

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02519

研究課題名(和文) 巨大な内部空間を持つ蛋白質会合体を用いた電子顕微鏡解析用包摂材料の開発

研究課題名(英文) Development of material for electron microscopy analysis using protein complex with huge internal space

研究代表者

田中 良和 (Tanaka, Yoshikazu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：20374225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：種々のリンカーを介してゲストタンパク質をヘモシアニン内部に結合させることができた。また、リンカーの違いにより、ゲストの結合がホストの10量体構造の維持に及ぼす影響が異なることがわかった。これは、ゲストがホスト内部に結合する強さに起因することが示唆された。電子顕微鏡観察からも、条件を整備することで、内部にゲストを包摂したまま安定な10量体構造を維持できることがわかった。金ナノ粒子を用いた評価からは、ゲストの包摂率を向上させることの重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

著しい発展を遂げているクライオ電顕単粒子解析であるが、100 kDa以下の小さな蛋白質や形状に際立った特徴のない蛋白質の解析は依然として難しく、あらゆる蛋白質の構造を容易に決定できる手法の開発を望む声は大きい。ヘモシアニンをゲストに用い、その開発を目指した本研究で得られた知見、すなわち、ホストの会合構造がゲストを結合させるリンカーの種類により異なることや、ゲストの包摂率を向上させることの重要性が、今後の技術開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Method to encapsulate the guest protein inside the hemocyanin via various linkers was developed. The effect of guest binding on the decameric structure of the host differed depending on the linker. This was suggested to be due to the strength of the binding of the guest inside the host. Electron microscopic observation also showed that by improving the conditions, it was possible to maintain a stable decameric structure with the guest encapsulated inside. Evaluation using gold nanoparticles suggested the importance of improving the encapsulation ratio.

研究分野：タンパク質立体構造解析

キーワード：ヘモシアニン 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

これまで蛋白質の立体構造を決定する様々な方法が開発されてきたが、その中でクライオ電顕単粒子解析は、近年、著しい発展を遂げ注目を集めている。クライオ電顕解析では、顕微鏡写真から数万~数十万個もの蛋白質をピックアップし、それらから 3 次元構造を再構築するため、巨大で特徴的な形状の分子ほど容易に解析できる。一方で 100 kDa 以下の小さな蛋白質や形状に際立った特徴のない蛋白質は顕微鏡写真のノイズに埋もれやすく、粒子をピックアップするのが難しいため、構造解析の難易度が高くなる。これらの背景を考えると、小さな蛋白質でも容易にピックアップして解析できる手法が開発できれば、クライオ電顕解析によりあらゆる蛋白質の構造を高分解能で決定できるようになると期待される。

申請者は、総分子量 4MDa の巨大な 10 量体の蛋白質会合体 ヘモシアニンの立体構造をクライオ電顕と X 線結晶構造解析の両方の手法で決定し、ヘモシアニンが内部に直径約 110 Å の広大な空隙を持つ 5 回対称な円筒型の巨大蛋白質会合体であることを明らかにした (Structure (2015)、J. Struct. Biol. (2015))。ヘモシアニンは筒状の外壁領域と 5 つの内部ドメインから構成されるが、内部空間は分子量 750 kDa の蛋白質の体積に相当し、一般的な蛋白質ならば十分に包摂できる。その上、ヘモシアニンには反応性の SH 基を持つシステイン残基が内部ドメインにサブユニットあたり 1 つだけ (10 量体に 10 個) 存在する。申請者は、これらの特徴を生かし、ヘモシアニンの空隙中にシステイン残基を介して蛋白質を部位特異的に包摂させる技術を開発した。この、ヘモシアニンへの蛋白質包摂技術 (特開 2017-214339) をクライオ電顕解析に応用すれば、X 線結晶構造解析よりも容易に包摂したゲスト蛋白質の構造を決定できると考えられる。さらに、そのままではノイズに埋もれやすい小さな蛋白質でも、ヘモシアニン中に包摂させ、その特徴的な円筒構造をピックアップすれば、その内部にはゲスト蛋白質が含まれているため、小さな蛋白質のピックアップが難しいというクライオ電顕の抱える課題への解決策にもなり得る。

