

平成30年 5月28日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13747

研究課題名(和文) 結晶格子を利用したタンパク質結晶化支援タグの開発

研究課題名(英文) Development of protein crystallization tag using crystalline lattice

研究代表者

真板 宣夫 (MAITA, Nobuo)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・准教授

研究者番号：00404046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の結晶構造解析では、良質な結晶を得るために数百の結晶化条件検討が必要であり、これが一番のネックとなっている。私は多孔性結晶格子を作るタンパク質に着目し、そのままの結晶格子にゲストタンパク質を遺伝子工学的に融合させてその結晶構造を得るという手法の開発を行った。内径110 nmの八面体構造の結晶格子を作るR1ENを用いて、8種類のR1EN融合タンパク質を作製した。ユビキチンを融合体(R1EN-Ub)はリンカーの長さが異なるコンストラクトを複数作製し、R1EN単独と同じ条件で結晶を得ることが出来た。そのうち三つについてユビキチンの構造解析に成功し、この手法の有効性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：Crystal structure analysis of protein requires several hundreds of crystallization conditions screening to obtain high quality crystals, which is the most important bottleneck. I focused on proteins that make a porous crystal lattice and developed a method of genetic engineering fusion of guest proteins to the crystal lattice as it is to obtain its crystal structure. Eight proteins were selected as fusion guests to R1EN, which assembles a honeycomb lattice with an inner diameter of 11 nm. I prepared ubiquitin fusions (R1EN-Ub) with different linker lengths, and successfully crystallized under the same conditions as R1EN alone. I succeeded in structural analysis of three ubiquitin constructs. I could demonstrate the effectiveness of this R1EN fusion method.

研究分野：構造生物化学

キーワード：タンパク質結晶構造解析 結晶工学

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の結晶構造解析は、結晶化の壁を越えなければならない問題点を有する。結晶化の手間を省く手法は今までも多く研究されてきたが、有効な方法は未だない。結晶構造解析は良質なタンパク質結晶を作製する必要があるが、実際はタンパク質分子が規則的に整列している状態であれば解析が可能である。そこで、予め三次元格子を構築して、それに特定の分子を結合させるというアプローチが考えられる。東大の藤田教授らは「結晶スポンジ法」を開発し、多孔性 MOF で結晶を作り、これに低分子有機化合物を結合させて構造解析を行った(Inokuma et al, Nature, 2013)が、孔のサイズが小さいため、この方法でタンパク質の構造解析をすることは出来ない。また、DNA 配列を設計して三次元的に格子を組上げ、それにタンパク質を結合させる方法が提案されている(Seeman, Nature, 2003)。この方法は将来的に特異的配列に結合する DNA 結合タンパク質に応用可能であるが、こうして作られた DNA 結晶自体の分解能が低いことと、原理的に DNA 結合タンパク質以外には使えないという問題点がある。その他、人工設計タンパク質で格子や籠構造を作る研究(Lai et al, Science, 2012; King et al., Nature, 2014)が複数報告されており、新規タンパク質の結晶構造解析への応用が期待されている。

### 2. 研究の目的

結晶スポンジ法をタンパク質に適用する際に、二つの大きな問題点がある。一つはタンパク質を入れるのに十分な孔の大きさ、もう一つはゲストタンパク質の占有率である。30-40kDa のタンパク質であれば、内径 6-10nm の孔が必要であるが、内径 9nm の MOF はすでに報告されている(Deng et al., Science, 2012)。しかしながら、ゲストタンパク質を浸潤によって結晶格子内に 100% の占有率を達成することは原理上困難である。これらの問題は、結晶格子自体をタンパク質で作ったものを利用すれば解決する。つまり孔の大きな結晶格子を形成するタンパク質を用い、このタンパク質にゲストタンパク質を遺伝子工学で繋げればこれが可能となる。これを達成するために巨大孔を持つ人工デザインタンパク質開発が盛んに行われている。その一方、天然タンパク質結晶で巨大孔を持つものが既にいくつか存在し、それを利用すれば簡単にゲストタンパク質の結晶構造解析が可能ではないかと考えた。

