被覆小胞に結合する巨大な粒子を発見し、その形が教会などに見られるアーチ形天井に似ていることからボルト (vault) と名付けた¹⁾。粒子の発見から20年以上もの間、多くの研究者達が本粒子の機能解明に向けた研究に取り組み、様々な可能性が探られてきたが、どれも本質的な機能と言えるものではなく、ボルトの機能解析は長年に渡り停滞気味であった。我々が本研究を開始した2002年の時点でも本質的な機能は明確ではなかったが、これだけ大きな粒子が生体内に無意味に存在している訳はなく、本粒子の全体構造決定を機能解明への突破口にしたいと考え、ボルト粒子全体のX線結晶構造解析に着手した。このようなタンパク質複合体の機能解明に立体構造情報から迫る場合、ドメインに分けるなどして断片的な構造情報を得る方が容易でリスクも低いため、現在の主流ではあるが、「生体内に存在するそのままの形を見ることが機能解明への一番の近道である。」と考え、粒子の全体構造決定にこだわって研究を進めた。そして、研究開始から約6年の歳月を要したが、2008年8月に3.5 Å分解能でボルト外殻の全立体構造を決定することに成功した²⁾。粒子の全体構造は、これまでのタンパク質にはない非常に特徴的な形をしており、生物が造り上げた芸術作品とも言えるものであった。本稿では、ボルトの構造決定までの道のりと構造から見えてきた機能解明に繋がる興味深い事実について述べる。

2. ボルトとは

ラット肝臓より単離されたボルトは3種類のタンパク質 (major vault protein (MVP), vault poly(ADP-ribose) polymerase (VPARP), telomerase-associated protein 1 (TEP1)) と1種類の非翻訳RNA (141塩基) によって構成されており³⁻⁶⁾、分子量約1,000万でサイズが約400 Å×400 Å×700 Åという、細胞質内で最大の分子量を持つ核酸-タンパク質複合体である。ボルトのクライオ電子顕微鏡モデルは、樽状の形を示し、その形からキャップ、ショルダー、ボディーという三つのドメインに分けることができる (図1)。ボルトは、ヒト、ウシ、ラットなどの高等生物の他

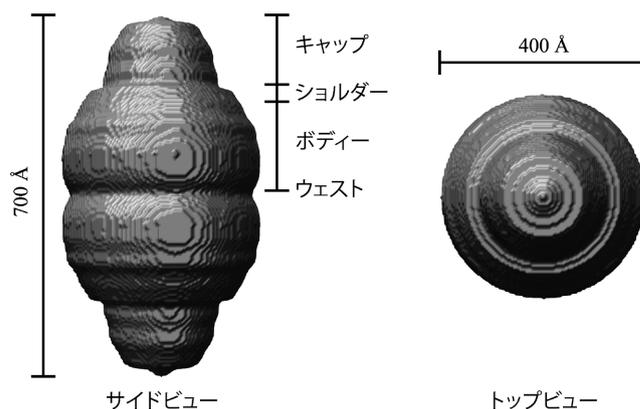


図1 ラット肝臓由来ボルトのクライオ電子顕微鏡モデル。粒子長軸が約700 Å、胴体部分の最大径は約400 Åである。粒子はその形から、キャップ、ショルダー、ボディーと呼ばれる三つのドメインに分けることができる。粒子中央部の少しへこんだ部分はウェストと呼ばれる。

に、ゼブラフィッシュ、エイ、粘菌、ムラサキガイ、原虫、腸球菌、ウシガエルなどの両生類、鳥類など幅広い真核生物種に存在することが分かっている。しかし、同じ真核生物でも出芽酵母、分裂酵母には存在せず、大腸菌等の原核生物にも存在しないことが知られている。本粒子は、そのほとんどが細胞質に存在しているが、ごく一部が核膜周辺に存在するという報告もあり、1990年代は核-細胞質間物質輸送や多剤耐性ががん細胞における抗がん剤の核外排出への関与を示す報告が大半であった⁷⁻⁹⁾。しかし、2000年代に入り、細胞内シグナリングへの関与など新たな報告が目立つようになってきた¹⁰⁻¹²⁾。そして、2007年には自然免疫反応への関与を示す報告があり、現在ではこの説が有力であると考えられる¹³⁾。

