

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13095

研究課題名(和文)細胞内蛋白質結晶化反応を用いた構造解析手法の開拓

研究課題名(英文)In cell protein crystallization for structure analysis

研究代表者

上野 隆史(Ueno, Takafumi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：70332179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：X線結晶構造解析の目覚ましい進歩により、従来不可能と考えられてきたマイクロ微小結晶からの構造決定が次々と報告されている。これらの成果は、精製された大量の蛋白質と、良質な結晶を得るための長い時間が必要とされてきた結晶作成の常識を劇的に変えつつある。本研究では、迅速結晶構造解析に向けた革新的な結晶化手法の確立として、細胞内で鑄型となる細孔を蛋白質の結晶化により作成し、構造解析の目的となる蛋白質を同じ細胞内で同時に発現させ、鑄型蛋白質結晶の細孔へ規則正しく集積し、複合結晶の構造解析を目指した。その結果、タンパク質を挿入可能な内部空間を形成し、さらに目的タンパク質をその内部に挿入することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：Due to the remarkable progress of X-ray crystal structure analysis, structure determination from micro protein crystals has been reported. These results are dramatically changing the common sense of protein crystallization which requires a long time, a large quantity and high quality of protein samples. One challenge using this technique is to determine protein structures with microcrystals formed spontaneously in cells. Natural systems utilize intracellular crystallization reactions for purification and storage of protein synthesized in vivo. In this study, we succeeded in the creation of protein crystals with pore spaces as intracellular templates as an innovative crystallization method for rapid crystal structure analysis. In addition, we succeeded in accumulating the target protein simultaneously produced in the crystal.

研究分野：生体関連機能化学

キーワード：タンパク質結晶 結晶構造解析 タンパク質集合体 超分子化学

1. 研究開始当初の背景

近年、X線結晶構造解析の目覚ましい進歩により、従来不可能と考えられてきた数 $\mu\text{m}$ の微小結晶からの構造決定が次々と報告されている。これらの成果は、精製された大量の蛋白質と、良質な結晶を得るための長い時間が必要とされてきた結晶作成の常識を劇的に変えつつある。この技術を用いたチャレンジの一つに、細胞内で自発的に形成される蛋白質微小結晶の構造決定がある。生命は、生体内で合成した蛋白質の精製、保存の戦略として細胞内の結晶化反応を巧みに利用している。この現象は、生物学的には古くから知られているものの、得られる結晶サイズが数 $\mu\text{m}$ であり、結晶構造解析に用いられることはなかった。しかし、2007年に昆虫細胞で形成される多角体結晶の構造が決定されて以来(Coulibaly et al., *Nature* 2007)、細胞内で形成された蛋白質結晶の構造解析は注目を浴びつつも、報告例は数例にとどまっている。その理由は、未だに細胞内で様々な蛋白質を結晶化する手法が確立されていないためである。一方、研究代表者はこれまで、多くの蛋白質結晶の内部に形成される数 nm の細孔へ様々な機能分子の集積が可能であることを示してきた (*RSC Adv.* 2015, *Inorg. Chem.* 2015, *Small*, 2012, *ACIE* 2011)。また、蛋白質結晶内に形成される細孔の特徴を生かし、集積した化合物の高分解能構造解析にも成功している (*Inorg. Chem.* 2010, *JACS* 2009)。最近では、細胞内で安定な結晶を形成する多角体の分子設計により、結晶内部への機能分子集積制御にも成功している (*Adv. Mater.* 2015, *Chem. Lett.* 2015)。従って、これらの機能化法を融合し、新しい細胞内の蛋白質結晶化手法の確立が可能と考え、本研究に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、迅速結晶構造解析に向けた革新的な結晶化手法の確立にあり、従来の培養・精製した蛋白質の結晶化とは全く逆の発想により達成する。具体的には、(1)細胞内で鑄型となる細孔を蛋白質の結晶化により作成し、(2)構造解析の目的となる蛋白質を同じ細胞内で同時に発現させ、

鑄型蛋白質結晶の細孔へ規則正しく集積し、(3)細胞に封入されたまま目的蛋白質を含む複合結晶の構造解析を目指す。本手法は、蛋白質結晶化反応から構造解析までを一つの細胞内で完遂する斬新な手法であり、生命原理の理解や、創薬等に向けた革新的な分子技術となる。