本研究では既存のタンパク質結晶を三次元格子として利用して、新規タンパク質の結晶化および構造解析を容易にすることを目的とする。タンパク質結晶の中で溶媒領域の大きいものを選び、それをタグとして新規タンパク質を融合させたものを作製し、同じ結晶格子を作らせる。新規タンパク質は溶媒領域中に配置され、上手く固定されれば結晶構

造を解くことが可能となる。また、タグのタンパク質のみを一定の割合混ぜて結晶化することで分子量の大きなタンパク質についても溶媒領域中に配置出来るようにする。

### 3. 研究の方法

巨大孔結晶格子を形成する R1EN(Maita et al, Nucl Acids Res, 2007)を用いる。R1EN の結晶は空間群  $R\bar{3}21$  で単位胞の大きさが  $a=b=141.3$ ,  $c=37.5$  である。大きい結晶が得られやすく、最新の放射光線源を用いた場合、これまでに最大 1.6 Å の高分解能データが取れている。この結晶は溶媒領域が大きく(72%)、中空の八ニカム構造をしている。八ニカムの直径は約 110 Å もあり、c 軸方向は無限に穴が続いている(図 1)。また、N 末端および C 末端は共に溶媒領域に露出しており、融合させたタンパクは溶媒領域に位置することが期待される。

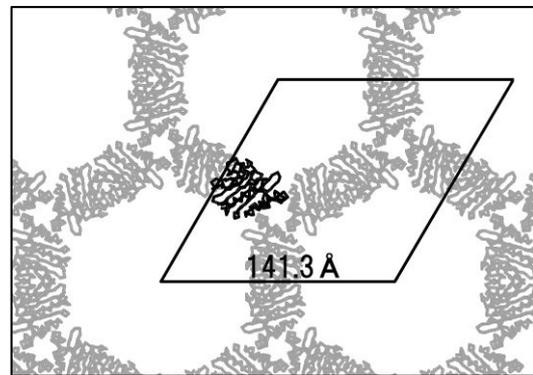


図 1 R1EN 結晶のパッキング。R1EN 一分子を太線で示す

形状にもよるが、20kDa 程度の分子量のタンパク質であれば衝突することなく溶媒領域に存在出来るため、融合タンパク質のみで結晶を作らせることが可能となる。それ以上の分子量のタンパク質の場合は、R1EN 単体を適当量混ぜて結晶化することで立体障害が起こらないように工夫をする。

結晶化は R1EN 単体の条件に近いものを用いて、デザイン通りの結晶格子が得られるようにする。R1EN 単体は溶液中でダイマーモノマーの平衡状態にあり、溶液中でも結晶パッキング中で見られた相互作用をしていることが示唆されている(未発表)。このため、融合タンパク質でも同じ結晶格子を作らせることは難しくないと期待される。

#### (1) 発現系の構築

R1EN 融合タンパク質を簡単に作製可能にするために、2007 年の論文で用いたコンストラクトを改良し、R1EN の直後に BamHI/SmaI/SalI/XhoI サイトを挿入したものを作製した。また、フレキシブルなリンカーを段階的に削り、C 末端融合のコンストラクトは pET16b-R1EN223, pET16b-R1EN225, pET16b-R1EN227, pET16b-R1EN229, pET16b-R1EN231, pET16b-R1EN245 の計 6 種類作製した。また、N 末端

