

分子量が1000万にも及ぶ生体内巨大分子に対する構造解析

山下栄樹 大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2
 加藤公児 大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2
 田中秀明 大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

要旨 分子量が1000万にも及ぶ巨大分子である「蛋白質-核酸複合体 vault」は、幅広い真核生物で確認されているにも関わらず、生体内での働きについて未だ特定できていない。vaultの全体構造をX線結晶構造解析により3.5 Å分解能で決定した。vaultの全体構造から粒子形成メカニズムと機能解明に繋がる非常に興味深い事実が明らかになった。

1. はじめに

生体内では、高度に制御されエネルギー的に非常に効率的な反応が行われている。生体内での制御された反応には、数多くの機能蛋白質や核酸などが会合した様々な生体超分子複合体が、中心的な役割を担っている。これら生体超分子複合体は、複合体を構成するそれぞれの機能蛋白質あるいは核酸での反応の和では解釈できない高度な制御系を有し、反応を効率良く行っている。生体内での高度に制御された効率的な反応は、超分子複合体内の蛋白質と蛋白質、あるいは蛋白質と核酸との間での相互作用が深く関わっている。従って、複雑な反応系を制御している生体超分子複合体をそのままの形で構造解析を行い、各機能蛋白質や核酸の立体構造配置や詳細な分子間相互作用の知見を得ることが、生体内の組織化された機能を理解する上で重要である。X線結晶構造解析法は、これら生体超分子複合体の立体構造情報を精度良く得ることができる最も強力な手法の一つである。分子量が大きな生体超分子複合体のX線結晶構造解析を行うには、放射光での測定が必要不可欠である。本稿では、生体超分子結晶構造解析ビームライン (BL44XU) を利用することにより回折強度データが収集できた巨大分子 vault の結晶構造解析について紹介する。

2. vault について

1986年に UCLA の L. H. Rome らの研究グループによってラット肝臓から被覆小胞を抽出した際に被覆小胞に結合する謎の巨大な粒子が発見され、その形が教会などに見られるアーチ型の天井に似ていることから名付けられた¹⁾。ラット肝臓から単離された vault は 3 種類の蛋白質

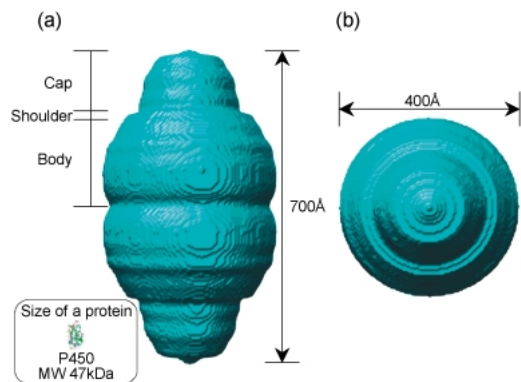


Fig. 1 CryoEM reconstruct structure of the rat liver vault. (a) Side view. (b) Top view.

(分子量約10万の major vault protein (MVP), 分子量約19万の vault poly(ADP-ribose) polymerase (VPARP), 分子量約29万の telomerase-associated protein 1 (TEP1)) と 1 種類の非翻訳 RNA (141塩基) により構成されており²⁻⁵⁾、分子量が約1000万、粒子のサイズが最大径約400 Å、長軸約700 Å という、今日までに報告されている生体内分子の中では最大の蛋白質-核酸複合体である (Fig. 1)。vault 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3つのドメインに分ける事ができる。

vault はラットで発見されて以後、粘菌からヒトまで幅広い真核生物において見出された。多くの研究者たちが機能解明に向けた研究に取り組み、粒子の中に物質を入れた核-細胞質間の物質輸送への関与や、ガン細胞における多剤耐性化への関与などさまざまな可能性が探られてきた⁶⁻⁸⁾。しかし、どれも本質的な機能と言えるものではなく、vault の機能は謎に包まれたままであった。我々は、

これだけ大きな粒子が生体内に無意味に存在しているわけではなく、生体内に存在する vault 粒子そのままの立体構造情報が機能解明への大きな突破口になると考え、2002年に vault 粒子全体の X 線結晶構造解析に着手した。vault 粒子全体の構造決定にこだわって、X 線結晶構造解析開始から6年目の2008年に3.5 Å 分解能で vault 外殻全体の立体構造を決定することに成功した⁹⁾。vault 全体の立体構造から粒子形成メカニズムと機能解明に繋がる非常に興味深い事実が明らかになった。

