

令和元年6月3日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07264

研究課題名(和文) ナノ構造体内部への選択的タンパク質取り込み機構の解明

研究課題名(英文) Study on the encapsulation mechanism of guest proteins into bacterial nanocompartment

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が形成するナノ構造体エンカプスリンへの外来タンパク質の内包機構について明らかにするために、*Rhodococcus erythropolis* N771由来エンカプスリンの分解能3.3Åの結晶構造を決定した。*Thermotoga maritima*由来エンカプスリンの構造研究で構造体に内包するタンパク質に付加されたターゲット配列との相互作用部位であると推定された部位の立体構造は*R. erythropolis*由来エンカプスリンでもよく保存されており、この部位のF27、K28、R34に変異を導入すると内包効率が低下したことからこれらのアミノ酸がターゲット配列と相互作用していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により60量体エンカプスリンの結晶構造としては2例目の構造を明らかにすることに成功し、外来タンパク質の内包に関わる相互作用部位を推定することができた。この結果は、今後のエンカプスリンの研究にとって必須の構造情報であり、この成果をもとに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としてのエンカプスリンの応用研究が加速されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to provide insight into the encapsulation mechanism of guest proteins into the internal cavity of the bacterial nanocompartment, the crystal structure of encapsulin from *Rhodococcus erythropolis* N771 was determined at 3.3 Å resolution by an X-ray diffraction method. The structure of estimated recognition site in *Rhodococcus erythropolis* N771 encapsulin subunit is quite similar to that of *Thermotoga maritima*. Since the mutations of Phe27, Lys28 and Arg34 in this site results in the significant reduction of encapsulation, it was suggested that these amino acids were interacted with the target sequence fused to the C-terminus of the guest protein.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質シェル構造体 ナノ構造体 エンカプスリン 結晶構造 ターゲット配列 認識部位

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

酵素や基質の濃度を高め、特定の反応や一連した反応を効率的に行うために、全ての生命体は細胞内の区画（コンパートメント）化を行っている。真核生物のコンパートメントは、核、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、リソソームといった脂質膜で囲まれた細胞内小器官であり、一方、ある種の微生物はタンパク質のサブユニットのみから構成された小さなコンパートメントを有することが知られている。その代表例として、一部の微生物がその細胞内に形成するバクテリアマイクロコンパートメント（BMC）が挙げられる。BMCは、5~10種程度のタンパク質から構成された粒径150-200 nm程度の外殻の内部に特定の代謝反応に関与する酵素（群）を内包したものであり、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等が知られている [T. O. Yeates, *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 681, (2008)]。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よりも小さなコンパートメントが発見された [M. Sutter *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, **15**, 939 (2008)]。エンカプスリンと命名されたこのコンパートメントは、一種類のタンパク質から構成された粒径25 nm程度の外殻構造（ホモ60量体）の内部に活性酸素の働きを抑制するペルオキシダーゼや鉄貯蔵に関わるフェリチン様タンパク質といったタンパク質を内包したものであり、原核生物の生存に重要や役割を果たすと考えられている。最近、エンカプスリン様遺伝子の探索と系統樹解析により、放線菌、プロテオバクテリア、シアノバクテリアなど原核生物の1-3.5%程度がエンカプスリンを有すると推定され、外殻を形成するタンパク質が4種に分類されること、少なくとも9種類の内包タンパク質が存在することなどが明らかにされている [T. W. Giessen & P. A. Silver, *Nat. Microbiol.*, **2**, 17029 (2017)]。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、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と大腸菌を用いた組換え体としての発現に成功し、精製したタンパク質が粒径25nm程度の構造体を形成すること、および、超遠心法で評価した構造体の分子量から、獲得した構造体が *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を強く示唆する結果を得た。さらに、内包タンパク質の種類や基質のシェル透過性などを制御することにより、酵素を安定に保持したマイクロリアクターやマイクロセンサー、あるいは、ドラッグデリバリーキャリアーとしての活用が期待できると考え、*R. erythropolis* N771 由来エンカプスリンの安定性や外来タンパク質の内包制御等に関して研究を進めてきた。内包されるタンパク質は外殻タンパク質遺伝子のすぐ上流にコードされており、エンカプスリンが形成される際に内包タンパク質のC末端に存在するターゲット配列が外殻タンパク質に認識されると考えられてきたことから、*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38アミノ酸残基を内包に関わるターゲット配列と推定し、この配列を付加することで蛍光強化緑色蛍光タンパク質やルシフェラーゼなど外来タンパク質が内包可能なことを明らかにした [A. Tamura, *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 13 (2015)]。しかしながら、内包した外来タンパク質のサイズを考慮すると内包の割合は高いものではなく、タンパク質を安定、かつ効率的に内包するためには、外来タンパク質に応じてターゲット配列の種類、長さ、位置などを改良する必要があることが予想された。そこで本研究では、適切な分子設計に関する基礎的な知見を得ることを目的に、内包に関わるターゲット配列の必須部位と外殻タンパク質内のターゲット配列結合部位の探索を行った。

