

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14677

研究課題名(和文)熱応答ゲル化ポリマーを利用した、中性子線構造解析のための大型結晶作製法の開発

研究課題名(英文)Development of a method to grow large protein crystals for neutron structural analysis

研究代表者

姚 閔(Yao, Min)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：40311518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、中性子線構造解析のために、タンパク質の良質な大型結晶の作製技術を確立することを目的とする。研究期間で、LCST型温度応答ポリマーを利用して、数種類のサンプルの大型結晶を成長させた。そのうち、分子量110kDaであるGatCABと基質の複合体の中性子構造も得られ、そのポリマーが結晶の成長に有効であることが確認できた。また、LCST型温度応答ポリマーが結晶成長に与える影響を検討したところ、結晶成長中に溶液のエントロピー変化量の変化が見られた。これは、結晶成長とともに生じていた温度変化によってポリマーの相転移が起こり、タンパク質結晶の周辺にある水分子に影響を与えたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to establish technology for growing large protein crystals with high quality, which is essential to analyze the protein structure by neutron crystallography. We tried to grow up larger crystals by using LCST-type polymers for several protein samples, and have succeeded in growing larger crystals. Among those samples, we collected neutron diffraction data of GatCAB (Mw:110 kDa), and determined the neutron structure. The effectiveness of LCST-type polymer on the growth of large protein crystal was confirmed. Moreover, the entropy changes during in the crystallization solution using LCST-type polymer were investigated during crystal growth. Therefore, it is assumed that LCST-type polymer changed the state of water molecules around the protein molecules.

研究分野：構造生物学

キーワード：中性子線結晶構造解析 タンパク質結晶成長 LCST型温度応答ポリマー ゲル ゾル X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析法の発展により、非常に多くのタンパク質の構造が明らかにされてきたが、タンパク質の作用機構の詳細を理解するためには、プロトンや、水素原子、水分子などを精度よく可視化する必要がある。それらの可視化には、中性子線の構造解析が有効であることは知られているが、解析に適用できる結晶のサイズが極端に大きいこと (>0.5mm³) から、その利用は制限されている。実際、PDBに登録された10万個の構造のうち、中性子によるものは100個にも満たない。したがって、中性子線回折に利用できるようにサイズの結晶を作製する有効な結晶成長法が期待されている。

そこで、我々はタンパク質の大型結晶を成長させるための様々な試みを行ってきたが、最近、LCST型温度応答ポリマー(熱ゲル化ポリマー)がタンパク質結晶の成長に有効であることを見出した。熱ゲル化ポリマーは、低温で溶液状態にあるポリマーが温度上昇に伴ってゲル化する性質を持つ(図1)。我々はGatCAB複合体(総分子量11万)の結晶成長に、熱ゲル化ポリマーを利用することで体積にして1000倍の成長を観察した。タンパク質の結晶成長に及ぼす熱ゲル化ポリマーの効果は、結晶成長とゲル化が正の相関関係によって生じたものといえる。この現象を汎用的な結晶成長法として利用することは非常に有望であると考えられる。

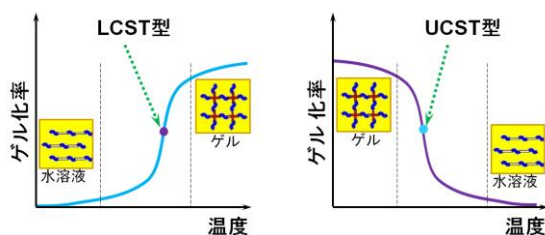


図1. 温度応答ポリマーの温度特性
(LCST: Lower Critical Solution Temperature)
(UCST: Upper Critical Solution Temperature)

2. 研究の目的

本研究ではLCST型温度応答ポリマーをタンパク質結晶成長に及ぼす影響を検討することによって、LCSTを利用した中性子回折実験に利用可能な、良質の大型結晶を作製するための新しい方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

当研究室で結晶構造解析に成功したタンパク質と微結晶しか得られていないサンプルを合わせて、合計5種類を用いて、異なる濃度のLCSTを加えて結晶成長をさせ、LCSTが様々な結晶化条件に対する影響を観察し、結晶化の方法も検討した。また、結晶化溶液の温度変化と共に、タンパク質の溶解度を測定し、タンパク質結晶成長に伴う溶液のエントロピー変化の見積もりを試みた。さらに、得られた大型結晶を用いて、中性子線の回折実験を行い、データ収集、および構造解析も行った。

4. 研究成果

数種類のサンプルを用いてLCST型温度応答ポリマーが大型結晶の成長に与える効果を検討した結果、GatCAB以外、セロビオース2-エピメラーゼCE、tRNA成熟化酵素Trl1のligaseドメインの大型結晶の成長にもLCST型温度応答ポリマーが有効であることが確認できた。また、LCST型温度応答ポリマーの様々な結晶化条件に対する適用性を検討したところ、そのポリマーは、塩の高い結晶化条件に適用しないことが分かった。