3. 試料調製および結晶化

ラットの肝臓から単離した vault を用いて、様々な結晶化条件を探索した。1度の試料調製では、ラット肝臓2 kg から約8 mg の高純度な vault を得ることができた。3.5 Å 分解能で構造解析が成功するまで、一ヶ月に1~2回のペースで試料調製及び結晶作成を行った。結晶化探索で得られた結晶については、SPRING-8 の生体超分子結晶構造解析ビームライン BL44XU で結晶の回折能を確認しながら、結晶化条件の最適化を行った。高分解能の回折強度データが得られる良質な結晶を得るまで、試料調製及び結晶化条件の最適化を繰り返して、6種類の結晶を得た。そのうちの一つは、凍結条件を最適化することにより、3.5 Å 分解能以上の回折点を示した (Fig. 2, Fig. 3)。

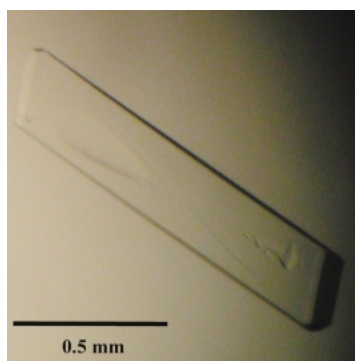


Fig. 2 A crystal of the rat liver vault.

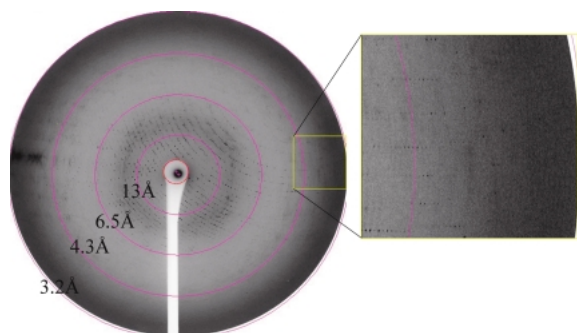


Fig. 3 Diffraction image from the vault crystal.

4. 凍結条件の最適化

蛋白質や核酸などの生体試料の結晶は、強力な放射光により損傷を受けやすいので、凍結条件化で測定しなければならない。しかし、蛋白質結晶は蛋白質分子間の弱い相互作用から形成され、かつ結晶中の溶媒含有量も50%以上と非常に高いことが多いので、抗凍結剤や凍結方法などの凍結条件の選択を誤り易い、その場合、結晶に物理的な損傷を与え、回折点が伸びたりあるいは割れたり、損傷が大きいときには全く観測できなくなる。特に、vault の様な巨大な複合体の結晶は、回折強度が非常に弱いため、高角側の回折点が観測できなくなりやすい。従って、我々はどの結晶においても、まず結晶をガラスキャピラリーに詰めて常温での回折実験を行い、結晶の回折能や回折点の形を観測し、抗凍結剤や凍結方法で影響を受ける前の結晶の状態を確認した。抗凍結剤の探索では、一般的によく用いられる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、約30種類の試薬を用いた。その結果、PEG400 が最適な抗凍結剤であることが分かったが、高分解能の回折強度データが得られる再現性が低いという問題点があった。抗凍結剤として使用した PEG400 の濃度は34% (w/v) で、当初は結晶を34% (w/v) PEG400 を含んだ溶液に直接浸透させていた。我々は、急激な抗凍結剤濃度の上昇が結晶に損傷を与えているのであろうと考え、PEG400 の濃度を5分おきに1%ずつ上昇させて結晶への物理的な損傷を極力減らす方法を試みた。その結果、再現性よく高い分解能の回折強度データを得る事が可能になった。また、結晶を最終濃度の抗凍結剤中に一晩浸透することで、結晶間の同型性を高めることにも成功した。vault 結晶への抗凍結剤の種類と濃度や凍結方法の凍結条件が確立したことにより、高分解能の回折強度データ収集は飛躍的に進んだ。

5. 回折強度データ収集

凍結条件の最適化により得られた再現性良く高分解能まで X 線を回折する結晶は、空間群が C2, 格子定数が $a=702.3 \text{ \AA}$, $b=383.8 \text{ \AA}$, $c=598.5 \text{ \AA}$, $\beta=124.7^\circ$ であった。このような巨大な格子を持った結晶は、回折強度が微弱で回折点の間隔が狭いため、回折点を分離して高分解能の回折強度データを集めるためには、指向性の良い高輝度の X 線源が必要で、大面積の二次元検出器を用いて、結晶と検出器面との距離を長く取って回折実験を行う必要がある。また、微弱な高角側の回折点を精度良く測定するためには、結晶と検出器面との間を He ガスに置換しバックグラウンドを下げる必要がある。全ての回折強度データ収集はこれらの条件を満たしている SPRING-8 の生体超分子結晶構造解析ビームライン BL44XU で行った。アンジュレー

