

X線結晶構造解析による細胞内及び細胞間での 物質輸送の研究

A X-ray crystallographic studies of intra- and
inter-cellular transport

月原 富武 (TSUKIHARA TOMITAKE)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任教授



研究の概要

Exportin-5:RanGTP:Pre-miRNA 及び Exportin-5:RanGTP の X 線結晶構造解析を行い、Pre-miRNA の核外輸送に関わる蛋白質-RNA 相互作用を明らかにした。ボルトの 3.5Å 分解能構造解析を行い、39 回対称構造を作るのは分子間でヘリックスを作る新しい 2 次構造であることを見つけた。ギャップ結合チャンネルの変異体を用いてチャンネル形成に必須の分子間相互作用を確定した。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X 線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

高等な生物では、特定の分子を働くべき場所に輸送する仕組みがあり、そのことによって高度に制御された生命の営みが可能になっている。こうした輸送に関わる生体超分子の立体構造を決定して、その働きの仕組みを明らかにするのが本研究の目的である。特定の化学物質を運ぶ担体がどのように化学物質を認識し、どのような仕組みで目的の場所に移動するかを 3 つのケースで解き明かしたい。

核内で pre-miRNA を選択的に捕獲し核外への輸送するイクスポーティン、細胞内での輸送に関わる巨大な粒子であるボルト、及び細胞間輸送に関わるギャップ結合チャンネルを研究対象に取りあげ、X 線結晶構造解析による研究を行ってきた。

我々は、これらの生体超分子の調製、結晶化に集中的に取り組んで、何れも結晶化に成功して構造決定も進展してきた。

2. 研究の目的

イクスポーティンは Exportin-5・RanGTP・pre-microRNA 3 者複合体の構造決定を 3.0Å 分解能で行い、pre-microRNA の選択的核外輸送機構を解明する。

ボルトの X 線結晶構造解析では、ウイルス以外では最大の分子の構造解析である。極めて薄い殻構造で巨大な中空を持つ粒子の構

造ができる仕組みは全く謎である。3.0Å を超える分解能の構造解析を行い、全構造を決定して構造構築機構を明らかにする。

ギャップ結合チャンネルでは、開孔型、閉孔型コネキシン 26 の構造を共に 3.0Å を超える分解能で決定し、チャンネルの開閉機構を解明する。またホモロジーモデリングによって細胞間接着が可能な異なったコネクソンの組み合わせを提案する。

3. 研究の方法

Exportin-5・RanGTP・pre-microRNA、ボルト、ギャップ結合チャンネル何れも高分解能 X 線結晶構造解析を行う。ギャップ結合チャンネルの研究では電気生理学的実験も行って機能解析研究も行う。

4. これまでの成果

Exportin-5・RanGTP・Pre-microRNA 3 者複合体の 2.9Å 分解能 X 線結晶構造解析に成功した。Exportin・RanGTP 全体は野球のファーストミットの形をしている。Pre-microRNA の 2 塩基 3' オーバーハング構造がミットの底にあるトンネル構造に入り込んで数多くの水素結合によって強固に捉えられている。ミットの内側は正に帯電しており表面電荷が負に帯電している二重螺旋 RNA を柔らかく包んでいる。その結果、核内にある多様な RNA のうち約 700 種ある Pre-microRNA を選択的に認識して捕獲できるようになっている。

ラット肝臓のボルトの構造を我々が 3.5Å 分解能で決定して後、39 回対称の構造の普遍性、必然性が大きな論争点になって来た。MVP 以外の副成分である TEPI と vRNA は 3.5Å 分解能の電子密度を綿密に検討した結果、その位置を決めることができた。VPARP の MVP への結合位置は、別の研究者による既報の EM による情報をもとに MVP への結合部位を決めることができた。

コネクシンの N 末ヘリックスを構成するいくつかのアミノ酸を置換した変異体を調製して電気生理学的実験を行った。その結果は、N 末ヘリックスがチャネルの開閉制御に関わっていること及び、Asp2 が電位依存性開閉に関わっているという我々の主張を支持するものであった。また、蛍光蛋白質修飾した変異体コネクシンの蛍光顕微鏡観察と電気生理学的実験を行った。その結果、Lys168 と Asn176 が heterotypic channel 形成の鍵になっていることを確認し、半チャネル合体の可能性を示すルールを確定した。

5. 今後の計画

イクスポーティンでは、Exportin-5 単体の構造決定も行い、2者複合体、3者複合体の構造と合わせて、Exportin-5 による Pre-miRNA の核外輸送の全容を解明する予定である。

ボルトの結晶は容易に劣化する。発現系で調製した MVP のみで構成されているボルトは両端に直径 50Å の大きな穴が空いており、殆どの蛋白質も自由に通過できる。そこで発現系で調製したボルトを長時間透析して内部の不純物蛋白質成分を取り除いた上で結晶化を行う。これによって時間経過に伴う結晶の劣化を抑えることが期待される。

ギャップ結合チャネルは、6 年以上掛けて発現・精製・結晶化を確立した人から引き継いで、徐々にその人のレベルに近づいて閉孔型の 4Å 分解能の結晶を得るところまで到達した実施者の膜蛋白質調製能力が着実に進歩しており、後一息と言うところである。SPRING-8 の微小結晶用ビームライン BL32XU を利用することによって高分解能データを収集する予定である。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)
1. Aspartic Acid Residue D3 Critically Determines Cx50 Gap Junction Channel Transjunctional Voltage-Dependent Gating and Unitary Conductance. Xin L, Nakagawa S, Tsukihara T, Bai D. *Biophysical Journal*, 査読有, **102**, 1022-1031 (2012).
2. Asparagine175 of connexin32 is a critical residue for docking and for forming functional heterotypic gap junction channels with connexin26. Sho Nakagawa, Xiang-Qun Gong, Shoji Maeda, Yuhua Dong, Yuko Misumi, Tomitake Tsukihara, Donglin Bai., *J Biol Chem*. 査読有, **286**, 19672-19681 (2011).
3. Selective nuclear export mechanism of small RNAs. Lee SJ, Jiko C, Yamashita E, Tsukihara T. 査読有, *Curr Opin Struct Biol*, **21**, 101-8. (2011)
4. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions., Maeda S, Tsukihara T., *Cell Mol Life Sci*., 査読有, **68**, 1115-29 (2011)
5. ヒト由来ギャップ結合チャネルの構造解析 前田将司 生化学 査読無 **83**, 36-40, (2011)
6. Structural and functional studies of gap junction channels. Nakagawa S, Maeda S, Tsukihara T. *Curr Opin Struct Biol*., 査読有, **20**, 423-30. (2010)
7. ギャップ結合チャネルの X 線結晶構造 前田将司 生物物理 査読無 **50**, 190-191, (2010)
8. A high resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. Chimari Okada, Eiki Yamashita, Soo Jae Lee, Satoshi Shibata, Jun Katahira, Atsushi Nakagawa, Yoshihiro Yoneda, Tomitake Tsukihara, *Science*, 査読有 **326**, 1275-1279 (2009).
9. 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 田中秀明 日本生物物理学会誌 査読無 **49**(6) 302-303 (2009)
10. 分子量約 1000 万の巨大粒子 vault の X 線結晶構造 田中秀明、加藤公児、山下栄樹 日本結晶学会誌 査読無 **51**(3) 189-194 (2009)
11. 2010 年日本結晶学会賞・西川賞 (日本結晶学会) 月原富武 受賞理由: 生体超分子の構造と機能の解明