

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 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657104

研究課題名（和文） 多孔体界面におけるタンパク質結晶化

研究課題名（英文） Protein crystallization at the porous medium

研究代表者

松村 浩由 (MATSUMURA HIROYOSHI)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30324809

研究成果の概要（和文）：

本研究では、多孔体界面を利用して、タンパク質の構造解析に必要な良質かつ高強度のタンパク質結晶を高確率で作製する技術を開発した。様々な多孔体素材を使って濃度や塗布量の最適化を行ったところ、アガロースゲルの塗布量 2 マイクロリットルにおいて良好な結果が得られた。またモデルタンパク質を用いた結晶化スクリーニングにおいて、本技術を用いると結晶化確率が上昇することを見出した。また、結晶化プレートの開発に取り組んだ。溶液攪拌法との組み合わせ技術、ならびにレーザー核発生法との組み合わせ技術を検討し、有効性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：

We investigate the nucleation rate of protein crystals at the interface of solution and porous medium (agarose gel). It was found that 2 ul agarose gel at concentrations of 2.0% (w/v) promoted the number of protein crystals. We also developed a new dispensing system for preparation of the crystallization plates. This technique combined with solution stirring technique improved the crystal quality of a protein complex, thereby solving the crystal structure. The combination with laser irradiation technique demonstrated increase in the nucleation rate. Thus, we propose that a crystallization method using semi-solid agarose is powerful for the screening of crystallization conditions.

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	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：多孔体、界面、たんぱく質、結晶化

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の結晶構造解析は、大型放射光施設、コンピュータ解析技術の飛躍的な進歩により、生命科学の強力かつ必須な手法となり、構造生物学という学術領域が確立されている。しかし、最重要課題である結晶化技術においては、試行錯誤から抜け出せず、未開拓領域のままである。申請者らは、結晶成長は静置状態が理想である、とされる従来の常識とは逆の発想で、フェムト秒レーザー照射による結晶核発生、及び溶液攪拌による高品

質化という全く新しい手法を発見した。これまでに、タンパク質の専門家が成し得なかった多くの難結晶性タンパク質の結晶化に成功し、それらの構造が初めて決定されるに至った。

さらに、最近、申請者は、従来溶液中で行うことが常識とされてきたタンパク質結晶が固相ゲル中で得られることを新たに見いだした。本手法を用いると、溶液中で行うよりタンパク質の核発生確率が上昇する (Appl. Phys. Express, 2, 125501, 2009)。これは、

アガロースゲルが多孔体であり、タンパク質分子を一時的に孔中にトラップできることに起因すると予想される。

しかし、この手法では、アガロースゲルを一旦 90℃付近まで熱した後タンパク質溶液をゲルと混合する必要がある、操作として煩雑である。また、熱に弱いタンパク質は変性する可能性がある。これらの課題を克服するため、本研究では、多孔体の界面に着目し研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、多孔体（固相ゲル）界面を利用して、タンパク質の構造解析に必要な良質かつ高強度のタンパク質結晶を高確率で作製する実用的な技術の構築を行った。具体的には、(1) 多孔体界面結晶化法にてタンパク質結晶化の有効性を検証し、この手法と(2) 結晶成長過程に効果的な申請者が見出した溶液攪拌法と組み合わせた。さらに(3) 結晶化プレートの開発に取り組んだ。本技術を適用するためには、平坦に高濃度アガロースゲルを塗布する必要があり、そのためのディスペンサー装置によるプレート上へ塗布を試みた。最後に、(4) レーザー照射による核発生技術との組み合わせ技術の開発に取り組んだ。この方法により溶液中のタンパク質分子をゲル界面に加速・注入することで平衡状態では実現できない高濃度圧縮を達成できると予想し、結晶化を誘起させる方法を検証した。

3. 研究の方法

(1) モデルタンパク質を用いた多孔体界面結晶化法の検証

結晶化スクリーニングにおける効果を実証した。モデルタンパク質であるエラスターゼを用いて、結晶化スクリーニングを行った。同時に、コントロールとして、多孔体なしの条件で結晶化を行い、新しい結晶化条件の数や結晶化の成功確率を比較した。

