

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22770116  
 研究課題名（和文）ゼオライトを結晶化基板材料として用いた汎用的タンパク質結晶化方法の確立  
 研究課題名（英文）Protein crystallization on zeolites as substrate materials  
 研究代表者  
 菅原 道泰 (SUGAHARA MICHIIRO)  
 独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・研究員  
 研究者番号：00415192

研究成果の概要（和文）：タンパク質 X 線結晶構造解析においてボトルネックである結晶化問題を解決するために、タンパク質結晶化促進剤として見出した合成ゼオライトのモレキュラーシーブを結晶化基板材料として用い、汎用的タンパク質結晶化方法の確立を試みた。モレキュラーシーブ、およびその類似化合物を用いてタンパク質結晶化を行った結果、様々なタンパク質の結晶化が促進された。その結晶化基板材料はマイクロ孔、結晶性、および金属イオンを有する物質が適していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Protein crystallization is still a major bottleneck in structural biology. In order to overcome this difficulty, an advanced crystallization method using synthetic zeolite molecular sieves (MS) as hetero-epitaxial nucleants by which a directed crystal nucleation on the material surface occurred in a wide variety of proteins, has been developed in this study. A sparse matrix screening experiment in the presence of MS or MS-like compounds has been performed, showing a clear improvement in the success rate of protein crystallization as compared with the conventional screening. The results suggested that micro-porous, crystalline and metal-ion-binding materials promote nucleation of proteins.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析，タンパク質結晶化，ゼオライト，モレキュラーシーブ，ヘテロエピタキシャル

#### 1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析により得られるタンパク質立体構造はタンパク質機能解明のための重要な情報源の一つである。近年、世界各

国で進められた構造ゲノム研究によってタンパク質結晶化技術は大きく発展した。しかしながら、その結晶化方法は溶液中でのタンパク質の自発的な結晶核形成に頼っている

ために積極的な結晶化制御が難しく、現在普遍的タンパク質結晶化技術は確立されていない。本研究では、タンパク質と相互作用する基板材料の表面上にタンパク質分子を配列させることで結晶を析出させる方法に着目した。1988年にMcPherson等によって報告された鉱物表面からヘテロエピタキシャル成長によって結晶を析出させる方法はタンパク質の結晶性を向上させる手法として注目された。しかしながら、50種類の鉱物を用いて調査したにも関わらず、汎用的に使用できるタンパク質結晶化促進物質は見つっていない。

そこで、過去に報告されたタンパク質と相互作用する様々な物質の特徴から、構造規則性(結晶)、細孔、およびイオンを有する、加えて、構造が原子レベルで既知、安価、無毒、形状加工が容易な物質を考慮し、その候補材料を調査した。その結果、合成ゼオライトのモレキュラーシーブ(市販品)がタンパク質結晶化基板材料として利用できることを見出した。用いたモレキュラーシーブ 3A, 4A, 5A, および 13X はそれぞれ 3, 4, 5, および 13Å の均一な細孔を持ち、それぞれ K・Na, Na, Ca, および Na イオンを有する結晶性物質である。これらモレキュラーシーブを用いてタンパク質の結晶化を行った結果、いくつかのタンパク質でモレキュラーシーブ依存的な結晶生成が認められた。得られたタンパク質結晶は全てモレキュラーシーブ表面上から析出し、別の空間群の高分解能結晶が生成した。また、モレキュラーシーブを添加しなければ結晶化しないタンパク質もあった。それら結晶構造の共通点として、タンパク質がシート状2次元結晶を形成し、さらに積み重なることで3次元結晶を形成していた(図1)。



図1. 合成ゼオライトのモレキュラーシーブを用いたタンパク質結晶化法の概念図。

したがって、モレキュラーシーブによってヘテロエピタキシャル結晶成長が起こり、タンパク質結晶化が促進されたと考えられる。しかしながら、使用したタンパク質の種類が少ないため全てのタンパク質に適応できるとは限らない。タンパク質結晶化における本手法の汎用性を確認し、その結晶化機構を解明するには様々なタンパク質を用いて調査する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、結晶化基板材料を用いた汎用的タンパク質結晶化方法を確立するために、以下の研究を行った。

### (1) モレキュラーシーブを用いたタンパク質結晶化における結晶化機構の解明

様々なタンパク質の結晶化により本手法の汎用性を確認し、またそれら結晶構造から、モレキュラーシーブ-タンパク質間相互作用の環境、およびモレキュラーシーブが結晶パッキングに与える影響を調査することで結晶化機構を解明し、モレキュラーシーブが異なる様々なタンパク質の結晶化基板材料として利用できる理由を明らかにする。