3. 研究の方法

内包に必須となるターゲット配列の部位を探索するため、*R. erythropolis* N771 由来エンカプスリン（ReEnc）への外来タンパク質の内包に必要と推定したターゲット配列の一部を削除した複数種類の外来タンパク質変異体を作製した。ReEnc との内包の可否や効率の検討には、これまでに確立している蛍光強化緑色蛍光タンパク質（EGFP）との共発現系を用いた。また、エンカプスリン内部に存在するターゲット配列認識部位について検討するために、ReEnc の結晶化とX線結晶構造解析を行った。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 を共同利用課題として利用した。

4. 研究成果

ReEnc のターゲット配列のC末端側から6-14残基に相当するGSLGIGSLK配列は、他種のエンカプスリンやエンカプスリンと推定されている遺伝子の上流に広く保存されていた。そこでこの保存部位に注目し、その前後を削除したターゲット配列を付加したEGFP変異体とReEncを共発現させて精製し、SDS-PAGEと蛍光測定により内包の可否を確認した。その結果、ターゲット配列のC末端から5残基目までを削除した変異体の内包効率に変化はなかったが、6残基以上を削除した変異体については内包を確認できなくなった。他方、ターゲット配列のN末端から19残基目まで（C末端から20残基目に相当）を削除したEGFP変異体についてはエンカプスリンへの内包を確認できたが、それ以上削除すると内包効率が大幅に低下した。以上のことからターゲット配列の保存領域が内包タンパク質の認識に関与することが示唆された。

大腸菌組換え体として発現、精製した *ReEnc* (264 アミノ酸残基) を用いて結晶化を行ったところ、格子定数の異なる三種類の結晶型が得られた。この中で六方晶に属する結晶について、X線回折測定を行い分解能 3.3 Å の回折データを収集した (空間群 $H32$, $a = b = 246.06$, $c = 561.52$ Å)。自己回転関数の計算を行った結果、60 サブユニットで構成されたエンカプスリンの特徴を示す 15 本の 2 回軸、10 本の 3 回軸、6 本の 5 回軸対称の存在が確認された。そこで、PHENIX software suite を用いて、60 量体の結晶構造が報告されている *Thermotoga maritima* 由来エンカプスリン (*TmEnc*) のサブユニット構造をプローブに分子置換法により初期位相の決定を行った。非結晶学的対称を用いた平均化により位相改良を行った後、構造精密化を行い、 $R = 0.241$, $R_{\text{free}} = 0.255$ のモデルを得ることに成功した。

