

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21244

研究課題名（和文）細胞内結晶化による標的タンパク質融合結晶の迅速構造解析

研究課題名（英文）In-cell protein crystallization for structure analysis

研究代表者

上野 隆史（Takafumi, Ueno）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：70332179

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の高分解能構造の決定は、生命現象の理解から医薬応用まで様々な分野で渴望されており、従来主流となっていたX線結晶構造解析に加え、様々な構造解析手法が開発されてきた。しかしながら、共通する大きな課題としてタンパク質の単離・精製が依然として解決されていない。本研究では、直径数nmの細孔を内部に有するタンパク質結晶（多孔性タンパク質結晶）に着目し、標的タンパク質を融合した標的タンパク質融合多孔性タンパク質結晶を細胞内で合成した。鋳型タンパク質の特定の部位に標的タンパク質を融合することによって、大型放射施設の微結晶ビームラインによる構造解析を行ない、構造決定に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の結晶構造解析装置の急速な進歩に伴い、国内外でも数 μm サイズの細胞内で結晶化するタンパク質の構造解析も報告されつつある。しかしながら、エンジニアリングしたタンパク質の結晶を細胞内合成し構造決定に成功した例は、数例のみである。本研究は、細胞内タンパク質結晶化、標的タンパク質融合多孔性タンパク質結晶化と超微小結晶構造解析を一貫して行うことによりはじめて達成できる。得られる成果は生命現象の理解から医薬応用まで様々な分野で渴望されている高分解能タンパク質構造の迅速決定を可能とし、その高い社会的インパクトとニーズにより、新しい生体分子化学の領域を切り開くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The determination of high-resolution protein structures has attracted attention in various fields, from life science to pharmaceutical applications. However, the purification of proteins remains a major common problem that has not yet been solved. In this study, we attempted to realize high-resolution structure determination of target proteins by intracellular crystallization of porous protein crystals fused with target proteins with pores of several nm in diameter. Target protein-fused porous protein crystals were synthesized in living cells. By fusing the target protein to a specific site of the template crystalline protein, the structure was determined by using the microcrystal beamline of a large synchrotron facility.

研究分野：生体関連化学

キーワード：タンパク質結晶 タンパク質集合体 結晶構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の高分解能構造の決定は、生命現象の理解から医薬応用まで様々な分野で渴望されており、従来主流となっていた X 線結晶構造解析に加え、Cryo-TEM や X 線自由電子レーザー、*in cell* NMR 等の構造解析手法が開発されてきた。しかしながら、共通する大きな課題としてタンパク質の単離・精製が依然として解決されていない。

2. 研究の目的

本研究では、単独では構造決定が困難な標的タンパク質を遺伝子的に融合した多孔性タンパク質複合結晶を細胞内結晶化により合成し、標的タンパク質の高分解能構造決定の実現に挑む (図 1)。

直径数 nm の細孔を内部に有するタンパク質結晶 (多孔性タンパク質結晶) に着目し、標的タンパク質を融合した標的タンパク質融合多孔性タンパク質結晶を細胞内で合成する。将来的には、大型放射施設の微結晶ビームラインによる自動結晶構造解析につなげる。そこで、期間内に、

(1) 多孔性タンパク質結晶の細胞内結晶化と最適化

(2) 標的タンパク質を融合した多孔性タンパク質結晶の細胞内合成と構造決定

(3) 迅速構造解析に向けた大腸菌を用いる標的タンパク質融合多孔性タンパク質結晶合成

を達成する。細胞内結晶化の利用によって、極微量でのタンパク質結晶化・構造決定とその迅速化を可能とする挑戦的な課題であり、タンパク質の「前処理、合成、精製」を一切必要としない新たなタンパク質構造解析技術の確立につながる。

