

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05314

研究課題名(和文) フェリチンを用いた新規「蛋白質ケージ構造解析法」の技術基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of the technical basis for a new "protein cage structure analysis methods" using ferritin

研究代表者

金丸 周司 (Kanamaru, Shuji)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：50376951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：クライオ電顕単粒子解析法を用いて50kDa以下の小さい蛋白質の構造決定を目標として、まず大腸菌大量発現系を構築しフェリチン24量体蛋白質ケージの内部空洞に標的蛋白質を閉じ込めることに成功した。また、適切な精製タグを用いることで標的蛋白質の導入されたケージのみを選択的に精製することに成功した。

一方で、内部空洞における標的蛋白質の導入数は内部空間を狭くすることで、ある程度制御できることが分かったが、標的蛋白質の位置と方向をそろえることはリンカーの種類や長さを変えても困難であり、標的蛋白質の高分解能構造の取得には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したフェリチン24量体内部空洞に効率的に標的蛋白質を導入し、単離精製する方法は、内部空洞の大きさよりも小さい蛋白質であれば標的蛋白質の配列を変えることなく簡便に導入することが出来る。フェリチンのもつ高い熱安定性・pH安定性を利用することで内部空洞に導入した蛋白質に機能を改変せずに安定性を付加することができるかと期待される。

研究成果の概要(英文)：To determine the structure of proteins smaller than 50 kDa using cryo-EM single-particle analysis, we first constructed an over-expression system in Escherichia coli and succeeded in confining the target protein in the inner cavity of a 24-mer ferritin protein cage. In addition, we succeeded in selectively purifying only the cages in which the target protein was introduced by using appropriate purification tags. On the other hand, the number of target proteins in the inner cavity could be controlled to some extent by narrowing the inner space, but it was difficult to align the position and orientation of the target protein even by changing the type and length of the linker, and we still could not obtain the high-resolution structure of the target proteins.

研究分野：構造生物学

キーワード：単粒子解析 ケージ蛋白質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の立体構造情報は生体の動作メカニズムを詳細に理解する上で、極めて重要な情報の1つである。現在その解析方法は、X線結晶構造解析法・NMR法・クライオ電子顕微鏡(電顕)単粒子解析法が主流であるが、それぞれの手法には解析を困難にしているボトルネックがあるため、新規蛋白質の立体構造を決定することは容易ではない。その中で、近年注目されているクライオ電顕単粒子解析法は結晶化が必要なく、近年電子線直接検出器が開発されたことで次々と原子分解能の構造が報告されている。しかしながら、依然として50kDa以下の小さい蛋白質の粒子画像を抽出し解析することは蛋白質の画像がノイズに埋もれ非常に困難であることが学術的課題となっている。そこで、抜本的な発想の転換が必要と考え本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究では高い熱安定性・pH安定性を有するフェリチン24量体蛋白質ケージの内部空洞に標的蛋白質を閉じ込め、粒子画像抽出が容易なフェリチンケージごとクライオ電顕で画像データを取得し粒子画像を抽出する過程を著しく簡便化することで100kDa以下の蛋白質のクライオ電顕高分解能単粒子解析を可能とする技術基盤を開発する。具体的には、①精製タグ-フェリチン-標的蛋白質からなる融合蛋白質を野生型フェリチンと同一大腸菌内で大量発現し、フェリチンの持つ自己集合能を利用し細胞内で標的蛋白質を孤立化させる。次に、②精製タグを用いて標的蛋白質が入ったフェリチンケージのみを選択的に単離・精製し、③電子線直接検出器の搭載された電子顕微鏡装置を用いて、クライオ電顕単粒子解析法により標的蛋白質の入ったフェリチンケージの原子分解能での立体構造を解明する。④さらに既存の方法では解析困難な蛋白質を試みることで、本研究で提案する「蛋白質ケージ構造解析法」が蛋白質立体構造解析の新たな技術となることを実証する。

### 3. 研究の方法

(1) 精製タグ-フェリチン-GFP融合蛋白質発現ベクターの作製:精製タグ-フェリチン-GFP融合蛋白質発現ベクターは低コピー複製開始点 p15A ori を持つ pACYC 系ベクターに構築した。一方、野生型フェリチン発現ベクターは高コピー複製開始点 ColE1 ori を持つ pET 系ベクターに構築した。精製タグは数残基からなるポリヒスチジンタグ(His タグ)や Strep(II)-タグだけでなく精製タグとして実績のある MBP などの蛋白質タグを試みた。