作製できた結晶の評価をX線回折実験と結晶構造解析によって行った。

(2) 溶液攪拌法との組み合わせ効果。

申請者が、3.1Å分解能の回折を得ているタンパク質-タンパク質複合体結晶(GAPDH-CP12 複合体)を用いて、溶液攪拌法と多孔体界面結晶化法の組み合わせ技術によって結晶化を行った。続いて、作製できた結晶の評価を行った。また、構造解析に適した結晶が得られたため、その構造解析を進めた。

(3) 結晶化プレートの開発

市販のディスペンサー装置を用いて、高濃度ゲルの塗布を試みた。

(4) レーザー核発生法との組み合わせ効果

申請者らがこれまで開発してきたレーザー照射による核発生法との組み合わせ技術をグルコースイソメラーゼを用いて試験した。

4. 研究成果

(1) 結晶化確率の上昇

エラスターゼの結晶化スクリーニングにおいて、多孔体がない結晶化スクリーニングでは8条件であったものが、多孔体界面での結晶化では13条件に増加した(図1)。このことから、多孔体に接触させることによって核発生が誘発されることが確認できた。また、アガロースゲルの塗布量2マイクロリットルにおいて良好な結果が得られた。



図1 エラスターゼの結晶化

(2) 溶液攪拌法との組み合わせ効果

申請者らがこれまで開発してきた溶液攪拌法との組み合わせ技術を検討した。蛋白質-蛋白質複合体(GAPDH-CP12)で品質の向上がみられた。具体的には、X線回折分解能が3.1Åから2.4Åまで改良され、構造解析にも成功した(図2)。

