

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		真核細胞内に存在する巨大粒子ボルトによる自然免疫反応に関する構造生物学的研究			
研究テーマ (欧文) AZ		Structural biology on natural immune reaction with large ribonucleoprotein particle vault that exists in eucaryocyte.			
研究氏 代表名 者	カカナ CC	姓)カトウ	名)コウジ	研究期間 B	2009 ~ 2010 年
	漢字 CB	加藤	公児	報告年度 YR	2010 年
	ローマ字 CZ	Kato	Koji	研究機関名	兵庫県立大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		兵庫県立大学大学院生命理学研究科・特任助教			
概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)					
<p>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1000万という巨大なRNA-蛋白質複合体である。私たちはラット肝臓由来ボルトを生体内に存在するままの状態で結晶化し、3.5 Å分解能のボルトの殻構造 (MVP) を決定した。その構造から脂質ラフトに局在する膜タンパク質 stomatin に構造の類似性が見られ、それは自然免疫反応の過程でボルトが脂質ラフトに集積されるという報告と一致していた。私たちはそれらの知見をさらに深めるために、ボルトが脂質ラフトの主成分であるコレステロールを結合した状態での構造解析と、さらに高分解能で全体構造を決定することを目的とした。</p> <p>まず、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のシオルダードメイン (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。</p> <p>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り、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。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。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。</p>					
キーワード FA	Vault	核酸-蛋白質複合体	X線結晶構造解析	自然免疫	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	ラット肝臓由来の巨大な核酸タンパク質複合体 vault の X 線結晶構造解析							
	著者名 ^{GA}	Sumisawa et al.	雑誌名 ^{GC}	実験医学					
	ページ ^{GF}	1751~1754	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	27
雑誌	論文標題 ^{GB}	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							
	著者名 ^{GA}	Kato et al.	雑誌名 ^{GC}	蛋白質、核酸、酵素					
	ページ ^{GF}	1159~1165	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	54
雑誌	論文標題 ^{GB}	分子量約 1000 万の巨大粒子 vault の X 線結晶構造解析							
	著者名 ^{GA}	Tanaka et al.	雑誌名 ^{GC}	結晶学会誌					
	ページ ^{GF}	189~194	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	51
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Vaults are among the largest cytoplasmic ribonucleoprotein particles and are found in numerous eukaryotic species. Roles in multidrug resistance and innate immunity have been suggested, but the cellular function remains unclear. We have determined the x-ray structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution and show that the cage structure consists of a dimer of half-vaults, with each half-vault comprising 39 identical major vault protein (MVP) chains. Each MVP monomer folds into 12 domains: nine structural repeat domains, a shoulder domain, a cap-helix domain, and a cap-ring domain. Interactions between the 42-turn-long cap-helix domains are key to stabilizing the particle. The shoulder domain is structurally similar to a core domain of stomatin, a lipid-raft component in erythrocytes and epithelial cells. This family is known to be involved in lipid raft association. Human stomatin, which has 40.3% and 18.4% sequence identities with PhStoCD and FlotBD7, respectively, is a major integral membrane protein of human erythrocytes. Podocin from mouse and mechano-sensory protein 2 from *Caenorhabditis elegans* have SPFH domains that bind cholesterol but not phosphatidylcholine. Cholesterol binding of the SPFH domain is likely an important factor in lipid raft association. Thus, the structural similarity between the shoulder domain and SPFH domain family supports the report proposing that MVP is recruited to lipid rafts, e.g., when human lung epithelial cells are infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Our structural analysis is expected to become an important foothold in clarifying the function of vaults.