構造解析の結果、*ReEnc* は *TmEnc* と類似した 60 量体構造を形成しており、構造体の外径は約 230 Å、内部空洞の直径は約 185 Å であることがわかった (Fig. 1)。両サブユニットの構造を比較すると *TmEnc* の解析でターゲット配列の相互作用部位と推定された部分の構造はよく保存されていたが、ヘリックスループ-ヘリックス構造を形成している部位に違いが見られた (Fig. 2)。サブユニットの構造に違いが見られた部位はエンカプスリン全体構造中では 5 回軸付近の構造を形成しており (Fig. 1a)、*TmEnc* では 5 回軸周りに穴が観測されたが、*ReEnc* ではこの穴は閉じられていた (Fig. 3)。したがって、ヘリックスループ-ヘリックス部位の構造の違いは、ナノ構造体の 5 回軸周りに形成される穴の開閉に関連している可能性が示唆された。*ReEnc* サブユニット内のターゲット配列認識部位を同定するために、構造解析により *TmEnc* の立体構造とよく類似していた部位のアミノ酸残基 (Fig. 2b) をアラニンに変えた部位特異的変異体を作製し、全長のターゲット配列を付加した EGFP と共発現・精製し、内包の可否を確認した。その結果、F27A, K28A, R34A 変異体について内包効率の低下が見られたことから、この部位がターゲット配列と相互作用していることが示唆された。

