

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286051

研究課題名(和文) 固相ゲル中結晶化法をベースとした複合体結晶構造解析の革新的技術開発

研究課題名(英文) Innovative technological development for the production of the complex crystal with high-strength hydrogel

研究代表者

杉山 成 (SUGIYAMA, SHIGERU)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90615428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：固相ゲル中結晶化法は、凝固したゲル中でタンパク質結晶を育成させる世界で初めてのタンパク質結晶化法である。本方法の特徴は、タンパク質結晶の有機溶媒に対する耐性を飛躍的に向上させたことにある。本研究では、従来法では実現できなかった、難水溶性化合物の溶解した高濃度有機溶媒へ、ゲル中結晶を浸漬することにより、複合体結晶を作製する新規技術開発を行った。その結果、凝固ゲル中ストレプトアビジン結晶とFABP3結晶を阻害剤が溶けた50%DMSO溶液へ数時間浸漬した後、X線回折実験によって得られたデータを用いて、構造解析を行ったところ、活性部位に阻害剤の電子密度をはっきりと観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：X-ray crystallography offers an unprecedented opportunity to facilitate drug discovery. The structural information of the protein-ligand complex has the potential to find ways to improve the lead compounds. The best way is to determine the three dimensional structure of the complex by soaking the ligand in crystals. However, the soaking step has a problem because many lead compounds are low water-soluble. Such lead compounds must be dissolved in concentrated organic solvents, such as dimethyl sulfoxide (DMSO). We recently developed a new method for growing crystals in a high-strength hydrogel. This method enabled us to increase the mechanical stability of the crystals. In this study, we transferred the hydrogel-grown avidin/streptavidin or FABP crystals into a 50% DMSO solution containing the inhibitors. We observed the clear electron density maps of the compounds that are bound to the active sites.

研究分野：生物学

キーワード：結晶工学 結晶成長 脂質結合タンパク質 凝固ゲル 創薬スクリーニング X線構造解析 脂質 難水溶性化合物

1. 研究開始当初の背景

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。しかし、この研究を行うためには良質なタンパク質の結晶を育成する必要がある。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。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、技術的進歩が見られず、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。

申請者は、これらの問題を解決するために、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実験を、完全に凝固させたハイドロゲル中（固相ゲル中）で育成させる、世界で初めての結晶化技術を開発した。この技術によって育成したタンパク質結晶は、結晶の周りに凝固したゲルが存在するため、結晶に接触することなく取り出すことができる。そのため、結晶に損傷を与えることなくマウント操作が可能となり、高精度なX線回折データを再現性良く得ることができる。実際に、いくつかのタンパク質ではProtein Data Bankに登録されている構造よりも高い分解能をもつ高品質結晶を育成することに成功している。本技術の最大の特徴は、タンパク質結晶の機械的強度の向上を実現させたことにある（S. Sugiyama, *et al.*, “Growth of protein crystals in hydrogels prevents osmotic shocks”, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 5786–5789, 2012）。その結果として、固相ゲル中タンパク質結晶は、有機溶媒や乾燥に対して耐性を有すること分かった。

近年、医薬品開発において新薬創出の成功率は減少傾向にあり、製薬会社においては開発期間の短縮とコスト削減が強く望まれている。その解決策の一つとして、タンパク質の立体構造情報を用いた創薬開発が行われている。具体的には、標的タンパク質と化合物との複合体のX線構造解析から、化合物との相互作用メカニズムについて、構造情報を基に議論し、化合物の親和性および特性を最適化することで、新規リード化合物を迅速に見つける手段が利用されている。一般的に、この複合体結晶の作製には浸漬法が用いられる。浸漬法とは、化合物の溶けた溶液中にリガンドの結合していないフリーのタンパク質結晶を浸すことによって、結晶中に化合物を拡散させ、標的タンパク質分子と結合させる方法である。しかし、開発初期の新薬候補化合物の多くは一般的に疎水性が高く、高濃度の有機溶媒にしか溶けない場合が多い。ところが、タンパク質結晶は脆くて軟らかい

ため、高濃度有機溶媒中にタンパク質結晶を浸漬させた場合、ほぼ全ての結晶が浸透圧ショックによる損傷によって崩壊し（図2）、X線構造解析が困難になってしまう。そのため、現在、化合物との複合体結晶を作製できるのは、水溶性かつ高親和性の化合物のみに限られている。このような背景から複合体結晶の作製には新しい技術開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、従来法では実現できなかった、難水溶性化合物の溶解した高濃度有機溶媒中へ、固相ゲル中で育成したタンパク質結晶を浸漬することにより、容易に複合体結晶を作製できる新規技術開発を目的とする。具体的には、次の2つの項目の研究開発を行った。