タビームラインである BL44XU において、通常のタンパク質結晶の回折実験では、1 イメージ当たりの振動幅を 1° で数秒の露光で十分であるが、vault の様に巨大な粒子の結晶は回折強度が非常に弱いため、高分解能のデータを得るためには振動幅を小さくし、長時間露光を行う必要があった。実際、我々が回折強度データ収集に用いた結晶でも 1° 振動 5 秒露光では 8 Å 分解能程度の回折点しか得ることができなかったが、0.2° 振動で露光時間を 30~60 秒に延ばすことで最高 3.2 Å 分解能の回折点を得ることができた (Fig. 3)。しかし、当然のことながら長時間露光によって結晶が受ける X 線による損傷は大きく、1 カ所あたり 5 枚程度の回折イメージしか集めることができなかった。したがって、高分解能の回折強度データセットは長時間露光で、複数個の同型結晶を用いて収集することにした。まず、結晶の同型性を確認するためのリファレンスデータとして、1° 振動 5 秒露光で 1 つの結晶を使って 8 Å 分解能程度の回折強度データセットを収集した。長時間露光によるデータ収集では、振動角 0.2° で 1 カ所につき 5 枚の回折強度データを収集した。ビームサイズが 50 μm × 50 μm、結晶の長軸方向のサイズが約 0.7 mm であったので、1 つの結晶から約 10 度分のデータが収集できた。3.5 Å 分解能での高分解能の回折強度データを集めるのに 38 個の結晶を使った。

vault 結晶の格子は非常に大きいので、通常のタンパク質結晶の回折実験では測定しない 50 Å 分解能より低角側にも 1000 個近くの回折点がある。これら低角領域の回折点には分子の外形を示す貴重な情報が含まれているので、低角側の回折強度データの収集は巨大な生体超分子複合体の結晶構造解析を進める上で必要不可欠である。BL44XU では、ビームストップを結晶から二次元検出器方向に移動し、超分子複合体結晶の低分解能の回折強度データを収集できるようになっている。vault の低分解能の回折強度データ測定では、直径 0.8 mm のビームストップを結晶から 200 mm のところに設置し、結晶と二次元検出器との距離を高分解能測定では 700 mm で行っていたところを 1200 mm に変え、1 イメージ当たり 1° 振動幅/15 秒露光の条件で測定した。リファレンスデータと同様な 1 個の結晶を用いて低分解能側 200 Å 分解能までの回折強度データを収集することができた。

最終的には 39 個の同型結晶を用いて 200 Å ~ 3.5 Å 分解能のネイティブデータセットを得ることができた (Table 1)。同型性がないなどの理由でデータ収集に使えなかった結晶も含めると、一つのネイティブデータセットを収集するのに使用した結晶の数は数百個以上にのぼる非常に過酷かつ地道な作業であった。

Table 1 Intensity data and refinement statistics

| | |
|---|-----------|
| Data collection | |
| Resolution (Å) | 204–3.5 |
| Number of crystals | 39 |
| Number of frames | 1,361 |
| Observed reflections | 6,870,966 |
| Independent Reflections | 1,531,361 |
| Completeness (%) | 92.4 |
| Averaged redundancy | 4.5 |
| $I/\sigma(I)$ | 5.7 |
| R_{merge}^* | 0.209 |
| Refinement | |
| Reflection used | 1,436,394 |
| Number of protein residues | 31,668 |
| R factor (%)** | 0.310 |
| R_{free} factor (%)** | 0.330 |
| Rmsd from ideality | |
| Bond length (Å) | 0.013 |
| Bond angles (°) | 1.528 |
| Ramachandran plot statistics | |
| Residues in most favored region (%) | 80.0 |
| Residues in additionally allowed region (%) | 18.3 |
| Residues in generously allowed region (%) | 1.4 |
| Residues in disallowed region (%) | 0.3 |
| Averaged B factor | |
| Main chain (Å ²) | 112.3 |
| Side chain (Å ²) | 132.0 |
| Overall (Å ²) | 121.4 |

* $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of reflection and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of a group of equivalent reflectios.

** R is conventional crystallographic R factor, $\frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$. Five percent of the reflections that were excluded from the refinement were used in the R_{free} calculaion.

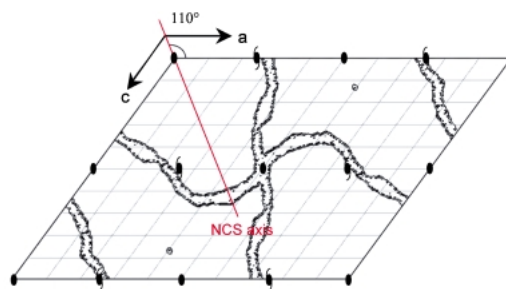


Fig. 4 A crystal packing of vault. Packing is shown in the *ac* plane.

