

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82502  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K05696  
研究課題名(和文) R1EN融合タンパク質結晶化法の高分子量タンパク質への応用

研究課題名(英文) Application of R1EN-Fusion method to large proteins

## 研究代表者

真板 宣夫 (MAITA, NOBUO)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・上席研究員

研究者番号：00404046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：R1EN-fusion法は結晶スポンジ法のように簡便にゲストタンパク質の結晶構造を決定する手法である。しかし分子量上限が21kDaであり、応用にはネックとなる。これを克服するためにジスルフィド結合によるヘテロ多量体を構築し、結晶化を試みたが再現性が極めて低く、結晶化の再現性の改善が急務であると思われた。沈殿剤のpHが結晶化に影響を与えるため、緩衝剤としてトリスを用いた条件で改めて結晶化条件を探索したところ、pH7.4で細長い結晶を得ることが出来た。これを手掛かりに条件を詰めて今後はよりコンスタントに結晶が得られ、より広い範囲のタンパク質の構造解析に適用できるようになると期待される。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の結晶構造解析は、基礎生物学から疾病、薬剤開発にわたって有用な知見を与える。しかし結晶化は不確定要素が多くハードルが高い。本研究は、簡単にタンパク質結晶を得ることが出来るR1EN-fusion法を、より広範囲の大きさのタンパク質に適用するための研究である。これによりこれまで構造不明であったタンパク質の詳細な立体構造が解明できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The R1EN-fusion method is a simple way to determine the crystal structure of fused-guest proteins. However, the upper limit of molecular weight is about 21 kDa, which may be a bottleneck for versatility. To overcome this issue, I constructed the disulfide-bonded dimer and trimer of R1EN and tried to crystallize them, but the success rate of crystallization was poor. Thus, I searched for the crystallization conditions again using Tris-buffer and obtained a thin, elongated crystals at pH 7.4. I expect that it will be able to refine the conditions and obtain crystals more consistently and applicable to structural study of large proteins.

研究分野：構造生物化学

キーワード：構造生物学 X線結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の結晶構造解析は、結晶化の壁を越えなければならない問題点を有する。結晶化の手間を省く手法は今までにも多く研究されてきたが、有効な方法は未だない。結晶構造解析は良質なタンパク質結晶を作製する必要があるが、実際はタンパク質分子が規則的に整列している状態であれば解析が可能である。そこで、予め三次元格子を構築して、それに特定の分子を結合させるというアプローチが考えられる。東大の藤田教授らは「結晶スポンジ法」を開発し、多孔性MOFで結晶を作り、これに低分子有機化合物を結合させて構造解析を行った(1)。私はこの概念をタンパク質の結晶構造解析に応用することを考えた。巨大孔タンパク質結晶格子をMOFのように足場として格子を作るタンパク質(ホスト)に、構造を解析したいタンパク質(ゲスト)を融合したキメラタンパク質を作り、結晶の空隙にゲストタンパク質を固定させることでゲストタンパク質の結晶構造解析を試みた。私が以前結晶構造解析を行った(2)カイコ由来レトロトランスポゾンのR1にコードされるORF2pのエンドヌクレアーゼドメイン(R1EN)にユビキチンを融合し、R1ENと同じ結晶化条件で同じ結晶格子を作らせることが出来た。さらに放射光で1.7 Åの回折データを取り、ユビキチンの結晶構造を得ることが出来た(3)。また、R1ENの単独構造モデルを使って分子置換で位相を計算し、自動でユビキチンの電子密度計算とモデリングを行うことが出来た。この手法では結晶化条件スクリーニングの省略、位相問題の克服、結晶構造解析における2大ボトルネックを克服することが出来た。

### 2. 研究の目的

R1ENを利用したタンパク質の結晶スポンジ法(R1EN-fusion法)はその有効性を証明することが出来た。しかしながら、この方法には下記のようないくつかの改善すべき問題点があった。

