

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82118

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14468

研究課題名(和文)膜タンパク質複合体のS-SAD法による構造解析

研究課題名(英文)Crystallography of membrane protein complex by S-SAD method

研究代表者

加藤 龍一 (KATO, Ryuichi)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：50240833

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)：先天性筋ジストロフィー症に関わる膜タンパク質複合体 POMT1-POMT2 の立体構造解析のため、哺乳類培養細胞での発現実験を行ったが発現量が非常に少なく、改善を試みたが結晶化を行うのに十分なタンパク質が得られなかった。そこで、昆虫虫体で発現させたタンパク質が体内で結晶化する方法を検討したが、目的タンパク質の発現は確認できなかった。

膜タンパク質であるPOMT1-POMT2 のX線結晶構造解析を、硫黄原子の異常分散効果を利用する位相決定法(S-SAD法)で行う手法の開発については、高エネ機構の放射光ビームラインで標準タンパク質を用いてS-SAD法の改良を行い、十分な成果が得られた。

研究成果の概要(英文)： For structural study of the membrane protein complex POMT1-POMT2, which is involved in congenital muscular dystrophy, expression experiments in mammalian cultured cells were performed. Unfortunately, the expression level was very low, which is insufficient to start crystallization experiments. We also examined the method of crystallizing proteins expressed in insect body, but the proteins did not express.

In parallel, we studied development of a method of performing X-ray crystal structure analysis of membrane protein POMT1-POMT2 by a phase determination method utilizing the anomalous dispersion effect of sulfur atoms (S-SAD method). By using standard proteins with synchrotron beamline at KEK, S-SAD method was improved, and sufficient results were obtained.

研究分野：構造生物学

キーワード：筋ジストロフィー ジストログリカン 膜タンパク質 結晶構造解析 POMT1 POMT2

1. 研究開始当初の背景

先天性筋ジストロフィー症の患者の遺伝子解析から、細胞外基質の構成タンパク質である α -ジストログリカンの糖鎖修飾異常がその原因であることが明らかにされている。

α -ジストログリカンは、ラミニン(laminin)などに代表される細胞外基底膜に存在するタンパク質群と、 α -ジストログリカン(α -dystroglycan)に修飾された糖鎖を介して相互作用をする。よって、 α -ジストログリカンの糖鎖修飾異常により、 α -ジストログリカンと細胞外基底膜に存在するタンパク質群との相互作用が破綻する結果、筋繊維細胞などが異常を起こし、先天性筋ジストロフィー症を発症する。また、 α -ジストログリカンは、哺乳類のタンパク質がもつ糖鎖としてはユニークな O-マンノース型糖鎖修飾を受けている。

本研究において構造解析の対象とする膜タンパク質酵素 POMT1-POMT2 複合体は、この α -ジストログリカんに糖鎖の最初のマンノースを付加する酵素として同定された。POMT1、POMT2 はそれぞれヒトにおいては、747 アミノ酸残基、750 アミノ酸残基の膜タンパク質であり、小胞体に局在していると考えられている。in vitro における POMT1 あるいは POMT2 タンパク質の単離、及び、O-マンノース型糖鎖修飾活性の測定は長い間困難を伴ったが、本研究の連携研究者である萬谷らによって、POMT1-POMT2 複合体を形成することが糖鎖修飾活性に必要であること、また、可溶化において界面活性剤 n-octyl-D-thioglucoside を用いることが酵素活性発現の鍵であること、などが見出されてきた。

先天性筋ジストロフィー症に深く関係している POMT1-POMT2 複合体の立体構造を決定することは、それ自体大きな学術的意義がある。そして、POMT1-POMT2 複合体の糖鎖修飾反応機構の解明は病因の基本的理解に寄与し、その治療につながる可能性がある。しかしながら、POMT1-POMT2 は膜タンパク質であり、また複合体でもあることから、近年まで活性測定条件を見出すことさえ困難であった。そのようなターゲットの発現及び、単離・精製・結晶化の条件を確立することは大きなチャレンジである。

2. 研究の目的

哺乳類細胞を用いて POMT1-POMT2 複合体の発現系を確立し、構造解析に向けたタンパク質の大量調整を行う。界面活性剤や脂質の検討を行い、POMT1-POMT2 複合体の結晶化が可能になる精製法を確立する。精製した POMT1-POMT2 複合体の結晶化を行い、硫黄原子の異常分散効果を利用する位相決定法(S-SAD 法)による立体構造解析を行う。立体構造情報に基づいて、先天性筋ジストロフ

フィー症の分子機構を明らかにすると共に、S-SAD 法を膜タンパク質に適応する手法の開発を行う。

3. 研究の方法

まず最初に、哺乳類細胞での POMT1-POMT2 複合体の発現系の構築を行う。POMT1 および POMT2 の C 末端に GFP をつなげて、その蛍光を測定することで高発現株を選択した。先行実験として、トランジェントでの発現には成功しており、これをベースに研究を展開した。大量発現に成功すれば、POMT1-POMT2 複合体の可溶化・精製条件の検討を行う予定であった。POMT1-POMT2 複合体は、それぞれ単独では活性を示さず、POMT1 と POMT2 の共発現が必須で、POMT1-POMT2 複合体の活性を保持したまま可溶化できる界面活性剤も限られているので、共発現での検討および、界面活性剤、精製の条件の検討を行った。