6. 構造解析

6.1 構造解析手法

vault の構造解析は、電子顕微鏡再構成モデルを用いて分子置換法により結晶格子内での分子の位置を決定し (Fig. 4), 分子内の対称を使った非結晶学的対称 (NCS: Non Cystallographic Symmetry) による電子密度の平均

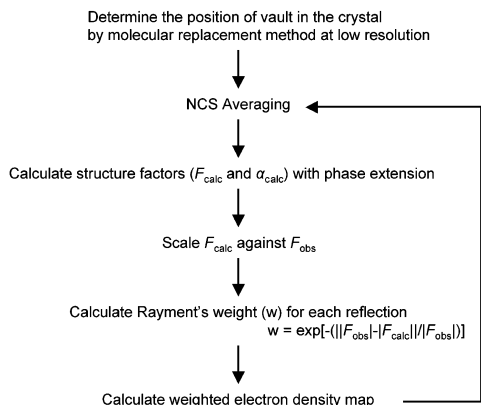


Fig. 5 Flow chart of phase extension for the vault crystal.

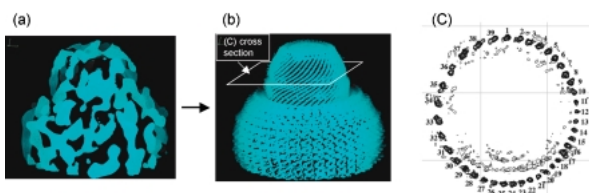


Fig. 6 Electron density map by phase extension using 3-fold NCS axis. (a) Initial electron density map of the half vault at 30 Å resolution. (b) Obtained electron density map at 4 Å resolution by phase extension. (c) A cross section on the cap domain.

化によって位相改良する方法で進めた (Fig. 5)。vault の長軸方向の回転対称については、粒子の発見者である L. H. Rome らの 8 回回転対称という説が長年に渡って信じられてきた¹⁰⁾。彼らは、粒子の発見当初、電子顕微鏡観察によりポリリジンでコートしたグリッド上で花びらのように開いた状態の vault (Open vault) を観察した。そして、彼らが花弁の数を 8 枚と数えて以来、vault の回転対称は 8 回回転対称であると論じられてきた。2004 年にはこうした見解に基づいてクライオ電子顕微鏡での研究により、粒子の回転対称は 48 回回転対称であり、vault の外殻は 96 個の MVP で形成されると報告され、それが定説となっていた¹¹⁾。我々も最初はその説に従って、分子置換法で得られた 30 Å 分解能の電子密度 (Fig. 6(a)) を、8 回や 48 回回転対称で電子密度を平均化しながら 4 Å 分解能まで位相拡張を行った。しかし、得られた電子密度は非常に乱れており、とてもモデル構築できるものではなかった。我々は電子密度を平均化する際の回転対称の数を 8 回から一つずつ減らして電子密度の平均化を試みた。すると、3 回回転対称での平均化で非常に明瞭な電子密度を得ることができた (Fig. 6(b))。4 Å 分解能での電子密度では、キャップドメインに α -ヘリックスを示す長い筒状の電子密度が確認でき、ボディードメインには繰り返し構造を示す電子密度を確認することができた。この 3 という数字も 48 の約数であることから、粒子内部に存在するマイ

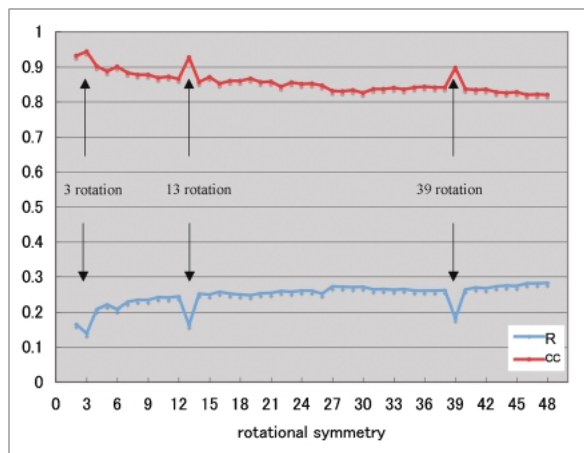


Fig. 7 R-factors and correlation coefficients between observed and calculated structure factors from each NCS averaging. The R-factor (R) in blue and correlation coefficients (cc) in red are plotted against various rotational symmetry values at 10 Å resolution.

ナー成分 (VPARP, TEP1, vRNA) の対称性が MVP に比べて低いため、8 回回転対称よりも 3 回回転対称での平均化の方が良いのであろうと解釈した。しかし、キャップドメインを構成する筒状の電子密度の数を数えると、その数は 48 本ではなく 39 本であった (Fig. 6(c))。これまでの経験や勝手な先入観から、「生物において、39 なんていう中途半端な数字があり得るのだろうか?」と少し悩みもしたが、電子密度をじっくり見ていくことで不安が自信へと変わっていくのにそれほど時間は必要ではなかった。