3. ボルトの結晶化と回折強度データ収集

ボルトの試料調製は粒子の発見者である L.H. Rome 教授らの方法を用い、3段階の密度勾配遠心分離によって調製した。2 kg のラット肝臓から約 8 mg の高純度な試料を得ることができた。最初の微結晶は、研究を開始して間もなく得られ、結晶化条件の最適化を行うことにより、2002年12月には非常にきれいな単結晶を得ることに成功した。この結晶を用い、SPring-8の生体超分子構造解析ビームライン BL44XUにおいて、初めての回折像を得た。しかし、得られた回折強度データの分解能は非常に低く、15 Å分解能程度であった。一般的に生体超分子複合体の結晶は回折強度が非常に弱いのだが、回折強度は結晶のサイズに比例するのでより大きく質の高い結晶を得るために結晶化条

件のスクリーニングを行った。研究開始から約5年間、試行錯誤を繰り返して6種類の結晶を得た。そのうちのひとつである空間群C2の結晶は、凍結条件を最適化することで、3.5 Å分解能以上の回折点を示す良質の結晶であった。

放射光での回折実験では、液体窒素の気流を用いて結晶を100 Kまで冷却し、X線照射によるダメージをできる限り軽減しながら回折強度データを収集するのが現在の主流である。この際、結晶には予め抗凍結剤を浸透させておき、結晶中の水が凍結して結晶が壊れてしまうのを防ぐ。抗凍結剤としては、グリセロールやエチレングリコール、様々な分子量のポリエチレングリコール (PEG) などに加えて糖類、オイルなど様々な種類があるが、これらを全て試してボルトの結晶に最適な抗凍結剤を探した。その結果、34% (v/v) PEG400 が最適な抗凍結剤であることが分かったのだが、急激な抗凍結剤濃度の上昇による結晶への物理的なダメージを極力減らすためにPEG400の濃度を5分おきに1% (v/v) ずつ上昇させることにした。また、結晶を最終濃度の抗凍結剤中に一晚浸透することで、脱水による結晶の質の改善と結晶間の同型性を高めることにも成功した。この手法の確立により、高分解能の回折強度データ収集は飛躍的に進み、39個の同型性のある結晶を用いて3.5 Å分解能の回折強度データを収集することに成功した。

4. ボルトの回転対称の決定と構造決定

ボルトの構造解析は、クライオ電子顕微鏡モデルを初期モデルとして用いた分子置換法と粒子長軸方向の対称性を用いた電子密度の平均化によって進めた。ボルトの発見者であるL.H. Rome教授らが、電子顕微鏡により花のように開いた状態のボルトを観察して花卉の数を8枚と数えて以来、ボルトは長軸方向に8回回転対称を持つというのが定説となっていた。彼らは2002年にクライオ電子顕微鏡による実験でボルトは48回回転対称を持つ(半分のボルトは48個のMVPから成ることを意味する。すなわち、1枚の花弁は6個のMVPから成るということである。)とし、ボルト粒子外殻は全部で96個のMVPで構成されると報告した。よって、我々も電子密度の平均化を行う際には、粒子長軸に8回、48回回転対称を仮定して構造解析を進めた。しかし、得られた電子密度は不明瞭で、とてもモデル構築できるものではなかった。したがって、独自の手法で粒子の回転対称を決定するの必要を感じた。

