

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651106

研究課題名（和文） バクテリアマイクロコンパートメントを用いた自己組織化タンパク質構造体の創製

研究課題名（英文） Creation of a self-organizing protein nano-structures using bacterial micro compartments

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

大腸菌由来エタノールアミン代謝マイクロコンパートメント（Eut-BMC）を構成する 5 つのシェルタンパク質を大腸菌で発現し、BMC 様の構造体の形成を確認した。好熱性シアノバクテリア由来カルボキシソームのシェルタンパク質の発現、結晶構造解析、相互作用解析を行った。Rhodococcus erythropolis N771 由来の Encapsulin と呼ばれるナノコンパートメントの発現と精製に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Formation of bacterial microcompartment like nano-particle was observed by expressing 5 different shell proteins from ethanolamin-utilizing microcompartment in Escherichia coli. Expression, purification, crystal structure determination and interaction study of shell proteins from carboxysome of a thermophilic cyanobacterium were performed. Expression and purification of encapsulin from Rhodococcus erythropolis N771 was performed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：バイオプロセス

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：バクテリアマイクロコンパートメント・ナノバイオテクノロジー・ナノ構造体・超分子構造

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、精密な機能的構造への自己組織化能を有することから、機能性ナノ構造体開発の材料として優れた特性を有している。しかし、立体構造の不安定性と新規な構造や機能のデザインが困難であるという問題があることから、タンパク質を用いた機能性ナノ構造体の開発は期待に反して進んでいない。これらの問題を解決し、他の材料や技術では開発不可能な複雑で機能性を有するタンパク質ナノ構造体を開発するためには、安定でデザイン性が高くかつ複雑な構造を自己組織化するタンパク質を選択することが

不可欠である。本研究では、バクテリアマイクロコンパートメント（BMC）に着目した。BMC は微生物細胞内に存在し、一辺が 100nm 程度の多面体のシェル構造であり、脂質二重膜をもたず、タンパク質のみで形成されている (Yeates TO, et al. (2008) Nat Rev Microbiol, 6, 681)。炭酸固定反応の場となる Carboxysome、エタノールアミンまたはプロパンジオール代謝 BMC (Eut-BMC, Pdu-BMC) が良く研究されている。最近、BMC の外殻を形成するシェルプロテインの X 線結晶構造が相次いで報告されており (Tanaka S, et al. (2009) Science, 327, 81 など)、3 または 6 量体として

特徴的な六角形構造を形成することがわかった。BMC は六角形構造をユニットとして構造形成され、サブユニットの組成と配置などで、BMC のサイズや構造が決まると考えられている。BMC は高い密閉性を有し、各ユニットに存在する穴を通して、基質と生成物などを選択的に透過すると考えられているが、詳細なメカニズムはわかっていない。申請者の研究室からも3名(うち2名は本申請の研究協力者)の学生と助教がカリフォルニア大学サンタバーバラ校の Sagermann 教授のもとに留学し、Eut-BMC のシェルタンパク質の結晶構造解析ならびに安定性の解析を行い、EutM, EutL の結晶構造を明らかにした (Sagermann M et al. (2009) Proc Natl Acad Sci USA, **106**, 8883)。しかし、BMC は精製が困難であり、再構成の成功例がないことから粒子を構成するサブユニットの組成も明らかにされていない。一方、Encapsulin とは単一のシェルタンパク質で構成される内部が空洞のナノ構造体であり、一部の微生物細胞内に形成されている。これまでに *Thermotoga maritima* や *Pyrococcus furiosus* 由来の Encapsulin の結晶構造が明らかにされており、それぞれホモ 60 量体、ホモ 180 量体として存在し、直径 20 および 30 nm のナノ構造体を形成することが明らかにされている。また、Encapsulin にはその上流にペルオキシダーゼ (Dyp) やフェリチン様タンパク質 (Flp) の配列がコードされている。それらのタンパク質はタンパク質配列の C 末端側にあるペプチドタグを介して Encapsulin の内部空洞に配置され、細胞内の有毒な物質を Encapsulin 内部に貯蔵または分解して代謝的に生じた有害物質から細胞を保護すると考えられている。BMC と比較して、小さいがナノ構造体の形成が比較的容易であり、ナノリアクターやバイオセンサーへの応用が期待されている。本研究では、Encapsulin も広い意味で BMC と考え、研究対象とすることにした。

2. 研究の目的

本研究課題では、BMC 及び Encapsulin を材料とし、これらの粒子の組成と全体構造、基質と生産物の選択的透過性、封入される酵素の導入機構を明らかにすることを研究目的とする。また、得られた情報をもとに外殻を構成するシェルタンパク質を利用した自己組織化能を有する機能性ナノ構造体を創製することを試みる。BMC はタンパク質が精密に自己組織化した粒子であることからサブマイクロメートルサイズの極めて魅力的なナノ構造体である。しかし、これまでの構造学的研究は電子顕微鏡による外形もしくは単一サブユニットからなる複合体の構造解析が大半であり、粒子そのものの生化学的解析は進んでいない。本研究の最大の特色は、