### (2) モレキュラーシーブを用いた効率的タンパク質結晶化技術の開発

本手法を用いたタンパク質結晶化を効率的に行うことで、タンパク質サンプルの無駄なロスをなくすために、モレキュラーシーブをマウントした結晶化プレートを作製し、加えて最適結晶化条件を調査することでモレキュラーシーブ用結晶化スクリーニング試薬キットを開発する。

### (3) 新規タンパク質結晶化基板材料の開発

より広範囲な各種タンパク質の結晶化に向けて、モレキュラーシーブをモデルとしたタンパク質結晶化を促進する新規タンパク質結晶化基板材料を見出す。

## 3. 研究の方法

### (1) モレキュラーシーブを用いたタンパク質結晶化機構の解明

サンプル量が十分に確保できるタンパク質としてキシラナーゼ等の市販モデルタンパク質、加えて9種類の微生物(*Escherichia coli*, *Geobacillus kaustophilus*, *Symbiobacterium toebii*, *Aquifex aeolicus*, *Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus*, *Aeropyrum pernix*, *Pyrococcus horikoshii*, および *Sulfolobus tokodaii*)由来タンパク質(合計28種類)を用いて、モレキュラーシーブ 3A, 4A, 5A, および 13X (和光純薬)との結晶化を、オイルマイクロバッチ法を導入した自動タンパク質結晶化装置 Autolab により行った(発表論文5)。加えて、膜タンパク質等を含む回折実験に適した良質結晶が析出しにくいタンパク質の結晶化を行い、本手法の実用性評価を行った。得られたタンパク質結晶の回折実験はインハウス回折計、および SPring-8 BL26B1 で行った。結晶析出状況、立体構造データ等の基礎データ収集を行うことでその汎用性を確認し、それら結晶構造から共通して見られる特徴を明らかにした。

### (2) モレキュラーシーブを用いた効率的タンパク質結晶化技術の開発

モレキュラーシーブを用いたタンパク質

の結晶化スクリーニングにおいて、サイズ0.4~0.2 mm程度の各モレキュラーシーブを結晶化プレートへマウントする作業は時間と手間がかかる。そこで、それら4種類の粉末状モレキュラーシーブの混合物を結晶化ウェルに固定化した結晶化スクリーニング用の結晶化プレートを作製し、タンパク質結晶化の効率化を試みた。

次に、モレキュラーシーブからタンパク質結晶が析出した際に使用した沈殿剤、添加剤の種類、濃度、pH等の結晶化条件から本手法に最適な結晶化試薬を特定し、大規模結晶化条件スクリーニングを必要としない結晶化試薬キットを作製した。加えて、タンパク質結晶化法として、オイルマイクロバッチ法、およびハンギング・シッティングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行い、本手法に適した結晶化方法を調査した。

### (3) 新規タンパク質結晶化基板材料の開発

モレキュラーシーブ同様に、細孔を有する結晶性物質として有機低分子結晶を用いたタンパク質結晶化を行った。得られた結果から、汎用性に優れたタンパク質結晶化基板材料が有すべき条件を検討した。

## 4. 研究成果

モレキュラーシーブを用いたタンパク質結晶化法によるその汎用性を確かめるため、28種類の異なるタンパク質(7.0~57.6 kDa, pI4.4~11.4)を用いて結晶化を行った。その結果、23種類のタンパク質でモレキュラーシーブ表面から結晶が析出した(図2a)。得られた結晶を用いて構造解析を行った結果、それら全ての結晶構造において、ヘテロエピタキシャル結晶成長特有の層状構造が確認できた(図2b, 発表論文3, 4)。

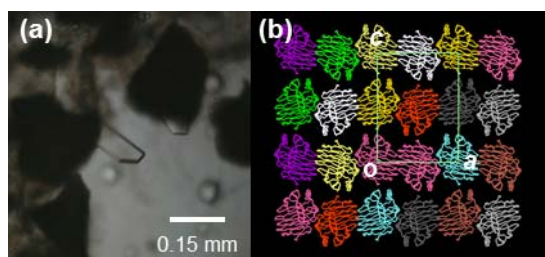


図2. (a)モレキュラーシーブ表面から析出したタンパク質結晶の写真。(b)得られた結晶の構造。層状構造を形成。

また、本手法によるタンパク質結晶化の実用性を評価するため、回折実験に適した良質単結晶を得るのが困難な膜タンパク質の結晶化を行った。その結果、回折分解能の向上は見られなかったが、本手法により微小結晶のみが析出しやすい膜タンパク質の大幅な結晶サイズの改善に成功した。これら結果か

