

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440015

研究課題名(和文) タンパク質シェル構造体エンカプスリンの構造形成原理の解明

研究課題名(英文) Studies on protein-based microcompartment (encapsulin) from *Rhodococcus erythropolis* N771

研究代表者

野口 恵一 (Noguchi, Keiichi)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・准教授

研究者番号：00251588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Rhodococcus erythropolis N771由来エンカプスリンを対象に、ナノ構造体の構造形成、および、構造体内部へのタンパク質取込機構に関して基礎的知見を得ることを目的に研究を行った。エンカプスリン遺伝子の上流にコードされているペルオキシダーゼのC末端部の37アミノ酸残基を緑色蛍光タンパク質やルシフェラーゼのC末端に付加することにより、これら外来タンパク質をエンカプスリンに内包させることに成功した。また、立体構造解析に適したエンカプスリン単結晶を得ることに成功し、放射光を用いて分解能3.3 Åの回折データを収集した。データ解析により、60量体構造の形成を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：The encapsulin nanocompartment from *Rhodococcus erythropolis* N771 was expressed and purified in wild-type and C-terminally His-tagged forms. Negative-stained transmission electron microscopy observation showed that the encapsulin monomers were assembled as a spherical particle with a diameter of 28 nm. Heterogeneous guest proteins such as enhanced green fluorescence protein and firefly luciferase were packaged into the internal cavity of the encapsulin nanocompartment by fusing the C-terminal 37-amino-acid sequence of the *R. erythropolis* N771 DypB peroxidase to the C-terminus. Two kinds of crystallization conditions were found for the recombinant protein. Crystals obtained using one of two conditions diffracted to 3.3 Å resolution and the crystal system is trigonal, with unit-cell parameters of $a = 235.5$ Å and $\beta = 63.2^\circ$. A self-rotation function calculated using the collected data suggested presence of 2-, 3- and 5-fold axes in the asymmetric unit.

研究分野：構造生物学

キーワード：ナノ構造体 X線回折 結晶構造 ナノ粒子 タンパク質シェル構造体 ウィルス様粒子 認識配列

1. 研究開始当初の背景

細胞中での酵素反応を効率的に行うために、ある種の微生物はバクテリアルマイクロコンパートメント (BMC) と呼ばれる直径 100-150 nm 程度の構造体を形成する。このナノ構造体は、5~10 種程度のタンパク質から構成された外殻 (シェル) の内部に特定の反応に関与する酵素 (群) を内包したものであり、その代表例として、炭素固定を行う反応場として機能するカルボキシソームや、細胞毒性が高い代謝反応中間生成物を隔離しエタノールアミン、または、1,2-プロパンジオールの代謝を行うメタボロソームが挙げられる。

近年、好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来の機能未知タンパク質の構造学的研究により、BMC よりも小さなナノ構造体が発見された。エンカプスリンと命名されたこの構造体は、5 個のサブユニットにより形成された五角形構造が 12 個集合した直径 25 nm 程度のホモ 60 量体であり、エンカプスリン遺伝子のすぐ上流にコードされているペルオキシダーゼ、またはフェリチン様タンパク質を内包する。さらに、エンカプスリンと配列相同性の高い遺伝子を持つ他種微生物でも類似の構造体の形成が確認され、内包されるタンパク質の C 末端に存在する 40 残基程度のペプチドが、内包に関わるシグナル配列として機能していることが示された。

一方、ウィルスのカプシドという観点から構造研究が行われてきた超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来のウィルス様粒子構成タンパク質やバクテリオファージ HK97 カプシドタンパク質 gp5 は、それぞれ、直径 30 nm 程度のホモ 180 量体、直径 55 nm 程度のホモ 420 量体というエンカプスリンより大きな構造体を形成することが知られているが、これらのサブユニット構造はエンカプスリンに極めて類似している。従って、エンカプスリンサブユニットと同じファミリーに属するタンパク質はサイズ、内包する酵素、機能等の異なるナノ構造体を構成する可能性が予想されるが、関連した構造的知見は非常に限られており、その詳細に関してはほとんど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

最近、当研究室において、放線菌 *Rhodococcus erythropolis* N771 から *T. maritima* 由来エンカプスリンと相同性の高い遺伝子の単離、大腸菌を用いた組換え体としての発現、目的タンパク質 (分子量 30 kDa) の精製に成功した。精製物の電子顕微鏡観察を行ったところ、直径 25nm 程度の球状粒子の形成が確認され (図 1)、さらに、超遠心法と流動場分離多角度光散乱法により測定した構造体の分子量が約 1.8 MDa であったことから、観察された構造体は *T. maritima* 由来エンカプスリンと同様にホモ 60 量体を形成していることが示唆された。

