

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82118

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657079

研究課題名(和文) エックス線結晶構造解析で用いるタンパク質結晶の質を大きく改善する手法の開発

研究課題名(英文) Method for crystal quality improvement of protein crystal

研究代表者

千田 俊哉 (Senda, Toshiya)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授

研究者番号：30272868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：多段階で複数の種類のクライオプロテクトant溶液にソーキングする「多段階ソーキング法」の手法を確立し、CagA結晶の質を10オングストローム分解能から3.1オングストローム分解能に改善した。CagA結晶の場合には、二段階で二種類のクライオプロテクトant溶液(トレハロースとPEG1000)にソーキングした場合に最も分解能が改善された。さらに、この手法を他のいくつかのタンパク質結晶にも適用し、当初3.5オングストローム分解能の回折しか生じなかった結晶の質を最終的には2.1オングストローム分解能まで改善することができた。

研究成果の概要(英文)：The multi-step soaking method is a novel approach to the post-crystallization treatment used to improve quality of protein crystals. This new method improved the crystal quality of CagA, a type IV secretion effector derived from *Helicobacter pylori*, from 10 angstrom to 3.1 angstrom resolution. In addition, this method were applied to the other protein, and improved its crystal quality from 3.5 angstrom resolution to 2.1 angstrom resolution.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：結晶工学 クライオプロテクトant タンパク質 結晶化 分解能 X線結晶構造解析 回折データ測定

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析でタンパク質の結晶構造を決定するためには、きれいな回折を高分解能まで生じる質の良い結晶が必要である。しかしながら、実際には低分解能で乱れた回折しか生じない結晶しか得られずに、X線結晶構造解析による構造決定をあきらめてしまうことも少なくなかった。そのため、結晶の質を改善するために有効な方法が必要とされていた。

2. 研究の目的

結晶の質が悪く、結晶構造解析が困難な場合であっても、結晶の質を改善するための良い手法があれば結晶構造を決定できる。本研究の目的は、凍結条件の検討をはじめとする結晶工学的処理の手法を誰でも簡単に試すことができる合理的基準に基づく手法へと進化させ、多くのタンパク質結晶に適用することである。

3. 研究の方法

1) クライオプロテクトantを用いた結晶工学的処理により、タンパク質結晶の質を改善した。クライオプロテクトantのスクリーニングは、Hampton Research社のCryoProを用いて行った。クライオプロテクトant溶液は、標準母液にグリセロール等のクライオプロテクトant試薬を15-30%程度になるように加え、pHが結晶化溶液や標準母液とほぼ同じになるように調製した。約20種類のクライオプロテクトant溶液を作成し、各々のクライオプロテクトant溶液にソーキングした結晶を2-3個用意し、X線を当てて回折イメージを確認することで結晶の質を判断した。この段階で有効なクライオプロテクトantを選び出し、有効なクライオプロテクトantに多段階でソーキングすることでさらに結晶の質の大幅な改善を試みた。

2) CagA結晶の質を改善していく過程で蓄積された膨大な回折データを用いて「結晶工学的処理の条件」と「X線回折強度データの質」との関係を詳細に分析し、多段階で複数のクライオプロテクトant溶液にソーキングし結晶を凍結する手法が有効であるか、検証した。

3) クライオプロテクトant溶液を用いた結晶工学的処理をCagA以外のいくつかの種類のタンパク質結晶に適用し、結晶の質を改善することを試みた。

4. 研究成果

1) クライオプロテクトantを用いたCagA結晶の質の改善

CagA結晶の質は非常に悪く、最も一般的なクライオプロテクトantであるグリセロールを用いて結晶を凍結した場合には、10 Å分解能の回折しか生じなかった(図1)。はじめ

に、約20種類のクライオプロテクトant溶液の中から有効なクライオプロテクトantを選び出すためのスクリーニングを行った結果、トレハロースとエリスリトールが有効であることが明らかとなった。単独でトレハロースやエリスリトールを用いた場合には3.5 Å分解能程度の回折データが収集できたが、結晶構造解析を成功させるためには、結晶の質をさらに改善する必要がある。そこで、複数のクライオプロテクトant溶液に多段階でソーキングする「多段階ソーキング法」を確立し、結晶の質を大きく改善することを試みた。その結果、二段階で二種類の異なる種類のクライオプロテクトant溶液(トレハロース+PEG1000)にソーキングした場合に分解能が最も改善され、3.1 Å分解能のデータを収集することができた(図1)。

