

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657068

研究課題名(和文) 二次元有機 - 無機ハイブリッド複合体空間を用いた新規結晶化法

研究課題名(英文) A novel method to crystallizing proteins by using two-dimensional organic-inorganic hybrid material

研究代表者

姚 閔 (YAO, Min)

北海道大学・先端生命科学研究所(研究院)・教授

研究者番号：40311518

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)：本研究では、化学材料を用いたタンパク質の結晶核形成を促進する新規技術を開発するために、規則的な機能性有機 - 無機ハイブリッド複合体を持つ二次元分子材料にペプチドを固定することに成功し、さらに固定したペプチドにターゲットタンパク質をリンクさせることで、タンパク質結晶核形成を促進する新規技術の開発を行った。その材料を用いて、モデルタンパク質Trypsin、および新規タンパク質(リボソームの生合成に關与するRpf2-Rrs1複合体)の結晶化を試み、この方法の可能性を検討し、更なる新規材料を開発するための手係りを見つけた。

研究成果の概要(英文)：In order to increase the probability of forming crystal kernels for proteins, we develop a novel method by using chemical material. In this method, we use a new material which is regular and functional two-dimensional organic-inorganic hybrid material. We have got succeeded to bind peptides on it in regular arrangement and link them to proteins. We tried to crystallize Trypsin and Rpf2-Rrs1 complex by using this new material with regular peptides, and found a way to develop different new materials further.

研究分野：構造生物学, タンパク質結晶学

キーワード：タンパク質結晶化 規則的二次元分子 CPAPHS 結晶核形成 X線結晶構造解析 分子材料

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質結晶構造解析の技術革新は驚くほどの勢いで進み、真核生物由来の Ribosome, Vault のような巨大超分子複合体の構造解析や、疾患の治療につながる膜タンパク質の構造解析が次々と成功している。また、タンパク質結晶構造解析法を用いた創薬も現実的になって来ている。しかしながら、タンパク質結晶構造解析では、依然、「結晶化過程」が越えなければならない大きな壁として立ちだかっている。現在でも、解析に適した高品質の結晶を得るための方法論は確立しておらず、結晶化試薬や、結晶の成長環境の網羅的な探索による偶然的な方法に依存しているのが現状である。従来の結晶化法を凌駕する全く新しい結晶化法が期待されている。

現在までに様々な結晶化法が開発されている。遺伝子工学やタンパク質工学によるサンプルの調製、分子表面の改変、抗体の利用、結晶化試薬キット、レーザー照射、無重力環境利用などの方法である。これらの方法は、それぞれに一定の効果があるものの、さらなる有用な結晶化法の開発が必要である。研究代表者は、数年前から化学材料の利用に注目し、材料化学の専門家である Yao 博士（中国上海大学、教授）と、彼が開発した規則的な機能性有機-無機ハイブリッド複合体を持つ二次元分子空間をタンパク質結晶核形成へ応用する可能性を検討するための実験を開始した。その結果、その二次元分子空間にカルボキシル基を結合すること、またアミノ酸残基を固定することに成功した。このことから、研究代表者は、規則的な二次元分子空間（材料）を用いたタンパク質結晶核形成法を開発するという着想に至った。

### 2. 研究の目的

一般的に、結晶中のタンパク質は規則正しく並んでいるため、何らかの方法で、タンパク質を規則的に並ばせることによって、結晶を成長させることはよく考えられている。しかし、どのように規則的に並ばせるかがキポイントである。本研究は、従来の方法と全く異なり、規則的な機能性有機-無機ハイブリッド複合体を持つ二次元分子空間を利用して、タンパク質が規則的に配列するための

環境を与え、結晶の核形成を促進しようとするものである。そのアイデアでは、タンパク質と規則的な二次元分子空間の間にペプチドをリンカーとして導入して、規則的な二次元分子空間に固定し、人工的にタンパク質を規則的に配列させることで、結晶核形成の起こりやすい環境を創製する（図1）。