まず孔の大きさは有限であるので、ゲストタンパク質の分子量にも上限があるという事である。タンパク質結晶では、溶媒含有量の範囲は大体40-80%であるので、40%で見積もるとおよそ21kDaが上限となる。真核生物の総タンパク質の平均分子量は45.6kDaである(4)ので、R1EN-fusion法に汎用性を持たせるためには分子量の上限を克服する必要がある。そこで、R1EN 1分子に対してゲスト1分子ではなく、R1EN 2分子または3分子に対してゲスト1分子となるように、システイン残基の変異体を作りジスルフィド結合によるヘテロ二量体または三量体を作り、結晶化すれば分子量の上限が42-63kDaまで上げることが可能となる。

次に、今回成功したのはユビキチン(8kDa)であったが、そのほかにも10-20kDaの数種類のタンパク質を試している。しかしながらほとんどの場合結晶が得られず、結晶が得られたとしてもゲストタンパク質が揺らいでいて電子密度が見えなかった。またユビキチンの場合でも、間をつなぐリンカーが長い場合は電子密度が見られなかった。さらに構造解析が可能だったユビキチンの場合、単独構造ではディスオーダーして見えていなかったR1ENのN末端領域がユビキチンと相互作用することで固定されていることが分かった。このため、何らかの方法でゲストタンパク質を固定させる工夫が必要であると考えられた。以上2つの問題点を克服するため、結合ペプチドを用いたゲストタンパク質の安定化及びジスルフィド結合によるR1EN多量体の結晶化を行う。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 システイン残基変異によるジスルフィド結合したR1EN二量体の構築

R1EN結晶構造(PDB: 2E19)の結晶学的隣接分子との相互作用面を調べて、距離及び構造への影響がほとんどないと考えられる部位を探索し、これをシステインに変異した変異体を作製する。結晶構造では、非対称単位はR1EN一分子であるので、これを考慮して、最小限度の変異に留めるようにする。

既に二回対称軸の相互作用面にあるAla73をCysにしたものを作り、還元させてゲルろ過で

精製を完了している。これを拡張して、R1EN(A73C)と R1EN(A73C)-guest をジスルフィド結合させたものをゲルろ過で精製する。

### 3 2 . システイン残基変異によるジスルフィド結合した R1EN 三量体の構築

二量体と同様にして、三回軸の相互作用面にある残基を選んでシステイン残基の変異体を作製する。二量体とは異なり、溶液中では特異的な結晶格子中で見られた三回軸の相互作用は起こらないので、結晶を作らせて結晶中でジスルフィド結合を形成させ、その後再溶解してゲルろ過で R1EN:R1EN:R1EN-guest のヘテロ三量体を精製する。

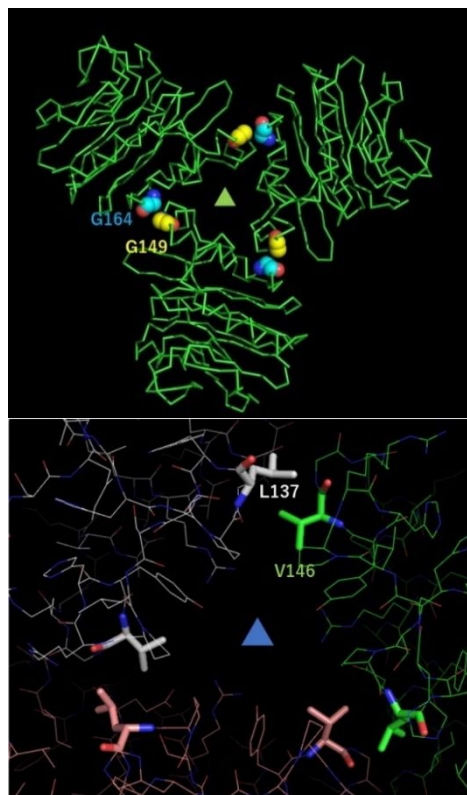


図 1 三回軸の相互作用面と変異箇所

### 3 3 . タンデム二量体 R1EN の作製

R1EN をタンデムに連結したコンストラクトを作り、簡便にヘテロ二量体を作ることが出来る様にする。

### 3 4 . ゲストタンパク質安定化のためのゲストペプチド複合体の作製

これまでに、Sumo をゲストタンパク質として結晶を得たが Sumo の電子密度を確認することはできなかった。Sumo を空隙中で安定化させるため、Sumo と結合する短いペプチドを同一分子内に導入したものを作製する。同様に、ユビキチンとユビキチン結合モチーフも作製する。