エンカプスリンのサイズ、安定性、内包する酵素を制御することが可能となれば、マイクロリアクター、マイクロセンサー、ドラッグデリバリーキャリアー等としての活用が期待される。そこで本研究では、エンカプスリン構造体の形状、物性、及び内包酵素の選択性などについて検討を行い、構造形成や酵素取込機構に関する基礎的知見を得ることを目的として研究を行った。

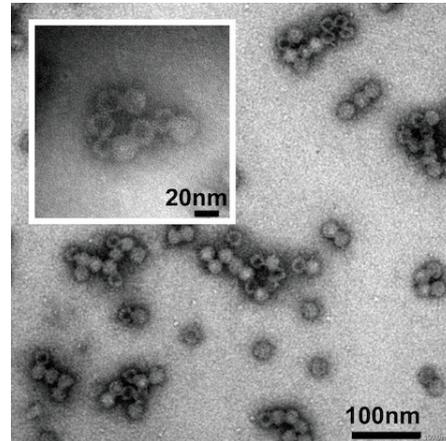


図 1 *Rhodococcus erythropolis* N771 由来エンカプスリンの透過電子顕微鏡観察像 (ネガティブ染色)。

3. 研究の方法

R. erythropolis N771 由来エンカプスリンについて、His-tag 配列を付加した大腸菌による組換え体の大量発現系は既に構築済みであったが、これに加え、タグを付加しない組換え体の発現系を新たに作製した。遺伝子操作、大腸菌の培養、タンパク質の発現、精製などには研究室に既設の設備を用いた。

T. maritima 由来エンカプスリンと配列類似性の高いタンパク質遺伝子の同一オペロン上流には、抗酸化酵素の遺伝子がコードされており、これらの酵素の C 末端に保存されている 40 残基程度の配列を認識することによって内部へのタンパク質の取り込みが行われていることが示唆されている。本研究では、*R. erythropolis* N771 由来エンカプスリン遺伝子の上流にコードされているペルオキシダーゼの C 末端部にタンパク質取り込みに関わる認識配列と推定できる 37 残基のアミノ酸配列の存在が確認できたため、この配列を付加した蛍光強化緑色蛍光タンパク質やルシフェラーゼの発現系を構築し、エンカプスリンとの共発現と精製により、エンカプスリンへの内包の可否について検討を行った。

エンカプスリンの詳細な立体構造情報を収集するために、エンカプスリンの結晶化と X 線回折データの収集を行った。結晶化実験には研究室に既設の設備を、結晶化に用いたエンカプスリン試料の確認や結晶の予備的な測定には、本学学術研究支援総合センターに既設の共同利用機器 (透過電子顕微鏡、質量分析装置、X 線回折装置) を使用した。構

造解析に必要な回折データ収集は高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 Photon Factory のタンパク質結晶用ビームライン BL-1A、BL-5A、BL-17A、NW12A を共同利用課題として利用した。回折データ処理、結晶構造解析に必要なソフトウェア等についても、研究室に既設のシステムを利用した。

4. 研究成果

当初、*R. erythropolis* N771由来エンカプスリンサブユニットを C 末端に His-tag 配列を付加した組換え体として発現させ、アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行っていた。しかし、再構成したエンカプスリンの分子量測定の結果、主要成分である分子量 1.8 MDa の構造体に加え、存在比は少ないがその 2 倍程度の分子量を持つ構造体の形成を示唆する結果が得られた。そこで本研究では、単一のシェル構造体のみを得るために、タグを付加しない組換え体の発現系を作製し、精製方法を確立した。

N 末端に Strep-tag 配列を、C 末端にエンカプスリン内部への取り込みに関わる認識配列と推定した 37 残基のアミノ酸配列を付加した蛍光強化型緑色蛍光タンパク質 (EGFP_{tags}) の発現系を構築し、His-tag 配列を付加した *R. erythropolis* N771 由来エンカプスリン (*Re encapsulin*_{his}) との共発現を行った。得たタンパク質を Ni-NTA アフィニティークラムで精製後、ゲルろ過カラムで分離した結果、*Re encapsulin*_{his} と共発現させた EGFP_{tags} は *Re encapsulin*_{his} と同時に溶出することがわかった (図 2 の C)。この溶出位置は、単独で発現させた *Re encapsulin*_{his} とほぼ同位置であり (図 2 の A)、他方、単独で発現後 Strep-Tactin カラムで精製した EGFP_{tags} の溶出位置とは異なっていた (図 2 の B)。N 末端に Strep-tag 配列、C 末端に推定認識配列を付加したルシフェラーゼ (Luc_{tags}) についても *Re encapsulin*_{his} との共発現、精製実験を行ったところ、同様な結果が得られた。以上のことから、EGFP_{tags}、および、Luc_{tags} は共発現により *Re encapsulin*_{his} と複合体を形成することが示された。

