

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657076

研究課題名(和文) DNA クランプを用いた新規結晶化シャペロンの開発

研究課題名(英文) Crsytallization chaperon by DNA clamp for protein crystallography

研究代表者

橋本 博 (Hashimoto, Hiroshi)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：40336590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は、クランプ分子を結晶化シャペロンとして利用したタンパク質の新規結晶化技術の開発である。PCNAなどのクランプは一般に3量体のリング構造を形成する。クランプは、分子の対称性が高いこと、それ自身が比較的容易に結晶化することから結晶化シャペロンとして有用であると考えた。本研究が開発する結晶化技術は、タンパク質の結晶化における有効な選択肢の1つになると期待できる。いくつかのタンパク質で結晶化を検討したところ、本研究で開発した結晶化シャペロンベクターの有効性が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Crystallization of proteins is the most crucial step in the protein crystallography. To date, various crystallization chaperon for proteins are developed. However, there is no versatile chaperon applicable for various proteins. We consider that DNA clamp molecule is usable for crystallization chaperon because DNA clamp adopt symmetric quaternary structure and easily crystallized. Our chaperon will be an option for protein crystallization. In this works, we constructed three types of expression vectors to produce chaperon-fused protein. We tested tree proteins and showed availability of our chaperon.

研究分野：X線結晶構造解析

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

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析はタンパク質の立体構造を原子レベルで解明できる強力な構造決定法であるが、目的タンパク質を結晶化する必要がある。タンパク質の結晶化は、結晶構造解析において最も困難なプロセスであり、これまでに結晶化を促す様々な方法が考案されている。結晶化シャペロンもその一つであり、一般には、結晶化したいタンパク質に他のタンパク質(結晶化シャペロン)を融合させ、目的タンパク質の結晶化を促す。結晶化シャペロンの融合により、目的タンパク質の可溶性、発現量の増加、タンパク質の安定性の向上などの効果も期待できる。最近では、Gタンパク質共役受容体に T4 リゾチームを融合させ、結晶構造解析に成功した例が記憶に新しい (Rosenbaum *et al.*, *Science*, 2007)。マルトース結合タンパク質など、これまでに様々な結晶化シャペロンが報告されている (Symth *et al.*, *Protein Sci.*, 2003; Koide, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2009)。目的タンパク質に結合する抗体は、結晶化シャペロンとして有効であるが (Ostemeier *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 1995 など)、費用と手間を考えると、現状では誰もが使えらる簡便な手法ではない。分子表面にヒスチジン残基などの金属イオンの配位子を導入し、金属イオンによる対称的な分子会合を誘導し、結晶化させる方法がある (Laganowsky *et al.*, *Protein Sci.*, 2011)。しかし、配位子の導入位置が重要であり、既知構造が存在しない場合、配位子の導入は試行錯誤に頼らざるを得ない。つまり、万能な結晶化シャペロンは存在しないため、利用できる選択肢は多い方が良い。そこで申請者は、あらかじめ対称的に会合している分子を利用すれば、結晶化を促進できると考え、結晶化シャペロンとして DNA クランプ分子に着目した。

2. 研究の目的

PCNA に代表される DNA クランプは、サブユニット間で N 末側側と C 末側が相互作用し、Heat-to-Tail 型の 3 量体のリング構造を形成する。本研究では、PCNA や会合様式の異なる変異体を簡便に目的タンパク質に融合できる結晶化シャペロンベクターを構築し、結晶化シャペロンの有効性を検証する。

3. 研究の方法

本研究は、DNA クランプである PCNA を結晶化シャペロンとして利用した新規結晶化技術の開発である。結晶化したい目的タンパク質を、DNA クランプである PCNA との融合タンパク質として発現できるベクター系を構築する。結晶化シャペロンの有効性を調べるためにいくつかの構造未知タンパク質に適用し、結晶化を検討する。

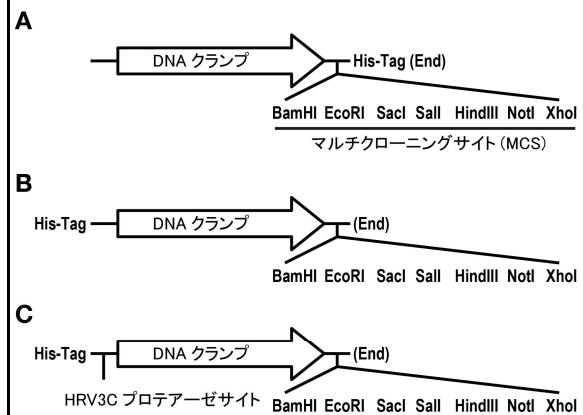


図 1 結晶化シャペロンベクターの基本図
(1) ベクターの構築

基本的なベクターマップを図 1 に示した。タイプ A は一番単純なベクターで、マルチクローニングサイトに目的遺伝子を挿入することで、目的タンパク質の N 末端側に PCNA を融合できる。この系では目的タンパク質の C 末端側にヒスタグが付加される。タイプ B は PCNA の N 末端側にヒスタグを付加したものの。タイプ C は、タイプ B のヒスタグの C 末端に HRV3C (LEVLFQGP) プロテアーゼが認識するサイトを挿入し、ヒスタグを切断できるようにした。