6.2 粒子の回転対称決定法

3 回回転対称での平均化が電子密度の質を劇的に向上させ、キャップ領域に筒状の電子密度が 39 本であることから、vault の持つ回転対称は 3 回や 39 回回転対称であると考えた。このことの正当性を立証するために、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 NCS を用いた電子密度の平均化法により、30 Å 分解能から 10 Å 分解能までの位相拡張を行った。そして、観測された構造因子の大きさ $|F_{obs}|$ と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の大きさ $|F_{calc}|$ との間の R-factor: $R = \frac{\sum (|F_{obs}| - |F_{calc}|)}{\sum |F_{obs}|}$ と相関係数 C.C.: $C.C. = \frac{\sum (|F_{obs}| - |F_{calc}|) \times (|F_{calc}| - |F_{calc}|)}{[\sum (|F_{obs}| - |F_{obs}|)^2 \times (\sum (|F_{calc}| - |F_{calc}|)^2)]^{1/2}}$ を比較した。正しい回転対称では、他に比べて R-factor は小さくなり、C.C. 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、vault 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¹²⁾ (Fig. 7)。

6.3 粒子の回転対称を用いた電子密度の平均化と位相拡張

粒子の回転対称が 3, 13, 39 回回転対称を持つのである

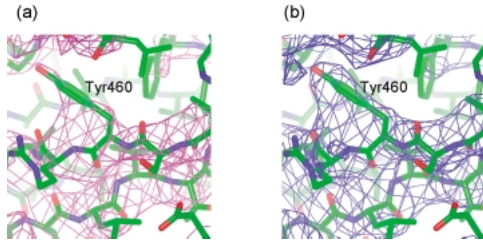


Fig. 8 Comparison between electron density maps averaged by 3-fold and pseudo-39-fold non-crystallographic rotational symmetries. The refined MVP model is shown by stick colored green for carbon atoms, blue for nitrogen atoms and red for oxygen atoms. (a) Electron density map obtained by the 3-fold NCS averaging is depicted as pink cage. (b) Electron density map obtained by the pseudo-39-fold NCS averaging is shown by blue cage.

のであれば、最も対称性の高い39回回転対称で電子密度を平均化する事が最も良い電子密度を得る方法であるが、我々が得た結晶中の vault 粒子は、結晶のパッキングによる影響で粒子が所々歪んでいた。よって、39回回転対称で平均化すると電子密度が乱れてしまい、良い電子密度を得ることができなかった。したがって、まずは対称性の最も低い3回回転対称を用いて電子密度の平均化を行いながら3.5 Å 分解能まで位相拡張をし、得られた電子密度をもとにモデル構築を行った。

得られた電子密度を基にモデルを構築したところ、vault の外殻を構成する MVP は全部で12個の構造ドメインで構成されていることが明らかになった。キャップ領域の長い α -ヘリックスは途中で傾きが変わっていたのでさらに2つのドメインに分け、vault の外殻を構成する MVP を最終13個の構造ドメインに分類した。得られた原子座標に基づき各ドメインについて39個の NCS マトリックスを計算した。得られた507個 (13×39) の NCS マトリックスを用いてドメインごとに電子密度の平均化をしながら、6.0 Å 分解能から3.5 Å 分解能まで位相拡張を行った。この際、各 NCS マトリックスは位相拡張のサイクルごとに精密化した。この擬似39回回転対称を用いた電子密度の平均化により、電子密度は大幅に改善され (Fig. 8), トリプトファン, チロシン, フェニルアラニンなど、かさ高い側鎖の電子密度が明瞭になった。

7. 構造

7.1 全体構造

vault の全体構造は最大直径が400 Å, 長軸が670 Å の樽のような形であった (Fig. 9)。vault の外殻は39個の MVP が環状に並ぶことによって vault 粒子の半分 (half vault) を形成しており、それらが2つ合わさることによって78個の MVP が D_{39} 対称を持った構造を形成していた。vault の各ドメインの長さはキャップが155 Å, ショル

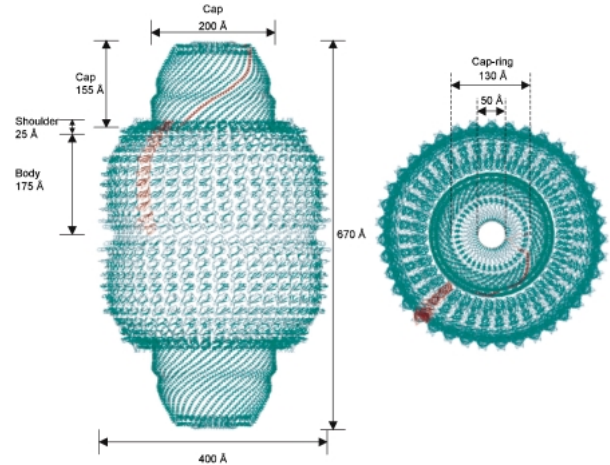


Fig. 9 Overall structure of the vault. An MVP monomer is colored in brown and the others are colored in teal blue.