3. 研究の方法

(1) 細孔を有する鑄型蛋白質結晶の設計と細胞内合成

昆虫の多角体病ウイルスは、昆虫細胞感染後に多角体とよばれる結晶性蛋白質を産生する。この多角体は、自己集積反応により細胞内に1-5 $\mu\text{m}$ の結晶を形成する(図 1a, 1b)。多角体結晶の本来の役割は、多角体病ウイルスの保護である。野生型の多角体結晶は結晶全体積のわずか19%の細孔空間しか持たないために、広範囲な pH、温度、有機溶媒、乾燥、凍結に対し安定に結晶を保持できる。この性質を利用し、細孔を有する鑄型蛋白質結晶を形成する。多角体結晶を鑄型とし、目的の蛋白質を規則正しく集

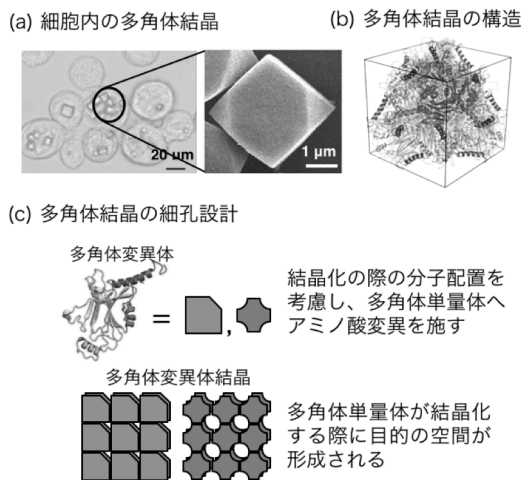


図 1. 細胞内の多角体結晶(a)、その結晶構造(b)と多角体結晶内の細孔設計(c)

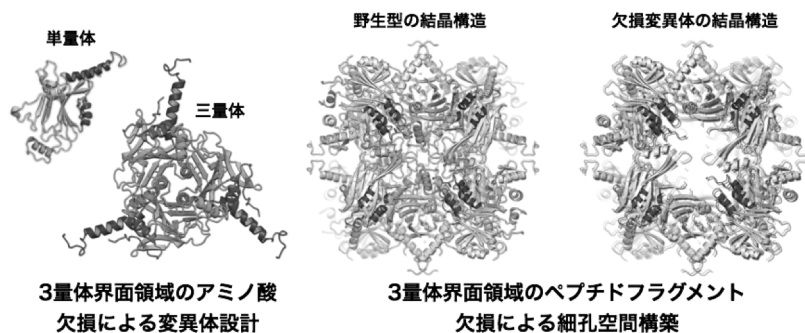


図 2. 三量体界面領域のペプチド欠損による細孔空間構築

積するためには、内部空間の拡張が必要となる(図 1c)。この機能化に際し、最初に必要な設計は、結晶の形成と安定化に必須な分子界面の同定である。野生型の結晶構造からは、多角体単量体が結晶中で三量体構造を形成し、構造単位となって結晶が構築されていることがわかる(図 2)。つまり、三量体同士が相互作用する部位のアミノ酸置換あるいは、フラグメント欠損を緻密に設計できれば、細孔空間を広げることができると考えた。そこで、結晶内の構造ユニットである三量体間の分子動力学計算によって、三量体間界面の結晶安定性への影響を見積もり、アミノ置換やフラグメント欠損領域の候補を絞る。

#### 4. 研究成果

実際に、特定の領域を削除した多角体変異体の結晶化に成功し、大きな空間を有する結晶の形成を確認した。また、幾つかのタンパク質の挿入と、その複合結晶からの回折データ取得も成功しており、当初の目的を達成している。

#### 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 12 件)

1. T. K. Nguyen and T. Ueno  
Engineering of Protein Assemblies within Cells  
*Curr. Opin. Struct. Biol.*, 51, 1-8 (2018).
2. S. Ryu, Y. Matsumoto, T. Matsumoto, T. Ueno, Y. R. Silberberg, and C. Nakamura  
Improved efficiency of nanoneedle insertion by modification with a cell-puncturing protein  
*Jpn. J. Appl. Phys.*, 57, 03EB02 (2018).
3. S. Abe, B. Maity, and T. Ueno  
Functionalization of protein crystals with metal ions, complexes and nanoparticles  
*Curr. Opin. Chem. Biol.*, 43, 68-76 (2018)
4. H. Inaba, and T. Ueno  
Artificial bio-nanomachines based on protein needles derived from bacteriophage T4  
*Biophys. Rev.*, *in press*.
5. S. Abe, K. Atsumi, K. Yamashita, K. Hirata, H. Mori, and T. Ueno  
Structure of in cell protein crystals containing organometallic complexes  
*PCCP*, 20, 2986-2989 (2018).
6. B. Maity, S. Abe, and T. Ueno  
Observation of gold sub-nanocluster nucleation within a crystalline protein cage  
*Nat. Commun.*, 8, 14820 (2017).
7. S. Abe, H. Tabe, H. Ijiri, K. Yamashita, K.

