

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14682

研究課題名(和文) 籠目DNA origamiが叶える極小分子の高分解能立体構造解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a high resolution three-dimensional structure analysis method of minimal molecules by KAGOME DNA origami

研究代表者

加藤 貴之 (KATO, Takayuki)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：20423155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は通常クライオ電子顕微鏡観察において粒子の選択および3次元再構成がうまく計算できないような分子量100kDa以下の分子に対して、籠目型DNAを鋳型として用い、分子を籠目の中心位置に固定することで粒子の選択を可能にするための技術を開発することを目的としている。負染色法によってMotAの構造解析を行い、その大きさと形を測定することに成功した。これをもとに、籠目型DNAの中心空間がMotAよりも大きくなるように、また標的分子が特定の位置に固定化されるようにビオチンタグが付加された4本のDNAをデザインした。この籠目型DNAorigamiの形成を電気泳動及び負染色法で評価した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we will develop a technique for fixing a small molecule in the center of KAGOME pattern DNA origami. It can be used as a nano chamber for structural analysis of a small molecule, less than 100 kDa, by electron cryomicroscopy. The stator protein MotA in flagella motor was selected as a target protein for evaluation for this technique. In the beginning, the MotA structure was solved by electron microscopy, and shape and size information was obtained. Then KAGOME pattern DNA origami was designed to fit it, which will be formed by four single stranded DNA. The one DNA has biotin labeled to fix the target protein into the center of KAGOME DNA origami. The formation of KAGOME pattern was evaluated by electrophoresis and negative stained electron microscope.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 構造解析 DNA origami

1. 研究開始当初の背景

数年前まではクライオ電子顕微鏡による構造解析は分解能が低く、複合体の構造解析を低～中分解能で解析し、その複合体を構成する分子のX結晶構造解析による高分解能な原子構造をそのマップに当てはめることで疑原子分解能の構造を構築していた。クライオ電子顕微鏡による構造解析だけで、原子モデルを構築できるほどの高分解能な構造は、20面体ウイルスなどの対称性の高い一部の分子のみであった。しかし、近年、電子線を直接検出するダイレクトディテクターの開発によって、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子像解析の分解能は飛躍的に向上した(参考1)。2016年4月の時点で単粒子像解析の最高分解能は2.2(参考2)であり、この分解能はX結晶構造解析に肉迫するほど高分解能である。これに加え、クライオ電子顕微鏡は結晶化を必要とせず、溶液中での構造が解析できるため、より生理条件に近い構造を明らかにすることが可能である。しかし、一見欠点がないように見える単粒子像解析方法だが、X線結晶構造解析とは解析できる分子量に大きな隔たりがある。Protein Data Bankに登録されたX線結晶構造解析で解析されている主な分子量は40kDa(参考3)であるのに対し、EMDBに登録された電子顕微鏡による構造解析では、1-10MDaという非常に大きい分子の構造解析が最も多くなされている(参考4)。

GPCRをはじめとする病気に関連する膜たんぱく質の分子量は非常に小さく、それを解析するのは今の電子顕微鏡技術では困難である。これは、タンパク質などの生体試料は電子線照射に弱く、ごく限られた電子線でしか観察できない。そのため小さな分子はノイズに埋もれてその位置を確認することが困難である。クライオ電子顕微鏡による構造解析が今後医薬、薬学分野でも汎用的に使うことができる技術となるためには、より小さな分子でも高分解能で解析できる手法を確立する必要がある。

2. 研究の目的

DNAは遺伝情報を伝達する以外に、その配列を制御することでナノ構造を作成するためのナノブロックとして用いることができる。この技術はDNA origami(参考5)と呼ばれ、これまでに様々な2Dのパターンや3Dの構造が作成されてきた。この技術を利用するとナノスケールのチャンバーを作成することができ、その中に特定の分子を閉じ込めることができる。

本研究は通常のクライオ電子顕微鏡観察において粒子の選択および3次元再構成がうまく計算できないような分子量100kDa以下の分子に対して、籠目型DNAによって作成されたナノスケールのチャンバーを用いて、その個々の分子をそのチャンバーに固定することで粒子の選択を可能にするための技