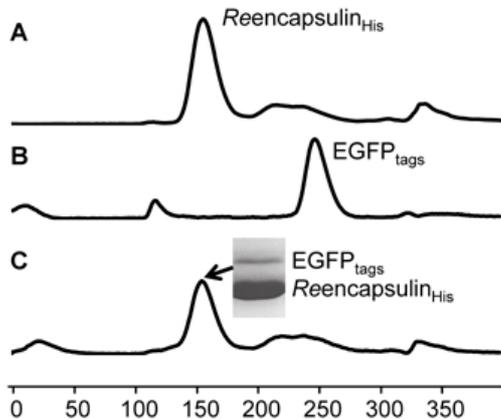


図 2 (A) *Re encapsulin*_{his}、(B) EGFP_{tags}、(C) *Re encapsulin*_{his} と EGFP_{tags} の共発現体のゲルろ過精製の結果。

外来タンパク質 EGFP_{tags}、および、Luc_{tags} が *Re encapsulin*_{his} に内包されているか、あるいは、*Re encapsulin*_{his} の外側と相互作用しているかについて検討した。*Re encapsulin*_{his} と EGFP_{tags}、あるいは、Luc_{tags} との共発現タンパク質を、それぞれ、Ni-NTA アフィニティークラムで精製後、Strep-Tactin カラムで精製したところ、EGFP_{tags} や Luc_{tags} は溶出画分には見られず (図 3 A、B のレーン 6)、素通り画分に *Re encapsulin*_{his} と共に確認された (図 3 A、B のレーン 5)。他方、単独発現させた EGFP_{tags} と Luc_{tags} を Strep-Tactin カラムにより精製を行ったところ、ともに溶出画分に確認できた (図 3 A、B のレーン 3)。 *Re encapsulin*_{his} と共発現させた際、両外来タンパクの Strep-tag 配列が Strep-Tactin カラムと相互作用しなかったことから、EGFP_{tags} や Luc_{tags} は *Re encapsulin*_{his} に内包されていることが示唆された。

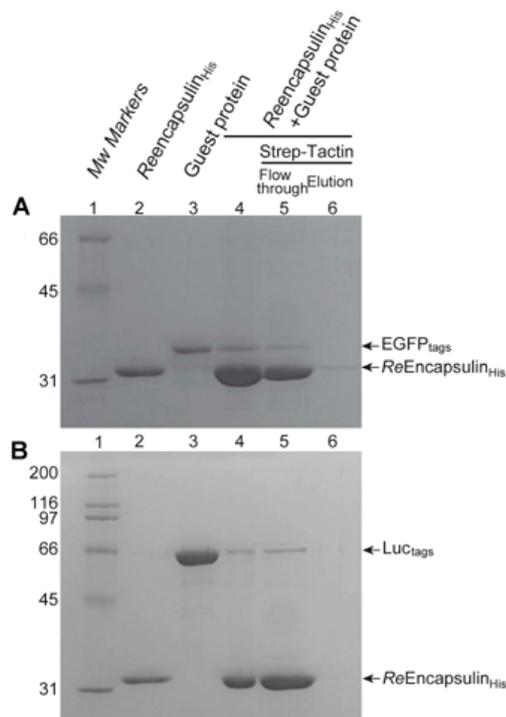


図 3 (A) *Re encapsulin*_{his} と EGFP_{tags}、(B) *Re encapsulin*_{his} と Luc_{tags} の共発現タンパク質の SDS 電気泳動の結果。レーン 1、分子量マーカー；レーン 2、Ni-NTA アフィニティークラムで精製した *Re encapsulin*_{his}；レーン 3、Strep-Tactin カラムで精製した外来タンパク質；レーン 4、Ni-NTA アフィニティークラムで精製した *Re encapsulin*_{his} と外来タンパク質の共発現タンパク質；レーン 5、Ni-NTA アフィニティークラムで精製後、Strep-Tactin カラムを素通りした *Re encapsulin*_{his} と外来タンパク質の共発現タンパク質；レーン 6、Ni-NTA アフィニティークラムで精製後、Strep-Tactin カラムで精製した *Re encapsulin*_{his} と外来タンパク質の共発現タンパク質。

透過電子顕微鏡観察、分子量測定によりナノ構造体の形成を確認後、精製したエンカプスリンを用いて結晶化実験を開始し、複数の結晶化条件を得ることに成功した。次に、結晶化条件の最適化を行うため、異なる条件で得た単結晶について放射光での回折実験を行った。その結果、X線回折測定に適した外形と大きさの結晶が成長する2種類の条件を得ることに成功した。得られた2種の結晶についてX線回折実験を実施したところ、三方晶、 $a = 235.5 \text{ \AA}$, $\alpha = 63.2^\circ$ の単位格子の結晶から、分解能 3.3 \AA の回折データを収集することができた。得られたデータをもとに自己回転関数の計算を行った結果、60量体構造を示唆する2回軸、3回軸、5回軸の存在を確認することができた(図4)。そこで、これまでに構造解析が行われている唯一のエンカプスリンである *T. maritime* 由来エンカプスリンのサブユニット構造をプローブに用いて分子置換法による構造解析を行った結果、ナノサイズの球状構造体の初期構造モデルが得られた。現在、モデルの改良を進めている。

