

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82118

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18507

研究課題名(和文)放射光を用いたヒトノイラミナーゼの細胞内結晶構造解析

研究課題名(英文)In cellulo crystallography with a synchrotron for a human neuraminidase

研究代表者

小祝 孝太郎(Koiwai, Kotaro)

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・研究員

研究者番号：60620721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、糖鎖分解酵素ヒトノイラミナーゼ1(NEU1)の分子構造を決定することによって、その変異が、なぜNEU1のノイラミナーゼ活性を減少させ、リソソーム病を引き起こすのかを解明することを目的としている。

本研究期間では、NEU1細胞内結晶を抽出するための従来の手法を大きく改善させ、NEU1細胞内結晶からX線回折データの収集に成功した。また、抽出した結晶を一度溶解させ、精製することで、良質なタンパク質を調製することにも成功した。以上の成果は、今後のNEU1の再結晶化と構造決定に繋がる進展のみならず、他の細胞内結晶化蛋白質にも応用することが可能なものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to clarify a molecular mechanism why mutations causing lysosomal diseases on human neuraminidase-1 (NEU1) reduce its activity. During this period, methods to prepare NEU1 in cellulo crystals have been improved, and X-ray diffraction data were collected from the extracted crystals. Furthermore, high-quality protein solution has been prepared by using the improved method followed by purification. This work opens a way for not only on NEU1 structural analysis but for commonly in cellulo crystallography.

研究分野：構造生物学

キーワード：リソソーム病 ノイラミナーゼ 細胞内結晶 放射光 構造生物学 自由電子レーザー

1. 研究開始当初の背景

糖鎖の蓄積は、特定疾患難病ガラクトシアリドーシス (GSD)・シアリドーシス (SD) を引き起こす。GSD・SD は日本人の約 10 万人に 1 人の割合で発症するが、世界の症例の約 60% が日本人で占められている。GSD・SD 患者は出生後、重度の発育・知的・運動障害を発症する。その原因は、糖鎖分解酵素ノイラミナーゼ NEU1 の変異によるノイラミナーゼ活性の減少と、それに伴う細胞内での糖鎖の蓄積である (Monti *et al.* Adv Carbohydr Chem Biochem 2010)。

ノイラミナーゼ (NEU) は、タンパク質や脂質に付加された糖鎖を加水分解する酵素である。ヒトは 4 種類の NEU をもち、その内 NEU1 は細胞内でタンパク質や糖鎖を分解するリソソームに局在する。これまでに、GSD・SD 患者の NEU1 変異は 25 変異が報告されているが、多くの変異は活性中心とは異なる領域に局在しており、どのような分子機構で NEU1 変異が GSD・SD の発症に起因するのかが不明である。このような背景の下、GSD・SD の治療法の確立を目指し、ヒト NEU の構造決定が挑戦されているが、NEU1 が 1967 年に発見されて以来 (Mahadevan *et al.* J Biol Chem 1967)、未だそれに成功していないのが現状である。

NEU1 は、大腸菌発現系のポリペプチドでは NEU 活性がなく、昆虫細胞発現系のポリペプチドでは自己凝集するために結晶どころか十分なサンプルを調製することも困難である。これは NEU1 自身の糖鎖修飾と、リソソーム内でのカセプシン A との相互作用が必要であるためである (Bonten *et al.* J Biol Chem 2009)。

連携研究者である徳島大学 伊藤孝司 教授は、これらの問題を解決するために、哺乳動物細胞発現系を用いた NEU1 の精製を試みた。驚くべきことに、過剰発現させた NEU1 は細胞内で結晶化した。細胞内結晶は稀にはあるが、タンパク質を細胞内に過剰発現させると創出する例があり、近年では、非常に小さな細胞内結晶からでも構造解析が可能となっており、構造解析のための有用な手段となりつつある。