術を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

籠目型DNA実験に用いる標的分子として、超高度好熱菌 *Acuifex aures* 由来回転べん毛モーターの固定子MotAを用いることにした。

まずMotAを精製し、3- μ Lの試料溶液をカーボングリッドに載せ、余分な溶液を濾紙で吸い取り、酢酸ウランで染色した。JEM-3200FSC(日本電子)とF415MPカメラ(TVIPS)を用い、200kV、40,000倍にて、50枚の画像を撮影した。その画像から2,000粒子像を手動で選択し、Relion1.4の2D classificationにて20クラスに分類した。その中の10クラスをレファレンスとして、プレートマッチングによる自動粒子選択を行った。得られた54,532粒子像から2D classificationによって構造解析に適した粒子像を選択、最終5,419粒子像から立体構造を解析した。

4本のDNAをデザインし、合成オリゴマーをInvitrogenから購入した。2 μ Mの4種類のDNAをそれぞれ2 μ Lずつ混合し、10mM MgCl₂、5mM Tris(pH 8.0)、1mM EDTA溶液で最終20 μ Lに希釈した。その溶液を90から20まで72時間かけてアニリングを行った。目的産物の確認は12.5%のアクリルアミドゲルを用いた電気泳動にて行った。

4. 研究成果

細菌はべん毛と呼ばれる運動機関を持ち、それを回転させることで水溶液中を自由に遊泳することができる。べん毛モーターは細胞膜内外に作られる電気化学ポテンシャルを運動エネルギーに変換することでべん毛を回転させる。エネルギー変換はMotA/MotB複合体によって行われる。MotA/MotB複合体は細胞内膜に埋まっている膜たんぱく質であり、それぞれ4:2の割合で結合することで複合体を形成し、それを一つの単位として、回転子であるべん毛基部体の周りに最大11個配置することで300Hzもの高速回転を実現していると考えられている。

近年、超高度好熱菌 *Aquifex Aureus* 由来MotAはMotBなしで安定に精製することが可能であり、ホモ4量体を形成すると考えられている。MotAホモ4量体での分子量は128kDaと非常に小さく、クライオ電子顕微鏡による構造解析は困難であり、本実験にとって適していると考えられる。MotAはこれまでに構造解析されておらず、その大きさが明らかにされていない。DNA origamiの技術は大きさと形を自由に設計することが可能であるため、目的タンパク質に対して最適なチャンバーを作成することが可能である。籠目型DNAによるチャンバーの大きさを決めるためにまず、負染色法によって染色したMotAの構造解析を行った。最終5,419枚の

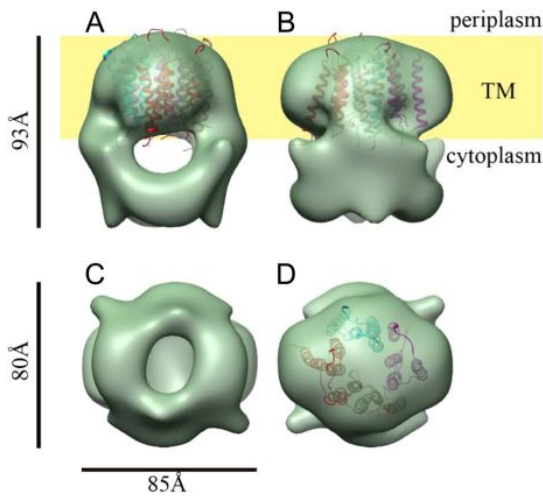


図 1. MotA ホモ 4 量体の立体構造

MotA の分子像から 25 Å の構造解析に成功した(参考 6)。この結果は大きさと形状を評価するには十分な分解能であり、高さ、幅、奥行きはそれぞれ約 93、85、80 オングストロームで、図 1 に示すように膜貫通領域と、中央に穴の開いた細胞質ドメインを持つことが明らかとなった。MotA はその配列から 4 回膜貫通型のタンパク質であることが予想されている。今回解析された構造では膜貫通領域のドメインは 4 回膜貫通ヘリックスが 4 つ収まる程度の密度を持っており、以前から予想されていたように MotA のホモ 4 量体を形成していることが明らかになった。

この大きさをもとに、籠目型 DNA を設計することにした。4 種類の合成 DNA を用いて籠目型 DNA アレイを作成する技術は Oxford 大学の Turberfield らの研究室で行われている(参考 7)。その技術をもとに、約 93、85、80 オングストロームの MotA が入るような