ら、結晶化に成功したそれらタンパク質のサイズ、および等電点等に特異性はなく、幅広い範囲のタンパク質が本手法により結晶化することが明らかになった。

本手法による効率的タンパク質結晶化技術の開発では、モレキュラーシーブをマウントした結晶化プレートを開発した。これまでの結晶化結果から、細孔サイズ、および含有しているイオンが異なる4種の各モレキュラーシーブがどのようなタンパク質の結晶化に効果があるのかは不明であった。そこで、より効率の良い結晶化を行うために、4種類のモレキュラーシーブ混合物を結晶化プレートウェルにマウントした結晶化スクリーニング用の結晶化プレートを作製した。本プレートを用いることで、従来法では結晶を得ることが困難な *Methanocaldococcus jannaschii*由来ID41836タンパク質の結晶化に成功し(図3a)、その結晶構造を決定した。また本プレートを用いることで、結晶性が良くても、回折高分解能結晶の獲得が困難なタンパク質の良質結晶獲得に成功した(図3b, 発表論文1)。

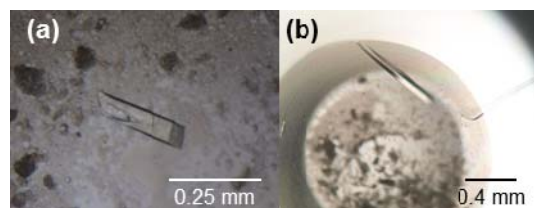


図3.モレキュラーシーブ混合物をマウントした結晶化プレートを用いることで得られたタンパク質結晶の写真。(a)ID41836タンパク質、および(b)α-アミラーゼの結晶。

次に、タンパク質結晶化スクリーニングより得られたデータから結晶化成功率の高い試薬を調製し、本手法に適した初期スクリーニング用結晶化試薬キットを作製した。高濃度塩を含む結晶化試薬の場合、モレキュラーシーブ表面から積極的に塩結晶が析出する。したがって、本手法による結晶化において、その沈殿剤は主にポリエチレングリコールが適している。加えて、本手法に最適な結晶化方法を調査するために、オイルマイクロバッチ法、およびハンギング・シッティングドロップ蒸気拡散法との比較を行った。結果として、最も多く良質単結晶を析出したのはオイルマイクロバッチ法であった。

また、モレキュラーシーブ表面から析出したタンパク質結晶を誰もが簡単に扱うことができ、さらに高品質回折データを収集するための結晶マウント法を開発した(図4)。本マウント法では、ファイバー先端に結晶をマウントすることで、従来のクライオループを用いたマウント法と比較して溶液の付着

を最小限に抑えることが可能である。結果として、本マウント法はS/N比の良い回折データ収集を可能にする(発表論文2)。

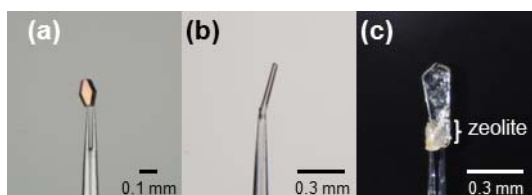


図4. ファイバーを用いた結晶マウント法。ブロック(a)、ロッド(b)形状の結晶も容易にマウントできる。(c)ゼオライトのモレキュラーシーブから析出したタンパク質結晶をそのままマウントした写真。

最後に、タンパク質-基板材料の両結晶間における接触面での格子整合を調査した。本研究において使用したモレキュラーシーブはパウダー結晶をペレット状に加工したものであるため、新たにゼオライト単結晶を用いてタンパク質結晶化を試みた。しかしながら、良質タンパク質単結晶の析出までは至っていない。一方で、タンパク質結晶化を促進する細孔性金属含有結晶を新たに見出し、良質タンパク質単結晶の獲得に成功した(図5)。得られたタンパク質結晶の格子定数は、使用する物質に応じて変化しており、格子整合の重要性が示唆された。また、金属を含まない細孔性結晶を用いてタンパク質結晶化を行った結果、いくつかのタンパク質では結晶化が促進したが、その汎用性は確認できなかった。したがって、これら結果から汎用的にタンパク質結晶化を促進する基板材料は、細孔、金属を有する結晶性物質が適していると思われる。

