

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 6月 5日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23860028

研究課題名（和文） 固相メビオールゲル中で育成させる新規タンパク質結晶化技術

研究課題名（英文） New practical technique for Protein Crystallization with Mebiol Gel

研究代表者

杉山 成 (SUGIYAMA SHIGERU)

大阪大学・理学（系）研究科（研究院）・特任准教授

研究者番号：90615428

研究成果の概要（和文）：溶液中で育成させることが常識とされてきたタンパク質の結晶化を、高温にさらすことなく固化したメビオールゲル中で育成させる、世界で初めての結晶化技術を開発しました。この技術によって、結晶に損傷を与えることなく、再現性のある高精度なX線回折データを得ることが可能となりました。さらにメビオールゲルは、タンパク質結晶の核発生を促進すると共に、メビオールゲル中結晶は、浸透圧ショックにも強いことが明らかとなりました。これらの成果は、固相ゲル中で育成させる結晶化技術の汎用性を高める結果となりました。

研究成果の概要（英文）：In this study, we successfully crystallized three proteins in Mebiol gel. Our analysis indicates that Mebiol gel provides new possibilities for overcoming the inherent problem of high-temperature damage to the proteins. We also investigated the nucleation rate of protein crystals in the presence of Mebiol gel and found that Mebiol gel increased the number of protein crystals. Furthermore, the Mebiol gel surrounding the crystals reduces the influence of osmotic shock in high-ionic-strength solutions. This technique will open up a new dimension for the crystallization of biological macromolecules in hydrogels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物性・結晶工学

キーワード：メビオールゲル、アガロースゲル、固相ゲル中結晶化、タンパク質結晶化、X線構造解析、創薬、分子設計

1. 研究開始当初の背景

バイオサイエンス分野におけるタンパク質の立体構造情報の重要性は、益々増大しつつある。特に、薬剤となりうる様々な化合物とタンパク質との相互作用を、立体構造情報を基に議論し、生体内における種々の生物反

応を考察することは、分子設計や創薬という観点から考えれば、必要不可欠である。また、ヒトゲノム解読が終了し創薬ターゲットとなる疾患関連タンパク質が次々と明らかになるにつれて、タンパク質が持つ構造情報の解明がさらに必要になっている。

このような研究を行うに当たって必要になるタンパク質の立体構造情報を、原子レベルで得るための最も強力な手段はX線構造解析であるが、この研究を行うためには、良質なタンパク質の結晶を作製する必要がある。ところが、タンパク質結晶は豆腐のように脆く、非常に“壊れやすい”。この不安定性の問題により、短時間で高精度なタンパク質立体構造情報を得る技術は未だに確立されていないのが現状である。これは、X線構造解析に必須な、結晶の凍結（放射線損傷を回避させるため必須）と結晶のマウント操作において、技術的進展が見られず、現在でも人の手による不確実な方法によって結晶を取り扱うため、結晶自体に損傷を与えてしまうからである。このために、構造解析がなされないままになっている重要なタンパク質がいくつも存在している。

私たちは、これらの問題を解決するために、タンパク質の結晶化実験を、完全に固化したアガロースゲル中（固相ゲル中）で育成させる新しい結晶化技術の開発に取り組んできた（S. Sugiyama, K. Tanabe, M. Hirose, T. Kitatani, H. Hasenaka, Y. Takahashi, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori, T. Inoue, and H. Matsumura, “Protein Crystallization in Agarose Gel with High Strength: Developing an Automated System for Protein Crystallographic Processes”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 48, 075502, 2009）。これまでのタンパク質結晶化実験は、溶液中で行われることが常識とされてきたため、ゼリーのように固化したゲル中でタンパク質を結晶化させるという発想そのものがなかった。この技術によって育成した結晶は、周りにゲルが存在するため、結晶をゲルで被覆したまま、結晶に直接接触することなく、取り出すことができる。また、高品質かつ大型のタンパク質単結晶が得られやすく、その結晶から高精度のX線回折データが再現性良く得られる。