2. 研究の目的

本研究は、NEU1 結晶構造を決定し、GSD・SD 患者の NEU1 変異がなぜノイラミナーゼ活性を減少させるのかを解明することによって、その治療法の確立の基盤を構築する。研究期間内には、NEU1 細胞内結晶の作成法および調製法を確立し、NEU1 タンパク質の結晶構造を、細胞内結晶化法によって得られた NEU1 結晶から、放射光を用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究に用いる手法の概略は以下の通り

である。

(1) 哺乳動物細胞を用いて、NEU1 タンパク質を過剰発現させることによって細胞内で結晶を創出させる。

(2) 細胞内から結晶を抽出・調製する。

(3) X 線回折実験と結晶構造解析を行う。

また、

(4) 抽出した結晶を溶解させ、NEU1 タンパク質を精製する。

(5) 試験管内で再結晶化し、X 線回折実験を行う。

各段階において、条件検討を行い、NEU1 タンパク質の結晶構造の解明を目指すとともに、細胞内結晶化という新しいタンパク質結晶調製法の確立を行う。

4. 研究成果

(1) 哺乳動物細胞内での NEU1 細胞内結晶創出の高効率化

本研究において、最も重要な点は、いかに結晶創出細胞数を増やし、最終的な結晶をいかに多く抽出するか、である。

細胞内での結晶化の効率の向上のために、まず、各種培養細胞株の検討を行った。ヒト胎児腎臓細胞株、CHO 細胞株、HeLa 細胞株を検討したところ、ヒト胎児腎臓細胞株 (HEK 293FT 細胞株) が最も高収率で NEU1 細胞内結晶を抽出することができることを突き止めた。

HEK 293FT 細胞株を用いても、結晶創出の効率は全培養細胞のうち 1% 程度の結晶創出効率であった。本研究者は、細胞内でのタンパク質の結晶化には、タンパク質のターンオーバー以上の、過剰なタンパク質発現が必要であると考えた。本研究者は、NEU1 安定過剰発現細胞を作成することに成功した。NEU1 タンパク質の発現量は、向上したが、通常の培養条件下では、NEU1 安定過剰発現細胞は、結晶を十分には創出しなかった。

そこで、本研究者は、NEU1 安定過剰発現細胞に NEU1 過剰発現プラスミドを再度遺伝子導入することで、5 倍の効率で NEU1 細胞内結晶を創出させることに成功した。また、細胞培養方法を検討し、より簡便かつ高純度に細胞内結晶を抽出し、精製する手法を開発した。

(2) 細胞内結晶の単離・調製方法の確立

X 線回折実験および、その後のタンパク質溶液の調製には、高純度で結晶を調製することが重要な課題であった。

細胞から結晶を抽出するには、界面活性剤を用いて、細胞膜を溶解させる必要があり、既に連携研究者である徳島大学伊藤孝司教授が確立していた緩衝液の条件を採用した。

しかしながら、その手法では、結晶の濃縮の妨げとなる細胞の核を破砕することはできず、大きな問題となっていた。そこで、本研究者は、抽出バッファー条件を検討することで、細胞の核は破砕されるが、結晶が安定

に保存できる条件を見出した。これによって、これまでの 100 倍以上の高純度の結晶懸濁液を調製することが可能となった。

(3) X 線回折実験と結晶構造解析

調製した NEU1 細胞内結晶を用いて、大型放射光施設 Photon Factory および、SPring-8、自由電子レーザー施設 SACLA にて X 線回折実験を行った。大型放射光施設での X 線回折実験によって、初めて NEU1 細胞内結晶の X 線回折像を取得することに成功した。X 線による損傷が激しかったため、回折像は各結晶につき 1 枚が限界であったが、およそ 9 - 20 Å の分解能の回折斑点を観測することに成功した。一方で、調製した結晶数に対して、想定よりも回折像を得ることができなかった。これは、大型放射光施設での X 線回折実験には、抗凍結処理を施していたためだと考えられる。そこで、自由電子レーザー施設 SACLA にて、X 線回折実験を行った。

