

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：82118

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650026

研究課題名(和文)嫌気条件下で結晶化の成功率を高める手法の開発

研究課題名(英文) Anaerobic crystallization for protein crystallization

研究代表者

千田 美紀 (SENDA, Miki)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任助教

研究者番号：10707467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、嫌気条件下での結晶化の有効性を証明し、嫌気条件下でのタンパク質結晶化技術を多くのタンパク質の結晶化に適用した。それにより、通常の好気条件下での結晶化スクリーニングでは結晶が得られなかったタンパク質の結晶化を成功させることが可能になった。結晶化条件が未知のタンパク質のサンプルについて嫌気条件下での結晶化を試みた結果、好気条件下では結晶が得られなかったが、嫌気条件下では結晶を再現性良く得ることに成功し、2.0Å分解能の回折データを得るに至った。嫌気条件下での結晶化は、様々なタンパク質の結晶化に適用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It's essential to obtain crystals with high reproducibility for an X-ray protein crystallography. Anaerobic crystallization is useful to improve reproducibility of crystallization, because oxidation of protein solutions hampered the crystal formation. We've established typical procedures for the anaerobic crystallization and the anaerobic crystallization was tested for several proteins. Crystals were obtained with higher reproducibility under anaerobic condition than under aerobic condition. We believe that anaerobic crystallization is effective to crystallize a various kinds of proteins.

研究分野：Protein crystallography

キーワード：タンパク質の結晶化 嫌気条件下での結晶化 嫌気チャンバー 結晶化の再現性向上

### 1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析でタンパク質の結晶構造を決定するためには、回折実験に用いるタンパク質結晶を得ることが必須である。しかしながら、結晶化スクリーニングを行っても結晶が得られない、結晶が得られる条件が見つかって再現性が非常に悪く確実に結晶を得ることができないケースが多いことが問題になっており、結晶化スクリーニングの成功率や結晶化の再現性を高める方法の開発が待ち望まれていた。タンパク質が結晶化しない問題は、結晶化スクリーニングキットの種類や数を増やすだけでは解決できないことも多く、タンパク質側に問題があることも少なくない。タンパク質側の問題を解決し、結晶化を成功させるために、生物種の変更、変異体の利用、天然変性領域の除去などが試みられており、多くの成功例が報告されていた。また、我々は、結晶化ドロップレットの経時変化の観察結果から時間の経過とともに増えていく酸化膜に注目し、タンパク質の酸化やその結果生じるタンパク質の変性も結晶化を妨げる要因となり得ると考えていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、はじめに嫌気条件下での結晶化の有効性を証明し、その後、嫌気条件下でのタンパク質結晶化技術を誰でも簡単に試すことができる手法へと進化させ、多くのタンパク質の結晶化へ適用できるようにすることである。それにより、酸化されやすく通常の好気条件下での結晶化スクリーニングでは結晶化条件を見つけることができなかったタンパク質や、結晶化の再現性が悪く、安定して結晶を得ることが難しかったタンパク質の結晶化を成功させることが可能になる。

### 3. 研究の方法

(1) 好気条件下と嫌気条件下での結晶化でドロップレットの経時変化に違いが出るかを検証した。研究代表者らが研究を進めているいくつかのタンパク質について好気条件下と嫌気条件下で結晶化スクリーニングを行い、結晶化ドロップレットの経時変化の違いを我々が開発した immediate observation method により観察することで追跡した。嫌気条件下での結晶化には、タンパク質の結晶化のために整備してきた嫌気チャンバー (Hirasawa, anaerobic 'HARD') を用いた (図1)。チャンバーの中には、インキュベータと実体顕微鏡を備え、結晶化実験から結晶化プレートの保存、観察までの一連の操作を嫌気条件下で行えるようにした。結晶化スクリーニングキットは Wizard I または Crystal Screen I を用いた。これらは使用前に嫌気チャンバーに入れ、十分に脱酸素した。また、結晶化に使用するプレートやカバーガラスも同様に脱酸素した。



図1 結晶化用嫌気チャンバー

(2) 既に結晶が得られることが明らかになっているタンパク質を用いて好気条件下と嫌気条件下で結晶化スクリーニングを行い比較することにより、結晶が得られる条件の違いがあるかを検証した。スクリーニングキットは Wizard I または Crystal Screen I を用いた。また、既に結晶が得られることが明らかになっている条件付近で結晶化を行い、好気条件下と嫌気条件下で再現性に違いがあるかを検証した。

結晶化条件が既知のサンプル (ピロリ菌の CagA\_1-876) について Wizard I を用いて好気条件下と嫌気条件下で結晶化の初期スクリーニングを行い、結晶が得られる条件の違いがあるかを比較した。

D-アスパラギン酸酸化酵素 (DDO) の結晶化を既に結晶が得られることが明らかになっている結晶化条件周辺で行い、好気条件下と嫌気条件下における再現性の違いを比較した。