しかし、この方法には解決すべき課題が存在する。それは、アガロースゲル中で結晶を育成させるために、流動性のあるアガロースゾル溶液とタンパク質溶液を混合する必要があるが、アガロースのゲル化温度は通常35°C以下であるため、ゾル状態を維持できる35°C以上では、混合時に多くのタンパク質が損傷してしまうことである。

この課題を克服するために、申請者はアガロースゲルとは、正反対のゾルゲル温度相転移を起こすメビオールに着目した。メビオール（市販品、発売元：池田理化）は、低温（0°C以上 15°C以下）で流動性のあるゾル、室温（約20°C以上）でゲルになる化学合成ポリマーである。このメビオールゲルを使用することによって、低温下で、メビオールのゾル溶

液とタンパク質溶液の混合溶液を作製することが可能となる。これにより、タンパク質サンプルを損傷させることなく、安定に結晶化させることができる。その結果、固相ゲル中で育成させる結晶化技術の汎用性が高まり、構造ゲノム研究の促進および創薬プロセスの飛躍的進展が見込まれる。

2. 研究の目的

本研究では、これまで私たちが開発してきた、ゼリーのように固化したゲル中でタンパク質結晶を育成させる新しい結晶化技術の汎用化に主眼をおき、タンパク質を高温にさらすことなく固相メビオールゲル中で結晶を作製させる新規技術の確立にある。

次の2つの項目を目標に実施する。

- (1) タンパク質を高温にさらすことなく固相ゲル中で結晶を育成する新規技術を確立する。
- (2) 固化したメビオールゲル中で育成したタンパク質結晶を用いてX線回折実験を行い、本技術の有効性を検証する。

本技術は、従来、溶液中で行われることが常識とされてきたタンパク質の結晶化実験を固相メビオールゲル中で行う新規技術である。具体的には、低温でゾル、室温でゲルに転移するメビオールゲルを使用し、これまで高温下でしか実現できなかったゲルとタンパク質の混合溶液の作製を、低温下でも可能となる新しい結晶化技術を開発する。さらにX線回折実験によって、本技術の優位性の評価をし、固相ゲル中で育成させる結晶化技術の汎用化を目指す。

3. 研究の方法

(1) タンパク質サンプルの調整

研究に用いるタンパク質サンプルの精製を行った。4種類のタンパク質（エラスターゼ[ELS]、グルコースイソメラーゼ[GI]、リゾチーム[LZM]、インシュリン）は、市販品を購入した。しかし、一部のサンプルにおいても不純物が多く、また購入ロットによってサンプル純度に大きな差を生じた。その結果、タンパク質結晶化実験において、それが研究結果の再現性に影響を及ぼしたため、サンプルの精製を液体クロマトグラフィーによって行った。具体的には、結晶化実験に用いる一部のサンプルは、アフィニティー、イオン交換またはゲルろ過クロマトグラフィーを行った後、SDS-page および Native-page 電気泳動によって純度が同程度になるよう精製した。

(2) 固相ゲル中結晶化技術の確立

メビオールゲルは、これまで結晶化実験に使用されたことがないため、4種類のタンパク質（ELS、GI、LZM、インシュリン）を用

いて、最適なゲル濃度、温度コントロール、およびタンパク質溶液との混合方法を検討した。具体的には、24%メビオールゲルを準備し、同等量のタンパク質溶液と結晶化試薬を氷上で混合させ、室温でゲル化させた後、結晶化実験を行った。

(3) 固相ゲル中結晶化技術の評価

固相メビオールゲル中で育成したタンパク質結晶を用いてX線回折実験(SPring-8へ出張)を行い本技術の有効性を検証した。評価に使用したタンパク質結晶は、4種類のタンパク質(ELS、GI、LZM、インシュリン)から得られた結晶で行った。具体的には、固相メビオールゲル中で育成した4種類のタンパク質結晶の評価のための指標として、X線強度データの統計値であるR-merge、Resolution、Completeness、Mosaicityに設定した。さらに、それらの値を溶液中で成長した結晶と比較することによって、固相メビオールゲル中で育成した結晶化技術の優位性を評価した。