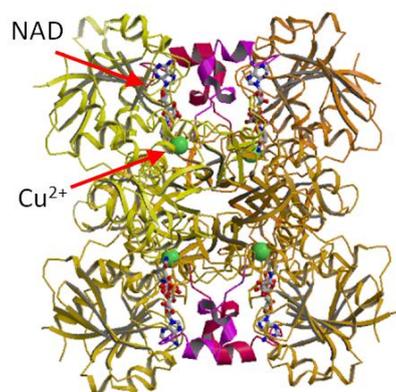


図2 GAPDH-CP12の立体構造

(3) 結晶化プレートの開発

ディスペンサーによる高濃度ゲルの塗布を試みたところ、結晶化プレートを精度高く作成できるシステムを構築できた。

(4) レーザー核発生法との組み合わせ効果

申請者らがこれまで開発してきたレーザー照射による核発生法との組み合わせ技術を検討した。グルコースイソメラーゼにおいて核発生確率の上昇が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- (1) Crystal structure of rice Rubisco and implications for activation induced by positive effectors NADPH and 6-phosphogluconate
H. Matsumura, E. Mizohata, H. Ishida, A. Kogami, T. Ueno, A. Makino, T. Inoue, A. Yokota, T. Mae, and Y. Kai
J. Mol. Biol., **422**(1), 75-86 (2012).
- (2) Crystal structure of the N-terminal domain of the yeast general corepressor Tup1p and its functional implications
H. Matsumura, N. Kusaka, T. Nakamura, N. Tanaka, K. Sagegami, K. Uegaki, T. Inoue, and Y. Mukai
J. Biol. Chem., **287**(32), 26528-26538 (2012).
- (3) Crystal structure of the superfamily 1 virus helicase domain from tomato mosaic virus
M. Nishikiori, S. Sugiyama, H. Xiang, M. Niiyama, K. Ishibashi, S. Nakamura, T. Inoue, M. Ishikawa, H. Matsumura, and E. Katoh
J. Virol., **86**(14), 7565-7576 (2012).
- (4) Growth of protein crystals in hydrogels prevents osmotic shocks
S. Sugiyama, M. Maruyama, G. Sazaki, M. Hirose, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, and H. Matsumura
J. Am. Chem. Soc., **134**(13), 5786-5789 (2012).
- (5) Three-dimensional non-invasive, cross-sectional imaging of protein crystals
N. Nishizawa, S. Ishida, M. Hirose, S. Sugiyama, T. Inoue, Y. Mori, K. Itoh, and H. Matsumura
Biomed. Opt. Express, **3**(4), 735-740 (2012).
- (6) Spatially precise, soft microseeding of single protein crystals by femtosecond laser ablation
H. Yoshikawa, Y. Hosokawa, R. Murai, G. Sazaki, T. Kitatani, H. Adachi, T. Inoue, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori, and H. Masuhara
Cryst. Growth Des., **12**(9), 4334-4339 (2012).
- (7) Effects of a forced solution flow on the step advancement on {110} faces of tetragonal lysozyme crystals: direct visualization of individual steps under a forced solution flow
M. Maruyama, H. Kawahara, G. Sazaki, S. Maki, Y. Takahashi, H. Y. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, and Y. Mori
Cryst. Growth Des., **12**(6), 2856-2863 (2012).
- (8) The in silico screening and X-ray structure analysis of the inhibitor complex of *Plasmodium falciparum* orotidine 5'-monophosphate decarboxylase
Y. Takashima, E. Mizohata, S. R. Krungkrai, Y. Fukunishi, T. Kinoshita, T. Sakata, H. Matsumura, J. Krungkrai, T. Horii, and T. Inoue
J. Biochem., **152**(2), 133-138 (2012).
- (9) Human hematopoietic prostaglandin D synthase inhibitor complex structures
Y. Kado, Y. Okano, N. Okazaki, K. Aritake, N. Uodome, H. Matsumura, Y. Urade, and T. Inoue
J. Biochem., **151**(4), 447-455 (2012).
- (10) 天然変性タンパク質による光合成調節の新規分子メカニズム
松村浩由、田茂井政宏、重岡成
化学と生物, 50(11) 786-788
- (11) 固相ハイドロゲル中でのタンパク質結晶化
杉山 成、松村浩由、丸山美帆子、佐崎 元、廣瀬未果、安達宏昭、高野和文、村上 聡、井上 豪、森 勇介
日本結晶学会誌, 54, 300-303 (2012).
- (12) 一枚の写真 超高分解能光断層計測を活用し、タンパク質結晶の3次元・非破壊断層イメージングに成功
西澤典彦、石田周太郎、松村浩由、廣瀬未果、杉山成、森勇介、井上豪、伊東一良
O plus E、アドコム・メディア, 575-576 (2012).
- (13) 転写制御因子 Tup1-N 末端ドメインのX線結晶構造とその複合体形成メカニズム
中村太一、松村浩由、井上豪、日下菜花、田中直子、向由起夫
日本結晶学会誌, 55, 110-115 (2013)

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 松村浩由、石田周太郎、廣瀬未果、杉山成、井上豪、森勇介、伊東一良、西澤典

彦 超高分解能光断層計測によるタンパク質結晶の無侵襲観察技術 日本農芸化学会大会，東北大学，仙台，2013.3.24-28

- (2) 松村浩由、溝端栄一、木津奈都子、石田宏幸、田茂井政宏、前忠彦、横田明穂、甲斐泰、和田野晃、牧野周、重岡成、井上豪 カルビン回路酵素 RuBisCO と GAPDH の活性調節機構の解明 日本植物生理学会大会、岡山，2013.3.21-23
- (3) 西澤典彦、石田周太郎、廣瀬末果、杉山成、井上豪、森勇介、伊東一良、松村浩由 超高分解能 OCT によるタンパク質結晶の三次元イメージング 日本結晶学会年会，仙台，2012.10.25-26
- (4) 錦織雅樹、杉山成、相宏宇、新山真由美、石橋和大、石川雅之、松村浩由、加藤悦子 ウイルススーパーファミリー1 ヘリカーゼ様ドメインの結晶構造解析 日本蛋白質科学会大会、名古屋、2012.06.20-22
- (5) Norihiko Nishizawa, Shutaro Ishida, Mika Hirose, Shigeru Sugiyama, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Kazuyoshi Itoh, Hiroyoshi Matsumura Non-invasive, three-dimensional, cross-sectional imaging of protein crystals grown in gel, 日本蛋白質科学会大会、名古屋、2012.06.20-22

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：METHOD FOR OBSERVING PROTEIN CRYSTAL

発明者：西澤典彦、松村浩由、他 9 名

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2011/071332

出願年月日：2012 年 11 月 22 日

国内外の別：外国

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 浩由 (MATSUMURA HIROYOSHI)