### 3 4 . 結晶安定化のためのシステイン変異体の作製

二回軸と三回軸の両方にシステイン残基を入れることで、平面状の 2D 結晶を作る。また、上下方向にもシステイン残基を導入して、タンパク質結晶による COF(Covalently-linked Organic Framework)ともいべき構造体を作る。

上記のゲストタンパク質としては、以前から用いている KLF5、Ubiquitin、METTL7、FAM3C、PCNA、Sumo のほか、GFP と mCherry を用いる。

## 4 . 研究成果

### 4 1 . システイン残基変異体

二回軸にある Ala73 をシステイン残基にしたものを作って、還元下でゲルろ過で二量体を精製することが出来た(3)。また、これを結晶化して実際にジスルフィド結合していることを構造的に確認した(3)。Ala73Cys の融合蛋白質を作ったが、KLF5、METTL7、FAM3C は発現が極めて低かった。GFP、mCherry は精製することが出来たが、ゲルろ過で二量体由来のピークを確認することはできなかった。これは元々溶液中で結晶中と同じ二量体を緩く作っているため、GFP、mCherry のように自身が相互作用するようなゲストの場合は適用が難しいとわかった。三回軸の部分を見てみると、ヘリックスが丁度三回軸のところに位置し、その両端にグリシンがあるので、これをシステインに変えた変異体を作製した(G149C/G164C)(図 1)。しかし、このコンストラクトは大腸菌でほとんど発現しなかった。発現しない理由を培養条件などに限定して考えていたため、時間がかかってしまったが、2カ所のグリシンをシステインにしたことで翻訳直後の折りたたみの際に自由度が大きく変わり、正しく折りたたまれずに分解されてい

のだと思い当たった。そこで、別の箇所の2残基(図1)をシステインに置換したコンストラクト(L137C/V146C)を構築したところ、今度は野生型と同レベルの発現が見られた。また、R1ENの2D結晶を作るため、これら3カ所に変異を入れたコンストラクト(R1EN-3C)も構築した。

次に、上下方向の相互作用面にもジスルフィド結合を導入するため、二カ所(G36C/V69C)のシステイン残基を追加した変異体(R1EN-5C)を作製した。グリシンに変異を入れたものであったが、WTと同様に発現・精製することが出来た。

#### 4 2 . タンデム二量体 R1EN の作製

ジスルフィド結合によるヘテロ二量体を作ることが難しいことから、タンデムな R1EN のコンストラクトを作り、その C 末端にゲストタンパク質を融合させる方法を試みた。R1EN の配列の両端に NdeI サイトが入るように設計したプライマーを用いて増幅させ、R1EN の開始コドンにある NdeI サイトを利用して、NdeI で切断した R1EN 発現プラスミドに入れて、タンデムな R1EN を発現するコンストラクトを作った。次にゲストタンパク質を挿入する際にギブソンアセンブリーでコンストラクト作りを行うと、重複した配列があるために、目的と異なるエラーが沢山取れてくるので難航したが、KLF5、FAM3C、METTL7 のコンストラクトを作製することが出来た。これらについて大腸菌で発現・精製を試みたが、発現量が極めて低く、現在発現方法の改善を検討中である。

#### 4 3 . ゲストタンパク質固定化のためのゲスト

R1EN-Ubiquitin の例でゲストタンパク質を何らかの方法で固定しないと上手くいかないことが判明した。既にコンストラクトを作製しているユビキチンと Sumo をテストケースとして、これに結合するモチーフを R1EN の反対側に融合して固定化を図ると同時に、複合体解析法の確立を目指した。MCAF1 と PIASx の SIM(Sumo Interacting Motif)と Sumo、hHR23b の UIM(Ubiquitin Interacting Motif)と Ub の組み合わせを用いた(図2)。R1EN は N 末と C 末が隣接しており、どちらも空隙に突出しているため、N 末と C 末にそれぞれ別のタンパク質を融合させることが出来る。また、隣接しているため Ub-UIM のような比較的弱い相互作用の複合体を解析するのに適していると考えられる。これらについて大腸菌で発現・精製を行い、結晶化まで行ったが、結晶は得られていない。