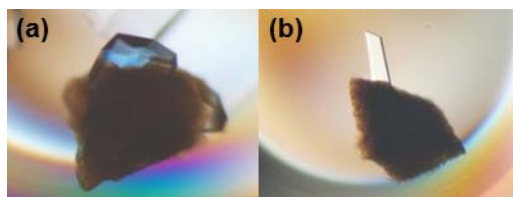


図5. モレキュラーシーブ同様に、マイクロ孔を有する結晶性物質の表面から析出したタンパク質結晶の写真。(a)リゾチーム、および(b)キシラナーゼの結晶。

## 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5件)

- ① Michihiro Sugahara, Michiyo Takehira, Katsuhide Yutani, Effect of Heavy Atoms on the Thermal Stability of  $\alpha$ -Amylase from *Aspergillus oryzae* (2013). *PLoS ONE*, **8**(2), e57432. (査

読有)

(DOI:10.1371/journal.pone.0057432)

- ② Michihiro Sugahara, A fiber-based crystal mounting technique for protein cryocrystallography (2012). *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 362-366. (査読有)  
(DOI:10.1107/S002188981200756X)
- ③ Michihiro Sugahara, Naoki Kunishima, Protein crystallization with zeolite (2011). *Acta Crystallogr. A* **67**, C767. (査読無)  
(<http://journals.iucr.org/a/issues/2011/a1/00/a48538/a48538.pdf>)
- ④ Michihiro Sugahara, Yuko Kageyama-Morikawa, Naoki Kunishima, Packing Space Expansion of Protein Crystallization Screening with Synthetic Zeolite as a Heteroepitaxial Nucleant (2011). *Crystal Growth & Design*, **11**, 110-120. (査読有)  
(DOI:10.1021/cg100987g)
- ⑤ Michihiro Sugahara, Katsumi Shimizu, Yukuhiko Asada, Hideki Fukunishi, Hirohumi Kodera, Takeshi Fujii, Eiji Osada, Takashi Kasazaki, Toshihumi Sawada, Hideyuki Chikusa, Kazuaki Kondo, Akira Yorihiro, Naoki Kunishima, Autolabo: an automated system for ligand-soaking experiments with protein crystals (2010). *J. Appl. Crystallogr.* **43**, 940-944. (査読有)  
(DOI:10.1107/S0021889810018595)

[学会発表] (計9件)

- ① 菅原道泰, 国島直樹, 「ゲルカプセル内でのタンパク質結晶化」第85回日本生化学会大会, H24年12月15日(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡)
- ② 菅原道泰, 国島直樹, 「回折実験のためのタンパク質結晶マウント法」平成24年度日本結晶学会年会, H24年10月26日(東北大学, 宮城)
- ③ 菅原道泰, 国島直樹, 「タンパク質 X 線結晶構造解析のための結晶化テクニック」第12回日本蛋白質科学会, H24年6月21日(名古屋国際会議場, 名古屋)
- ④ 菅原道泰, 国島直樹, 「ゼオライトを用いたキシラナーゼの結晶化スクリーニング」日本化学会第92春季年会, H24年3月25日(慶應義塾大学, 神奈川)
- ⑤ Michihiro Sugahara, Naoki Kunishima, 「Protein crystallization with zeolite」IUCr2011 (XXII Congress and General Assembly, International Union of Crystallography), H23年8月27日~28日(Municipal Conference Centre,

- Spain)
- ⑥ Michihiro Sugahara, Protein crystallization screening with microporous synthetic zeolites Molecular Sieves, NHRI-RIKEN Short Seminar, February 14, 2011 (National Health Research Institute NHRI, Taiwan)
  - ⑦ Michihiro Sugahara, Protein crystallization screening with microporous synthetic zeolites Molecular Sieves, Workshop on Structural Biology in Southern Taiwan through RIKEN PTP, February 13, 2011 (University Center for Bioscience and Biotechnology, National Cheng Kung University, Taiwan)
  - ⑧ 菅原道泰, 国島直樹, 「マイクロ孔ゼオライトを用いたタンパク質結晶化スクリーニング」日本結晶学会平成 22 年度年会, H22 年 12 月 3 日 (大阪大学コンベンションセンター, 大阪)
  - ⑨ Michihiro Sugahara, Yuko Kageyama-Morikawa, Naoki Kunishima, Protein crystallization with synthetic zeolite molecular sieves as hetero-epitaxial nucleants, Asian Crystallographic Association (AsCA) 2010, H22 年 11 月 2 日 (BEXCO, Korea)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: タンパク質結晶製造方法

発明者: 菅原道泰

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特願

番号: 2011-111682

出願年月日: 2011 年 5 月 18 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 道泰 (SUGAHARA MICHIIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶

構造解析研究グループ・研究員

研究者番号: 00415192