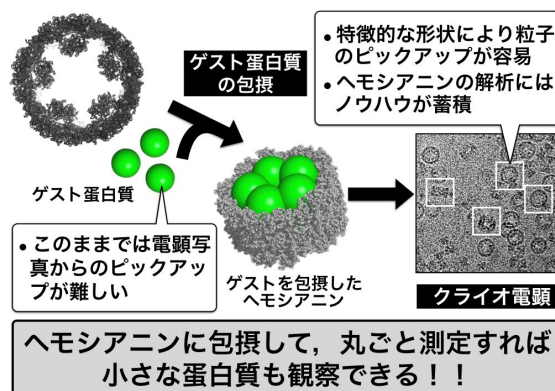


図 1 本研究の概要

2. 研究の目的

本研究では、ヘモシアニンの持つ分子包摂材料としての 3 つの優れた性質を利用し ((1) 蛋白質を包摂でき、(2) 特徴的な円筒構造のためピックアップが容易で、(3) 解析のノウハウが蓄積されていること) ヘモシアニンの内部空間に目的蛋白質を包摂させて丸ごと構造解析するクライオ電顕解析の手法を開発することを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、活スルメイカ (Todarodes pacificus) の外套膜を切開し、リンパ管から注射器を用いて採取した血リンパ液を実験に用いた。超遠心分離機 (HITACHI, CS 150FNX) を用いてスルメイカ血リンパ 400 μ l を 40,000 \times g, 6 h, 4 $^{\circ}$ C で超遠心分離した後、上清を除去し、沈殿に 100 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 200 mM CaCl₂ を含む buffer を添加し、4 $^{\circ}$ C で一晩静置した後、穏やかにピペティングすることで沈殿を溶解し、精製ヘモシアニンとして実験に用いた。

ゲストに用いた緑色蛍光タンパク質 (GFP) は、大腸菌発現系を用いて可溶性分子として大量調製した。C 末端に付加した His6 タグを用いて Ni アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過により精製し、以後の実験に用いた。また、ホモプロパルギルグリシン (Hpg) 基を導入した GFP は、大腸菌 B834 (DE3) 株を用いて、Hpg を Met の代わりに添加した M9 最少培地にて培養することで調製した。ストレプトアビジンは市販のものを用いた。

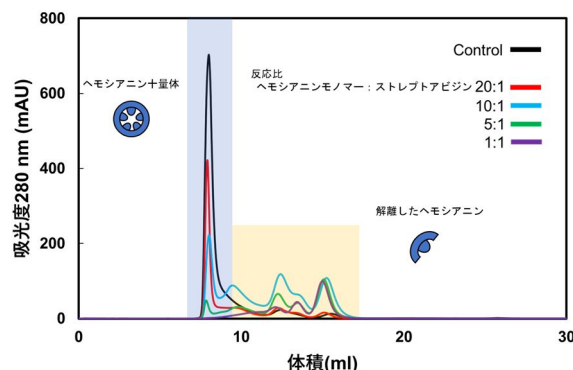


図 2 ストレプトアビジンの添加によるヘモシアニンの多量体構造の変化

透過型電子顕微鏡観察には、HITACHIのHT7600(電子銃:タングステンヘアピンフィラメント カメラ機種:AMT HR 仕様:1k×1k)、HT7700(電子銃:Lab6 カメラ機種:XR-41B 仕様:2k×2k)を用いた。観察サンプルの作製には、カーボン支持膜を貼った400メッシュグリッド(銅)(VECO社)を親水化処理した後、2%酢酸ウランを染色液に用いたネガティブ染色を行い、観察した。

4. 研究成果

本研究では、研究開発当初、すでに開発されていた種々の包摂方法を改良し、Ni-NTA基とHis6タグ間の相互作用、および、ビオチン-ストレプトアビジン間の相互作用を利用したゲスト包摂の方法を構築した。ビオチンを介したストレプトアビジンの包摂を題材に、ゲストの包摂による宿主への影響をゲル濾過にて確認したところ、ゲストの増加により10量体構造のヘモシアニンの割合が減少し、解離したヘモシアニンが増加した。これらの結果より、ゲストの包摂率が高まるにつれ、内部空間内の立体障害が生じ、これが引き金となって宿主の10量体構造が維持できなくなることがわかった(図2)。そこで、次に、宿主が10量体構造を維持できる量のゲスト(ストレプトアビジン)を添加したヘモシアニンを用いて、ネガティブ染色法による電子顕微鏡観察を行なった(図3)。その結果、ストレプトアビジンを包摂したヘモシアニンの多くが10量体構造を維持していることがわかり、ゲル濾過の結果と一致した。

