

## 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24年5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657028

研究課題名（和文） ヘテロ複合体の形成を制御・促進する汎用タグの開発

研究課題名（英文） Development of the general tags for formation of hetero-complex

## 研究代表者

姚 閔 (YAO MIN)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：40311518

## 研究成果の概要（和文）：

ヘテロ複合体の形成を制御・促進する汎用タグ HA-tag を開発するため、まず、タンパク質立体構造のデータベース PDB に登録された 3Å 分解能以上のタンパク質結晶構造から、*in silico* でタグの候補ペプチドを探索した。見つけたいくつかの候補ペプチド (Coiled-coil) と、転写因子 SarS (自己ダイマー) および ribosomal タンパク質 P1-P2 (ヘテロダイマー) の内、最終的に 2種類のヘテロダイマータグ 2HA-tag を選抜した。それらのタグをモデルタンパク質へ融合し、2HA-tag がヘテロ複合体の形成に及ぼす効果について検討している。

## 研究成果の概要（英文）：

In order to develop the general tags, HA-tags which can control and promote the formation of a hetero complex, we first searched candidate peptides of the tag from the protein crystal structures (more than the 3Å resolution) from PDB in silico. Finally two kinds of hetero-dimer tag (2HA-tag) were selected. We constructed model proteins with 2HA-tag fusion at the N or C terminal, and over-expressed them in *Escherichia coli*. The experiments of hetero-dimer formation are in progress.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学，構造生物化学

キーワード：X線結晶解析，蛋白質工学，遺伝子工学，タグ，ヘテロ複合体，多量体形

## 1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析は原子レベルで生命現象を解明するための圧倒的に優れた手法であるが、このためには、結晶化という困難なステップを必ず成功させなければならない。特に、多くのタンパク質-タンパク質やタンパク質-核酸のヘテロ複合体、それも相互作用の弱い複合体は、安定な状態が得られないため、結晶化は非常に困難である。

近年、研究代表者らは結晶化を促進するタグ (Rotational Symmetry-tag : RS-tag) を開発し、RS-tag により形成された多量体の構造を得ることに成功した。また、7残基の繰り返しからなるアミノ酸残基で形成される colied-coli 構造のうち、5, 7位の残基の種類によってヘテロ2量体の colied-coli が形成されることが報告されたことから、研究代表者は、RS-tag のアミノ酸残基を改変することによって、安定なヘテロ多量体の形成を制御・促進できる汎用のヘテロタグ (Hetero Assembly tag : HA-tag) を開発し、相互作用の弱いヘテロ複合体の構造解析を行うという着想に至った。

## 2. 研究の目的

タンパク質は、生体内で離合集散系を含む集合体を形成し、高度に制御された仕組みで動的に働く。その仕組みにおいては、各々のタンパク質から形成されるヘテロ複合体や同一酵素の異なる反応フォームから形成されたヘテロ複合体が同時に存在することがある。21世紀に入り、分子生物学は、個々の遺伝子とその産物であるタンパク質を基盤とした研究を超え、離合集散系における分子の集合体形成と高度に制御された働きの仕組みを解き明かす新局面を迎えている。その仕組みを解明する上において、様々なヘテロ複合体の形成を自由自在に制御することができるならば、分子生物学の様々な新たな展開を導き出すことができよう。

本研究は、バイオインフォマティクス、タ

ンパク質工学、遺伝子工学を駆使し、私達が開発した結晶化を促進するタグRS-tagからスタートし、そのアミノ酸残基を改変することによって、ヘテロ2または3量体形成を制御・促進できるタグHA-tagをデザインし、それらをターゲットタンパク質に融合したときのヘテロ複合体の形成に及ぼす効果を検討し、安定なヘテロ複合体を制御・促進するのに有効なタグを作製すること、さらに、作製したHA-tagを、安定なヘテロ複合体が得られないため、これまで結晶化に成功していないヘテロ複合体の結晶化・構造解析へ応用することを目的とする。

## 3. 研究の方法

天然な複合体形成能の弱いヘテロ複合体形成を促進できる擬似の2あるいは3回軸対称を持つヘテロタグ (HA-tag) を創製するのが本研究の目的である。そのためには、①バイオインフォマティクスとタンパク質工学の手法によって、PDB およびゲノムネットのデータベースから HA-tag の候補ペプチドを *In Silico* で探索し、設計する。設計した候補ペプチドを用いて、申請者らは既に見出したホモタグ RS-tag を改変して、HA-tag をデザインする。②遺伝子工学の手法によって HA-tag をモデルタンパク質へ融合して、大量調製する。③結合実験により HA-tag が天然な複合体形成能の弱いヘテロ複合体形成の促進に及ぼす効果を検討しながら、HA-tag およびターゲットタンパク質へ融合する際に必要なリンカの最適化を行う。④安定なヘテロ複合体を得られたら、結晶化・構造解析を行う。タンパク質モデルとして複合体の形成を可視化できる、分割した YFP の断片と CFP, および当研究室のターゲットタンパク質を使用する。