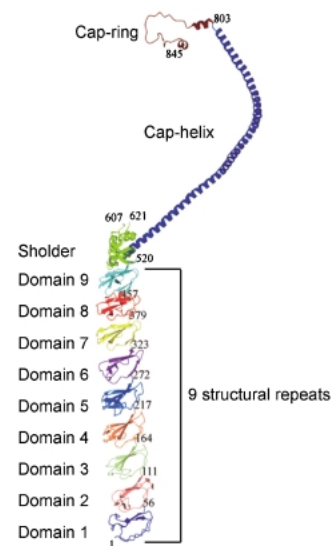


Fig. 10 Ribbon drawing of an MVP monomer.

ダーが25 Å としてポディーが175 Å であった。さらに vault の外殻の厚さは15–30 Å と非常に薄く、粒子内部は大きな空洞になっていた。その空洞の大きさは、これまでに X 線結晶構造解析により構造決定された最大の細胞内分子である分子量約250万の70S リボソームを2, 3分子入れることができるほどである。

7.2 MVP モノマー構造

MVP モノマーは非常に長く伸びた珍しい構造をとっていた。MVP モノマーはアミノ末端側からポディードメイン (アミノ酸残基 1–519), ショルダードメイン (アミノ酸残基520–646), キャップヘリックスドメイン (アミノ酸残基647–802), キャップリングドメイン (アミノ酸残基803–845) から形成されていた (Fig. 10)。ポディードメインは、9つの繰り返し構造になっており、それぞれの線

り返し構造は約55残基のアミノ酸からなり5本の β 構造で構成された2つの逆平行 β シートを持っていた。最初の繰り返し構造（ドメイン1）のアミノ末端のアミノ酸残基は2回対称の関係にある分子間で逆平行 β シートを形成していた。ショルダードメインは4本の β 構造からなる逆平行シートと4本の α ヘリックスからなる α/β 球状構造であった。キャップヘリックスドメインは42ターンの α ヘリックスからなり、39回回転対称軸方向へ155 Åの長さを持っていた。キャップヘリックスドメインのカルボキシル末端側に、vaultの樽状構造に蓋をするような形で、キャッピングドメインが存在していた。

8. 構造から示唆されたこと

MVPだけを大量発現系を用いて発現させると、vault様の粒子を形成することが報告されており¹¹⁾、vaultはMVPの自己集合により粒子の殻構造を形成すると考えられている。vaultの粒子形成に関わると考えられているMVPモノマー間の相互作用は、水素結合、イオン結合や疎水性相互作用を合わせて、74箇所存在していた。この相互作用の57%がキャップヘリックスドメインに集中しており、ドメインのアミノ酸残基数の19%がMVPモノマー間の相互作用に関与していた（Fig. 11）。この相互作用の中心は疎水性相互作用であった。これらのことから、まず、キャップヘリックスドメイン間の相互作用が中心となってMVPの自己集合がおこり、half vaultの構造が形成され、さらに2つのhalf vaultがMVPのボディードメインのドメイン1の相互作用（Fig. 12）により会合し、完全なvault粒子の構造が形成されると考えられる。

得られたMVPの各ドメイン構造について、DALIサー

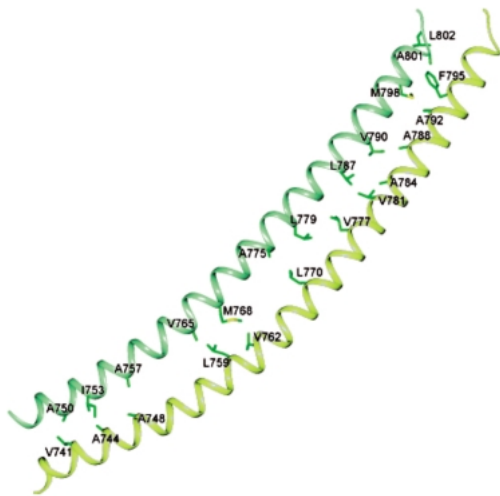


Fig. 11 Hydrophobic interactions between MVP monomers in the cap-helix domain. Most of the hydrophobic residues appear at the interface between two helices to form hydrophobic interactions.

バー¹³⁾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、細胞膜上の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¹⁴⁻¹⁶⁾と類似の構造を持つことが明らかになり（Fig. 13）、立体構造情報からvaultが脂質ラフトに結合する可能性が示された。脂質ラフトは、細胞膜上でスフィンゴ脂質やコレステロールが富んだ領域で、様々な膜タンパク質が集積しており、膜を介したシグナル伝達や細菌の感染などにおいて重要な役割を果たすと考えられている。