多くの化合物と標的タンパク質との複合体結晶を浸漬法により作製するため、微量のタンパク質溶液を扱う自動結晶化スクリーニング装置に対応した固相ゲル中結晶化法の開発を行う。

難水溶性化合物として、疎水性の高い化合物を用いる。それらの化合物濃度を変化させ、高濃度有機溶媒に溶解させた後、そこへ固相ゲル中結晶を浸漬させることで複合体結晶を作製する。さらに、X線回折実験により結晶学的データと比較検討しながら浸漬方法（化合物濃度、浸漬時間、有機溶媒濃度など）を最適化する。

最終的に、本技術の特徴を活かし、高濃度有機溶媒に溶けた種々の難水溶性の脂肪酸リガンド溶液へ、脂肪酸結合タンパク質（FABP）の結晶を浸漬し、得られた複合体結晶を精密に構造解析することで、これまで未解明であった脂肪酸分子認識の構造基盤とその生理的役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 固相ゲル中結晶化法

膨大な化合物と標的タンパク質との複合体結晶を作製するためには、微量のタンパク質溶液を扱う自動結晶化スクリーニング装置に対応した、高効率な固相ゲル中結晶化法を開発することが必要である。一方、これまでの固相ゲル中結晶化法は、高粘度ゾル溶液を取り扱うため、微量（数 μL ）の容量ではゾル溶液とタンパク質溶液を均一に混合させることができない。そのため、それぞれの溶液を50 μL ずつ混合した後に、2 μL ずつ結晶化プレートに分注していた。この方法では、多くの時間と労力を必要とし現実的に網羅的な結晶化スクリーニングは困難である。この問題を解決するために、予め固相ゲルを結晶化プレートに2 μL ずつ塗布し、そのゲル上から自動結晶化装置により結晶化溶液（タンパク質溶液と沈殿剤）を滴下した。ゲル中に結晶化溶液を浸透させることでゲル中に結晶を晶出させる方法を検討した。本研究では3種類のタンパク質（Lysozyme, Glucose isomerase, streptavidin）を用いた。

(2) 化合物に対する浸漬法

固相ゲル中結晶を用いた浸漬技術を確立するために、モデルタンパク質として2種類のタンパク質 (streptavidin と FABP) を用いた。難水溶性化合物を溶解させるための溶媒として、3種類の有機溶媒 (dimethyl sulfoxide; DMSO、dimethyl formamide、ethanol) を用いた。具体的には、難水溶性化合物を有機溶媒にそれぞれ溶解させた後、固相ゲル中結晶を浸漬させた。X線回折実験 (シンクロトロン放射光 SPring-8) により構造解析を進め、活性部位に結合した化合物の有無を確認することで本方法を評価した。

(3) 脂肪酸結合タンパク質 (FABP) への応用

先の開発の応用として、FABP に対して、ほぼ同じ結合親和性をもつ、鎖長の異なる脂肪酸 (C10~C18) を用いて研究を進めた。各種の脂肪酸分子の結合による構造差異が、タンパク質-脂肪酸複合体の全体構造に与える影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 固相ゲル中結晶化法の汎用化

アガロース粉末から高温 (90 ~ 100) で溶解させたアガロースゾル溶液を結晶化プレートに 2 μ L ずつ流し込み、室温で 30 分以上静置して凝固させた。その後、凝固ゲルの上からタンパク質溶液と結晶化剤を流し込み、ゲル中にタンパク質と結晶化剤を拡散させ、結晶を育成させる方法を試みた (図 1)。