(2) GFP が1分子導入されたフェリチンケージ(Fer-GFP)の高効率生産・単離精製:  
高分解能構造解析に必要な均一な試料を得るため蛋白質発現段階から最終精製まで、各段階での最適な条件を検討した。発現誘導温度(18~37°C)・時間(3~16時間)・誘導剤(IPTG)濃度(0.01~1mM)を変えることで、Fer-GFP が高効率で得られる条件を探索した。

(3) 精製標品の生物物理的解析：単離精製した Fer-GFP を用いて、分析超遠心・動的光散乱・ネガティブ染色電顕等を用いて、その生物物理学的特徴を明らかにするとともに、精製標品の均一性を評価した。

(4) 立体構造解析（クライオ電顕単粒子解析）：均一な精製標品を連携研究者とともに K2 Summit 電子カウンティング直接検出カメラを備えた、クライオ電子顕微鏡を用いて画像を取得した。計算機クラスタを用いた大量画像の解析により、高分解能立体構造解析を行った。

(5) 標的蛋白質とフェリチン間のリンカーの再デザイン：クライオ電顕単粒子解析により内部標的蛋白質の分解能が上がらず構造が決まらなかったため Pro 主体の硬いリンカーや  $\alpha$ -ヘリックスリンカー、フレキシブルリンカーを試みた。標的蛋白質を導入していない様々なリンカーを導入したフェリチンの X 線結晶構造解析も行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 標的蛋白質内包フェリチンの大腸菌大量発現

高コピー野生型フェリチン発現ベクターと低コピー標的蛋白質融合フェリチン発現ベクターを同じ大腸菌に導入した。これにより、発現量をタグ-Fer-GFP: Fer が 1:5~1:10 程度に制御でき、効率的に GFP が導入された GFP 内包フェリチンを生産することが可能となった。また、発現条件を変えることで GFP 内包フェリチンの形成効率や導入 GFP の数をある程度コントロールすることが可能となった。

##### (2) 標的蛋白質内包フェリチンの精製と効率的生産

当初用いていた精製タグである His タグは、Ni アフィニティカラムに野生型フェリチンも結合することが判明した。そのため、精製タグを StrepII タグに変更し、GFP 内包フェリチンを選択的に得ることが可能となった。

##### (3) 標的蛋白質内包フェリチンのクライオ電子顕微鏡観察

精製した GFP 内包フェリチンを実際にクライオ電子顕微鏡で観察した。その結果、少量の標的蛋白質の入っていないフェリチンケージも観察されたが、図 1 に示すようにフェリチン内部に GFP と思われる密度をもったフェリチンケージが確認できた。これにより、標的蛋白質のみでは抽出困難な GFP をフェリチンケージごと抽出することが可能となった。

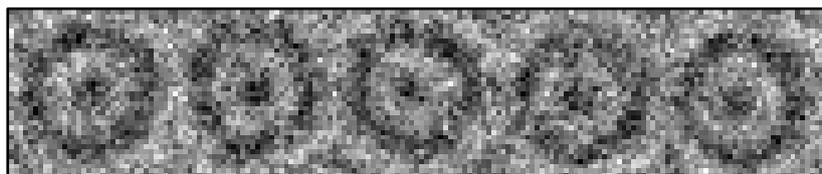


図 1 GFP 内包フェリチンのクライオ電子顕微鏡画像

##### (4) ヘリックスリンカー導入フェリチンの結晶構造解析

予備的な単粒子解析の結果より、内包された GFP のフェリチンケージ内での位置と方向がそろっていないことが示唆された。ケージ内での GFP を固定するためフェリチンの C-末端の 4 ヘリックスバンドルに様々な長さ (8~13 残基) のヘリックスを付加した Fer-Helix 変異体を作成

しその立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。Fer-Helix 変異体は概ね野生型フェリチンと同程度の分解能 ( $\sim 1.5 \text{ \AA}$ ) を示したが、図 2 に示すように付加したヘリックス配列に相当する電子密度は観察することが出来なかった。