我々は粒子の長軸方向に2~48回まで全ての回転対称を仮定して電子密度の平均化を行い、30 Å分解能から10 Å

分解能まで位相拡張した。そして、観測された構造因子 F_{obs} ($I = |F_{\text{obs}}|^2$: 構造因子 F_{obs} は原子配置に直接関係した量である。結晶によるX線回折強度 I の測定により絶対値 $|F_{\text{obs}}|$ (構造振幅と呼ばれる) が得られ、分子置換法や重原子同型置換法などの手法により位相を決定することで、構造因子 F_{obs} が求まる。 F_{obs} のフーリエ変換により電子密度が得られる。)と結晶格子内に配置したクライオ電子顕微鏡モデルを各回転対称で平均した電子密度から計算された構造因子 F_{calc} (電子密度を逆フーリエ変換すると F_{calc} が求まる。)との間の R 因子($\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$: R 因子は、 $|F_{\text{obs}}|$ と $|F_{\text{calc}}|$ のずれを表す。)と相関係数($\sum (|F_{\text{obs}}| - \langle |F_{\text{obs}}| \rangle) (|F_{\text{calc}}| - \langle |F_{\text{calc}}| \rangle) / [\sum (|F_{\text{obs}}| - \langle |F_{\text{obs}}| \rangle)^2 \sum (|F_{\text{calc}}| - \langle |F_{\text{calc}}| \rangle)^2]^{1/2}$)を比較した。正しい回転対称では、他に比べて R 因子は小さくなり、相関係数は大きくなるはずである。その結果は非常に明瞭で、この手法による回転対称の探索により、ボルトが3, 13, 39回回転対称を持つことをはっきりと証明することができた¹⁰⁾。ボルトの外殻は、39個のMVPが集まってできたお椀型の半分のボルト二つがN末端同士で会合することにより、全部で78個のMVPで構成されることが明らかになった(図2)。MVPは非常に特徴的な縦長の構造をしており、九つの繰り返し構造とシヨルダー、キャップヘリックス、キャップリングの計12個の構造ドメインから形成されていた。

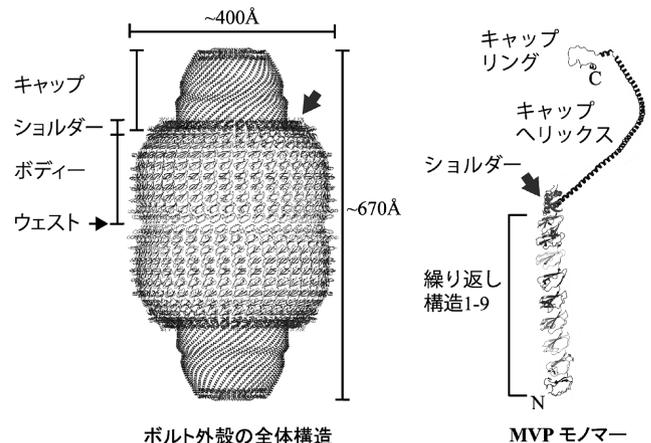


図2 ボルト外殻の全体構造と MVP モノマーの構造

ボルト外殻は78個のMVPによって形成されている。縦長の特徴的な形を持つMVPが39個集まってお椀型の半分のボルトを形成し、それらがN末端同士で2回対称の関係で会合することで鳥かご状の構造が形成されている(左図)。MVPモノマーは九つの繰り返し構造とシヨルダー、キャップヘリックス、キャップリングの計12個の構造ドメインで形成される(右図)。図中の矢印はシヨルダードメインを示している。

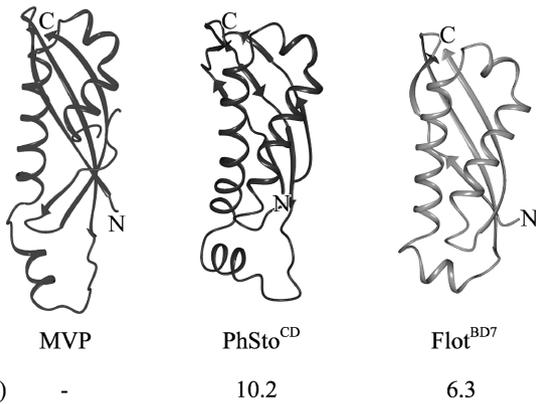


図3 MVP ショルダードメインと SPFH ドメインの構造比較
MVP のショルダードメインは、アミノ酸相同性が低いにもかかわらず脂質ラフトへの結合に重要な SPFH ドメインと類似の構造を持つ (PhSto^{CD}: core domain of stomatin from *Pyrococcus horikoshii* (PDB 3BK6), Flot^{BD7}: flotillin-2 band-7 domain (PDB 1WIN))

5. ボルトの構造情報から見てきたこと

我々は、得られた MVP の各ドメイン構造について、DALI サーバー¹⁵⁾を用いた構造類似性の検索を行った。その結果、ショルダードメインは、脂質ラフトへの結合に重要であるとされる SPFH (stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C) ドメインと類似の構造を持つことが明らかになり (図3)、立体構造情報からボルトが脂質ラフトに結合する可能性が示された。この結果は、ボルトが自然免疫に関与するとする M.P. Kowalski らの報告とも一致している¹³⁾。彼らは、肺上皮細胞に緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) が感染する際、ボルトが脂質ラフトに集まることで、自然免疫による抵抗性が高まることを報告している。また、このボルトの集合は脂質ラフトに存在する Cl⁻チャネルの嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) と *P. aeruginosa* との結合によって調節されることも示している。このように、これまで散漫気味であったボルトの機能解明において、生化学的、構造生物学的アプローチの両面から一つのしっかりと方向性を示せたことは非常に意義深い。