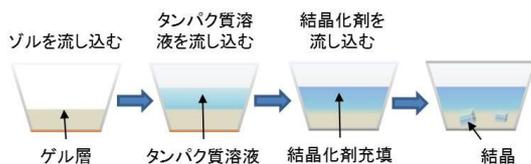


図 1 固相ゲル中結晶育成の汎用化法

これらの結果、本研究で用いたタンパク質サンプルにおいて、それらの結晶の大部分がゲル中ではなくゲル上で観察された。傾向として、分子量の大きなタンパク質サンプルほど、ゲル上で結晶が観察された (図 2)。これは、ゲル繊維中への浸透速度がタンパク質の分子量に依存していることが原因であった。また、タンパク質溶液と結晶化溶液を混合した後にゲル中へ浸透させたため、タンパク質がゲル中へ十分に拡散する以前に、結晶の核発生がゲル上で進んだためと考えられた。そのための対策として、ゲル中にタンパク質を十分に浸透させた後、結晶化溶液を添加することで対応した。その結果、結晶の析出時間が遅くなり、ゲル中にも結晶が観察された。しかし、この対策方法でも多くの結晶がゲル上で析出するため、本汎用化法は、まだ多くの改善を必要とする結果となっている。

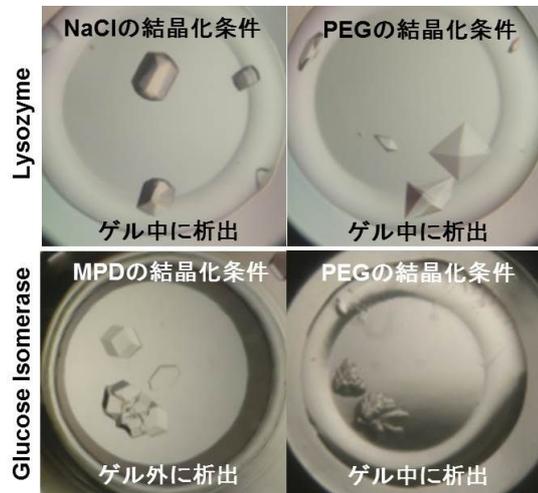


図 2 固相ゲル中結晶化法

Lysozyme では結晶化条件 (3種類) を変えてもゲル中のみで結晶が観察される。しかし、Glucose isomerase では、多くがゲル上で結晶が析出してしまふ。

(2) 化合物溶液に対する浸漬技術の確立

本実験では、2種類のタンパク質 (Streptavidin と FABP) を用いた。Streptavidin と FABP に結合する難水溶性化合物として、それぞれ阻害剤 T-02196 と抗酸化剤 BHT (dibutylhydroxytoluene) を用いた (図 3)。BHT 化合物は水への溶解度が低く (60 μ g/100ml)、そのため ITC による分子間相互作用解析において、アフィニティを再現性良く見積もることが困難であった。しかし、リボソームに BHT を溶解させることでアフィニティを安定して見積もることが可能であった。

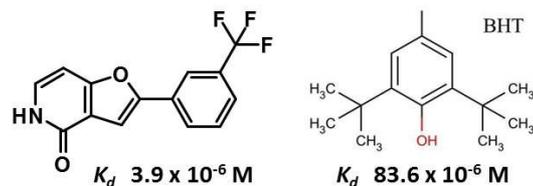


図 3 T-02196 (左) と BHT (右)

まず、従来法により Streptavidin-T-02196 複合体と FABP-BHT 複合体サンプルの作製を試みた。T-02196 または BHT 化合物の 5~10% DMSO 含有水溶液を Streptavidin または FABP と共に結晶化したところ、T-02196 由来の電子密度は僅かに確認できたものの、BHT 由来の電子密度は確認することができなかった。次に、凝固ゲル中で育成させた Streptavidin 結晶またはアポ型 FABP 結晶を用いて、浸漬法による難水溶性化合物との複合体結晶の作製を試みた。具体的には、20mM 化合物を溶かした 50%DMSO 含有水溶液中に、凝固ゲル中 FABP 結晶を 3 時間以上浸漬して作成した複合体結晶を用いて高分解能データ (1.0Å または 1.4Å 分解能、SPring-8 にて) を収集した。さらに、それらの回折データを用いて

構造解析を実施したところ、Streptavidin または FABP の活性部位に、はっきりと活性部位内に存在する化合物の電子密度を観察することに成功した(図4と5)。しかし、2時間未満の浸漬時間では、どちらの化合物においても電子密度を明確に観察することはできなかった。