(3) 結晶化条件が未知のサンプルについて嫌気条件下での結晶化を試みた。このサンプルは、ピロリ菌の CagA と相互作用することが知られているタンパク質であり、好気条件下では非常に酸化されやすく大量の酸化膜を生じてしまうことが問題になっていた。そのため、嫌気条件下でタンパク質の酸化を抑制することにより結晶化を成功させることを試みた。

### 4. 研究成果

(1) 我々が研究を進めているピロリ菌の発がんタンパク質 CagA の EPIYA 配列含有ペプチドとその相互作用タンパク質との複合体について好気条件下と嫌気条件下で Crystal Screen I を用いて結晶化を行い、ドロップレットの経時変化の違いが生じるかを検証した結果、30秒後には大きな差は見られなかったが (図2)、1日後の観察で大きな違いがある条件があることが明らかとなった (図3)。

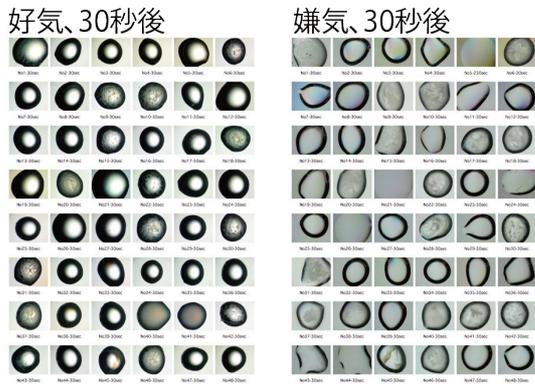


図 2 結晶化から 30 秒後のドロプレットの比較の結果、大きな差は見られなかった。

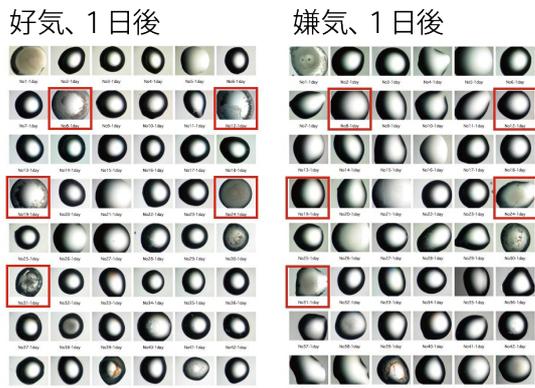


図 3 結晶化から 1 日後のドロプレットの比較、好気条件と嫌気条件で大きな違いがあったドロプレットを赤枠で示した。

大きな違いがあった条件は、Crystal Screen I の No.8, 12, 19, 24, 31 であったが、これらの条件の多くには、イソプロパノールが含まれていた。それらを抜き出して比較した結果を図 4 に示す。好気条件下ではタンパク質が変性して生じたと考えられる不可逆的な沈殿が見られるのに対して、嫌気条件下ではそのような沈殿が生じていないことが確認できた。この結果から、このサンプルではいくつかの条件（特にイソプロパノールを含む条件）について嫌気条件下の方がタンパク質を変性させにくい傾向があったため、嫌気条件下で結晶化を行うことにより結晶化成功のチャンスを広げることができるのではないかと考察した。

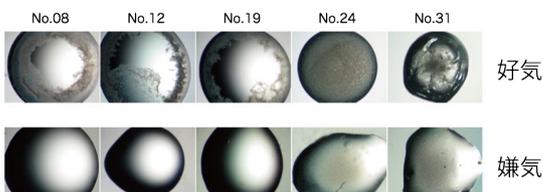


図 4 結晶化後 1 日経過したドロプレットの比較の結果、好気条件と嫌気条件で大きな違いがあった条件を抜き出して示した。

## (2) 結晶化条件が既知のサンプルの嫌気条件下での結晶化の効果

### ピロリ菌の発がんタンパク質 CagA

CagA の N 末側構造領域である 1-876 番の領域 (CagA\_1-876) の結晶化は、7-15% エタノール、50 mM Tris-HCl pH7.0-9.2 を結晶化溶液として用いることで得られることが我々の研究から明らかになっている (Hayashi *et al.*, 2012)。しかし、この結晶化条件で得られた CagA\_1-876 の結晶の性質が非常に悪かったため、エタノールを沈殿剤として含む条件以外の新しい結晶化条件を探索することは有益であると考えられた。そのため、嫌気条件下でスクリーニングを行い、新しい結晶化条件を探索することを試みた。Wizard I を用いて好気条件下と嫌気条件下で結晶化初期スクリーニングを行い、結晶が得られる条件を比較した結果、好気条件下では既存の結晶化条件であるエタノールを沈殿剤として含む条件 (Wizard I, No.42: 15% エタノール、100 mM トリス緩衝液) のみで結晶が得られたのに対し、嫌気条件下では PEG3000 やイソプロパノールなどを含むより幅広い条件で結晶が得られ、嫌気条件下では幅広い条件で結晶が得られる傾向があることが示された (図 5)。この結果から、嫌気条件下の方が結晶化条件を探索するために有利なケースがあると考察した。従って、好気条件下での結晶化スクリーニングで結晶が得られない場合であっても、嫌気条件下での結晶化スクリーニングを行うことで結晶が得られる条件が見つかる可能性があると考えられる。