融合タンパク質にも対応したコンストラクト(pGEX-R1EN-Nfus)も作製した。

#### (2) 融合タンパク質の作製

標準タンパク質としてユビキチンや Sumo1 などの融合体を作製した。その他、構造未知のタンパク質の融合体も作製した。作製したものは以下の通り。

ヒトユビキチン

pET16b-R1EN223-Ub

pET16b-R1EN225-Ub

pET16b-R1EN227-Ub

pET16b-R1EN229-Ub

pET16b-R1EN231-Ub

pET16b-R1EN245-Ub

ヒト Sumo1

pGEX-Sumo-R1EN

pGEX-Sumo-R1ENdN

マウス Fam3C

pET16b-R1EN223-FAM3C

pET16b-R1EN225-FAM3C

pET16b-R1EN231-FAM3C

pET16b-R1EN245-FAM3C

マウス METTL7B

pET16b-R1EN223-METTL7B

pET16b-R1EN225-METTL7B

pET16b-R1EN231-METTL7B

マウス CABIT1

pET16b\_R1EN223-CABIT1

pET16b\_R1EN225-CABIT1

ハダカデバネズミ Mfn2

pET16b\_R1EN223-Hg1Mfn2Cter

カイコ PCNA

pET16b\_R1EN225-BmPCNA

pET16b\_R1EN227-BmPCNA

マウス PrP

pET16b\_mPrP-R1EN

その他、複合体構造解析を目的として、R1EN のN末とC末にそれぞれ hHR23a-UIM とユビキチン、Sumo1 と SIM を融合させたコンストラクトを作製した。

#### (3) 精製、結晶化、データ測定

上記コンストラクトを大腸菌 BL21(DE3) Rosetta2 pLysS で発現させ、HisTrap カラムでアフィニティ精製後、陽イオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製を行った。精製タンパク質はバッファーA[30 mM Hepes-Na pH7.2, 0.18 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT] 中で 5 mg/ml まで限外ろ過膜で濃縮した。結晶化は以前の論文での条件 [1.8 M 酢酸ナトリウム pH7.8, 10 mM 硫酸アンモニウム, 1.0% Jeffamine M600 pH7]で行った。マイクロシーディングは、得られた結晶を 50  $\mu$ l の沈殿剤中に回収し、マイクロホモジナイザーですり潰して、さらに 500 倍希釈したものをタンパク質溶液と等量混合して蒸気拡散法の結晶化ドロップを作った。得られた結晶はマイクロループで掬って 18%グリセリンを含む溶液に移したのち、液体窒素で凍結させて

保存し、放射光施設でデータ測定を行った。回折データは XDS または iMosflm で処理し、ccp4i にバンドルされているソフトウェアを用いて精密化を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) R1EN-Ub の結晶構造解析

METT7LB と PrP は発現量が低く、また性質が悪かったため精製出来なかった。精製した R1EN245-Ub について、R1EN 単独の場合と同じ条件で結晶化を行ったが、結晶は得られなかった。そこで R1EN 単独の結晶を種結晶として、マイクロシーディングを行ったところ、R1EN 単独と同じ外形の結晶が得られた。R1EN 単独の混入を減らすため、さらにマイクロシーディングを行った。この結晶をフォトンファクトリーで回折データを取ったところ、空間群及び結晶学的パラメータは R1-EN243 単独の場合と同一であった。R1EN の構造を用いて分子置換を行い、電子密度を計算したところ、ユビキチンの電子密度は得られなかった。これは、R1EN 単独の結晶構造では、Gly222 までしか電子密度が見られておらず (Maita et al., 2007)、223-245 の領域がフレキシブルで、ユビキチンが固定されない事によると考えられた。そこでリンカーの長さを短くすることにし、Gly223 まで(R1EN223-Ub)、Thr225 まで(R1EN225-Ub)、Glu227 まで(R1EN227-Ub)、Asp231 まで(R1BmEN231-Ub)のコンストラクトを作製し、同様に結晶化を行い、回折データを取得して電子密度を計算した。リンカーが一番長い R1EN231-Ub では R1EN245-Ub と同様に電子密度が見られなかった一方、R1EN223-Ub、R1EN225-Ub 及び R1-EN227-Ub では空隙に一塊の電子密度を確認することが出来た。R1EN223-Ub のデータ(1.7  $\text{\AA}$ )で R1EN (PDB:2E19) とユビキチン(1UBQ)の二つの構造をサーチモデルとして分子置換を行うと、ユビキチンの正しい解が得られた(図2)。ただし電子密度は R1EN 部分と比べて弱く、ユビキチンの  $\alpha$ 1 は対称分子の  $\alpha$ 1 と近接していた。このことから、結晶格子中のユビキチンすべては固定されておらず、占有率は半分以下であると思われた。