その結果、およそ百万個の NEU1 細胞内結晶から、約 5000 枚の X 線回折像を得ることに成功した。X 線結晶構造解析の結果、NEU1 細胞内結晶は主に最大分解能 20 からなり、単位格子は各辺がおよそ 140 , 300~500 , 1100~1300 であることが示唆され、結晶構造解析に足りうるデータの収集に成功した。

(4) 結晶からの NEU1 タンパク質の精製

本研究内にて改善された手法を用いることで、安定かつ定期的に細胞内結晶を抽出することが可能となったため、タンパク質として精製するための条件検討が容易となった。結晶を溶解する際のバッファー条件と、カラムクロマトグラフィーの条件を検討することで、定期的に良質な NEU1 蛋白質溶液を調製することが可能となった。

(5) 試験管内再結晶化

上述の、結晶調製法と、タンパク質精製法を用いることで、現在、網羅的な結晶化条件の探索を行うまでに至っている。

研究期間内に、NEU1 分子構造を決定するに足りうる良質な結晶を作成するには至らなかったが、本研究中で確立した NEU1 蛋白質溶液調製法と、NEU1 蛋白質再結晶化条件を基にして、近い将来 NEU1 蛋白質の分子構造を決定することが期待出来る。

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 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

2017 年度量子ビームサイエンスフェスタ

2018 年 3 月 4 日 茨城県水戸市

小祝孝太郎、山田悠介、千田俊哉

Photon Factory BL-17A における MR-Native SAD データ収集条件の検討

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017 年 12 月 8 日

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、山田悠介、平木雅彦、加藤龍一、千田俊哉、Leonard M. G.Chavas、伊藤孝司、湯本史明

平成 29 年度日本結晶学会年会

2017 年 11 月 24 日 広島県広島市

小祝孝太郎、山田悠介、千田俊哉

Photon Factory BL-17A における MR-Native SAD データ収集条件の検討

ROIS/I-URIC 平成 29 年度 若手研究者クロストーク 2017 年 9 月 21 日~9 月 22 日

長野県松代市

小祝孝太郎、千田俊哉

Toward automation for protein crystallography

第 17 回日本蛋白質科学会年会 2017 年 6 月 22 日 宮城県仙台市

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、山田悠介、平木雅彦、加藤龍一、千田俊哉、Leonard M. G.Chavas、伊藤孝司、湯本史明

2016 年度量子サイエンスフェスタ 2017 年 3 月 14 日 茨城県つくば市

小祝孝太郎、山田悠介、諸橋香奈、稲葉和恵、湯本史明、丹羽隆介、千田俊哉

第 16 回日本蛋白質科学会年会 2016 年 6 月 9 日 福岡県福岡市

哺乳動物細胞を用いた結晶化とタンパク質の新規調製法確立

小祝孝太郎、月本準、東哲也、山田悠介、平木雅彦、加藤龍一、千田俊哉、Leonard M. G.Chavas、伊藤孝司、湯本史明

第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 1 日 神奈川県横浜市

ヒトリソーム性シアリダーゼ NEU1 の細胞内結晶の解析と、構造決定に向けて

小祝孝太郎、月本準、東哲也、山田悠介、平木雅彦、加藤龍一、千田俊哉、Leonard M. G.Chavas、伊藤孝司、湯本史明

日本結晶学会年会 2016 年 11 月 17 日

茨城県水戸市

X 線結晶構造解析を用いた創薬スクリーニングのための自動精密化および評価プログラムの開発

小祝孝太郎、山田悠介、諸橋香奈、稲葉和恵、湯本史明、丹羽隆介、千田俊哉

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小祝 孝太郎 (KOIWA, Kotaro)

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：60620721

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

伊藤孝司 (ITO, Kohji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号： 00184656

(4) 研究協力者

千田俊哉 (SENDA, Toshiya)

湯本史明 (YUMOTO, Fumiaki)