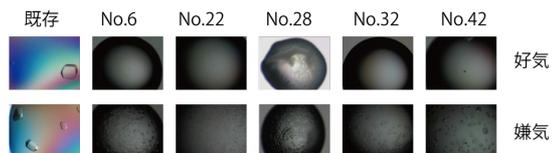


図 5 CagA の好気条件と嫌気条件での結晶化

### D-アスパラギン酸化酵素(DDO)

DDO の結晶は、5-10% PEG8000、100 mM リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウム、100 mM 酢酸バッファー pH 4.7 を結晶化溶液として用いることで得られることが我々の研究から明らかになっていた (Senda *et al.*, 2012)。しかしながら、再現性が悪く回折実験に向く 0.1mm 以上の大きい結晶がなかなか得られないことが問題となっていた。そこで、同じ精製ロットのサンプルを用いて好気条件下と嫌気条件下で既存の結晶化条件 (5-10% PEG8000、100 mM リン酸カリウム、100 mM 酢酸緩衝液 pH 4.7) で結晶化を行った結果、好気条件下では 7-9% PEG8000 を含む条件のみで結晶が得られたのに対し、嫌気条件下では 5-10% のすべての条件で結晶が得られ、しかも好気条件下よりも大型化する傾向があることが明らかになった (図 6)。

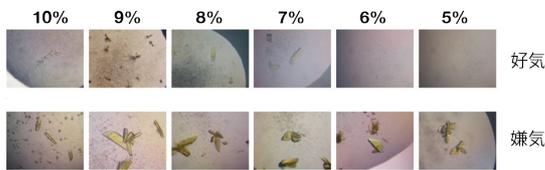


図 6 DDO の好気条件と嫌気条件での結晶化

### (3) 結晶化条件が未知のタンパク質への適用

結晶化条件が既知のタンパク質を用いたテストの結果から、嫌気条件下での結晶化が結晶化の成功率や再現性を高めるために有効であることが明らかとなった。そのため、結晶化条件が未知のタンパク質に対して嫌気条件下での結晶化を適用し、結晶化条件の探索を行った。

#### CagA の EPIYA 配列と結合するタンパク質の結晶化

このタンパク質は非常に酸化されやすく、好気条件下での結晶化を行った場合には数日で大量の酸化膜が生じてしまい、全く結晶が得られなかった。そこで嫌気条件下での結晶化スクリーニングを行った結果、沈殿剤として PEG4000 を含む条件で図 7 に示すような針状結晶が得られた。

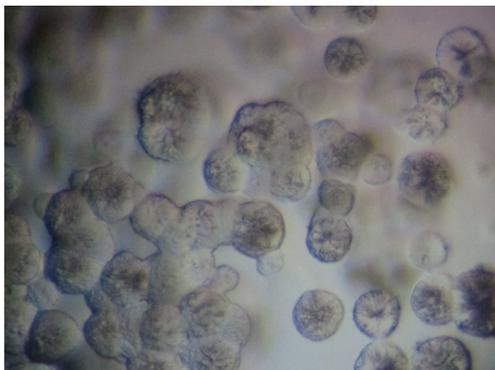


図 7 結晶化スクリーニングを嫌気条件下で行った結果得られた針状結晶

さらに、PEG4000 濃度を 35% から 30% まで 1% 刻みで変えた結晶化溶液を用意し、好気条件下と嫌気条件下で結晶化を行った結果、嫌気条件下では針状結晶の析出が再現したもの、好気条件下では再現性が悪く、数十ミクロン程度の針状結晶が一個析出するのみであった (図 8)。このタンパク質については、嫌気条件下での結晶化が、再現性を上げるために必須であると考えられた。

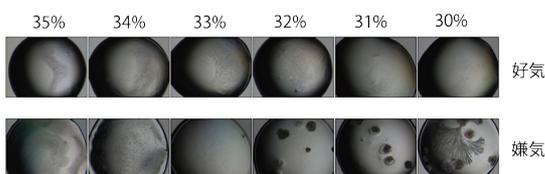


図 8 CagA の EPIYA 配列とその結合タンパク質複合体の結晶化ドロプレットを好気条件と嫌気条件で比較した結果

そのため、結晶化条件の最適化は嫌気条件下で行った。PEG 濃度やタンパク質濃度を変化させた結晶化条件の最適化の結果、シッティングドロップ蒸気拡散平衡法で結晶化を行うと 29.5-31% PEG4000 を含む結晶化溶液を用いた場合に、0.5mm 程度の長さの棒状結晶が得られることが明らかとなった (図 9)。