## 4. 研究成果

2010年度は、図1に示している方法を用いて、タンパク質立体構造のデータベース PDB

に登録された 3Å 分解能以上のタンパク質結晶構造から、タンパク質に人工的なヘテロ多量体形成を導入するためのタグ (HA-tag) の候補ペプチドの探索を行った。その結果、PDB に登録された約 6 万 5 千個の結晶構造から、ヘテロ 2 量体を形成する HA-tag の 5 種類の候補を見つけた。さらに、転写因子 SarS と ribosomal タンパク質 P1-P2 を含む合計 7 つの HA-tag 候補について、自由エネルギーの変化 (-ΔG) を計算し、2 種類の HA-tag を選抜し、実験へと進めた。構造解析されたタンパク質ヘテロ複合体のデータが少なかったため、*In silico* サーチ方法の開発には時間がかかった。融合タンパク質の大量調製やヘテロ複合体形成の検討までは辿り着けなかったが、簡単に様々なタンパク質を融合できるための HA-tag ベクターの作成に成功し、モデルタンパク質へ融合したサンプルの発現系構築を行った。

#### タグ探索の方針

- ◆コア構造 (コアドメイン) から独立した 20 残基以上の N、C 末端の断片 (タグドメイン)
- ◆その断片がローカルかあるいは結晶学的な 2 回転ヘテロ対称を形成している

#### アルゴリズム (Stepping Scan)

半径 R のプローブを用いてタンパク質の主鎖をスキャンして、N あるいは C 末端の独立領域を探索する。

#### 重要なパラメータ:

1. プローブ半径 R (R = 10 Å)
2. タグドメインのサイズ N (残基数) (N > 20)
3. タグとコアドメイン間の距離  $d_1$  ( $d_1 > 30$  Å)
4. 結晶中に対称操作による生じたタグドメイン間の距離  $d_2$  ( $d_2 < 15$  Å)

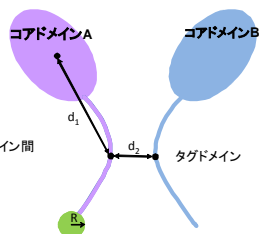


図 1. タグ探索方法

2011 年度は、前年度に、タンパク質立体構造のデータベース PDB に登録された 3Å 分解能以上の蛋白質結晶構造からヘテロ 2 量体を形成する 2HA-tag の候補を見つけたため、ヘテロ 2 量体を形成するタグの開発を先行させた。見つけたヘテロ 2 量体を形成する候補タグをそれぞれモデルタンパク質の N あるいは C 末端へ融合したサンプルの発現構築・精製およびヘテロ 2 量体形成に及ぼす効

果の検討を行ったところ、発現構築に難航した。ヘテロ 2 量体を形成するため、2HA-tag のペアを用いてそれぞれが融合したサンプルペアの両方を調製しなければならない。様々な条件を検討した結果、2HA-tag のペアで融合したサンプルペアの可溶化発現構築に成功した。現在、大量調製およびテロ 2 量体形成条件の検討を行っている。

#### 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 4 件)

- ① Aiping Zheng, Reo Yamamoto, Masaaki Sokabe, Isao Tanaka and Min Yao, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of eIF5BΔN and the eIF5BΔN-eIF1AΔN complex, *Acta Cryst.*, 査読有, F67, 730-733 (2011)  
DOI: 10.1107/S1744309111015910
- ② Jian Yu, Yong Zhou, Isao Tanaka and Min Yao, Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere, *Bioinformatics*, 査読有, 26, 46-52 (2010)  
DOI: 10.1093/bioinformatics/btp599
- ③ Nipawan Nuemket, Yoshikazu Tanaka, Kentaro Tsukamoto, Takao Tsuji, Keiji Nakamura, Shunji Kozaki, Min Yao and Isao Tanaka, Preliminary X-ray crystallographic study of the receptor-binding domain of the D/C mosaic neurotoxin from *Clostridium botulinum*, *Acta Cryst.*, 査読有, F66, 608-610 (2010)  
DOI: 10.1107/S1744309110012182
- ④ Daiki Ogata, Toshihiko Ooi, Takaaki Fujiwara, Seiichi Taguchi, Isao Tanaka and Min Yao, Crystallization and preliminary X-ray studies of azoreductases from

*Bacillus* sp. B29, *Acta Cryst.*, 査読有, F66,  
503-505 (2010)  
DOI: 10.1107/S1744309110007785

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

姚 閔 (YAO MIN)

北海道大学・大学院先端生命科学研究所・  
准教授

研究者番号：40311518

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし