

Title	Structure analysis of rat liver vault at 3.5Å resolution
Author(s)	加藤, 公児
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49728
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	加藤公児
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 22567 号
学位授与年月日	平成 20 年 12 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	Structure analysis of rat liver vault at 3.5 Å resolution (3.5 Å 分解能でのラット肝臓由来 vault の構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 中川 淳史 (副査) 教授 青島 貞人 教授 奥山 健一 名誉教授 月原 富武

論文内容の要旨

ラット肝臓より単離された 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 万でサイズが約 $40 \times 70 \text{ nm}$ という今までに報告されている RNA-蛋白質複合体の中では最大である。

これまでに NMR、X 線結晶構造解析そしてクライオ電子顕微鏡解析によって、vault の構造情報が報告されている。クライオ電顕による vault 粒子の 20 Å 程度での全体構造や、NMR による vault の主要な構成成分である major vault protein(MVP)の 113-221 残基から成る 3-4 ドメインと呼ばれる小さなフラグメントの構造そして X 線結晶構造解析による 9 Å 分解能での構造など、vault の構造情報は限られている。

また、vault の生理的役割については、物質輸送、多剤耐性癌細胞における耐性獲得、シグナル伝達、自然免疫への関与などの機能が報告されているが、vault の本質的な機能については議論の最中である。

このよう背景を受けて私たちは vault を複合体の状態で構造解析することにより、構造形成メカニズムや生理機能を解明することを目的とした。私たちはラット肝臓由来 vault を構成成分にばらすことなく、結晶化することに成功し、現在ところ、vault の外側の殻を形成する MVP (861 残基中 812 残基) の構造を 3.5 Å 分解能で決定した。MVP モノマーはアミノ末端側から、9 個の繰り返しドメイン、肩ドメイン、キャップヘリックスドメイン、キャップリングドメイン構造をとっている。vault の殻構造は 39 量体の MVP がリング状に配置されることにより vault 粒子の半分を形成していた。そして、それら 2 つが合わさることによって 78 量体の MVP が D_{39} 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。これまでに報告されている vault の構造は 48 回対象を持つ 96 量体である。構造解析の分解能も 9 Å で、その中の MVP の構造も我々の構造と大きく異なっている。こうした誤りが生じたのは、十分吟味することなく 48 回対称を信じ込んで構造解析を実施したところにある。vault の粒子形成に重要であると考えられる MVP のモノマー間の相互作用は C 末端部分に集中しており、その部分が中心となって MVP の自己集合がおこり、vault の構造が形成されるのではないかと考えられる。

機能を明らかにするために使うことのできる構造が得られたので、DALI server を用いて、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（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）に局在する膜タンパク質ストマチンに高い相同性を示した（ $\text{rmsd} = 2.2\text{\AA}$ ）。このストマチンはコレステロールを結合することが知られている。それは上記の vault が自然免疫に関与するという機能研究の中で vault が脂質ラフト周辺に集まるという観察と一致しており、vault が自然免疫に関与するという機能を強く示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究では、分子質量13MDaの巨大なタンパク質-核酸複合体であるVaultの立体構造を、X線結晶構造解析法を用いて3.5Åで決定した。Vaultは、これまでに報告されているタンパク質-RNA複合体としては最も大きな粒子である。Vaultの生理学的役割については、物質輸送、多剤耐性ががん細胞における耐性の獲得、シグナル伝達、自然免疫への関与などが報告されているが、その本質的な機能については議論が続いている。

Vaultの構造に関しては、これまでに、クライオ電子顕微鏡による20Å分解能の構造、X線結晶構造解析による9Å分解能の構造、およびNMRによる110残基ほどの小さなドメイン構造が報告されているのみであった。今回の研究では、Vault粒子の持つ対称性が、従来報告されていた D_{4h} ではなく、 D_{3h} であることをX線回折強度データから明らかにした。これにより、3.5Åという高い分解能での原子構造の決定を行うことが成功した。

本研究では、Vaultの外側の殻を形成するMVPタンパク質（861残基中812残基の原子モデル）を決定した。これは、アミノ末端側から9回の繰り返しドメイン、ショルダードメイン、キャップヘリックスドメイン、キャップリングドメインがタンデムにつながり、それが39個リング上に配置され、さらに同じものが2回軸で関係付けられた78量体構造を取っていた。

さらに、データベース検索から、ショルダードメインの構造が、脂質ラフトに局在する膜タンパク質ストマチンと高い類似性を示すことを見出した。このことは、Vaultが自然免疫に関与する際にラフト付近に集まるという結果を支持し、Vaultが自然免疫に関与するという機能を強く示唆している。

本研究は、X線結晶構造解析のこれまでの限界を越える巨大なタンパク質-核酸複合体の構造解析を行い、さらに、その立体構造から機能解析に迫る成果をあげている。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。