Hirata, K. Atsumi, T. Shimoi, M. Akai, H. Mori, S. Kitagawa and T. Ueno  
Crystal Engineering of Self-Assembled Porous Protein Materials in Living Cells  
*ACS Nano*, 11, 2410-2419 (2017).

8. 安部 聡、上野隆史  
超分子タンパク質の分子設計によるバイオハイブリッド材料の開発  
*有機合成化学協会誌*, 75, 1264-1273 (2017).

9. B. Maity, and T. Ueno  
Design of Bioinorganic Materials At the Interface of Coordination and Biosupramolecular Chemistry  
*Chem. Rec.*, 17, 383-398 (2017) (Selected as a Front Cover).

10. B. Maity, K. Fukumori, S. Abe and T. Ueno  
Immobilization of two organometallic complexes into a single cage to construct protein-based microcompartment  
*Chem. Commun.*, 52, 5463-5466 (2016).

11. H. Tabe, T. Shimoi, M. Boudes, S. Abe, F. Coulibaly, S. Kitagawa, H. Mori, T. Ueno  
Photoactivatable CO Release from Engineered Protein Crystals to Modulate NF- $\kappa$ B Activation  
*Chem. Commun.*, 52, 4545-4548 (2016).

12. S. Abe, B. Maity, and T. Ueno  
Design of a Confined Environment using a Protein Cage and Crystals in Development of Biohybrid Materials  
*Chem. Commun.*, 52, 6496-6512 (2016). (Selected as an Inside Front Cover)

[学会発表] (計 20 件)

1. T.Ueno, "Construction of Protein Needle and the Application for In Vivo MRI imaging"  
KAIST-Tokyo Tech Bio Joint Workshop, KAIST, Daejeon, Korea, 22/Feb/2018 (Invited Lecture)
2. T.Ueno, "Design of Protein Assembly for Supramolecular materials"  
Post-Mini workshop of Tokyo Tech Life Science and Technology International Symposium, "New Frontiers of Supramolecular Chemistry in Non-equilibrium Systems", Tokyo Tech, Tokyo 11/Jan/2018 (Invited Lecture)
3. T.Ueno, "DESIGN OF PROTEIN ASSEMBLY FOR BIOINORGNIC MATERIALS"  
11th Japan-China Joint Symposium on Metal Cluster Compounds, Nagoya Univ., Nagoya, 09/Oct/2017 (Invited Lecture)
4. T.Ueno, "Design of Bioinorganic Materials Constructed by Coordination Chemistry"  
6th Asian Conference on Coordination Chemistry Melbourne, Australia, 25/Jul/2017 (Invited Lecture)
5. T.Ueno, "Functional Design of Protein Cage for Sustainable Bionanomaterial"

ASPIRE FORUM 2017, NTU, Singapore, 13/July/2017 (Invited Lecture)

6. T.Ueno, "Artificial Protein Architectures

Designed by Crystal Engineering"

Session: Science of mobility-coupled functional molecular machines, The 17th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan, Sendai, 22/Jun/2017

7. T.Ueno, "Design of Protein Assemblies as Molecular Templates"

10th China-Japan Joint Symposium on Functional Supramolecular Architectures, Wuhan University, Wuhan, China, 16/May/2017 (Invited Lecture)

8. T.Ueno, "Design of Protein Assemblies as Supramolecular Platforms"

Frontier Bioorganization Forum 2017, 1. T.Ueno, "Dynamical ordering and integrated functions of biomolecular systems", Academia Sinica, Taipei, 25/Apr/2017 (Invited Lecture)

9. T.Ueno, "CO Releasing Bioinorganic Nanomaterials for CO Gas Biology"

The International Advanced Drug Delivery Symposium 2017

Taipei, 06/Apr/2017(Invited Lecture)