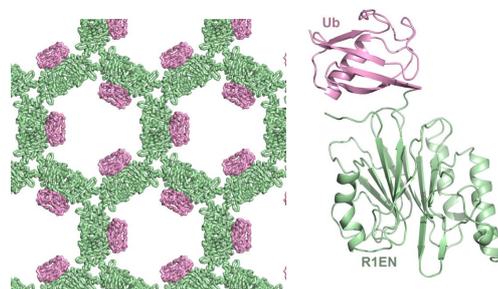
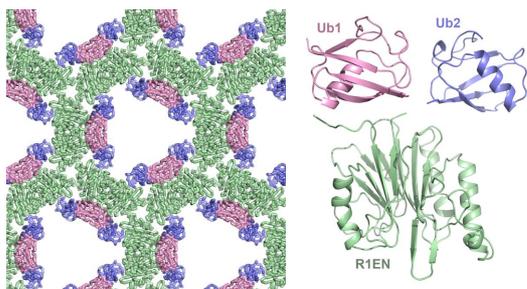


図2 R1EN223-Ub 結晶のバックング(左)。R1EN223-Ub の全体構造(右)

次に、この手法でユビキチン構造が ab initio に R1EN の分子置換による位相だけで解けるかどうか試した。R1EN モデルから計算

した位相を用いてDMによる位相改善 & 自動モデル構築を行ったところ、65/72 残基を自動で主鎖を置くことが出来、そのうち 36 残基は側鎖までモデリングすることが出来た。また、R1EN225-Ub と R1EN227-Ub では、R1EN223-Ub で見たのと同じ位置に Ub が結合している他に、もう一つ別の位置にも Ub が結合しているのが確認できた(図3)。これは Ub のマルチコンフォーメーションであると考えられる。便宜上、R1EN223-Ub で見られた位置を Ub1、R1EN225-Ub と R1EN227-Ub で新たに見られた位置を Ub2 と表記する。R1EN の C 末端と Ub2 の N 末端の距離は 9.4 Å で、R1EN223-Ub のリンカーでは届かない距離であった。

Ub1 は Ub も R1EN も構造は単独のものとはほとんど変化は見られなかった。しかしながら、Ub1 と R1EN の N 末の His4-Pro9 との相互作用が見られた。R1EN 単独結晶構造ではこの N 末領域は単独構造ではディスオーダーしている領域であり、ユビキチンが融合されたことで新たな相互作用により構造が固定されたと考えられる。Ub1 と Ub2 の相互作用を詳しく見ると、Ub1-Ub1 は Ub1 の 1 同士の間以外には極めて自然な相互作用であり、Ub1-Ub2 も不自然な点は見られなかった。このことから、4 つのユビキチン(Ub1 と Ub2 がそれぞれ 2 つ)が一つのユニットとして結晶格子を作っていることが示唆された。C 軸方向にはこのユニットが規則正しく整列することが出来るが、六角形を構成する軸の間では独立しているので結果として衝突やマルチコンフォーマーとして観察されると推察された。



**図3** R1EN225-Ub 結晶のバックング(左)。R1EN225-Ub の全体構造(右)

R1EN の構造を比較したところ、Ile88-Leu93 のループ部分に小さな構造変化が見られた。構造変化していない場合の電子密度も見られたことから、この部分はマルチコンフォーマーもしくは、Ub が固定されているものとされていないものの違いを表していると思われる。この変化により、Trp91 が、隣接する 2 つの対称分子の Ub と疎水性相互作用しており、Ub の位置の安定化に寄与していると思われる。Ub1 の 1-2 のループ領域は、アシメの R1EN と直接が 3 つ、水分子を介したものの 1 つの相互作用が見られた。R1EN の Ile88-Leu93 領域はこの相互作用領域に含ま