#### ペプチド複合体



図2 弱い相互作用の複合体解析のためのコンストラクト

#### 4 4 . システイン残基変異体の結晶構造解析

まず、ゲストタンパク質のない R1EN-3C、R1EN-5C だけの結晶化を試みた。これまで通り、精製タンパク質(5mg/mL)を用いて、pH6.5-8.2 まで振ったバッファー(1.8M 酢酸ナトリウム、20mM 硫酸アンモニウム、1%(v/v) Jeffamine M-600)を沈殿剤としてハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化をした。効率を上げるために、wt-R1EN で作った微結晶でマイクロシーディングを行った。再現性が低く、なかなか結晶が得られなかったが、1ドロップにだけ結晶が成長し、これを PhotonFactory でデータ測定したところ、二回軸である Cys73 はジスルフィド結合が確認できたが、三回軸では架橋されていなかった。

#### 4 5 . 結晶化条件の再考

R1EN の問題点は結晶化の再現性の低さであり、そのためにシーディングを用いている。徳島

大学時はシーディングを用いることで再現性は良好であったが、異動に伴って再現性が著しく低くなってしまった。R1EN 結晶が得られる pH の範囲がシビアであることが原因であるが、それをカバーするために常に pH 範囲を振って結晶化している。凡そ pH7-7.5 で結晶が得られるが、結晶化条件には緩衝能のあるものが無く、特に酢酸は揮発しやすく揮発によって pH が大きく変化してしまう。そこでトリスバッファーに置換した条件で結晶が得られるか試みた。すると、pH 7.5 の条件で図 3 のような細長い結晶が得られたが、極めて細いために回折データは取得できなかった。

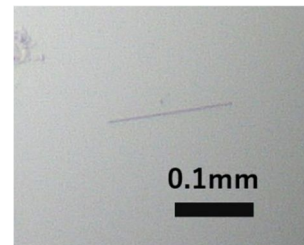


図 3 トリスで得られた結晶

#### 4 6 .まとめと考察

本研究では研究計画で当初目標としていた結果が思うように得られなかった。R1EN 結晶の再現性の低さが主要因であるが、それまでに行ってきた工夫 (pH を振る、シーディングを行う) でも改善しないという問題に当たってしまった。さらに研究期間の途中で異動があり、種として使うための wt-R1EN の結晶を得るまでに 1 年以上かかってしまった。またコロナウィルスの流行により異動してすぐにテレワークと移動制限が起り、4 ヶ月近く実験が出来なかったことも研究の妨げとなってしまった。しかし最終的にトリスバッファーで結晶が得られたことはこの問題の打開につながるものと思われる。

しかしながら、今回の研究期間で R1EN の問題点を洗いだし、解決の糸口もつかむことが出来た。これらの知見をもとに今後は迅速に R1EN-fusion 法の開発研究を進めることが出来ると期待される。

#### <参考文献>

1. Inokuma Y, et al, *Nature*, 495, 461-466 (2013).
2. Maita N, et al, *Nucl Acids Res*, 35,3918-3927 (2007).
3. Maita N, *J Am Chem Soc*, 140, 13546-13549 (2018).
4. Yeates TO, Agdanowski MP, Liu Y, *Curr Opin Struct Biol*, 60, 142-149 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohno Ayako, Maita Nobuo, Tabata Takanori, Nagano Hikaru, Arita Kyohei, Ariyoshi Mariko, Uchida Takayuki, Nakao Reiko, Ulla Anayt, Sugiura Kosuke, Kishimoto Koji, Teshima-Kondo Shigetada, Okumura Yuushi, Nikawa Takeshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Crystal structure of inhibitor-bound human MSPL that can activate high pathogenic avian influenza	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000849	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 真板宣夫	4. 巻 74
2. 論文標題 タンパク質結晶の隙間を使った“結晶スポンジ法”	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 32 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap <a href="https://researchmap.jp/read01392_79">https://researchmap.jp/read01392_79</a>
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------