(2) 結晶化の検討

結晶化を行う目的タンパク質の遺伝子を結晶化シャペロンベクターに組み込み、大腸菌を用いて発現チェックを行い、発現量や可溶性などについて、結晶化シャペロンの影響を評価した。発現・可溶性が良好な系については、精製を進め、結晶化スクリーニングを行った。結晶化スクリーニングは Thermo Fischer Scientific 社の結晶化装置 Hydra II を使用した。結晶化条件は市販のスクリーニング試薬を用いることで、検索空間の偏りを無くす。そのために複数のスクリーニングキットを使用した。代表的なスクリーニング試薬として、Hampton Research 社の Crystal Screen I & II、Qiagen 社の PACT Premier、JCSG Plus、PEGs、PEGs II を使用する予定である。結晶化プレートの観察と結果のスコアリングは Art Robbins 社の結晶観察装置 CrysCam を使用した。X線実験は実験室系 X線回折装置および放射光施設を利用し、得られた結晶の回折能を調べると共に、回折強度データを収集した。

4. 研究成果

クランプを結晶化シャペロンとして、目的タンパク質をクランプ分子の C 末端に融合さ

せ、さらにアフィニティー精製用のヒスタグを付加できるベクター、クランプ分子のN末端にヒスタグを付加させたベクター、クランプ分子のN末端にヒスタグを付加させ、タグを切断させるためにHRV3Cプロテアーゼの認識サイトを挿入したベクターの作成を完了した。

作成した結晶化シャペロンベクターを用いて、3つの構造未知タンパク質(Protein-X、Y、Z)について、試料調製と結晶化を行い、本ベクターの有効性を検証した。

(1) Protein-X

本タンパク質は、出芽酵母由来の分子量7 kDaの小型のタンパク質で、C2H2型のZn-fingerモチーフを持つ。これまでに結晶化は得られてはいたが、回折分解能が10オングストローム程度であり、X線結晶構造解析には至っていなかった。そこで目的タンパク質をコードする遺伝子を本シャペロンベクターに組み込み、タンパク質の発現を調べた。その結果、多くが可溶性画分に得られ、カラムクロマトグラフィーによって精製した。結晶化スクリーニングの結果、結晶化に成功し、西播磨大型放射光実験施設SPring-8においてX線回折実験を行ったところ、2.7オングストローム分解能程度の回折強度データを得ることができた(表1)。さらに、構造解析を進めた結果、分子置換法による解を得ることに成功している。

しかし、結晶化シャペロンと目的タンパク質の間のリンカーの柔軟性のため、目的タンパク質の明瞭な電子密度を得るには至っていない。今後、リンカーの長さを検討することで、リンカーの柔軟性が改善されると期待できる。

(2) Protein-Y

本タンパク質は、出芽酵母由来の分子量32 kDaのタンパク質である。これまで大腸菌を用いて大量発現を試みてきたが、安定に精製することができなかった。本シャペロンベクターを利用して発現条件を検討したところ、最終的にヒスタグを付加させない系において、最も効率よく精製することができた。さらに、結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、PCNAの会合状態を変える変異を導入した場合に、結晶を得ることに成功した。フォトンファクトリーにおいて、X線回折実験を行ったところ、3.0オングストローム分解能の回折強度データを得ることに成功した(表2)。

(3) Protein-Z

本タンパク質は、ヒト由来の17 kDaのタンパク質であり、BRCTドメインを持つ。大腸菌を用いた発現系によって、高純度な試料を得ていたが、網羅的な結晶化スクリーニングを行っても結晶を得ることができなかった。本シャペロンベクターを利用して、発現

条件を検討したところ、可溶性は低下したものの、精製標品を得ることができた。結晶化条件のスクリーニングを行った結果、針状結晶を得ることに成功した。

以上の結果から、本研究で開発した結晶化シャペロンベクターの有効性が確認できた。したがって、本結晶化シャペロンは様々なタンパク質への応用が期待できる。今後はリンカーの長さやアフィニティータグの種類と位置、プロテアーゼサイトの検討によってベクターのバージョンアップアップが可能である。

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8件)

- (1) Akira Inoue, Sotaro Kikuchi, Asami Hishiki, Youming Shao, Richard Heath, Benjamin J. Evison, Marcelo Actis, Christine E. Canman, Hiroshi Hashimoto, & Naoaki Fujii, A Small Molecule Inhibitor of Monoubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) inhibits Repair of Interstrand DNA Crosslink, enhances DNA Double-strand Break, and sensitizes Cancer Cells to Cisplatin, *J. Biol. Chem.* (2014) 289, 7109-7120, DOI10.1074/jbc.M113.520429
- (2) Chandanamali Punchihewa, Akira Inoue, Asami Hishiki, Yoshihiro Fujikawa, Michele Connelly, Benjamin Evison, Youming Shao, Richard Heath, Isao Kuraoka, Patrick Rodrigues, Hiroshi Hashimoto, Masanobu Kawanishi, Mamoru Sato, Takashi Yagi, & Naoaki Fujii, Identification of a small molecule PCNA inhibitor that disrupts interactions with PIP-Box proteins and inhibits DNA replication, *J. Biol. Chem.* (2012) 287, 14289-14300, DOI 10.1074/jbc.M112.353201

[学会発表](計15件)

- (1) 橋本博
損傷乗り越えDNA合成におけるポリメラーゼ相互作用の構造基盤
第12回NRGICがん・ゲノム重点セミナー
2013年7月5日
長崎大学
- (2) Hiroshi Hashimoto, Sotaro Kikuchi, Asami Hishiki, Mamoru Sato, Chandanamali Punchihewa, Naoaki Fujii
Crystal structures of human PCNA in complex with small molecule

inhibitors for cancer therapeutics
AsCA 12/CRYSTAL 28
12/2-12/6, 2012
Adelaide Convention Centre, Adelaide,
Australia

- (3) 菊池 壮太郎、菱木 麻美、Chandanamali
Punchihewa、藤井 直明、佐藤 衛、橋本
博
抗がん剤併用薬開発に向けた PCNA と阻
害剤との複合体構造
第 12 回日本蛋白質科学会
6/20-6/22, 2012
名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 博 (HASHIMOTO HIROSHI)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号：40336590

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：