図 9 CagA の EPIYA 配列とその結合タンパク質複合体の結晶化条件最適化の結果得られた結晶

この条件では再現性良く、一度の結晶化で多くの結晶を得ることができた。そのため、回折データの分解能を向上させるためのクライオプロテクタントへのソーキング条件の探索を迅速に進めることができ、既に 2 Å 分解能の回折データを取得し (図 10)、結晶構造を決定するに至っている。このタンパク質の結晶構造決定は、嫌気条件下での結晶化なしでは非常に困難であったと考えている。

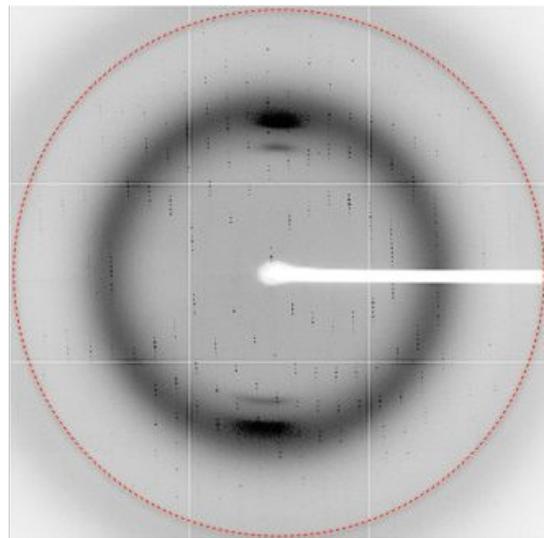


図 10 CagA の EPIYA 配列とその相互作用タンパク質の複合体結晶から得られた回折パターン

(4) 他のタンパク質への適用のために  
現在、嫌気チャンバーを他の研究者が様々なタンパク質の結晶化を行うために使用できるように、嫌気条件下での結晶化手順のマニュアル化を進めている。

## 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 5 件)

Senda, M., Hayashi, T., Hatakeyama, M., Takeuchi, K., Sasaki, A. & Senda, T. Use of multiple cryoprotectants to improve diffraction quality from protein crystals. *Crystal Growth & Design*, 査読有、16、2016、1565-1571、doi: 10.1021/acs.cgd.5b01692

Sumita, K., Lo, Y., Takeuchi, K., Senda, M., Kofuji, S., Ikeda, Y., Terakawa, J., Sasaki, M., Yoshino, H., Majd, N., Zheng, Y., Kahoud, E. R., Yokota, T., Emerling, B. M., Asara, J. M., Ishida, T., Locasale, J. W., Daikoku, T., Anastasiou, D., Senda & T., Sasaki, A. T. The Lipid Kinase PI5P4K $\beta$  Is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis. *Molecular Cell*、査読有、2016、61、1-12.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.011>

Sugiyama, Y., Senda, M., Matsuda, T. & Senda, T. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of acetophenone reductase from *Geotrichum candidum* NBRC 4597. *Acta Crystallogr. F*、査読有、2015、71、320-323. doi: 10.1107/S2053230X15002265.

Nishizawa, A., Harada, A., Senda, M., Tachihara, Y., Muramatsu, D., Kishigami, S., Mori, S., Sugiyama, K., Senda, T. & Kimura, S. Complete pyridine nucleotide-specificity conversion of an NADH-dependent ferredoxin reductase. *Biochem. J.*、査読有、2014、462、257-265. doi: 10.1042/BJ20140384.

Sugimoto, K., Senda, M., Kasai, D., Masai, E., Fukuda, M. & Senda, T. Molecular mechanism of strict substrate specificity of an extradiol dioxygenase, DesB, derived from *Sphingobium* sp. SYK-6. *PLoS One*. 査読有、2014、9 (3), e92249.

doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092249>

〔学会発表〕(計 4 件)

千田美紀、千田俊哉、嫌気条件下で結晶化の成功率を高める手法、2015年12月3日、BMB2015、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Miki Senda, Toshiya Senda, A comprehensive strategy to obtain high quality crystals. American Crystallographic Association (ACA) 2015、2015年7月29日、フィラデルフィア(米国)

千田美紀、千田俊哉、タンパク質結晶の質を効率良く改善するための結晶工学的処理の手法、第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月26日、あわぎんホール(徳島県・徳島市)

Miki Senda, Toshiya Senda, Anaerobic crystallization for protein crystallography. *23rd Congress of the IUCr*、2014年8月11日、モントリオール(カナダ)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

千田 美紀 (SENDA, Miki)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任助教

研究者番号：10707467