れており、構造変化したもののほうが水素結合が 1 つ多くなっている。

ユビキチンの構造を、報告されている結晶構造 (1UBQ) と比較したところ RMSD = 0.46-0.55 Å で、ほとんど同じであった。このことから、R1EN に融合させて結晶構造解析を行う手法は極めて有効であると結論付けられた。

### (2) その他のタンパク質

METT7LB と PrP は発現量が低く、また性質が悪かったため精製出来なかった。ユビキチン以外では、ほとんどのサンプルで結晶が得ることが出来なかった。Sumo1-R1EN で結晶が得られたが、解析の結果、Sumo1 の電子密度は見えなかった。その理由として、Sumo1 の C 末端が比較的フレキシブルで、さらに R1EN の N 末端(5-9)もフレキシブルであったためと考えられる。その他に、分子量の大きいものについて空隙内のスペースを確保するために融合体と R1EN 単独を混ぜて結晶化することを試みた。R1EN225-FAM3C と R1EN を等量混ぜたものについて結晶化を行い結晶は得られたが、解析の結果、R1EN 単独のみが結晶化したものと判明した。

### (3) まとめ

R1EN の結晶格子をそのまま利用して、新たに融合タンパク質の結晶構造解析を行うという当初の目的はユビキチンで達成された。しかしながら、ユビキチン以外のタンパク質について期限内に構造を得ることは出来なかった。原因として、立体障害で R1EN の結晶格子に組み込めない、とは逆に、結晶内で揺らいでいて電子密度が見えない、融合したゲストタンパク質の相互作用が強く、格子形成の邪魔をしている、などが考えられる。今回成功したユビキチンに於いてもリンカーが長いと電子密度は得られず、また R1EN の N 末ペプチドとの相互作用のおかげでユビキチンが固定されていたことから、リンカーの長さ及び N 末の配列のデザインが成功のカギであると思われる。これらの結果を踏まえ、今後はゲストタンパク質分子量の上限を上げることと、N 末のペプチドデザインを行って、汎用性のある方法にしたい。

### <引用文献>

- Inokuma Y, et al, X-ray analysis on the nanogram to microgram scale using porous complexes. *Nature* 495, 461-466 (2013).
- Seeman NC, DNA in a material world. *Nature* 421, 427-431 (2003).
- Lai YT, et al, Structure of a designed protein cage that self-assembles into a highly porous cube. *Nature Chem* 6, 1065-1071 (2014).
- King NP, et al, Accurate design of co-assembling multi-component protein

nanomaterials. *Nature* 510, 103-108 (2014).  
Deng H, et al, Large-Pore Apertures in a Series of Metal-Organic Frameworks. *Science* 336, 1018-1023 (2012).  
Maita N, et al, Characterization of the sequence specificity of the R1Bm endonuclease domain by structural and biochemical studies. *Nucl Acids Res* 35, 3918-3927 (2007).

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 3件)

Keisuke Kitakaze, Yasumichi Mizutani, Eiji Sugiyama, Chikako Tasaki, Daisuke Tsuji, Nobuo Maita, Takatsugu Hirokawa, Daisuke Asanuma, Mako Kamiya, Kohei Sato, Mitsutoshi Setou, Yasuteru Urano, Tadayasu Togawa, Akira Otaka, Hitoshi Sakuraba & Kohji Itoh. Protease-resistant modified human -hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model. *J Clin Invest* 126, 1691-1703 (2016). DOI:10.1172/JCI85300

[査読有]

Ayako Ohno, Arisa Ochi, Nobuo Maita, Tatsuya Ueji, Aki Bando, Reiko Nakao, Katsuya Hirasaka, Tomoki Abe, Shigetada Teshima-Kondo, Hisao Nemoto, Yuushi Okumura, Akira Higashibata, Sachiko Yano, Hidehito Tochio & Takeshi Nikawa. Structural analysis of the TKB domain of ubiquitin ligase Cbl-b complexed with its small inhibitory peptide, Cblin. *Arch Biochem Biophys* 594, 1-7 (2016). DOI:10.1016/j.abb.2016.02.014