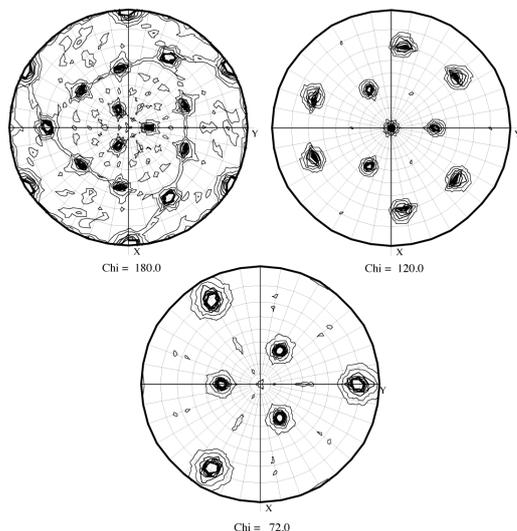


図4 自己回転関数の計算結果(2回軸、3回軸、5回軸の存在の確認)。

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1件)

- ① Akio Tamura, Yosuke Fukutani, Taku Takami, Motoko Fujii, Yuki Nakaguchi, Yoshihiko Murakami, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda and Masafumi Odaka, Packaging guest proteins into the encapsulin nanocompartment from *Rhodococcus erythropolis* N771, *Biotechnol. Bioeng.*, 査読有, **112**, 13-20 (2015), DOI: 10.1002/bit.25322.

[学会発表](計20件)

- ① 中口雄貴, 他, 好熱性シアノバクテリア由来 Carboxysome 外殻形成機構に関する研究, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月1日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)。
- ② 藤井基子, 他, 機能性ナノ粒子構築のための *Rhodococcus erythropolis* N771 株由来 Encapsulin への外来タンパク質の導入, 第15回日本蛋白質科学会年会, 2015年6月25日, あわぎんホール(徳島県・徳島市)。
- ③ 川北賢宏, 他, 好熱性シアノバクテリア由来 RuBisCO の形成機構の解明, 第15回日本蛋白質科学会年会, 2015年6月25日, あわぎんホール(徳島県・徳島市)。
- ④ 藤井基子, 他, *Rhodococcus erythropolis* N771 株由来 Encapsulinの構造と機能性ナノ粒子構築への利用, 第3回日本生物工学会 東日本支部コロキウム, 2015年3月3日, 東京工業大学すずかけホール(神奈川県・横浜市)。
- ⑤ 中口雄貴, 他, Hetero-Complex Formation among Carboxysome Shell Proteins from a Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, 7th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-7), 2014年11月30日, ゴールドコースト(オーストラリア)。
- ⑥ 中口雄貴, 他, 好熱性シアノバクテリア由来 Carboxysome 外殻関連タンパク質間の相互作用解析, 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月26日, ワークピア横浜・横浜産貿ホール マリネリア(神奈川県・横浜市)。
- ⑦ 養王田正文, 他, *Rhodococcus erythropolis* N771 由来 Encapsulin を用いた機能性ナノ粒子開発に関する研究, 平成26年度日本生化学会関東支部例会, 2014年6月24日, 茨城大学 理学部インタビュースタジオ(茨城県・水戸市)。
- ⑧ 田村彰朗, 他, *Rhodococcus erythropolis* N771 由来 Encapsulin を用いた機能性ナノ粒子開発に関する研究, 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。
- ⑨ 三木智寛, 他, 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1由来カルボキソームのサブユニット CcmL、CcmM の機能・構造解析, 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。
- ⑩ 山口慶, 他, 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1由来 Carboxysome シェルタンパク質の発現と構造解析, 第13回日本蛋白質科学会年会, 2013年6月12日, とりぎん文化会館(鳥取県・鳥取市)。
- ⑪ 田村彰朗, 他, *Rhodococcus erythropolis* N771 由来 Encapsulin を用いた機能性

ナノ粒子開発に関する研究, 第40回 生
体分子科学討論会, 2013年6月7日, 大阪
大学銀杏会館 (大阪府・吹田市) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 恵一 (NOGUCHI, Keiichi)
東京農工大学・学術研究支援総合センタ
ー・准教授
研究者番号 : 00251588

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

養王田 正文 (YOHDA, Masafumi)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号 : 50250105