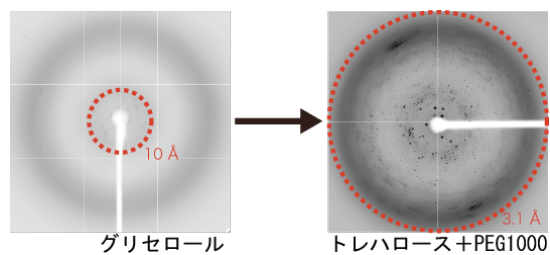


図1 CagA結晶からの回折パターン

CagAの結晶構造を決定するまでに収集した回折データセットの数は160データセット以上にもなるが、その中でソーキング条件を少しずつ変化させることで結晶の質を改善していった。データ番号と分解能との関係をプロットすると、ソーキング条件を検討することで、結晶の質が少しずつ改善されていったことがわかる(図2)。

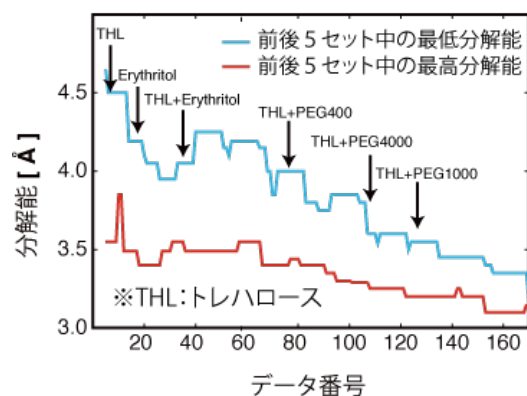


図2 データ番号と分解能の関係

二種類のクライオプロテクトant(トレハロースとPEG1000)を組み合わせることで分解能は大きく改善されたが、CagAのN末端側ドメイン(ドメインI:1-261番)の電子密度が不明瞭で完全なモデルを組み立てることは困難であった。

そこで、この方法をさらに発展させ、三段

階で三種類の異なる種類のクライオプロテクトANT溶液（トレハロース+PEG4000+PEG400）にソーキングすることを試みた結果、N末端側ドメイン（1-261番）の電子密度が明瞭になり、最終的には1-876番のモデルを組み立てることに成功した（図3）。CagAのX線結晶構造解析については、学術論文誌で成果発表を行った（雑誌論文2）

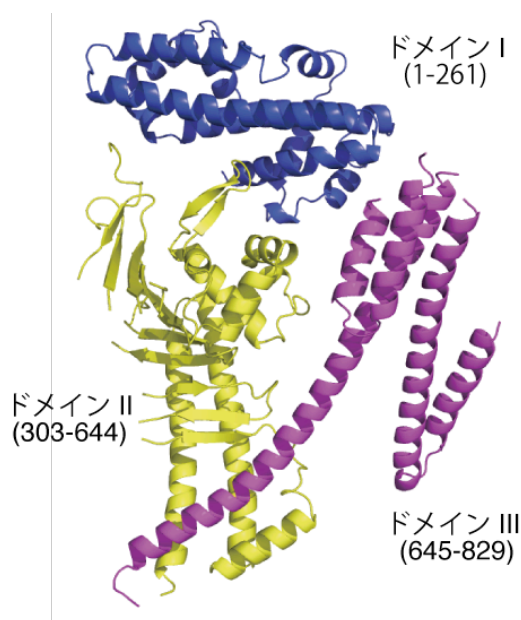


図3 CagAの結晶構造

## 2) データの統計的な解析

CagAの結晶構造解析に成功するまでにX線を当てた結晶の数は1045個となった。それらのデータは、様々なソーキング条件で凍結した結晶から得られたものである。

まず、この膨大なデータをソーキング条件別に分けて統計的に処理するためにExcelのデータシートを策定した。このデータシートには、結晶のID、X線を当てることで生じた最大分解能、ソーキング条件、結晶の大きさ等の情報が含まれる。次に、このデータシートを用いて多段階で複数のクライオプロテクトANT溶液にソーキングする手法が有効であるかどうかを統計的に解析した。

その結果、単独のクライオプロテクトANTを用いる方法では、3.5 Å以上の回折を生じる結晶の割合が10%程度と非常に低いのに対して、二段階で二種類の異なる種類のクライオプロテクトANT（トレハロース+PEG1000）にソーキングした場合には、3.5 Å以上の分解能以上の回折を生じる結晶の割合が70%以上となることが示された。