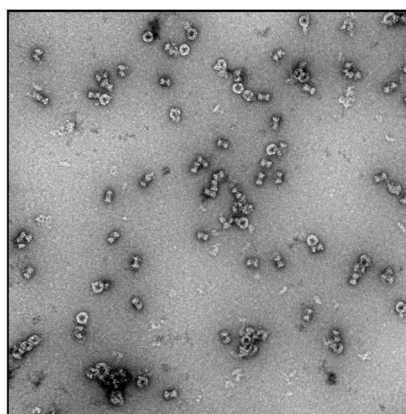


図3-ストレプトアビジンを結合させたヘモシアニンの電顕観察の結果

次に、Ni-NTA基を介して30モル当量のGFPを反応させ、ゲル濾過によりヘモシアニンの会合の様子を評価した。クロマトグラム(青)と各フラクションの蛍光強度(橙)を図4に示す(励起波長:485nm, 検出波長:535nm)。ヘモシアニン溶出位置に、ゲストのGFPに由来する蛍光が観察された。以上より、Ni-NTAリンカーを介してヘモシアニン10量体の内部空間にGFPを結合させることができた結論した。GFPを包摂させたヘモシアニンをネガティブ染色法による電子顕微鏡観察を行ったところ、興味深いことに、ストレプトアビジンを包摂させた場合とは異なり、NTAリンカーの場合は過剰量のゲストと反応させてもヘモシアニンは解離しなかった。これは、宿主内部へのゲストの結合の強さの違いに起因すると考えられる。すなわち、ストレプトアビジン-ビオチン間の相互作用は非常に強いため、ゲストの結合力が強く、その結果、宿主同士の相互作用を破壊するのに対し、Ni-NTA-His6タグ間の相互作用はこれに比べると弱いため、宿主の10量体構造を壊すほど強く内部空間に結合しないと推察される。

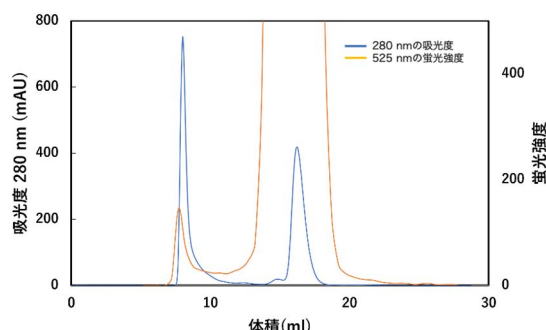


図4 Ni-NTA基を介してGFPを結合させたヘモシアニンのゲル濾過の結果

加えて、ゲストの包摂の様子を観察することを目指し、ビオチンを介してヘモシアニン内部に結合させたストレプトアビジンに、更にビオチン標識された金ナノ粒子を結合させ、ネガティブ染色法により電顕観察を行なった。重原子クラスターである金ナノ粒子は、電子顕微鏡観察にて強いシグナルを与えるため、容易にその存在を可視化できることを期待した。ゲル濾過により精製した金ナノ粒子を結合したヘモシアニンは赤褐色を呈しており、金ナノ粒子が結合していることが示された。電顕観察の結果、一部のヘモシアニンの近傍に金ナノ粒子に由来する黒点を確認された(図5)。これらは、ゲストであるストレプトアビジンを介してヘモシアニンに結合した金ナノ粒子であると思われる。しかし金ナノ粒子の結合率は期待したほど高くはなく、包摂率を上げる必要性が示唆された。

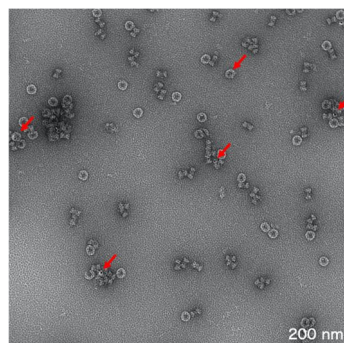


図5 ヘモシアニンにゲスト(ストレプトアビジン)を介して結合した金ナノ粒子の観察(赤矢印が金ナノ粒子)