4. 研究成果

(1) 固相ゲル中での結晶化

4種類のタンパク質(ELS、GI、LZM、インシュリン)を用いて、固化した8.0wt%メビオールゲル中(固相ゲル中)での結晶化を実施した。対照実験として従来法である溶液中での結晶化(溶液中結晶化)も同時に実施した。その結果、固相ゲル中で4種類のタンパク質全てで結晶が観察された(図1)。これは本結晶化技術が、従来法と同じ結晶化条件および方法で結晶を作製できる技術であることを示す初めての結果であった。

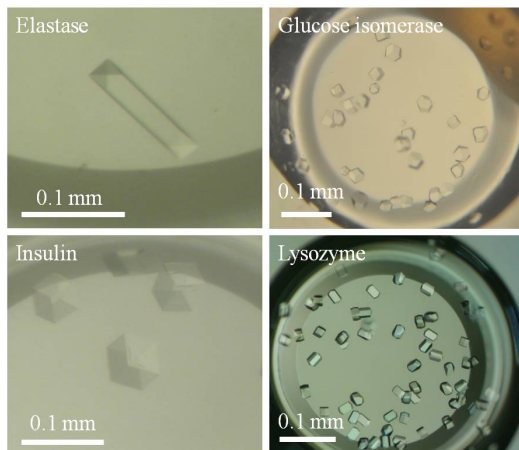


図1 固相ゲル中結晶

(2) メビオールゲルによる結晶核発生

4種類のタンパク質(ELS、GI、LZM、インシュリン)を用いて、ゲル濃度0-4.0%(w/v)の範囲内で結晶化実験を行い、ゲル濃度と晶出した結晶数との相関を検証した(図2)。その結果、ゲル濃度の上昇に従い、晶

出する結晶数が増加する傾向が示された(図2)。メビオールゲルは結晶の核発生を促進する効果を持つことが明らかとなった。しかし、その増加傾向はゲル濃度が2.0%までは直線的であるものの、2.5~3.5%ゲル濃度では減少傾向になり、再び4.0%から上昇に転じることが分かった。これらの結果は、以前の固相アガロースゲル中結晶化実験でも良く似た傾向が報告されている。

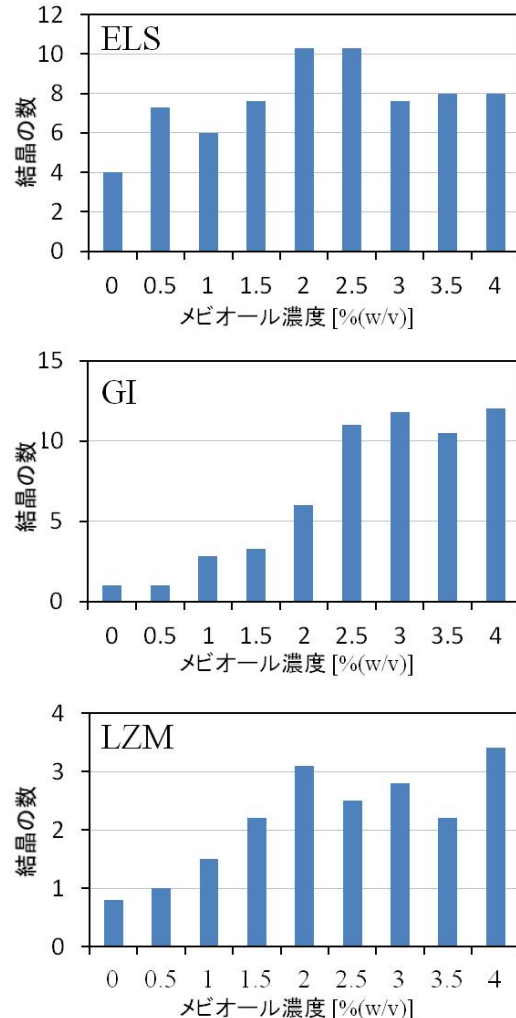


図2 ゲル濃度と結晶析出数のグラフ

(3) ソーキングでの浸透圧ショックの軽減
通常、タンパク質結晶は成長した環境と著しく異なる高イオン強度を持った溶液中へソーキングすると浸透圧ショックによってクラックを生じ致命的なダメージを受ける。ところが、固相メビオールゲル中で育成したELS、GI、LZM結晶は、それらの溶液中でも10分以上安定であった。対照的に、溶液中結晶は直ぐにクラックして溶け始めた(図3)。また放射光を用いた回折実験では、伸びや割れの無いシャープな回折点を示し、高精度構造解析に使えるデータを100%近いcompletenessで収集することができた。固相ゲル中結晶は、溶液中結晶と比べて浸透圧シ

