

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06505

研究課題名(和文)「化学ケージ結晶化法」による膜タンパク質X線結晶構造解析

研究課題名(英文)Chemical cage crystallization encapsulating membrane proteins

研究代表者

名倉 淑子(中田)(Nakura, Yoshiko)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：70799220

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)：「分子の自己集合技術」を駆使し、膜タンパク質を内包する「化学ケージ結晶化法」の確立を目的とし、克服しなくてはならない下記の課題に取り組んだ。

- (1) 化学ケージは有機溶媒中で合成されその環境において安定であるが、膜タンパク質と同じ環境下においても安定に自己集合できるように改変しなくてはならない。水溶液中において安定なケージとその反応の設計、改変を行なった。
- (2) ケージに内包された膜タンパク質の構造を解くには、ケージに対する膜タンパク質の位置を均一にする必要がある。ケージ内の定位置に揺らぎなく固定するためのタグ及びリンカーの設計や作製を行い、実際に固定化の確認を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内外の情報受容伝達、物質の取込みや不要物の排出、エネルギー生産など生命維持に必須な活動に膜タンパク質が果たす役割は多岐に渡り、多くの疾患にも関わっている。しかし、繊細で個性豊かな膜タンパク質の結晶構造解析は難しく、未だ多くの構造未解明な標的があり、既存のアプローチとは異なる革新的な方法論が必要である。化学ケージ結晶化法の利点を活かした方法論が確立できれば、膜タンパク質のX線結晶構造解析が飛躍的に進む。革新的な方法論を確立するにあたり、本研究がその礎となり構造機能生物学に大きな貢献をもたらす。

研究成果の概要(英文)：In this study, we worked on problems solving as bellow to establish an innovative methodology: chemical cage crystallization method that encapsulates membrane proteins by making full use of "self-assembly".

- (1) Chemical cages are synthesized in organic solvents and are stable in that environment, but they must be modified to be stable in the same environment as membrane proteins. We designed and modified a cage stable in aqueous solution and its reaction.
- (2) To determine the structure of membrane proteins encapsulated in the cage, it is necessary to make the position of the membrane protein with respect to the cage uniform. We designed and several tags and linkers in a fixed position on the cage without fluctuation. We immobilized the membrane proteins to the DNA origami plates to evaluate protein fluctuation.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜タンパク質 化学ケージ 分子自己集合 構造解析 固定化タグ

1. 研究開始当初の背景

細胞内外の情報受容伝達、物質の取込みや不要物の排出、エネルギー生産など生命維持に必須な活動に膜タンパク質が果たす役割は多岐に渡り、多くの疾患にも関わっている。しかし、膜タンパク質の結晶構造解析は難しい。なぜなら、構造解析を行うには、界面活性剤で可溶化して精製するプロセスが必要であり、これによって (1) 膜に埋め込まれた構造でなくなり不安定になる、(2) 疎水性領域を界面活性剤のミセルで覆い、膜タンパク質どうしの結晶形成を阻害する、という問題が生じるからである。膜タンパク質は繊細で個性豊かであり、未だ多くの構造未解明な標的があるということは、既存のアプローチとは異なる革新的な方法論が必要ということである。

研究代表者の所属していたグループでは、「分子の自己集合技術」を駆使し、化学ケージにタンパク質を内包した「化学-タンパク質ハイブリッド分子」の合成に成功した (*Nature Commun.*, 3; 1093, 2012)。さらに、これまで大きさに限界があったケージ状人工構造体として、過去最大の構造体合成にも成功し (*Nature*, 540; 563-566, 2016)、膜タンパク質を内包するための大きさを持った化学ケージの合成が可能になった。

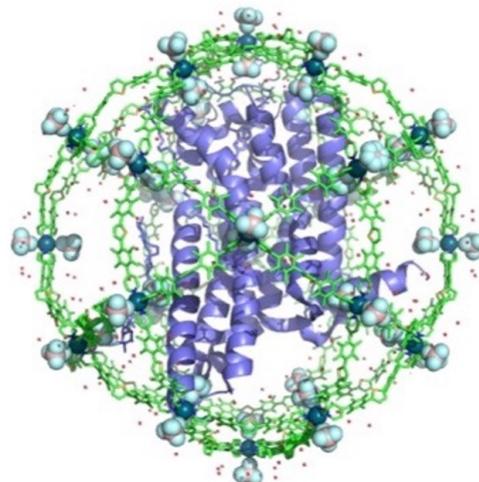


図1 化学ケージとGPCRの重ね合わせモデル

2. 研究の目的

本研究は、「分子の自己集合技術」を駆使し、膜タンパク質を内包する「化学ケージ結晶化法」の確立を目的とした。先行研究での可溶性タンパク質ユビキチンを内包した化学ケージの X 線結晶構造解析より、化学ケージは規則的に並び結晶を形成するが、内包されたタンパク質はさまざまな向きになり結晶する分子としては無秩序な状態であることが分かっており、この課題を克服し、膜タンパク質の構造解析に応用するために、以下2点を具体的な研究目標とした。

(1) 膜タンパク質の機能を保持したままケージに内包するために、化学ケージの改変を行なう。化学ケージは有機溶媒中で合成されその環境において安定であるが、水溶液中にある膜タンパク質を内包するためには、膜タンパク質と同じ環境下においても安定に自己集合できるように改変しなくてはならない。水溶液中において安定なケージとその反応の設計、改変を研究1の目的とした。