6. おわりに

幅広い真核生物が持つボルトは、粒子の発見から 20 年以上の間、謎に満ちた細胞内小器官であった。我々は、分子量が 1,000 万を超えるボルトを生体内に存在するそのままの状態に結晶化することに成功し、粒子の全体構造決

定を目指した研究を進めた。構造決定においては、独自の手法による粒子の正確な回転対称の決定が大きなブレイクスルーになった。我々が 3.5 Å 分解能で決定した粒子外殻の全体構造からボルトの脂質ラフトへの結合の可能性を示すことができた。この結果は、ボルトの自然免疫反応への関与を示す M.P. Kowalski らの報告とも一致しており、立体構造情報からボルトの機能解明に向けた一つの方向性を示すことができた。今後は、まだ構造決定できていないマイナー成分 (VPARP, TEPI, vRNA) を含んだ完全なボルトの全体構造をより高分解能で構造決定することで、謎の巨大粒子ボルトの機能解明への道を大きく切り開き、生化学的、分子生物学的アプローチで検証実験を行って、世界に先駆けたボルトの機能解明に繋げていきたい。

謝辞

本研究は元大阪大学蛋白質研究所・教授、月原富武先生 (現 兵庫県立大学ピコバイオロジー研究所教授) の指導のもと、多くの方々と共に進めてきました。位相決定に重要であった電子顕微鏡の単粒子解析においては、大阪大学蛋白質研究所の岩崎憲治准教授、SPring-8 の生体超分子専用ビームライン BL44XU におけるデータ収集や構造解析においては、吉村政人博士 (現 SPring-8・台湾ビームライン) に大変お世話になりました。また、プログラム Lafire を用いたモデル構築と構造の精密化におきましては、北海道大学理学部の姚閔准教授と周勇博士に大変お世話になりました。この場をお借りしまして御礼申し上げます。

- 1) Kedersha, N.L. & Rome, L.H. (1986) *J. Cell Biol.*, 103, 699–709.
- 2) Tanaka, H., Kato, K., Yamashita, E., Sumizawa, T., Zhou, Y., Yao, M., Iwasaki, K., Yoshimura, M., & Tsukihara, T. (2009) *Science*, 323, 384–388.
- 3) Stephen, A.G., Raval-Fernandes, S., Huynh, T., Torres, M., Kickhoefer, V.A., & Rome, L.H. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 23217–23220.
- 4) Kickhoefer, V.A., Siva, A.C., Kedersha, N.L., Inman, E.M., Ruland, C., Streuli, M., & Rome, L.H. (1999) *J. Cell Biol.*, 146, 917–928.
- 5) Kickhoefer, V.A., Stephen, A.G., Harrington, L., Robinson, M. O., & Rome, L.H. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 32712–32717.
- 6) Kickhoefer, V.A., Searles, R.P., Kedersha, N.L., Garber, M.E., Johnson, D.L., & Rome L.H. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 7868–7873.
- 7) Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M., Meijer, C.J., Clevers, H.C., & Scheper, R.J. (1995) *Nature Med.*, 1, 578–582.

- 8) Scheffer, G.L., Schroeijers, A.B., Izquierdo, M.A., Wiemer, E. A., & Scheper, R.J. (2000) *Curr. Opin. Oncol.*, 12, 550-556.
- 9) Gopinath, S.C., Matsugami, A., Katahira, M., & Kumar, P.K. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33, 4874-4881.
- 10) Yu, Z., Fotouhi-Ardakani, N., Wu, L., Maoui, M., Wang, S., Banville, D., & Shen, S.H. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 40247-40252.
- 11) Kolli, S., Zito, C.I., Mossink, M.H., Wiemer, E.A., & Bennett, A.M. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 29374-29385.
- 12) Kim, E., Lee, S., Mian, M.F., Yun, S.U., Song, M.K., Yi, S., Ryu, S.H., & Suh, P.G. (2006) *FEBS J.*, 273, 793-804.
- 13) Kowalski, M.P., Dubouix-Bourandy, A., Bajmoczy, M., Golan, D.E., Zaidi, T., Coutinho-Sledge, Y.S., Gygi, M.P., Gygi, S.P., Wiemer, E.A., & Pier, G.B. (2007) *Science*, 317 130-132.
- 14) Kato, K., Tanaka, H., Sumizawa, T., Yoshimura, M., Yamashita, E., Iwasaki, K., & Tsukihara, T. (2008) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 64, 525-531.
- 15) Holm, L. & Sander, C. (1996) *Science*, 273, 595-603.