本研究では、従来の結晶化方法と異なり、規則的な二次元分子材料を使用した汎用的な結晶法を開発する。タンパク質結晶化の過程は、核形成、成長、終止からなる。核形成が起こるためには、まず、各々のタンパク質分子がコンタクトして、規則的な会合体を作り、そしてそれを元に結晶核が形成される。したがって、人工的に規則的な会合体を作れば、結晶核形成を促進することができると考えられる。本研究では、規則的な機能性有機-無機ハイブリッド複合体を持つ二次元分子空間にターゲットタンパク質を結合し、人工的にタンパク質を規則的に並ばせることによって、タンパク質結晶の核形成に及ぼす効果を検討し、化学材料を用いたタンパク質の結晶核形成を促進するための新規技術の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、規則的な二次元分子空間を用いたタンパク質結晶核形成法の確立を行う。そのために、まず、①既に確立した方法により、カルボキシル基を持つ規則的な二次元分子空間材料を作製する。②その二次元分子空間に対して、親水性アミノ酸およびペプチドを固定する。③今まで X 線構造生物学的な研究に良く使われているモデルタンパク質を使用し、二次元分子空間にタンパク質を結合させ、分光光度計による吸光度と赤外線吸収スペクトルを用いて結合状況を評価する。④リンクしたサンプルについて結晶化を行い、得られた良質の結晶について、構造解析へ進める。2 年目以降には、結晶化および構造解析の結果から、二次元分子空間材料が結晶化へ及ぼす影響を評価し、二次元分子空間とタンパク質の間に介入するペプチドリンカーの最適化を行う。

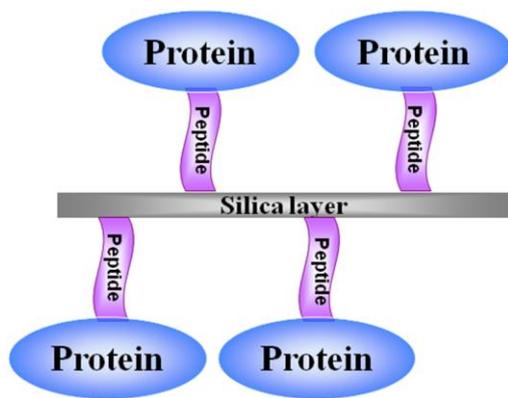


図 1. タンパク質と二次元分子空間のモデル

#### 4. 研究成果

開発を進めるために、室温条件で結晶化を試すモデルタンパク質として、室温条件で結晶化しやすいタンパク質 lysozyme や MBP を避けて、結晶化しない Trypsin を選択し、二次元分子材料による結晶化方法を試みた。まず、海外研究協力者が合成していた規則的な二次元分子材料である機能性有機-無機ハイブリッド複合体 carboxylpropylamidephenyl silica (CPAPhS) を室温の条件でモデルタンパク質とリンク反応をさせ、結晶化用の種を作製した。その結晶化種を用いて結晶化のスクリーニング (96\*4 条件) を行った結果、初期結晶を得ることができた。その結晶化の再現性も確認できた。得られた結晶を In-house X 線回折装置を使って照射したところ、約 3Å 分解能のデータセットを測定することができ、構造解析に成功した。しかし、得られた構造には、活性部位に分解されたペプチドが結合している。それは、結晶化の原因であり (Trypsin が低温、あるいは基質が結合すると結晶化する)、Trypsin の自己分解したものと考えられる。

一方、Trypsin を結晶化したときに、CPAPhS とタンパク質の反応条件などの検討を行い、最適化条件を見積もりした。その条件を新規タンパク質の結晶化に適用した。その新規タンパク質は、真核生物リボソームの生合成における 5S rRNP 複合体を形成するトランス因子 Rpf2 と Rrs1 の複合体 (Rpf2-Rrs1) である。Rpf2-Rrs1 複合体を最適化の反応条件で CPAPhS とのリンク反応をさせ、結晶化用の種を作製した。その結晶化種を用いて結晶化のスクリーニング (96\*4 条件) を行った結果、