以上の結果より、本研究では種々のリンカーを介してゲストタンパク質をヘモシアニンに結

合させることに成功した。また、リンカーの違いにより、ゲストの結合がホストの10量体構造の維持に及ぼす影響が異なることを、電子顕微鏡観察により明らかにした。今後、ゲストの包摂効率を上げることで、ヘモシアニンを有用なホスト分子として応用できるようになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ghanem Nouran, Kanagami Natsuki, Matsui Takashi, Takeda Kein, Kaneko Jun, Shiraishi Yasuyuki, Choe Christian A., Uchikubo Kamo Tomomi, Shirouzu Mikako, Hashimoto Tsubasa, Ogawa Tomohisa, Matsuura Tomoaki, Huang Po Ssu, Yokoyama Takeshi, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 in press
2. 論文標題 Chimeric mutants of staphylococcal hemolysin, which act as both one component and two component hemolysin, created by grafting the stem domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito Hiroaki, Matsui Takashi, Konno Ryo, Itakura Makoto, Koderia Yoshio	4. 巻 11
2. 論文標題 LC-MS peak assignment based on unanimous selection by six machine learning algorithms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02899-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Abe Satoshi, Pham Thuc Toan, Negishi Hashiru, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Ueno Takafumi	4. 巻 60
2. 論文標題 Design of an In Cell Protein Crystal for the Environmentally Responsive Construction of a Supramolecular Filament	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 12341 ~ 12345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202102039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Konno Ryo, Matsui Takashi, Ito Hiroaki, Kawashima Yusuke, Itakura Makoto, Koderia Yoshio	4. 巻 550
2. 論文標題 Highly accurate and precise quantification strategy using stable isotope dimethyl labeling coupled with GeLC-MS/MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 37 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Yuzuru, Matsui Takashi, Konno Ryo, Kawashima Yusuke, Sato Toshiya, Itakura Makoto, Koderia Yoshio	4. 巻 548
2. 論文標題 A highly efficient method for extracting peptides from a single mouse hypothalamus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 155 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Tsubasa, Ye Yuxin, Ui Mihoko, Ogawa Tomohisa, Matsui Takashi, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 514
2. 論文標題 Protein encapsulation in the hollow space of hemocyanin crystals containing a covalently conjugated ligand	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 31 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yano Shigekazu, Suyotha Wasana, Oguro Natsuki, Matsui Takashi, Shiga Shota, Itoh Takafumi, Hibi Takao, Tanaka Yoshikazu, Wakayama Mamoru, Makabe Koki	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structure of the catalytic unit of GH 87-type α -1,3-glucanase AgI-KA from <i>Bacillus circulans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15295-15295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51822-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 安部 聡、田中潤子、上野隆史
2. 発表標題 迅速タンパク質結晶化とサブミクロン結晶構造解析
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部 聡、上野隆史
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成を利用した結晶化とサブミクロン結晶構造解析
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部 聡
2. 発表標題 細胞内タンパク質結晶の分子設計による生体固体材料の開発
3. 学会等名 酵素工学研究会 第86回講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小寺義男, 中川謙, 板倉誠, 紺野亮, 大橋潤子, 佐藤俊哉, 川島祐介, 松井崇
2. 発表標題 微量組織を対象とした高感度ペプチドミクス
3. 学会等名 第46回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小寺義男, 紺野亮, 伊東大晃, 松井崇
2. 発表標題 SI-GeLC-MS/MSを用いた蛋白質切断状態の高精度比較分析
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 巨大タンパク質会合体ヘモシアニンの結晶中の空隙への生体分子の包摂
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 蛋白質の立体構造解析 -X線結晶構造解析とクライオ電顕単粒子解析-
3. 学会等名 酵素工学研究会第84回講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 巨大タンパク質会合体ヘモシアニンの構造解析
3. 学会等名 農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 次田篤史、松井崇、堀口安彦、横山武司、田中良和
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析による百日咳壊死毒の構造解析
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡、小島摩利子、小暮遼河、上野隆史
2. 発表標題 細胞内タンパク質結晶化の最適化と迅速構造解析
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡、小島摩利子、上野隆史
2. 発表標題 タンパク質の迅速結晶化とサブミクロン結晶の構造解析
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡
2. 発表標題 細胞内結晶工学によるタンパク質結晶の機能化
3. 学会等名 日本化学会東北支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 巨大タンパク質会合体ヘモシアニンの構造解析 結晶構造と電顕構造
3. 学会等名 2019年度 日本生化学会九州支部例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡の相関構造解析の有用性ーヘモシアニンを例としてー
3. 学会等名 日本蛋白質科学会 ランチョンセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中良和, 松井崇, Stefan Raunser, Gatsogiannis Christos
2. 発表標題 Structure analysis of squid hemocyanin using both X-ray crystallography and cryo-EM
3. 学会等名 化学系学協会東北大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松井 崇 (Matsui Takashi) (30463582)	北里大学・理学部・講師 (32607)	
研究分担者	安部 聡 (Abe Satoshi) (40508595)	東京工業大学・生命理工学院・助教 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------