BMC を微生物から単離精製ならびに組換え体サブユニットから再構成することによりインタクトな粒子として調製し、ナノ構造体として応用するために必要な生化学的特性を明らかにすることである。本研究により、BMC を新規自己組織化粒子として利用するための基盤技術が確立されることが強く期待される。また、Encapsulin については、比較的構造がシンプルであることから、遺伝子組換えによるナノ構造体の構築が可能であると考え、その利用技術の開発を行う。

3. 研究の方法

BMC については、これまでの研究の実績と新規性を考慮し、大腸菌由来エタノールアミン代謝マイクロコンパートメント (Eut-BMC)、*Thiobacillus thioparus* TH111 と好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来カルボキシソームを研究対象とする。Eut-BMC については、シェルを構成するサブユニットを同時に発現して、コンパートメントの形成を調べる。カルボキシソームについては、シェルを構成するタンパク質の構造と機能及び相互作用の解析を行い、それらの情報を基盤にコンパートメント形成について検討する。

一方、Encapsulin については、結晶構造が明らかになっている既知の Encapsulin のアミノ酸配列を BLAST 検索したところ、*Rhodococcus erythropolis* PR4 株の BAH36698.1 遺伝子が配列の相同性を有することが分かった。また、PR4 株が *R. erythropolis* N771 株の近縁種であることから *R. erythropolis* N771 株にも Encapsulin が存在することが予測された。そこで本研究では *R. erythropolis* N771 株から Encapsulin 遺伝子を獲得し、大腸菌内での発現と構造解析などを行った。

4. 研究成果

大腸菌の Eut-BMC を構成する Eut-S, -M, -N, -L, -K の 5 つのシェルタンパク質を大腸菌で発現し、EutK に付加した His-tag を用いて Ni キレートアフィニティークロマトグラフィーで複合体を精製した。得られた複合体を TEM で観察したところ、1 辺が 100 nm 程度の BMC 様の構造体を確認できた。しかし、再現性などの問題から、その特性の解析には至っていない。*T. thioparus* TH111 のカルボキシソームについては、ゲノム配列の解析や PCR 増幅による遺伝子の探索を行ったが、遺伝子を得ることはできなかった。一般的に *Thiobacillus* 属細菌にはカルボキシソームが存在すると考えられているが、我々が研究対象としていた *T. thioparus* はカルボキシソームを持たないことが分かった。

T. elongatus BP-1 由来 Carboxysome の構成

因子である CcmL (TeCcmL)、CcmM (TeCcmM) の機能、構造解析を行った。TeCcmL および TeCcmM の遺伝子を pET-23b ベクターへ導入し、大腸菌で組み換え体として発現し、種々のクロマトグラフィーで精製した。TeCcmL はタンパク濃度 63 mg/mL、0.1 M Sodium acetate pH5.0、25% (v/v) MPD の条件下でハンギングドロップ法を用いて結晶化した。得られた結晶の反射データの測定したところ、分解能 1.49 Å のデータを得ることができた。Synecocystis PCC6308 由来 CcmL の構造を基に分子置換法により構造解析を行った。その結果、TeCcmL は Synecocystis PCC6308 由来 CcmL と同様に 5 角形構造をとっていた (Fig. 1)。表面電荷に違いがあったが、中心孔の電荷や構造は保存されていた (Fig. 2)。

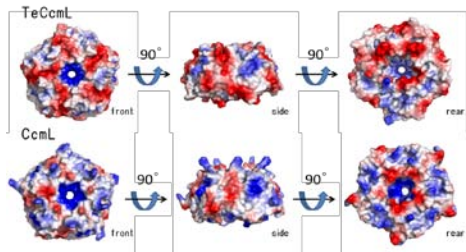


Fig. 1 TeCcmL と近縁種由来 CcmL の比較

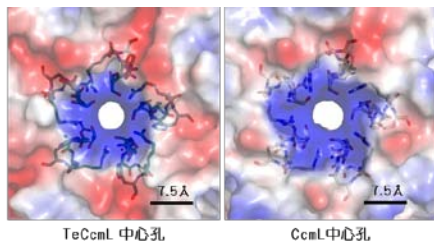


Fig. 2 中心孔の比較

また、CcmM は、遺伝子上に 2 つの翻訳開始点が存在し、長さの異なる CcmM(L)、CcmM(S) として翻訳されることが知られている。大腸菌による発現においても分子量の異なる 2 種類のタンパク質の発現が確認された。TeCcmM(S) の N 末端アミノ酸シーケンスの結果、TeCcmM(L) の 229 アミノ酸残基以降に相当していることがわかった。また TeCcmM(L) は N 末端側に γ -CA 様のドメインを持ち、 α -CA と同様に活性を示した。既知の Encapsulin のアミノ酸配列との BLAST 検索から、近縁種である *R. erythropolis* PR4 株の BAH36698.1 が Encapsulin をコードすることが分かった。そこで、BAH36698.1 からプライマーを設計し、*R. erythropolis* N771 株のゲノムを鋳型にした PCR を行った。得られた遺伝子と BAH36698.1 の相同性は 95.8% であり、アミノ酸配列では BAH36698.1 の 75 番目の Val が Ile、144 番目の Ile が Val になっ