ショックによる損傷を大きく軽減できる特性を持っていると考えられる。

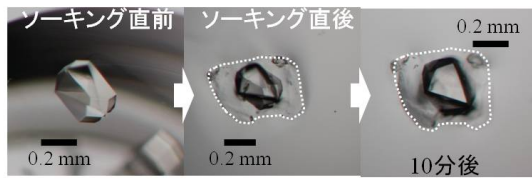


図3 ゲル濃度と結晶析出数のグラフ

(4) 固相ゲル中結晶のX線回折実験

固相ゲル中結晶の品質を評価するためX線回折実験を行った(図4)。特に、固相ゲル中結晶の凍結の可否の確認および溶液中結晶と固相ゲル中結晶から得られた結晶学的データの比較を行った。その結果、全ての固相ゲル中結晶は低温窒素ガス気流下で問題なく凍結させることが可能であった。また、それらの結晶から得られた回折強度データは、溶液中結晶と比べて結晶学的データの著しい差を生じなかった。

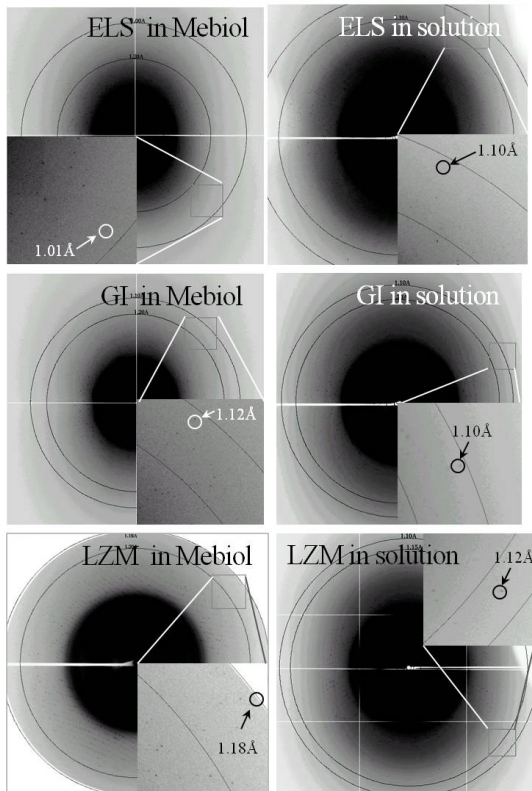


図4 固相ゲル中結晶(左側)と溶液中結晶(右側)のX線画像

(5) 固相ゲル中結晶の構造解析

これまでの研究から、固相ゲル中結晶は、ゲル繊維を取り込んだまま成長していることが分かっている。そのため、タンパク質分子表面に存在しているアミノ酸とゲル分子が相互作用し、それらがタンパク質の立体構造に大きな影響を与えている可能性がある。我々はそれらを検証するため、高分解能の

ELS、ThM、GI結晶のX線回折データを用いて、それぞれ構造解析を行った。その結果、溶液中結晶から得られた構造と比べて、大きな構造変化は観察されず、それらのタンパク質分子の平均二乗偏差(RMSD)は0.15Å以下であった。また分子表面に存在するアミノ酸側鎖にも大きな構造変化は観察されなかった。さらに、それらと相互作用していると考えられるゲル繊維の電子密度も特定することはできなかった。

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)