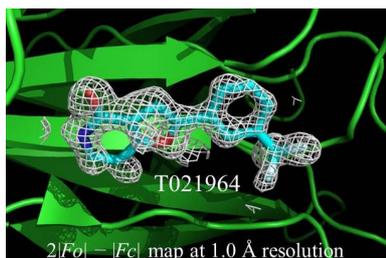


図4 活性部位に結合した阻害剤

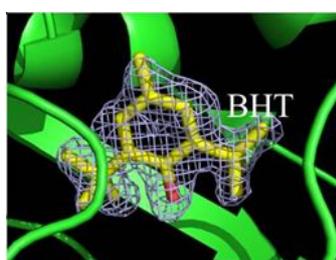


図5 FABP-BHT 複合体の結晶構造
2|Fo| - |Fc| map at 1.4Å resolution

(3) 脂質結合タンパク質 (FABP) の脂質認識の構造基盤の解明

はじめに、FABP と脂肪酸との複合体は、高濃度 FABP (10~20 mg/mL) に脂肪酸の粉末を添加する方法で行った。しかし、その方法では複合体を作製することはできなかった。実際に、結晶構造解析で FABP の活性部位に目的の脂肪酸の電子密度を観察することは困難であった。主な原因は、脂肪酸が難水溶性であるため、結晶化溶液に溶解できていないためであると考えられた。しかし、水系溶媒への脂質の溶解方法は、まだ十分に確立されていない。そのため、脂肪酸を溶解させるための溶媒として、DMSO がしばしば用いられる。高濃度 FABP に 10~20% DMSO に溶解させた 5~10 mM 脂肪酸を添加することで複合体の作製を試みたが、この方法でも成功しなかった。また、この方法では結晶自体を晶出させることが困難となった。主な原因は、脂肪酸がミセルを形成しタンパク質との複合体形成を阻害したためと考えられる。さらに、高濃度有機溶媒中では FABP サンプル自体に悪影響を及ぼしたと推察される。

これらの結果から、先で開発した固相ゲル中結晶の浸漬技術を FABP に適用した。その結果、FABP の活性部位に結合している飽和脂肪酸の活性構造を観察することは可能であった。しかし、飽和脂肪酸のアルキル鎖は、トレースすることはできたものの、今回の構造解析では十分に鮮明な原子レベルの電子密度を示さなかった。主な原因は、研究開発

項目 で検討した、難水溶性化合物に対する最適な浸漬条件(化合物濃度、浸漬時間、有機溶媒濃度など)は、脂質においては、まだ十分最適な条件ではなかった可能性が高い。さらに、脂質については、最適な浸漬条件を検討する前に、脂質の高濃度有機溶媒への最適な溶解方法を検討しておく必要があると考えられる。これらは今後の重要な課題としたい。

(4) まとめ

本技術によって、従来法では実現できなかった難水溶性化合物と標的タンパク質との複合体結晶を容易に作製できた。一方、脂質分子と標的タンパク質との複合体結晶の作製については、まだ検討すべき多くの課題を残す結果であった。しかし、凝固ゲル中結晶を用いた浸漬法は、従来、困難であった難水溶性リガンドの結合構造解明に向けて大きく道を開いた成果となっている。さらに、膨大な化合物ライブラリーから新薬候補化合物を探し出す全く新しい「創薬スクリーニング」への応用へ向けた第一歩になると期待される。

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15件)

S. Sugiyama, N. Shimizu, K. Kakinouchi, O. Hiraoka, H. Matsumura, H. Y. Yoshikawa, Y. Takahashi, M. Maruyama, M. Yoshimura, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, M. Murata and Y. Mori, Development of Protein Seed Crystals Reinforced by High-Strength Hydrogels, *CrystEngComm*, 査読有, 17, (2015), 8064-8071

T. Terai, M. Kohno, G. Boncompain, S. Sugiyama, N. Saito, R. Fujikake, T. Ueno, T. Komatsu, K. Hanaoka, T. Okabe, Y. Urano, F. Perez and T. Nagano, Artificial Ligands of Streptavidin (ALiS): Discovery, Characterization, and Application for Reversible Control of Intracellular Protein Transport, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 137, (2015), 10464-10467

M. Murata, S. Sugiyama, S. Matsuoka and N. Matsumori, Bioactive structure of membrane lipids and natural products elucidated by a chemistry-based Approach, *Chemical Record*, 15, (2015), 675-690

Y. Hayashi, M. Maruyama, M. Yoshimura, S. Okada, H. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, S. Murakami and Y. Mori, Spiral Growth Can Enhance the Both of Normal Growth Rate and Crystal Quality in Tetragonal Lysozyme Growth under a Forced Solution