10. T.Ueno, "Design of Protein Assemblies in Development of Biohybrid Materials"

Research Innovation Symposium in Life Science and Technology

Suzukake Hall, 09/Mar/2017(Invited Lecture)

11. T.Ueno, "Nanobiotechnology for designing hybrid materials by Protein Assembly"

11th Annual Symposium on Nanobiotechnology 2017 -Frontiers in Nanobiology and Nanomedicine-

Kawasaki, 28/Feb/2017(Invited Lecture)

12. T.Ueno, "Design of Protein Architectures in Development of Biohybrid Materials"

KAIST-Tokyo Tech Bio Joint Workshop

-Frontier of peptide/protein-based science and engineering-

Suzukake Hall, 23/Feb/2017(Invited Lecture)

13. T.Ueno, "IN VIVO FUNCTIONS OF ORGANOMETALLOPROTEINS"

5th Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry

Kolkata, 8/Jan/2017 (Invited Lecture)

14. T.Ueno, "In Vivo and In Vitro Bioinorganic Functions Designed within Ferritin Cage"

8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference

Auckland, 6/Dec/2016 (Invited Lecture)

15. T.Ueno, "Multi-bioinorganic Functions Designed within Protein Cage"

Japan-Korea-Taiwan Bioinorganic Chemistry Symposium 2016

Okazaki, Sep/30/2016 (Invited Lecture)

16. T.Ueno, "Biosupramolecular materials designed by protein assemblies"

2016 International Symposium on Polymer and Related Materials

Harbin Engineering University, Harbin, China, Jul/10/2016 (Invited Lecture)

17. T4フェージ由来蛋白質針による生体膜透過の動的秩序機構 (特別企画講演)

第97回日本化学会春季年会 特別企画「ハイブリッド自己組織化：秩序形成における生命系と人工系の接点」

平成 29 年 3 月 16 日 (慶応大、横浜)

18. 高分子的設計で挑むタンパク質集合体機能の化学 (Keynote講演)

第51回高分子学会北海道支部研究発表会, 北海道大学,

平成 29 年 1 月 19 日(北大、札幌)

19. ノロキャプシド融合分子ニードルの化学的設計

平成28年度AMED「下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究」第2回片山班 研究会議

平成 28 年 12 月 20 日(感染研、東京)

20. タンパク質針の動的作用機構と機能設計 エキゾチック自己組織化材料・金属と分子集合 合同シンポジウム

平成 28 年 11 月 23 日(鳥取)

[図書] (計 1 件)

1. 安部 聡、上野隆史

金属錯体による細胞機能制御

フロンティア生物無機化学 (錯体化学会フロンティア選書、三共出版)

pp476-496 (2016).

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

1. 発明者：金丸周司、上野隆史、岩崎博史

発明の名称：ヘテロタンパク質ケージ

出願人：国立大学法人東京工業大学

出願番号：特願 2017-227140

出願日：2017 年 11 月 27 日

2. 発明者：上野隆史、吉川健吾、真野恵、片山和彦、三木元博、戸高 玲子

発明の名称：複合ポリペプチド単量体、細胞浸透機能を有する当該単量体の会合体、及び、当該会合体を有効成分とする免疫賦活剤

出願人：デンカ株式会社

出願番号：特願 2016-207417

出願日：2016 年 10 月 23 日

3. 発明者：上野隆史、安部聡、笠松誠  
発明の名称：改変ポリヘドリンタンパク質及びその使用

出願人：国立大学法人東京工業大学

出願番号：特願 2016-171201

出願日：2016 年 9 月 1 日

4. 発明者：田中 良和、松野 明日香、  
北村 朗、金城 政孝、姚 閔、上野 隆  
史、安部 聡  
発明の名称：ヘモシアニン会合体を用い  
た包摂体の製造方法  
出願人：国立大学法人北海道大学  
出願番号：特願 2016-110309  
出願日：2016 年 6 月 1 日

○取得状況（計 1 件）

1. 名称：標的タンパク質の細胞内導入剤及  
び標的タンパク質の細胞内導入法  
発明者：上野隆史、稲葉央  
権利者：国立大学法人東京工業大学  
種類：特許  
番号：6304683  
取得年月日：平成 30 年 3 月 16 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ueno.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野隆史 (Ueno, Takafumi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：70332179