## 3) 他のタンパク質結晶への適用

上記の結果から、クライオプロテクトANTを用いた結晶工学的処理が結晶の質を改善するために有効であることが示された。そのため、この手法を他のタンパク質結晶へ適用

し結晶の質を改善することを試みた。

### ① フェレドキシン還元酵素 BphA4

グリセロールにソーキングしてBphA4結晶を凍結した場合には1.35 Å分解能のデータが収集できていたが、BphA4のより詳細な電子伝達機構を知るためには、より高い分解能のデータを得ることが必要とされていた。そこで、クライオプロテクトANTのスクリーニングを行い有効なクライオプロテクトANTを選び出し、二種類のクライオプロテクトANT溶液を組み合わせて用いることを試みた。その結果、スクロースとPEG200を組み合わせて用いた場合に、1.15 Å分解能の回折データが収集できるようになった。

### ② リン酸化酵素

一般的なクライオプロテクトANTであるグリセロールにソーキングした場合には、3.5 Å分解能の回折しか得ることができなかった。しかし、クライオプロテクトANTのスクリーニングを行い、有効なクライオプロテクトANT（ポリビニルピロリドンとエチレングリコール）を組み合わせて用いることで、2.5 Å分解能以上のデータを再現性良く得られるようになった。また、最高で2.15 Å分解能のデータを収集することができた。

### ③ SMP30

クライオプロテクトANTのスクリーニングを行った結果、グルコースやキシリトールが結晶の質を改善するために有効であることが明らかとなった。これらのクライオプロテクトANTにソーキングし凍結することにより安定して2.0 Å分解能以上のX線回折強度データを得ることができるようになり、X線結晶構造解析に成功した。この成果については、学術論文誌で成果発表を行った（雑誌論文1）

### ④ その他のタンパク質

現在、構造決定に向けてX線回折強度データの収集を行っている他のタンパク質結晶についても、クライオプロテクトANTのスクリーニングを行い結晶の質を改善することを進めている。スクリーニング及びデータ収集の効率化のために、様々なクライオプロテクトANT溶液にソーキングした結晶をロボットマウント用のカセットに詰めてX線回折データを収集している。

## 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 3 件）

1. S. Aizawa, M. Senda, A. Harada, N. Maruyama, T. Ishida, T. Aigaki, A. Ishigami, T. Senda, Structural basis of the  $\gamma$ -lactone-ring

formation in ascorbic acid biosynthesis by the senescence marker protein-30/gluconolactonase. *PLoS One.*, 査読有、8 (1)、2013、e53706、doi: 10.1371/journal.pone.0053706. Epub 2013 Jan 22.

2. T. Hayashi, M.Senda, H. Morohashi, H. Higashi, M. Horio, L. Nagase, D.Sasaya, T. Shimizu, N. Venugopalan, H. Kumeta, N. Noda, F. Inagaki, T. Senda, M. Hatakeyama、Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA、*Cell Host Microbe*、査読有、19、2013、20–33、doi: 10.1016/j.chom.2012.05.010.

3. M. Senda, A. Yamamoto, H. Tanaka, T. Ishida, K. Horiike, T. Senda、Crystallization and preliminary crystallographic analysis of D-aspartate oxidase from porcine kidney、*Acta Crystallogr Sect F*、査読有、68、2012、644–646、doi: 10.1107/S1744309112013243. Epub 2012 May 22.

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Toshiya Senda、Crystal quality improvement with cryoprotectants、International Conference on Structural Genomics 2013 –Structural Life Science、2013年7月30日、京王プラザホテル札幌（札幌）

2. Miki Senda、A novel approach of crystal-quality improvement by “the multi-step soaking method”、American Crystallographic Association Annual Meeting 2013、2013年7月24日、シェラトンワイキキホテル（ハワイ）

3. 千田 美紀、「multi-step soaking method」によるピロリ菌の発がんタンパク質 CagA 結晶の改善、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日、とりぎん文化会館（鳥取）

4. 千田 美紀、クライオプロテクトANTを用いた結晶工学的処理による *Helicobacter pylori* 由来 CagA 結晶の改善、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2012年9月21日、大阪大学（大阪）

5. Miki Senda、Improve the efficiency and reproducibility of protein crystallization、American Crystallographic Association Annual Meeting 2012、2012年7月31日、The Westin Boston Waterfront hotel（ボストン）

6. 千田 美紀、「すぐ見る法」による蛋白質の結晶化 ～スクリーニングの効率化と再現性の向上に向けて、第12回日本蛋白質科学会年会、2012年6月20日、名古屋大学（名古屋）

〔図書〕（計 1 件）

1. 千田 俊哉 他、羊土社、実験医学増刊構造生命科学で何がわかるのか、何ができるのか、2014、193

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千田 俊哉 (SENDA, Toshiya)

高エネルギー加速器研究機構

研究者番号：30272868