Flow, *Cryst. Growth Des.*, 14, (2015), 4278–4284

D. Matsuoka, S. Sugiyama, M. Murata and S. Matsuoka, Molecular dynamics simulations of heart-type fatty acid-binding protein in apo and holo forms, and hydration structure analyses in the binding cavity, *J. Phys. Chem. B*, 119, (2015), 114–127

S. Matsuoka†, S. Sugiyama†, D. Matsuoka, M. Hirose, L. Sébas-tien, H. Ano, T. Hara, O. Ichihara, S. R. Kimura, S. Murakami, H. Ishida, E. Mizohata, T. Inoue and M. Murata, Water-mediated Recognition of Simple Alkyl Chains by heart-type fatty acid-binding protein, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, (2015), 1508–1511 (†These two authors contributed equally to this work.)

H. Y. Yoshikawa, R. Murai, H. Adachi, S. Sugiyama, M. Maruyama, Y. Takahashi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, H. Masuhara, and Y. Mori, Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding, *Chemical Society Reviews.*, 43, (2014), 2147–2158

〔学会発表〕(計 31 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 New Approach for Protein Crystallization by Mebiol Hydrogel with Thermoreversible Gelation Polymer, ICSG2013, 2013. 7. 30, Sapporo, Japan

杉山成, 固相ハイドロゲル中でのタンパク質の結晶化, 日本物理学会第 69 回年次大会シンポジウム, 2014. 3. 28, 東海大学湘南キャンパス

S. Sugiyama, T. Terai, H. Matsumura, M. Maruyama, Y. Takahashi, Hiroshi Yoshikawa, M. Yoshimura, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, T. Nagano, and Y. Mori, Hydrogel Protects Protein Crystals From Osmotic Shock, IUCr2014, 2014. 8. 7, Montreal, Canada

S. Sugiyama, Hydrogel Protects Protein Crystals From Osmotic Shock, ICCBM15, 2014. 9. 18, Hamburg, Germany

杉山成, ゲルを利用したタンパク質結晶化法, 第 52 回日本生物物理学会年会シンポジウム“次世代タンパク質結晶化手法”, 2014. 9. 25, 札幌

杉山成, 垣之内啓介, 松村浩由, 安達宏昭, 丸山美帆子, 高橋義典, 吉川洋史, 吉村政志, 高野和文, 村上聡, 井上豪, 村田道雄, 森勇介, 難水溶性化合物と標的蛋白質との複合体結晶作製へ向けた新規技術開発, 平成 26 年度日本結晶学会年会, 2014. 11. 3, 東京大学本郷キャ

ンパス

S. Sugiyama, A Novel Approach for Protein Crystallization with High-strength Hydrogels, 3CG2014, 2014. 11. 5, Phuket, Thailand

杉山成, 垣之内啓介, 石田英子, 松村浩由, 安達宏昭, 高野和文, 丸山美帆子, 吉川洋史, 高橋義典, 吉村政志, 村上聡, 井上豪, 村田道雄, 森勇介, 創薬加速に向けた難溶性低分子複合体結晶作製の革新的技術開発, 第 64 回高分子討論会, 2015. 9. 16, 東北大学川内キャンパス

杉山成, 垣之内啓介, 高野和文, 松村浩由, 安達宏昭, 丸山美帆子, 吉川洋史, 高橋義典, 吉村政志, 村上聡, 井上豪, 村田道雄, 森勇介, 創薬スクリーニングに向けた難溶性化合物との複合体結晶作製技術, 第 45 回結晶成長国内会議 (NCCG-45), 2015. 10. 20, 北海道大学 S. Sugiyama, K. Kakinouchi, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, M. Maruyama, Y. Takahashi, H. Yoshikawa, M. Yoshimura, S. Murakami, T. Inoue, M. Murata and Y. Mori, Growth of Protein Crystals in High-Strength Hydrogels, 3rd International Picobiology Institute Symposium, 2015. 11. 8, Hyogo, Japan

〔図書〕(計 2 件)

杉山成 他, 株式会社エヌ・ティー・エス出版, ゲルテクノロジーハンドブック, 2014, 811–817

杉山成 監修, 株式会社シーエムシー出版, タンパク質結晶の最前線, 2013, 総ページ数 288

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

(2) 連携研究者

松森 信明 (MATSUMORI NOBUAKI)
九州大学・理学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号: 50314357

(3) 連携研究者

寺井 琢也 (TERAI TAKUYA)
東京大学・薬学研究科(研究院)・助教
研究者番号: 00508145