ている以外は全く同じであった。また、発現確認を行った結果、目的の Encapsulin と思われるバンドを確認することができた。Ni-Chelating クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーによって発現タンパク質を SDS-PAGE で単一バンドになるまで精製した。得られたタンパク質を 1% リンタングステン酸で染色し、TEM で観察したところ、直径約 20 nm の球状粒子を観察することができた (Fig. 3)。このことから精製したタンパク

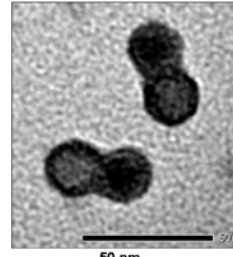


Fig.3 Encapsulin の TEM Image

質は Encapsulin として共通しているカプセル状の構造を形成していることが示唆された。

得られたタンパク質の分子量と粒子サイズを測定するために、FFF-MALS と沈殿平衡法による超遠心分析による解析を行った。その結果、

FFF-MALS からは、

分子量 1.8 MDa、RMS 半径 12 nm の粒子と分子量 4.1 MDa、RMS 半径 17 nm の複合体が少量存在することが確認された (Fig. 4)。同じタンパク質を沈殿平衡法で解析したところ、分子量 2.1 MDa の複合体とより高分子量の複合体とみられる肩ピークが観察された。

TEM 観察においても、粒径 20 nm 程度の球状粒子とその 2 量体と思われる構造が観察されることから、Encapsulin は分子量 1.8 MDa、RMS 半径 12 nm の球状構造をとり、一部が相互作用して 2 量体を形成していると結論した。

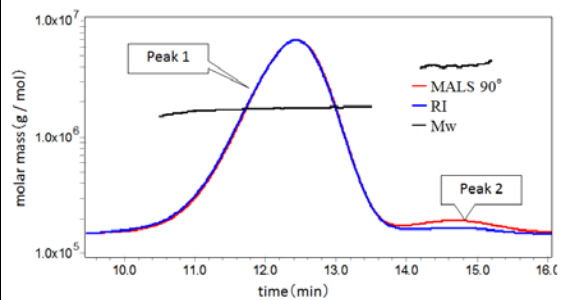


Fig.4 FFF-MALS による Encapsulin の分子量測定

以上の結果から、得られたタンパク質は目的の Encapsulin であり、塩基配列から計算した分子量が 29 kDa であることから、*T. maritima* 由来 Encapsulin と同様にホモ 60 量体を形成し、直径約 20 nm の球状粒子をとると考えられる。この粒子の表面には多数の His タグが露出していることから、様々なタンパク質や酵素のキャリアーとして利用できる可能性がある。

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)

[学会発表] (計 15 件)

(1)山口慶、瀧川拓哉、三木智寛、山中保明、福谷洋介、尾高雅文、養王田正文、野口恵一：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 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場

(2) 田村彰郎、福谷洋介、有坂文雄、野口恵一、養王田正文、尾高雅文：*Rhodococcus erythropolis* N771 由来 Encapsulin の発現と構造解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日 福岡国際会議場

(3) 田村 彰朗、福谷 洋介、有坂 文雄、野口 恵一、養王田 正文、尾高 雅文：*Rhodococcus erythropolis* N771 由来 Encapsulin の発現と構造解析、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 26 日、神戸国際会議場

(4) 三木 智寛、山口 慶、野口 恵一、尾高 雅文、養王田 正文：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 CcmI、CcmM、CcmN の発現と機能解析、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 26 日、神戸国際会議場

(5) 山口慶、竹野谷美穂子、野口恵一、尾高雅文、養王田正文：エタノールアミン代謝コンパートメントの発現と解析、酵素工学研究会第 68 回講演会、2012 年 10 月 5 日、東京大学山上会館

(6) 三木智寛、山口慶、山中保明、野口恵一、養王田正文、尾高雅文：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 CcmI、CcmM、CcmN の発現と機能解析、酵素工学研究会第 68 回講演会、2012 年 10 月 5 日 東京大学山上会館

(7)田村彰朗、福谷洋介、有坂友雄、野口恵一、養王田正文、尾高雅文：*Rhodococcus erythropolis* N771 由来 Encapsulin の発現と構造解析、酵素工学研究会第 68 回講演会、2012 年 10 月 5 日、東京大学山上会館

(8) 山口慶、竹野谷美穂子、野口恵一、尾高雅文、養王田正文：エタノールアミン代謝バクテリアルマイクロコンパートメントシェルタンパク質の発現と解析、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 21 日、名古屋国際会議場

(9) 竹野谷美穂子、養王田正文、Nikolakakis Kiel、Sagermann Martin：*Escherichia coli* 由来 Ethanolamine utilizing microcompartment の Shell protein EutM の結晶構造解析、第 63 回日

本生物工学会大会、2011 年 9 月 27 日、東京農工大学小金井キャンパス

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~yohda/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：20224248

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