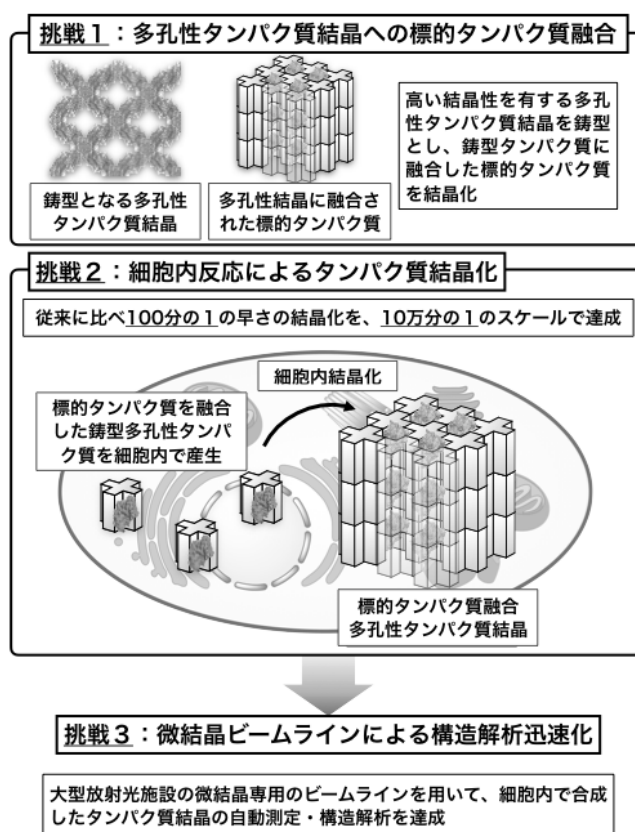


図 1. 細胞内タンパク質結晶合成

3. 研究の方法

(1) 多孔性タンパク質結晶の細胞内結晶化と最適化

本研究計画では、鑄型となるタンパク質結晶の選定が重要な鍵を握る。そこで、多角体結晶に着目した。細胞質多角体病ウイルスは昆虫細胞への感染時に多角体と呼ばれる結晶性のタンパク質を産生する。この多角体結晶は、ウイルス粒子を保護する保護剤として、ウイルス形成と同時に細胞内で産生される。様々な種類の多角体結晶が報告されて

おり、様々な環境に対し非常に安定であることが知られている(図 2)。そこで、構造安定化とウイルス取り込みに重要と思われる領域を推定して、分子設計をおこなった。

多角体分子表面のアミノ酸残基の欠損・置換を試み、標的タンパク質の導入部位を設計した。具体的には、多角体のこれまでの研究から見出してきた、結晶内で安定な細孔構造を形成する領域や、タンパク質の N 末端、C 末端を欠損させることにより、細孔内表面に遺伝子工学的な融合による固定化部位を設けた (図 3)。

(2) 標的タンパク質を融合した多孔性タンパク質複合結晶の合成

構造既知のタンパク質の融合により本手法の妥当性を評価する (図 4)。ペプチド：アルツハイマー病の原因とされ、42 残基から構成されるアミロイド(Aβ42)を標的とし、これまで困難とされている単量体やオリゴマー構造の形成を試みた。

さらに、融合タンパク質標的としていくつかの天然変性タンパク質の変性領域を融合した多角体を設計し、その結晶化を試みた。

(3) 標的タンパク質融合多孔性タンパク質結晶の構造解析

大型放射光施設 SPring8 の自動測定により結晶の回折データを得た。半自動の解析システムを用いたデータ処理を行なった。

4. 研究成果

アミロイドのフラグメントを融合した多角体では多角体結晶の特徴である立方体の結晶とは異なり、角が丸まった顆粒状の不溶物が得られた。一方、IDP を融合した多角体では、野生型と同様な立方体状の結晶が得られた (図 4)。結晶構造解析からも、2.15 Å の高分解能の構造をえることに成功した。しかしながら、目的とするフラグメントの電子密度は観測されなかった、標的フラグメントに隣接する分子間の相互作用を設計する必要が示された(図 5)。