(2) ケージに内包された膜タンパク質の構造を解くには、ケージに対する膜タンパク質の位置を均一にする必要がある。ケージの定まった位置に揺らぎなく固定するためのタグ及びリンカーの設計や作製を研究2の目的とした。

3. 研究の方法

(1) これまで用いられてきた化学ケージは、パラジウムなどの金属イオンを介する配位結合で形成されており、水溶液中では不安定である。水溶液中でも安定なケージを形成するために、共有

結合で自己集合できるよう五角錐を形成し得るカルボランを頂点としたケージを再設計した。カルボランを頂点とした骨格パーツを用いて共有結合によるケージを形成させ、その構造を確認するためケージ単体での結晶化を行った。

(2) 化学ケージ側には化学タグを設計し、タンパク質側にはそのタグに特異的に結合するペプチドをタグとして付加することを目的に、ファージディスプレイのライブラリを用いてペプチドの探索を行なった。リンカーについては、その形状や長さを検討するために、タンパク質側からはペプチド、化学ケージ側からは PEG を用いたリンカーを種々作製した。実際に DNA オリガミによる固定化プレート上にタンパク質を固定化した。

4. 研究成果

(1) 共有結合で自己集合するよう設計した骨格パーツを反応させたところ、構造体を形成していることが確認できた。理論通りのケージ構造をとっていることを確認するために、結晶構造解析を進めている。またこの構造体は、水で希釈しても溶解性を保持しており、水溶性の獲得に成功した。

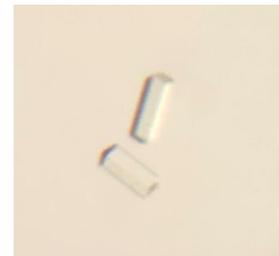


図2 化学ケージの結晶

(2) 化学ケージ側に付加する化学タグとして、8 種を化学合成した。これらの化学タグに対して、T7 ファージの表面にランダムなペプチドを提示させたライブラリから結合するものを増幅し、各化学タグに対して特異的で結合の強いペプチドを取得した。バイオパニングのラウンド毎に NGS 解析によって配列の分布から配列が収束していることを確認し、ペプチドタグとして特定の配列を得ることができた。

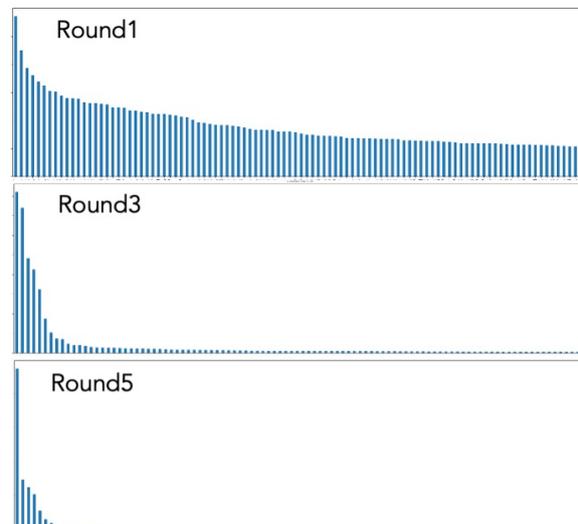
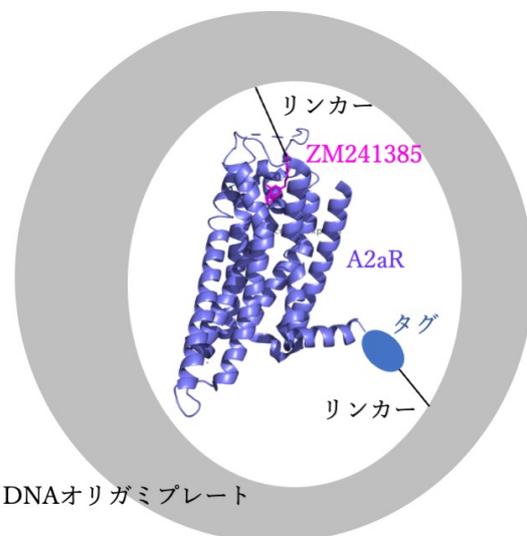


図3 バイオパニングによるペプチドの分布

モデルタンパク質としてアデノシン A2a 受容体 (GPCR) を、酵母の系で発現し、精製を行なった。本研究期間中は、化学ケージの代替品として DNA オリガミによる固定化プレートを用い、固定化実験を行なった。A2a 受容体の C 末端にタグを付加し、リンカーを介して DNA オリガミプレートに固定した。他方は、A2a 受容体のリガンド ZM241385 にリンカーを付加した分子を合成し、DNA オリガミプレートに固定した。この DNA オリガミプレートのクライオ電子顕微鏡単粒子解析を進めている。プレートへの固定を確認し、今後、タンパク質の揺らぎからリンカー長の最適化を行う予定である。



DNAオリガミプレート

図4 DNAオリガミプレートへの固定

当初の研究計画よりだいぶ遅れたが、基本的な技術の構築は目処が立ち、化学ケージが仕上がり次第、研究を進められる状況である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	藤川 鷹王 (Fujikawa Takao) (70839688)	京都大学・高等研究院・研究員 (14301)	

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