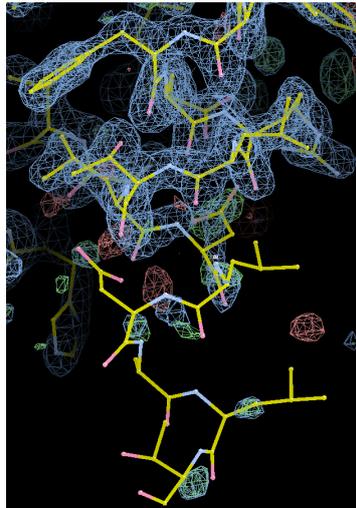


図 2 C-末端に 13 残基付加した Fer-Helix13 の結晶構造とその電子密度 (Phe166 から C-末端側)

#### (5) 標的蛋白質内包フェリチンの単粒子解析

GFP 内包フェリチンを Relion3 を用いて単粒子解析を行ったが、フェリチンは高分解能の密度を与えるが、内部の GFP は塊として密度は観察できるが高分解能構造を得るには至らなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takemura-Uchiyama, I.; Tsurui, H.; Shimakura, H.; Nasukawa, T.; Imanishi, I.; Uchiyama, J.; Fukuyama, T.; Sakamoto, S.; Morisawa, K.; Fujimura, M.; Murakami, H.; Kanamaru, S.; Kurokawa, K.; Kawamoto, K.; Iyori, K.; Sakaguchi, M.	4. 巻 369
2. 論文標題 Heterogeneous IgE reactivities to Staphylococcus pseudintermedius strains in dogs with atopic dermatitis, and the identification of DM13-domain-containing protein as a bacterial IgE-reactive molecule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnac019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hoshino Tomoyasu, Yamabe Emi, Hawari Muhammad Arisyi, Tamura Mayumi, Kanamaru Shuji, Yoshida Keisuke, Koesoema Afifa Ayu, Matsuda Tomoko	4. 巻 76
2. 論文標題 Oxidation of aromatic and aliphatic aldehydes to carboxylic acids by Geotrichum candidum aldehyde dehydrogenase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 131387 ~ 131387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tet.2020.131387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito Kentaro, Murayama Yasuto, Kurokawa Yumiko, Kanamaru Shuji, Kokabu Yuichi, Maki Takahisa, Mikawa Tsutomu, Argunhan Bilge, Tsubouchi Hideo, Ikeguchi Mitsunori, Takahashi Masayuki, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Real-time tracking reveals catalytic roles for the two DNA binding sites of Rad51	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16750-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanamaru Shuji, Uchida Kazuya, Nemoto Mai, Fraser Alec, Arisaka Fumio, Leiman Petr G.	4. 巻 12
2. 論文標題 Structure and Function of the T4 Spackle Protein Gp61.3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1070 ~ 1070
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v12101070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zdravkovic Aleksandar, Daley James M., Dutta Arijit, Niwa Tatsuya, Murayama Yasuto, Kanamaru Shuji, Ito Kentaro, Maki Takahisa, Argunhan Bilge, Takahashi Masayuki, Tsubouchi Hideo, Sung Patrick, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 118
2. 論文標題 A conserved Ctp1/CtIP C-terminal peptide stimulates Mre11 endonuclease activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2016287118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Argunhan B, Sakakura M, Afshar N, Kurihara M, Ito K, Maki T, Kanamaru S, Murayama Y, Tsubouchi H, Takahashi M, Takahashi H, Iwasaki H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cooperative interactions facilitate stimulation of Rad51 by the Swi5-Sfr1 auxiliary factor complex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e52566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.52566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 金丸周司
2. 発表標題 T2 類縁ファージのレセプター結合ドメインによる宿主認識
3. 学会等名 第8回ファージ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金丸 周司, 竹村 和浩, Aleksandar Zdravkovic
2. 発表標題 ファージレセプター結合蛋白質と宿主レセプターの相互作用解析
3. 学会等名 第59回生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金丸 朋子, 金丸 周司, 吉村 英恭
2. 発表標題 フェリチン1 分子中のH, L サブユニットの割合制御と鉄ナノ粒子の結晶性の比較
3. 学会等名 第59回生物物理年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuji Kanamaru
2. 発表標題 Structural and functional analysis of phage receptor binding protein and OmpC
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Kanamaru, Takafumi Ueno
2. 発表標題 Bacteriophage T4 as a platform for molecular engine
3. 学会等名 The 1st International Symposium on "Molecular Engine" (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金丸周司
2. 発表標題 PP01ファージのgp38レセプター結合ドメインの構造
3. 学会等名 第7回ファージ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金丸周司
2. 発表標題 Structure and function of phage receptor binding protein
3. 学会等名 第56回生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	重松 秀樹  (Shigematsu Hideki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------