9. まとめ

分子量が1000万を超える核酸-蛋白質複合体 vault は、

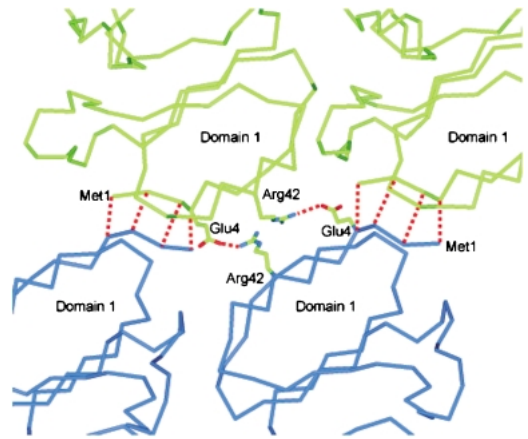


Fig. 12 Interactions between two half vaults. N-terminal residues of domain 1, from Met1 to Glu4, form an intermolecular antiparallel β sheet with those of the 2-fold symmetry-related molecule.

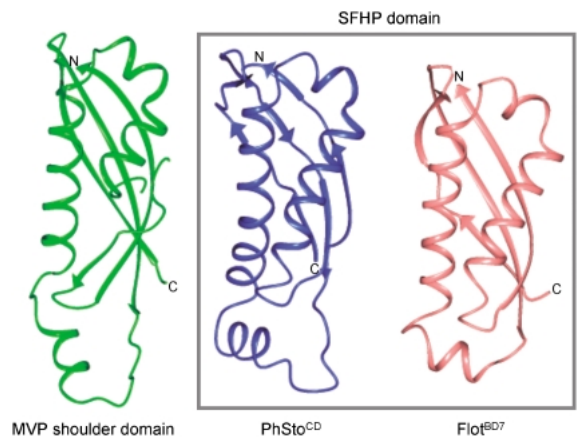


Fig. 13 Structures of MVP shoulder domain and two SPFH domains. The MVP shoulder domain is structurally similar to the core domain of stomatin (PhSto^{CD}) and the flotillin-2 band-7 domain (Flot^{BD7}). The shoulder domain, PhSto^{CD} and Flot^{BD7} overlap within 2.2 Å of root-mean-square deviation of C α atoms.

細胞内で発見されてから20年以上、幅広い真核生物がもつ謎に包まれた細胞小器官であった。我々は、生体内に存在するそのままの形で構造解析することが、vault 粒子の機能を理解する上で最も重要であるという理念の基で、vault 粒子の全体構造決定を目指した研究を進めた。構造解析においては、電子顕微鏡像を利用した初期位相の決定方法や粒子内の正確な回転対称を決定するための新しい方法を開発した。3.5 Å 分解能で決定した vault 粒子の全体構造から vault の細胞膜上にある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、vault が自然免疫反応に関与しているという M. P. Kowalski らの報告¹⁷⁾とも一致しており、本研究において vault の機能解明に向けた一つの方向性を示すことができた。

本稿で紹介した vault の結晶構造解析に使用した回折強度データは、全て SPring-8 の阪大蛋白研ビームライン (BL44XU) で収集したものである。vault のような巨大な生体超分子複合体の結晶構造解析を行うためには、再現性良く同型性の高い結晶を得る必要があり、そのためには、結晶化や抗凍結剤の最適化を回折イメージで確認しながら、条件を詰めなければならなかった。vault 結晶の場合、実験室系の X 線回折装置では回折点がほとんど得られないので、結晶化や抗凍結剤の最適化の段階から放射光での回折実験が必要であった。回折強度データ収集においても、ビームサイズ調整、露光時間及び振動角の調整、回折イメージの選択、ビームストップ調整といった点で多くの試行錯誤があった。結晶らしき固体が出てから 3.5 Å 分解能の構造解析に成功するまでに要した 6 年間、放射光のビームラインが安定して常時使える環境にあったことは本研究の遂行に必要不可欠であったことを強調したい。さらに vault の機能解明に向けた構造研究を進めるためには、今後も放射光を利用した高精度の回折強度測定法の開発が必要不可欠である。

謝辞

本研究は月原富武教授(阪大・蛋白研、兵大・ピコ研)はじめ、多くの方々との共同研究により成功しました。試料の調製においては住澤知之博士(産大・産生研)にご助言頂き、分子置換に用いた電子顕微鏡モデルは岩崎憲治准教授(阪大・蛋白研)にご提供頂きました。構造解析

においては、吉村政人博士(阪大・蛋白研、現 NSRRC)、姚閔准教授(北大・理)、周勇博士(北大・理)に大変お世話になりました。この紙面をお借りして御礼申し上げます。

