

令和 6 年 4 月 13 日現在

機関番号：82645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06041

研究課題名 (和文) タンパク質の「籠」を利用した膜タンパク質の新規構造解析手法の開発

研究課題名 (英文) Development of a new structural analysis method for membrane proteins using protein "cages"

研究代表者

阿久津 誠人 (Akutsu, Masato)

国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・主任研究開発員

研究者番号：00785206

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要 (和文) : 水溶性タンパク質を籠の内部に閉じ込めることに成功し、その精製法も確立させた。高分解能の解析とまでは到達できなかったが、籠の内部に閉じ込めた標的タンパク質について、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法による構造決定で確認することができた。籠の内部に膜タンパク質を配置するには困難が予想されたが、ミトコンドリア内膜の構造骨格として機能する一回膜貫通型の膜タンパク質を内包した籠を調製することに成功した。モデルによる予想では約40 kDa程度まで調製可能であるため、創薬ターゲットとなるような七回膜貫通型Gタンパク質共役受容体の調整の可能性も考えられるため、有用な方法になりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は全ての生物において重要な役割を果たしており、配列決定されたゲノムに含まれる遺伝子の約30%が膜タンパク質をコードしている。しかし、膜タンパク質の機能および構造の研究は未だ限定的である。本研究では、膜タンパク質を籠タンパク質との融合タンパク質として作製し、籠タンパク質の自己組織化能を利用することで、膜タンパク質を内包した籠を調製することに成功した。膜タンパク質の構造解析において、創薬研究への利用をも見据えた汎用性のある効率的な新技術になりうる可能性が示された。

研究成果の概要 (英文) : Purification method for the protein captured inside the cage protein was established. Although high-resolution analysis could not be achieved, the structures of the soluble target protein captured inside the cage protein were determined by single-particle reconstruction method by using cryo-electron microscopy. The cage protein also could capture a single transmembrane protein that functions as the structural backbone of the mitochondrial inner membrane, so that this method proposed by this research has potential to be useful method for the further study of membrane proteins.

研究分野：構造生物学

キーワード：単粒子解析

※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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の構造解析における最も顕著な問題は、その疎水的性質のために生じる凝集や不溶化である。そこで、その問題を解決するために、タンパク質で作製した“籠”の内側に膜タンパク質を発現させるという申請者独自の発想に至った。疎水的な性質を持った膜タンパク質は籠の内部に捕捉されることから、籠そのものの水溶性には影響が及ばないと考えられ、膜タンパク質をあたかも可溶性タンパク質のように調製できると期待された。さらに、籠の持つ高い対称性を利用し、単粒子解析（クライオ電子顕微鏡）やX線結晶構造解析を通じて、膜タンパク質の効率的な構造決定を可能にする計画であった。

2. 研究の目的

膜タンパク質は全ての生物において重要な役割を果たしており、配列決定されたゲノムに含まれる遺伝子の約30%が膜タンパク質をコードしている。しかし、膜タンパク質の機能および構造の研究は未だ限定的である。本研究では、膜タンパク質の構造解析において、創薬研究への利用をも見据えた汎用性のある効率的な新技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

生体内では、小さなタンパク質やペプチドが大きな構造の構成単位として自己組織化し、生物学的な役割を果たすことがある。このような構成単位を「籠タンパク質」と定義し（図1左）、籠タンパク質の自己組織化能をうまく利用すれば、膜タンパク質の効率的な生産および構造解析が可能になるのではないかとという申請者独自の発想に至った。具体的には、自己組織化して二十面体構造を形成する Encapsulin という籠タンパク質に着目し、二十面体構造の中空領域（以降、「籠」とする）に膜タンパク質を配置させることで、膜タンパク質の凝集や沈殿を回避できると考えた。膜タンパク質を籠タンパク質 Encapsulin との融合タンパク質として作製し、Encapsulin の自己組織化能を利用することで、膜タンパク質部分を籠の内部に配置させる方法を行う。

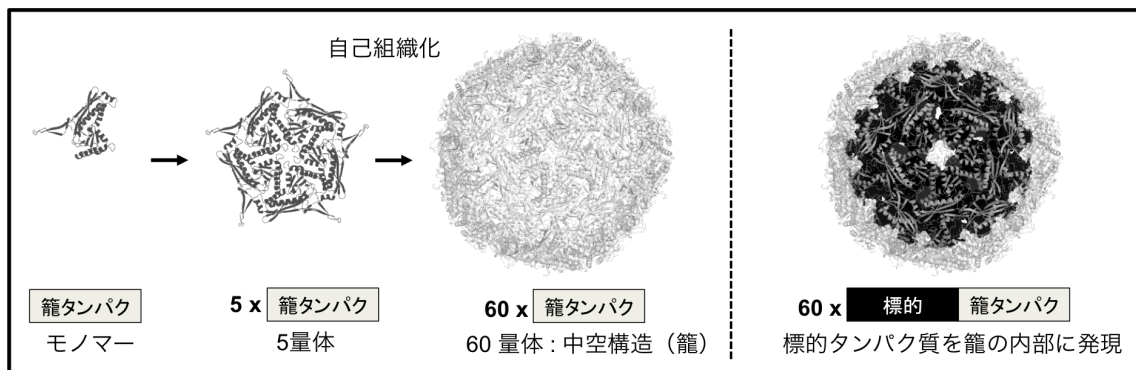
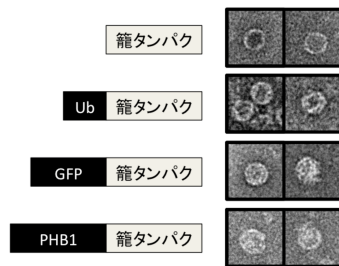


図1：「籠タンパク質」の自己組織化能を利用した、籠内部への膜タンパク質の配置

4. 研究成果

始めに、水溶性タンパク質（ユビキチン、Ub：緑色蛍光タンパク質、GFP）を籠の内部に閉じ込めることに成功し、その精製法も確立させた（図2A）。高分解能の解析とまでは到達できなかったが、籠の内部に閉じ込めた Ub（8.6 kDa）GFP について、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法による構造決定で確認することができた（図2B）。籠の内部に膜タンパク質を配置するには困難が予想されたが、ミトコンドリア内膜の構造骨格として機能する一回膜貫通型の膜タンパク質（PHB1, 約30 kDa）を内包した籠を調製することに成功した（図2A）。モデルによる予想では約40 kDa程度まで調製可能であるため、創薬ターゲットとなるような七回膜貫通型Gタンパク質共役受容体の調整の可能性も考えられるため、有用な方法になりうる可能性が示唆された。

A. 標的タンパク質を籠の内部に発現



B. 籠の内部に発現させたユビキチンとGFPの単粒子解析

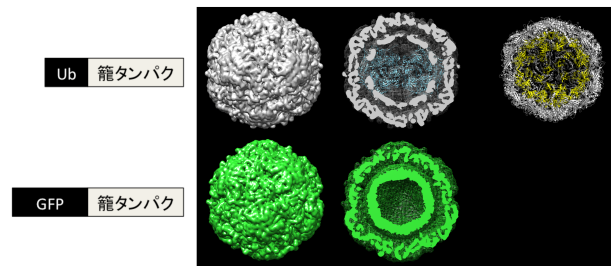


図 2 : 籠の内部に配置させた標的タンパク質の電子顕微鏡を用いた構造解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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