結晶構造解析については、S-SAD 法に最適化された放射光ビームラインで X 線回折データを効率よく収集するための研究を行い、膜タンパク質での S-SAD 法の確立を目指した。そして、それを POMT1-POMT2 複合体の立体構造決定へ適用するという方針で研究を進めた。

4. 研究成果

POMT1、POMT2 の哺乳類培養細胞での発現コンストラクトの設計を行い、それに基づいて発現用プラスミドの作成を行った。それを用いて発現実験を行ったが、両者とも発現量が非常に少なく、そのままでは結晶化スクリーニング実験を行うのに十分なタンパク質が得られない量であった。発現条件の検討を行うと共にコンストラクトの見直し等も行ったが、残念ながら発現量の改善には至らなかった。

少ないながら発現したタンパク質について、精製を試みた。界面活性剤の種類および濃度、脂質の選択および界面活性剤と脂質の混合比、などについて検討を行ったが、発現量そのものが少ないため、有効な精製法の確立に至らなかった。また、得られたタンパク質については、純度も分量も結晶化を開始するには不十分であった。

そこで、昆虫虫体で発現させたタンパク質が体内で結晶化する方法を、本研究に応用することを目指し、その検討を行った。しかしながら、こちらについても POMT1、POMT2 についてはその発現を確認することができなかった。

上記と平行して、POMT1-POMT2 複合体の結晶が得られた時に備えて、膜タンパク質の結

晶化およびX線回折実験についての実験方法の検討を行った。高エネ機構で開発運用している結晶化ロボットについて、Bicelle 法および LCP (lipidic cubic phase) 法による結晶化の対応について検討を進め、これらの方法による大規模結晶化スクリーニングを可能にした。これによって膜タンパク質の結晶化スクリーニングが効率よく行えるようになった。

結晶化スクリーニングで得られた結晶がタンパク質結晶かどうか、そしてその回折能がどれくらいであるかを簡単に調べることができるように、結晶化ドロップから結晶を取り出さずに結晶化プレートのままX線回折実験が行える環境を高エネ機構の放射光研究施設のタンパク質結晶構造解析用ビームライン PF, BL-17A に整えた。

位相問題を解決するための位相情報の取得を、タンパク質に元からある硫黄原子の異常分散を用いて行う S-SAD 法の改良についての検討を進め、高エネ機構の放射光施設のビームラインで、効率の良いデータ収集法の開発を行うことができた。なお、これらについては、POMT1-POMT2 複合体の結晶が得られなかったため、標準タンパク質を用いて研究開発を行った。

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 2件)

Yamashita K, Kuwabara N, Nakane T, Murai T, Mizohata E, Sugahara M, Pan D, Masuda T, Suzuki M, Sato T, Kodan A, Yamaguchi T, Nango E, Tanaka T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Yabashi M, Manya H, Endo T, Kato R, Senda T, Kato H, Iwata S, Ago H, Yamamoto M, Yumoto F and Nakatsu T., Experimental phase determination with selenome-thionine or mercury-derivatization in serial femtosecond crystallography. 査読あり IUCr J. 4, 1-9, 2017 DOI: 10.1107/S2052252517008557

Yamada, Y., Hiraki, M., Matsugaki, N., Kato, R. & Senda, T., In-situ data collection at the photon factory macromolecular crystallography beamlines. 査読あり AIP Conf. Proc. 1741, 050023(1-4), 2016 DOI: 10.1063/1.4952943

[学会発表](計 5件)

ConBio2017 神戸 2017.12.7
PF タンパク質結晶構造解析ビームラインに

よる構造生物学研究支援

山田 悠介、松垣 直宏、引田 理英、平木 雅彦、加藤 龍一、千田 俊哉 .

ConBio2017 神戸 2017.12.7

ヒトタンパク質の哺乳動物細胞を用いた細胞内結晶化

小祝 孝太郎、月本 準、東 哲也、真板 宣夫、山田 悠介、平木 雅彦、加藤 龍一、千田 俊哉、Chavas Leonard、伊藤 孝司、湯本 史明 .

日本結晶学会平成 29 年度年会 広島 2017.11.24

BINDSにおけるPFタンパク質結晶構造解析ビームラインの支援と高度化

山田 悠介、引田 理英、松垣 直宏、平木 雅彦、田辺 幹雄、湯本 史明、加藤 龍一、千田 俊哉 .

第 17 回日本蛋白質科学会年会 仙台 2017.6.22

ヒトタンパク質の哺乳動物を用いた細胞内結晶化

小祝 孝太郎、月本 準、東 哲也、真板 宣夫、山田 悠介、平木 雅彦、加藤 龍一、Leonard M. G. Chavas、千田 俊哉、伊藤 孝司、湯本 史明 .

The 12th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI 2015) ニューヨーク (アメリカ) 2015.07.08

In situ data collection at the Photon Factory macromolecular crystallography beamlines.

Yusuke Yamada, Naohiro Matsugaki, Masahiko Hiraki, Ryuichi Kato and Toshiya Senda

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<https://www2.kek.jp/imss/sbr/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 龍一 (KATO, Ryuichi)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：50240833

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

牧尾 尚能 (MAKIYO, Hisayoshi)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・研究員
研究者番号：00467474

松垣 直宏 (MATSUGAKI, Naohiro)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授
研究者番号：50342598

山田 悠介 (YAMADA, Yusuke)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教
研究者番号：20391708

萬谷 博 (MANYA, Hiroshi)
東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長
研究者番号：20321870

(4)研究協力者

なし