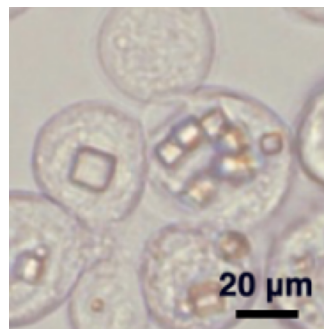


図 2. 細胞内で合成された多角体結晶体

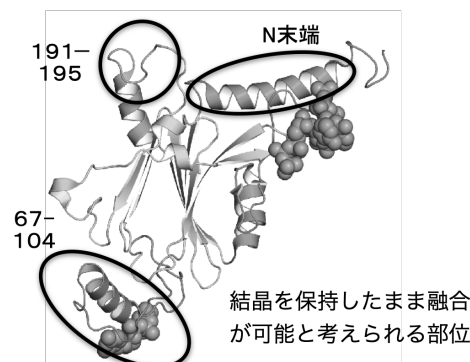


図 3. 多角体の標的タンパク質融合設計

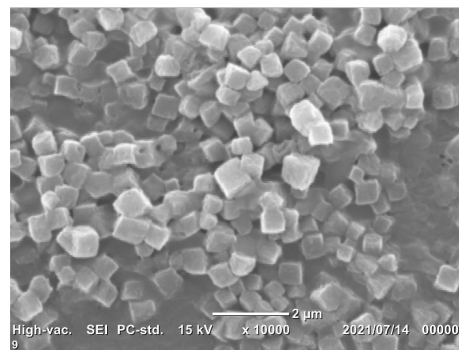


図 4. 融合タンパク質の結晶

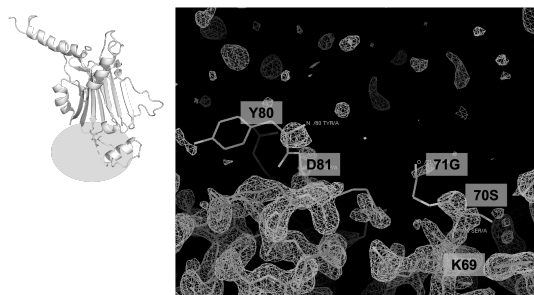


図 5. 融合結晶の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe Satoshi, Pham Thuc Toan, Negishi Hashiru, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Ueno Takafumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Design of in cell protein crystal for environmentally responsive construction of a supramolecular filament	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202102039	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 Nguyen Que Dan, Kikuchi Kosuke, Maity Basudev, Ueno Takafumi	4. 巻 22
2. 論文標題 The Versatile Manipulations of Self-Assembled Proteins in Vaccine Design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1934 ~ 1934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22041934	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 Nguyen Tien K., Abe Satoshi, Kasamatsu Makoto, Maity Basudev, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Kojima Mariko, Ueno Takafumi	4. 巻 4
2. 論文標題 In-Cell Engineering of Protein Crystals with Nanoporous Structures for Promoting Cascade Reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 1672 ~ 1681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.0c03129	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 Maity Basudev, Li Zhipeng, Niwase Kento, Ganser Christian, Furuta Tadaomi, Uchihashi Takayuki, Lu Diannan, Ueno Takafumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Single-molecule level dynamic observation of disassembly of the apo-ferritin cage in solution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 18562 ~ 18572
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0CP02069A	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 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊池 幸祐, 上野 隆史
2. 発表標題 Design of the two-dimensional protein assembly patterns by α -helical protein needle
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島摩利子, 安部聡, 上野隆史
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成による微小結晶構造解析
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池幸祐, 福山達也, Maity Basudev, 古田忠臣, 前多裕介, 内橋貴之, 上野隆史
2. 発表標題 α -ヘリックス人工分子針の動的集合設計
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菱川湧輝, 野谷大樹, Basudev Maity, 安部聡, 上野隆史
2. 発表標題 タンパク質ケージ内における芳香族分子集積と反応制御
3. 学会等名 日本化学会第101回春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島 摩利子, 菱川 湧輝, 安部 聡, 古田 忠臣, Tran Phuoc Duy, 北尾 彰朗, 上野 隆史
2. 発表標題 Energy Analysis of Miniprotein by in Vivo Protein Crystallization
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菱川湧輝, 野谷大樹, Basudev Maity, 安部聡, 上野隆史
2. 発表標題 タンパク質ケージを利用した芳香族クラスターの構築と外来分子内包
3. 学会等名 発動分子科学第5回領域会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 PHAM Toan Thuc, 安部 聡, 根岸 走, 上野 隆史
2. 発表標題 Construction of Fibril Protein Assemblies From Engineered Protein Crystals
3. 学会等名 69th Symposium on Macromolecules
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 PHAM Toan Thuc, 安部 聡, 根岸 走, 上野 隆史
2. 発表標題 Construction of Filament Protein Assembly From Autonomous Cross-Linked Crystals
3. 学会等名 14th Bio-related Chemistry Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野隆史
2. 発表標題 タンパク質結晶工学による新機能材料
3. 学会等名 第28回ポリマー材料フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中潤子, 安部聡, 長田俊哉, 上野隆史
2. 発表標題 GPCR 内包を目指したタンパク質ハイブリッド結晶の構築
3. 学会等名 第 10 回 CSJ 化学フェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nguyen Dan Que, 上野 隆史
2. 発表標題 Molecular design of protein needle for norovirus vaccine
3. 学会等名 第 10 回 CSJ 化学フェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野 隆史
2. 発表標題 Protein Crystals for Designing Multiple Nanofunctions
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡, 小島摩利子, 小暮遼河, 上野隆史
2. 発表標題 細胞内タンパク質結晶化の最適化と迅速構造解析
3. 学会等名 第14回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菱川湧輝, Basudev Maity, 安部聡, Diannan Lu, 上野隆史
2. 発表標題 フェリチンケージのサブユニット界面を利用した多核金結合サイトの構築
3. 学会等名 第70回錯体化学会討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菱川湧輝, 野谷大樹, Basudev Maity, 安部聡, 上野隆史
2. 発表標題 タンパク質ケージの内部空間設計による芳香族クラスターの構築
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島 摩利子, 安部 聡, 上野 隆史
2. 発表標題 In vivo Protein Crystal Engineering for Structure Analysis of Meta-stable State Mini-protein
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡, 小島摩利子, 上野隆史
2. 発表標題 タンパク質の迅速結晶化とサブミクロン結晶の構造解析
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菱川湧輝, Basudev Maity, 安部聡, Diannan Lu, 上野隆史
2. 発表標題 かご状タンパク質フェリチンのサブユニット界面における金集積機構の解明
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡, 小島摩利子, 小暮遼河, 上野隆史
2. 発表標題 タンパク質の細胞内迅速・微量結晶化と構造解析
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 タンパク質固体材料の製造	発明者 上野 隆史 / 安部 聡 / 小島 摩利子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/030226	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 タンパク質結晶の製造方法及び結晶構造解析方法	発明者 上野 隆史 / 安部 聡 / 小島	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/006607	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Ueno Lab
<http://www.ueno.bio.titech.ac.jp/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------