また、LCST型温度応答ポリマーが、結晶成長に対して、どのように影響するかを検討するため、LCST型温度応答ポリマーを加えた結晶化溶液の温度変化と共に、タンパク質の溶解度を測定し、タンパク質結晶成

長に伴う溶液のエントロピー変化の見積もりを試みた。その結果、LCST 型温度応答ポリマーを加えることによって、結晶成長中に溶液のエントロピー変化量の変化が見られた。このことから、LCST 型温度応答ポリマーが結晶成長とともに生じていた温度変化により相転移し、その相転移はタンパク質結晶の周辺にある水分子に影響を与えたと考えられる。

さらに、本研究のモデルタンパク質 GatCAB について、サイズ 2~5 mm³ の大型結晶の成長に成功した。また、GatCAB と基質 Gln との複合体の共結晶も重水条件で行い、大型結晶が得られた (図 2)。そこで、得られた GatCAB-Gln の重水置換した結晶を用いて、ドイツの中性子施設 MLZ にて回折データを収集し、中性子線の構造も成功した (図 3)。現在 X 線回折と中性子線回折データを合わせて、joint-refinement を行っている。

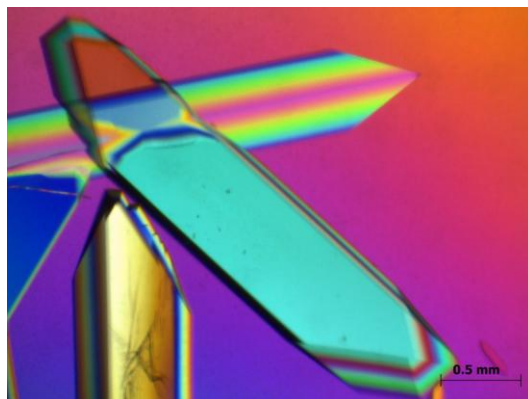


図 2. GatCAB-Gln の結晶

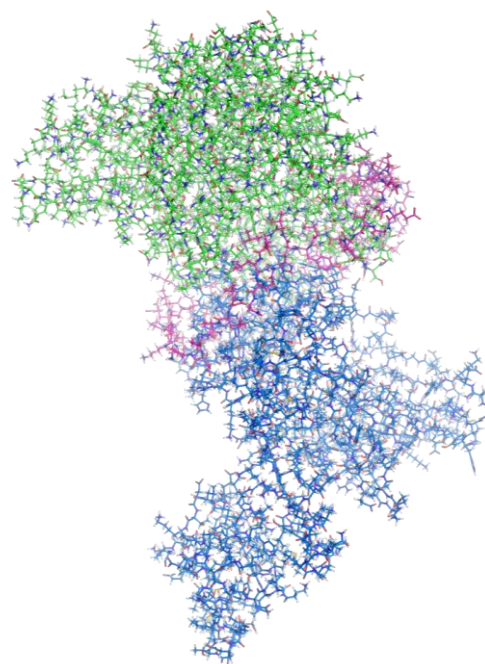


図 3. GatCAB-Gln の中性子構造
緑 : GatA ; 赤 : GatC ; 青 : GatB

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① Long Li, Koji Kato, Akira Shinoda, Toyoyuki Ose, Min Yao. Attempt to elucidate ammonia transportation of GatCAB by NMC. 平成 29 年度日本結晶学会年会 2017 年 11 月 23 日~24 日, JMS アステールプラザ (広島市) .

② Min Yao. Challenging to visualize ammonia transposition in a channel of amidotransferase GatCAB using neutron macromolecular crystallography 第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月 19 日~21 日, 熊本大学黒髪地区 (熊本市)

③ Long Li, Akira Shinoda, Koji Kato, Min Yao. Heterogeneous Nucleation of Protein

Crystals by using Nucleants. The 4th International Life-Science Symposium (ILSS) (国際学会) 2016 年 11 月 18 日, Hokkaido University Conference Hall (北海道・札幌市)

④李龍, 篠田晃, 加藤公児, 姚閔. Epitaxial Nucleation of Protein Crystals on the Crystalline Surface 平成 28 年度日本結晶学会年会 2016 年 11 月 17 日, 茨城県立県民文化センター (茨城県・水戸市)

[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

北海道大学 X 線構造生物学研究室 ホームページ

<http://altair.sc.i.hokuda.ac.jp/g6/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姚 閔 (YAO Min)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号: 40311518

(3) 連携研究者

加藤 公児 (Kato Koji)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号: 30452428

(4) 研究協力者

安達 基泰 (ADACHI Motoyasu)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門・量子ビーム応用研究センター・グループリーダー

研究者番号: 60293958