X 線照射に適用できる結晶を 20 条件以上得ることができた (図 2)。シンクロトロン放射光施設にて X 線回折実験を行ったところ、約 2.1Å 分解能の回折データを得ることができた。さらに、得られた Rpf2-Rrs1 複合体結晶を調べた結果、結晶中の Rpf2 と Rrs1 も断片化された。以上の結晶化の結果から、CPAPhS を用いた結晶化の処理過程には、タンパク質を分解させる要素があり、改良する必要がある。

また、結晶中に Rpf2 と Rrs1 が断片化される原因を調べるため、平成 26 年度には、Rpf2 と Rrs1 について限定分解処理を行い、その結果、同様な断片化が起こることが分かった。このような情報を用いて、Rpf2 と Rrs1 の断片を作り直し、結晶化を試みたが、3.0Å 程度の分解能の結晶しか得られなかった。このことから、CPAPhS が結晶化の促進に何らかの効果があると考えられる。今後、CPAPhS の改良と、結晶化に対する影響を検討し、有用な材料を創製することが期待される。

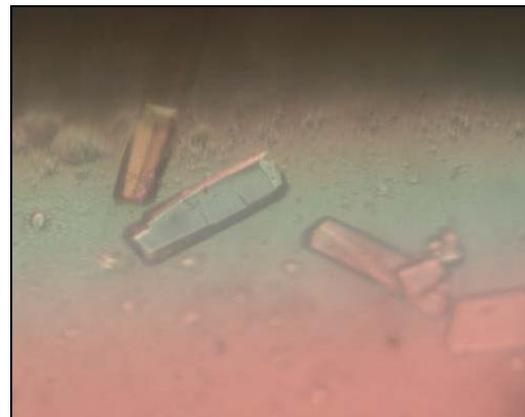


図 2. Rpf2-Rrs1 複合体の結晶

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Nozomi Asano, Koji Kato, Akiyoshi Nakamura, Keisuke Komoda, Isao Tanaka, Min Yao, Structural and functional analysis of the Rpf2-Rrs1 complex in ribosome biogenesis, *Nucl. Acid Res.*, 査読有, 印刷中 (2015)

DOI: 10.1093/nar/gkv305

- ② Nozomi Asano, Akiyoshi Nakamura, Keisuke Komoda, Koji Kato, Isao Tanaka and Min Yao, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of ribosome assembly factors: the Rpf2-Rrs1 complex, *Acta Cryst. F*, 査読有, 70, 1649-1652 (2014)  
DOI: 10.1107/S2053230X14024182
- ③ Xing Shen, Wataru Saburi, Zuo-Qi Gai, Keisuke Komoda, Jian Yu, Teruyo Ojima-Kato, Yusuke Kido, Hirokazu Matsui, Haruhide Mori and Min Yao, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of alpha-glucosidase HaG from *Halomonas* sp. strain H11, *Acta Cryst. F*, 査読有, 70, 464-466 (2014)  
DOI: 10.1107/S2053230X14001940
- ④ Xue Shao, Cong Li, Siwei Chen, Ken Yao, Min Yao, Functional two-dimensional organic-inorganic hybrid materials with regular peptides, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 査読有, 424, 66-73 (2013)  
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.02.011

[学会発表] (計2件)

- ① 朝野希美, 加藤公児, 中村彰良, 薦田圭介, 田中勲, 姚閔: 「真核生物リボソーム生合成関連因子 Rpf2 と Rrs1 の構造機能解析」, 第3回 RIBOSOME MEETING, ANA ホリデイ・インリゾート宮崎 (宮崎市), 2015年3月17-18日
- ② 朝野希美, 中村彰良, 薦田圭介, 加藤公児, 田中勲, 姚閔: 「リボソーム成熟に必要なタンパク質複合体の結晶構造解析へのチャレンジ」, 平成26年度日本結晶学会年会及び総会, 東京大学農学部 (東京都文京区), 2014年11月1-3日

[その他]

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

姚 閔 (YAO, Min)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号: 40311518

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

YAO, Ken

中国上海大学理学院・教授

研究者番号: なし