参考文献

- 1) N. L. Kedersha and L. H. Rome: *J. Cell Biol.* **103**, 699 (1986).
- 2) A. G. Stephen, S. Raval-Fernandes, T. Huynh, M. Torres, V. A. Kickhoefer and L. H. Rome: *J. Biol. Chem.* **276**, 23217 (2001).
- 3) V. A. Kickhoefer, A. C. Siva, N. L. Kedersha, E. M. Inman, C. Ruland, M. Streuli and L. H. Rome: *J. Cell Biol.* **146**, 917 (1999).
- 4) V. A. Kickhoefer, A. G. Stephen, L. Harrington, M. O. Robinson and L. H. Rome: *J. Biol. Chem.* **274**, 32712 (1999).
- 5) V. A. Kickhoefer, R. P. Searles, N. L. Kedersha, M. E. Garber, D. L. Johnson and L. H. Rome: *J. Biol. Chem.* **268**, 7868 (1993).
- 6) G. L. Scheffer, P. L. Wijngaard, M. J. Flens, M. A. Izquierdo, M. L. Slovak, H. M. Pinedo, C. J. Meijer, H. C. Clevers and R. J. Scheper: *Nature Med.* **1**, 578 (1995).
- 7) G. L. Scheffer, A. B. Schroeijers, M. A. Izquierdo, E. A. Wiemer and R. J. Scheper: *Curr. Opin. Oncol.* **12**, 550 (2000).
- 8) S. C. Gopinath, A. Matsugami, M. Katahira and P. K. Kumar: *Nucleic Acids Res.* **33**, 4874 (2005).
- 9) H. Tanaka, K. Kato, E. Yamashita, T. Sumizawa, Y. Zhou, M. Yao, K. Iwasaki, M. Yoshimura and T. Tsukihara: *Science* **323**, 384 (2009).
- 10) N. L. Kedersha, J. E. Heuser, D. C. Chugani and L. H. Rome: *J. Cell Biol.* **112**, 225 (1991).
- 11) Y. Mikyas, M. Makabi, S. Raval-Fernandes, L. Harrington, V. A. Kickhoefer, L. H. Rome and P. L. Stewart: *J. Mol. Biol.* **344**, 91 (2004).
- 12) K. Kato, H. Tanaka, T. Sumizawa, M. Yoshimura, E. Yamashita, K. Iwasaki and T. Tsukihara: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **64**, 525 (2008).
- 13) L. Holm and C. Sander: *Science* **273**, 595 (1996).
- 14) H. Yokoyama, S. Fujii and I. Matsui: *J. Mol. Biol.* **376**, 868 (2008).
- 15) N. Tavernarakis, M. Driscoll and N. C. Kyrpides: *Trends Biochem. Sci.* **24**, 425 (1999).
- 16) E. Umlauf, E. Csaszar, M. Moertelmaier, G. J. Schuetz, R. G. Parton and R. Prohaska: *J. Biol. Chem.* **279**, 23699 (2004).
- 17) M. P. Kowalski, A. Dubouix-Bourandy, M. Bajmoczy, D. E. Golan, T. Zaidi, Y. S. Coutinho-Sledge, M. P. Gygi, S. P. Gygi, E. A. Wiemer and G. B. Pier: *Science* **317**, 130 (2007).

● 著者紹介 ●

**山下栄樹**

大阪大学蛋白質研究所・助教
E-mail: eiki@protein.osaka-u.ac.jp
専門分野：蛋白質結晶学

【略歴】

1997年大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻博士後期課程修了，博士（理学）。1997年日本学術振興会特別研究員。1997年-2007年大阪大学蛋白質研究所助手。2007年4月より現職。

**田中秀明**

大阪大学蛋白質研究所・助教
E-mail: tana@potein.osaka-u.ac.jp
専門分野：蛋白質結晶学

【略歴】

200年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程単位取得退学，博士（理学）。2000年-2002年科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業（CREST）研究員。2004年-2007年大阪大学蛋白質研究所助手。2007年4月より現職。

**加藤公児**

大阪大学蛋白質研究所・特任研究員
E-mail: k-kato@protein.osaka-u.ac.jp
専門分野：蛋白質結晶学

【略歴】

2006年大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻博士後期課程単位取得退学，博士（理学）。2006-2007大阪大学蛋白質研究所技術補佐員。2007年4月より現職。

X-ray structure analysis of a 10 MDa biological macromolecule

Eiki YAMASHITA Institute for Protein Research, Osaka University,
3-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871

Koji KATO Department of Life Science, University of Hyogo,
3-2-1 Koto, Kamighori, Akoh, Hyogo 678-1297

Hideaki TANAKA Institute for Protein Research, Osaka University,
3-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871

Abstract Vault, which has a molecular mass of 10 MDa, is the largest cytoplasmic ribonucleoprotein particle. Although vaults are found in numerous eukaryotic species, the cellular function remains unclear. We have determined the x-ray structure of rat liver vault at 3.5 Å resolution. The structure consists of 78 identical MVP (Major vault protein) chains with 39-fold dihedral symmetry. Each MVP monomer folds into 12 domains; nine structural repeat domains, a shoulder domain, a cap-helix domain, and a cap-ring domain. The shoulder domain is structurally similar to a core domain of stomatin, which is a lipid-raft component in erythrocytes and epithelial cells.