S. Sugiyama, N. Shimizu, G. Sazaki, M. Hirose, Y. Takahashi, M. Maruyama, H. Matsumura, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, and Y. Mori, A novel approach for protein crystallization by a synthetic hydrogel with thermoreversible gelation polymer, *Cryst. Growth Des.*, 査読有, 13, (2013), 1899–1904

S. Nakayama, H. Yoshikawa, R. Murai, M. Kurata, M. Maruyama, S. Sugiyama, Y. Aoki, Y. Takahashi, M. Yoshimura, S. Nakabayashi, H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori, Effects of Gel-Solution Interfaces on Femtosecond Laser-Induced Nucleation of Protein, *Cryst. Growth Des.*, 査読有, 13, (2013), 1491–1496

杉山成、松村浩由、丸山美帆、佐崎元、廣瀬末果、安達宏昭、高野和文、村上聡、井上豪、森勇介、固相ハイドロゲル中でのタンパク質結晶化、*日本結晶学会誌*、査読有、54巻、(2012)、300–303

S. Sugiyama, M. Maruyama, G. Sazaki, M. Hirose, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, and H. Matsumura, Growth of protein crystals in hydrogels prevents osmotic shocks, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (13), (2012), 5786–5789

N. Nishizawa, S. Ishida, M. Hirose, S. Sugiyama, T. Inoue, Y. Mori, K. Itoh, and H. Matsumura, Three-dimensional, non-invasive, cross-sectional imaging of protein crystals using ultrahigh resolution optical coherence tomography, *Biomedical Optics Express*, 3, (2012), 735–740

[学会発表](計8件)

杉山成、松村浩由、丸山美帆子、佐崎元、廣瀬末果、安達宏昭、高野和文、村上聡、井上豪、森勇介、創薬スクリーニングを容易にするタンパク質結晶の機械的強

化技術、第 24 回 高分子ゲル研究討論会、
2013. 1. 16、東京大学 山上会館

杉山成、安達宏昭、高野和文、村上聡、
井上豪、森勇介、松村浩由、蛋白質の固
相ゲル結晶育成技術の開発とその機能
解析、第 42 回結晶成長国内会議、2012. 11.
9、九州大学筑紫キャンパス

石田周太郎、西澤典彦、廣瀬末果、杉山
成、井上豪、森勇介、伊東一良、松村浩
由、超高分解能 OCT によるタンパク質
結晶の 3 次元・高機能イメージング、日
本光学会年次学術講演会、2012. 10. 23、
東京 タワーホール船堀

S. Sugiyama, M. Maruyama, G. Sasaki, M.
Hirose, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami,
T. Inoue, Y. Mori, and H. Matsumura,
Hydrogel Protects Protein Crystals From
Osmotic Shock, 14th International
Conference on the Crystallization of
Biological Macromolecules (ICCBM14),
2012. 9. 27, Huntsville, Arabama USA

Y. Aoki, M. Maruyama, Y. Takahashi, M.
Yoshimura, H. Yoshikawa, S. Sugiyama, H.
Adachi, K. Takano, S. Murakami, H.
Matsumura, T. Inoue and Y. Mori, Effect of
solution stirring on protein crystal growth
on high concentrated hydrogel”, 14th
International Conference on the
Crystallization of Biological
Macromolecules (ICCBM14), 2012. 9. 27,
Huntsville, Arabama USA

石田周太郎、西澤典彦、廣瀬末果、杉山
成、井上豪、森勇介、伊東一良、松村浩
由、超高分解能 OCT によるタンパク質
結晶の 3 次元・非侵襲断層イメージング、
第 73 回応用物理学会学術講演会、2012. 9.
12、愛媛 松山大学文京キャンパス

S. Sugiyama, Growth of Protein Crystals in
Semi-Solid Hydrogel, Institute for Protein
Research Seminar, 2012. 6. 18, Osaka
University

S. Sugiyama, Towards an understanding of
lipid-protein interactions, new approaches
for producing high-quality protein crystals,
International ERATO Symposium on Lipid
Structures in and around Proteins, 2011. 11.
14, Hotel Hankyu Expo Park

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 成 (SUGIYAMA SHIGERU)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・
特任准教授

研究者番号：90615428