[査読有]

Akihiro Sugawara, Nobuo Maita, Hiroaki Gouda, Tsuyoshi Yamamoto, Tomoyasu Hirose, Saori Kimura, Yoshifumi Saito, Hayato Nakano, Takako Kasai, Hirofumi Nakano, Kazuro Shiomi, Shuichi Hirono, Takeshi Watanabe, Hisaaki Taniguchi, Satoshi Omura & Toshiaki Sunazuka. Creation of customised bioactivity within a 14-membered macrolide scaffold; design, synthesis, and biological evaluation using a family-18 chitinase. *J Med Chem* 58, 4984-4997 (2015). DOI:10.1021/acs.jmedchem.5b00175

[査読有]

##### [学会発表](計 7件)

真板 綾子, 真板 宣夫, 奥村 裕司, 永野 ひかる, 有田 恭平, 平坂 勝也, 安倍 知紀, 近藤 茂忠, 二川 健” 高病原性インフルエンザ感染に関わる宿主酵素 MSPL と阻害ペプチドとの複合体構造 “ 第 71 回日本栄養・食糧学会大会、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市), 2017 年 5 月 21 日

真板綾子, 真板宣夫, 奥村裕司, 永野ひかる, 次田早希, 有田恭平, 田畑考統, 平坂勝也, 安倍知紀, 近藤茂忠, 二川 健. “ II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ MSPL とペプチド性阻害剤との複合体結晶構造解析 ” 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(横浜市), 2016 年 12 月 2 日

真板綾子, 真板宣夫, 奥村裕司, 永野ひかる, 次田早希, 有田恭平, 坂東亜紀, 田畑考統, 平坂勝也, 安倍知紀, 近藤茂忠, 二川健. “ 高病原性インフルエンザウィルス感染に関わる宿主酵素 MSPL とペプチド性阻害剤の複合体結晶構造 ” , 第 16 回蛋白質科学学会年会, 福岡国際会議場(福岡市), 2016 年 6 月 9 日

鈴木良尚, 真板宣夫. “ グルコースイソメラーゼの沈澱剤フリー結晶化と結晶構造解析 ” , 日本物理学会第 71 回年次大会, 東北学院大学(仙台市), 2016 年 3 月 21 日

北風圭介, 水谷安通, 杉山栄二, 真板宣夫, 広川貴次, 瀬藤光利, 櫻庭均, 伊藤孝司. “ 改変型ヒト Hexosaminidase の GM2 蓄積症モデルに対する治療効果の評価 ” , BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸国際会議場(神戸市), 2015 年 12 月 2 日

伊藤孝司, 西岡宗一郎, 辻大輔, 東哲也, 真板宣夫, 小林功, 瀬筒秀樹, 湯本史明, 原囿景, 石明子, 川崎ナナ. “ 新規組換えリソソーム酵素の創製とリソソーム病治療への応用 ” , 第 15 回蛋白質科学学会年会, あわぎんホール(徳島市), 2015 年 6 月 25 日

真板宣夫, 月村考宏, 谷口貴子, 斎藤誠司, 大野一樹, 谷口寿章, 櫻庭均. “ -L-イズロニダーゼの結晶構造より明らかになった新たな N 型糖鎖の機能 ” , 第 15 回日本蛋白質科学学会年会, あわぎんホール(徳島市), 2015 年 6 月 24 日

##### [図書](計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 2件）

名称：多孔性タンパク質結晶を利用したタンパク質結晶化  
発明者：真板宣夫  
権利者：国立大学法人徳島大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-042456  
出願年月日：2017年3月7日  
国内外の別：国内

名称：多孔性タンパク質結晶を利用したタンパク質結晶化  
発明者：真板宣夫  
権利者：国立大学法人徳島大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2018/7697  
出願年月日：2018年3月1日  
国内外の別：国際

取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

Researchmap

<https://researchmap.jp/read0139279/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真板 宣夫 (MAITA, Nobuo)

徳島大学・先端酵素学研究所・准教授

研究者番号：00404046