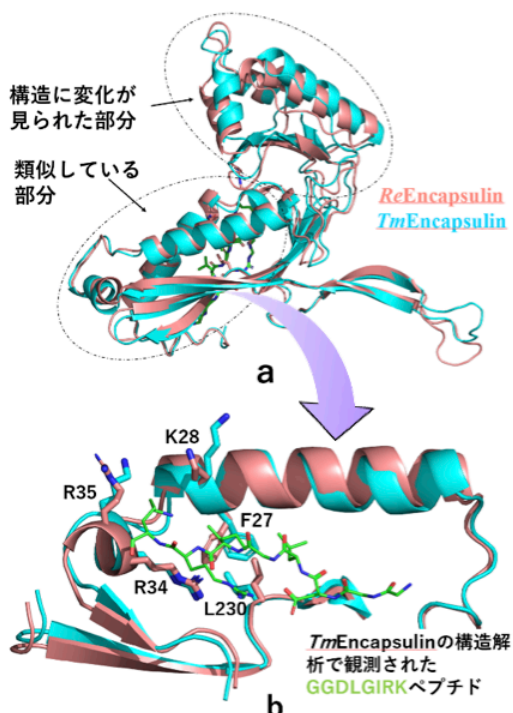


Fig. 2. (a) *ReEnc* と *TmEnc* のサブユニットの比較と (b) 変異を導入したアミノ酸残基。

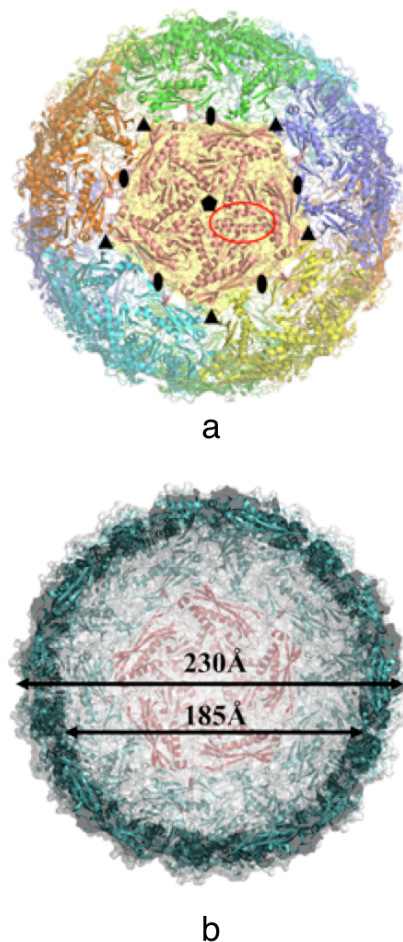


Fig. 1. (a) *ReEnc* の全体構造 (赤丸は *TmEnc* の構造と違いがある部分) と (b) *ReEnc* の断面

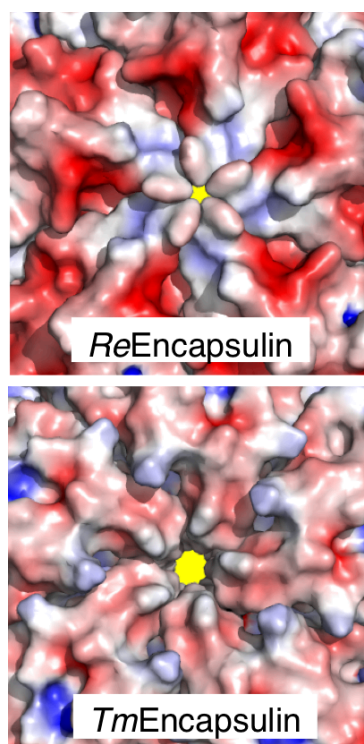


Fig. 3. エンカプスリンの 5 回軸付近の構造比較。

本研究により 60 量体エンカプスリンの結晶構造としては 2 例目の構造を明らかにすることに成功し、外来タンパクの内包に関わるターゲット配列とエンカプスリン内部の相互作用部位を推定することができた。この結果は、今後のエンカプスリンの研究にとって必須の構造情報であり、この成果をもとに应用研究が加速されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Takayuki Aihara, Toshiya Ito, Yasuaki Yamanaka, Keiichi Noguchi, Masafumi Odaka, Masae Sekine, Hiroshi Homma and Masafumi Yohda, Structural and functional characterization of aspartate racemase from the acidothermophilic archaeon *Picrophilus torridus*, *Extremophiles*, 査読有, **20**, 385-393 (2016), DOI: 10.1007/s00792-016-0829-7.
- ② Kazuaki Hakamada, Hirokazu Watanabe, Ryuji Kawano, Keiichi Noguchi and Masafumi Yohda, Expression and characterization of the *Plasmodium* translocon of the exported proteins component EXP2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, **482**, 700-705 (2017), DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.097.

〔学会発表〕 (計 12 件)

- ① 櫻井菜摘, 他, *Rhodococcus erythropolis* N771 株由来エンカプスリンの結晶構造解析, 日本結晶学会年会平成 30 年度年会, 2018 年 11 月 10 日, 東京工業大学大岡山キャンパス (東京都・目黒区) .
- ② 金丸宏輔, 他, *Rhodococcus erythropolis* N771 株由来ナノ構造体エンカプスリンへの外来タンパク質内包機構の解明, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018 年 6 月 28 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市) .
- ③ 金丸宏輔, 他, *Rhodococcus erythropolis* N771 株由来エンカプスリン (Re エンカプスリン) のタンパク質内包機構の解明, 第 6 回日本生物工学会東日本支部コロキウム, 2018 年 3 月 2 日, 筑波大学東京キャンパス文京校舎 (東京都・文京区) .
- ④ 金丸宏輔, 他, *Rhodococcus erythropolis* N771 株由来エンカプスリンナノ構造体への外来タンパク質の導入に必要なシグナル配列の探索, ConBio2017: 2017 年度 生命化学系学会合同年次大会 (第 40 回 日本分子生物学会年会・第 90 回 日本生化学会大会), 2017 年 12 月 7 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市) .
- ⑤ 藤井基子, 他, 機能性ナノ粒子構築のための *Rhodococcus erythropolis* N771 株由来エンカプスリンへの外来タンパク質の導入, 第 89 回 日本生化学会大会 in 仙台, 2016 年 9 月 26 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市) .
- ⑥ 木村真優, 他, オキシステロール結合タンパク質 (OSBP) の発現及び OSW-1 との相互作用解析, 第 89 回 日本生化学会大会 in 仙台, 2016 年 9 月 26 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市) .
- ⑦ 袴田一晃, 他, 熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 由来 PTEX の発現及び人工膜を利用した機能解析, 第 89 回 日本生化学会大会 in 仙台, 2016 年 9 月 26 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市) .

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 養王田 正文

ローマ字氏名: (YOHDA, masafumi)

研究協力者氏名: 福谷 洋介

ローマ字氏名: (FUKUTANI, yosuke)

研究協力者氏名: 袴田 一晃

ローマ字氏名: (HAKAMADA, kazuaki)

研究協力者氏名: 藤井 基子

ローマ字氏名: (FUJII, motoko)

研究協力者氏名: 金丸 宏輔

ローマ字氏名: (KANAMARU, kosuke)

研究協力者氏名: 櫻井 菜摘

ローマ字氏名: (SAKURAI, natsumi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。