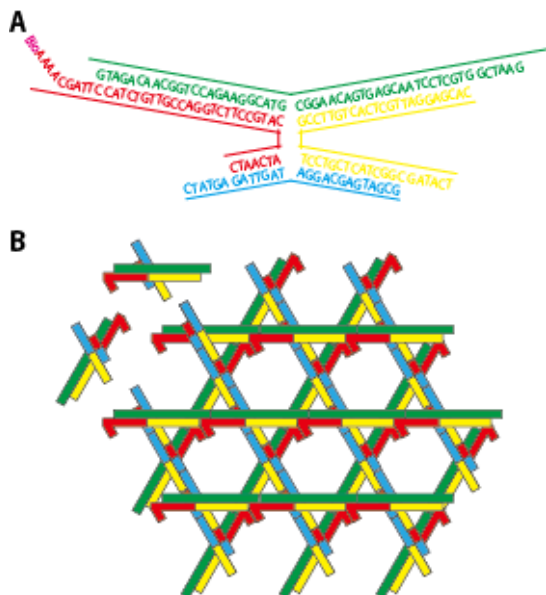


図 2. 4 種類の DNA の設計(A)とそのナノブロック (B 左上) 及び籠目型 DNA のデザイン (B 右)

籠目型 DNA をデザインした。今回、籠目型 DNA の構築には図 2A に示すような配列を持つ Red(R)、Green(G)、Blue(B)、Yellow(Y) の 4 本の DNA からなり、その 4 本を混合することで図 2B に示すようなナノブロックを構築することができる。このナノブロックは 90 から 20 までゆっくりとアニーリングすることで互いに結合し網目状の籠目型 DNA を形成する。籠目型の DNA チャンバーは六角形をしており、直径約 182 オングストロームであり、MotA が入るのに十分な大きさを持っている。R の DNA の 5'末端にタンパク質と結合できるようにビオチンが付加されている。

まず、短時間のアニーリングを行い、制生産物を電気泳動によって、ナノブロック構築の確認を確認した(図 3)。RGBY の 4 種類を入れたときにのみ、ナノブロックができていることが確認された。

この DNA を 72 時間アニーリングし、MotA と混合後、重金属で染色し、電子顕微鏡で観察したところ、DNA が互いに凝集しているのが確認された。これは DNA の力学安定性が、タンパク質の凝集を抑制できなかったものと考えられる。力学的安定性を改善するために、DNA の壁を 2 重にするなどの工夫が必要だと考えられる。

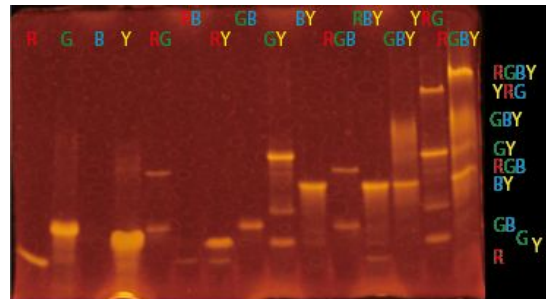


図 3. 4 種類の DNA のアニーリング

引用文献

- 1 Gao Y, et al., *Nature* (2016), **534**, 347-51.
- 2 Bartesaghi A., et al., *Science* (2015), **348**, 1147-51.
- 3 <https://www.rcsb.org/stats>
- 4 https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/statistics_mol_wt.html/
- 5 Rothmund PW., *Nature* (2006), **440**, 297-302.
- 6 Takekawa N., et al., *Sci Rep.* (2016), **6**.
- 7 Malo J., et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2009), **131**, 13574-5.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. Takekawa N., Terahara N., Kato T., Gohara M., Mayanagi K., Hijikata A., Onoue Y., Kojima S., Shirai T., Namba K. and Homma M., *Sci. Rep.* (2016), **6**, 31526. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 加藤貴之. 生理研研究会「クライオ電顕微鏡によるタンパク質の高分解能単流子構造解析」, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市), 2017 年 11 月.

2. Kato, T., Miyata, T., Horvath, P. & Namba, K. 第 55 回日本生物物理学会年会. 熊本大学 (熊本県熊本市), 2017 年 9 月.

3. Kato, T., Hosogi, N., Kaneko, T., Ishikawa, I. & Namba, K., 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場 (茨城県つくば市), 2016 年 11 月.

4. Kato, T., Miyata, T., Ueta, M., Wada, A., Wada, C. & Namba, K., Gordon Research Conference, The Chinese University of Hong Kong, Hon Kong, China, June 19-24, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 貴之 (KATO, Takayuki)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号 : 20423155