田中 秀明^{1,2}, 加藤 公児³, 住澤 知之⁴, 山下 栄樹¹

(¹ 大阪大学蛋白質研究所,

² 科学技術振興機構・さきがけ,

³ 兵庫県立大学生命理学研究科,

⁴ 鹿児島女子短期大学生活科学科)

Elucidation of the function based on the whole structure of rat liver vault, the largest ribonucleo-protein particle
Hideaki Tanaka^{1,2}, Koji Kato³, Tomoyuki Sumizawa⁴ and Eiki Yamashita¹ (Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, ²PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST), 4-1-8 Honcho Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan, ³Department of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori, Akoh, Hyogo 678-1297, Japan, ⁴Kagoshima Women's Junior College, 6-9 Kourai, Kagoshima 890-8565, Japan)

シナプスタグ仮説の実証

1. 記憶の分子機構研究の目標

我々が何かを体験する際に受け取るあらゆる感覚情報は、各受容器で電気信号に変換された後、シナプス伝達を介して神経細胞を次々と伝えられる。経験の認知は脳のこのような神経活動なので、その追認可能な形態である記憶も神経回路活動である。Hebbは、一定の感覚情報が特定の神経細胞群からなる回路を伝わりやすくなる結果、経験に対応する神経回路ができると考えた。更に、その仕組

みとして神経回路の使用によりシナプス伝達効率が変わると予想した¹⁾。その後の電気生理学的研究により、確かにシナプス伝達効率は一定ではなく、経験の頻度、強度、情動などに依存して変化し、その変化が維持されることが分かった。この性質をシナプス伝達の可塑性といい、記憶などの高次脳機能を担う神経回路形成の基本原則と考えられている。

シナプス伝達可塑性は初期及び後期可塑性に分類され、それぞれ短期と長期記憶に対応する。変化が増加のとき長期増強、減少なら長期抑圧と呼ばれ、記憶の性質を神経回路の性質を介して説明することを目標に分子機構の研究が盛んである。長期記憶が一生涯保持されることは記憶の目覚ましい特徴の一つであり、人が人として生きるために不可欠であるが、物質としての脳が常に代謝を受けていることを考えると驚異的である。後期可塑性の仕組み解明により、長期記憶の保持と想起の仕組み、他の記憶との連合による変化等の記憶の謎を解き、記憶障害に対する対抗手段を得ることができよう。

シナプス可塑性の分子機構を理解するには表現機構と入力特異性機構を明らかにする必要がある。げっ歯類海馬CA1野錐体細胞とSchaffer側枝のシナプス伝達の長期増強を例に解説しよう。表現機構とは可塑的变化の実体と局在(シナプスのどこで何が起きたか)のことで、シナプス後膜上のグルタミン酸受容体の一種である2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propanoic acid (AMPA)受容体の表面発現増加が初期可塑性の主要な表現機構である。一方、シナプス可塑性を起こす時に活動したシナプスでのみ可塑性が起きる性質を入力特異性という。一つの神経細胞には数千から数万のシナプスがあるので、入力特異性は可塑性を起こすシナプスを限定する仕組みである。初期可塑性につながる一連の反応は、シナプス前後の同時活動により起きる同時検出反応で始まる。例えば、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)受容体チャンネルは脱分極時にのみCa²⁺イオンを通す性質がある。このため、シナプス後細胞の脱分極時にシナプス前から放出されたグルタミン酸が起こすNMDA受容体依存性Ca²⁺流入は同時検出機構であり、この下流の反応で初期可塑性が起きるので、入力特異性機構として働く。各シナプスには異なる情報が運ばれてくるので、入力特異性機構は経験が含む多くの情報の中から覚える記憶内容を選ぶ仕組みでもある。このように、初期可塑性の主要な分子機構はかなり解明されたのだが、後期可塑性の表現機構と入力特異性機構は未解明である。