

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650026

研究課題名(和文)結晶非接触操作を可能にする結晶化促進剤充填ゲルカプセル内タンパク質結晶化法の確立

研究課題名(英文)Protein crystallization method in gel capsules with nucleants for contactless handling of crystals

研究代表者

菅原 道泰 (Sugahara, Michihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・特別研究員

研究者番号：00415192

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、タンパク質X線結晶構造解析において結晶非接触での操作を可能にするゲルカプセル内でのタンパク質結晶化技術を開発した。得られる結晶はゲルで保護されているため、結晶をマウントツールで拾い上げる際に物理的損傷を与えることなく、さらに結晶の抗凍結処理、重原子化、リガンドソーク等においては浸透圧による結晶の損傷を大幅に低減できる。本手法によりゲルカプセル内での10種のタンパク質の結晶化に成功した。それら結晶含有ゲルカプセルをそのまま用いて、100 Kの温度環境下での低mosaicityの回折データ収集、さらに、タンパク質結晶の白金重原子ソークに成功した。

研究成果の概要(英文)：A simple technique for protein crystallization in ionically cross-linked polysaccharide (alginate and carrageenan) gel capsules has been developed for contactless handling of crystals in X-ray crystallography. This method is designed to reduce mechanical damage to crystals caused by physical contact between crystal and mount tool and by osmotic shock during various manipulations including cryoprotection, heavy-atom derivatization and ligand soaking experiments. In this study, ten test proteins could be successfully crystallized in gel capsules. Two complete diffraction data sets from crystals of proteins in gel capsules were collected at 100 K without removing the crystals, showing that the crystals had low mosaicities. To demonstrate heavy-atom derivatization, lysozyme crystals were successfully derivatized with Pt atoms within alginate gel capsules. These results suggest that gel capsules prevent serious damage to protein crystals during such experiments.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質結晶化 ゲル ゼオライト 金属有機構造体

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析により得られるタンパク質立体構造は機能を理解するための重要な情報源の一つであり、生命現象の解明、創薬研究等に利用できることから、ライフサイエンスにおいて構造解析は急速に普及されつつある。近年、X線結晶構造解析の手法・装置は飛躍的に発展したが、従来法では回折実験に適した良質結晶が得られない多くのタンパク質があり、また物理的に壊れやすいタンパク質結晶のハンドリングも問題となっている。したがって、構造生物学のさらなる発展向け、これら問題の早期解決が望まれる。

2. 研究の目的

本研究はタンパク質 X 線結晶構造解析においてボトルネックであるタンパク質結晶化、さらに回折実験のための結晶ハンドリング問題を解決することを目的とした。ゲル環境下でのタンパク質結晶化は溶液の対流、析出した結晶の沈降を抑制できることから、多くの場合、良質タンパク質結晶が得られる。また、我々はこれまで、マイクロ孔、および金属を有する結晶性材料の合成ゼオライト・モレキュラーシーブ (MS) がタンパク質結晶化促進物質として利用できることを見出した。MS は様々なタンパク質の結晶化を促進するが、全てのタンパク質に利用できるわけではない。そこで本研究では、ゲルカプセル内でタンパク質結晶化を行い、さらに結晶化が困難なタンパク質のために、結晶化促進物質を調査・導入することで、良質タンパク質結晶の獲得を試みた。

また、ゲルカプセル内で析出した結晶を直接回折計にマウントすることで、結晶非接触でのハンドリングが可能になる。従来法では、クライオルーブ等の結晶マウントツールを用いて結晶を結晶化プレートから拾い上げるが、マウントツールが結晶に接触して損傷を与えてしまい、物理的に壊れやすい結晶のハンドリングは困難であった。さらに、クライオプロテクタント処理、タンパク質結晶の重原子化、リガンドソーク実験を行うにあたっては、多くの場合、浸透圧などにより結晶に損傷を与えてしまう。一方、ゲルで保護された結晶の利用は急激な浸透圧変化を回避できるため、結果として結晶損傷を低減できる。そこで、ゲルカプセル内タンパク質結晶を利用した 100 K の温度環境下での回折データ収集法の確立に加え、重原子等のリガンドソークを行い、その実用性を調査した。

3. 研究の方法

ゲルカプセル内タンパク質結晶化では、アニオンポリマーのアルギン酸がカルシウムイオンとの架橋により形成するゲルを用いた。最初に 0.2 M 塩化カルシウム含有結晶化溶液 1.0 μ l を結晶化プレート (72-well Nunc HLA crystal plate, Nalge Nunc International)に

分注し、20 μ l のパラフィンオイルでカバーした。そのパラフィンオイル層にタンパク質を含有する 1% (w/v)アルギン酸溶液 (154725, Wako Pure Chemical Industries) 0.5 μ l を分注した。その溶液ドロップが沈降し、カルシウム含有結晶化溶液と接触させることでゲルカプセルを作製した。また、ゲル化にカルシウムを必要とするアルギン酸はその結晶化条件に制限があるため、カリウム等のカチオンを架橋剤として利用できる 0.75% (w/v) κ -カラギーナン(22048, Sigma)を用いてゲルカプセルを作製した。結晶化では lysozyme, glucose isomerase, xylanase, catalase, streptavidin, thermolysin, および *Thermus thermophilus* HB8 由来 ID00367, ID70102, ID00403 タンパク質, *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来 ID11055, ID11492, ID70067 タンパク質を用いた。また本結晶化では独自に開発した初期スクリーニング用結晶化試薬 70 種を用いた。ゲルカプセルの自動結晶化の試みでは、市販タンパク質結晶化装置 mosquito (TTP LabTech) を利用した。

重原子化実験では、lysozyme 結晶含有アルギン酸ゲルカプセルをそのまま 20 mM K_2PtBr_6 溶液に 24 時間浸した。これらタンパク質結晶含有ゲルカプセルは、シリンジニードル(ST-C0.2, MIRUC OPTICAL CO. LTD.)をマウントした真空ピンセット(PRO-SERIES PEN-VAC, Virtual Industries, inc.)で拾い上げ、クライオ処理を行った後、液体窒素タンクに保存した。回折データはインハウス回折計、および SPring-8 BL26 を利用して収集した。

タンパク質結晶化促進物質の調査では、有する細孔径、骨格構造が異なる 4 種の MS, Molecular Sieves 3A (134-06095, Wako Pure Chemical Industries, Ltd), Molecular Sieves 4A (137-06085, Wako Pure Chemical Industries, Ltd), Molecular Sieves 5A (130-06075, Wako Pure Chemical Industries, Ltd), および Molecular Sieves 13X (131-0708, Wako Pure Chemical Industries, Ltd)に加えて、金属と有機リガンドによる多孔性配位ネットワーク構造を持つ 5 種の金属有機構造体 (MOF), aluminum terephthalate (688738, Aldrich), 2-methylimidazole zinc (691348, Aldrich), iron benzene-1,3,5- tricarboxylate (690872, Aldrich), copper benzene-1,3,5-tricarboxylate (688614, Aldrich), および magnesium formate (713716, Aldrich)を使用した。

4. 研究成果

アルギン酸ゲルカプセル内での 12 種類のタンパク質結晶化を試みた結果、10 種類のタンパク質の結晶化に成功した (その一例、図 1a)。一方、ゲル化にカルシウムを必要としない κ -カラギーナンを用いて 5 種のタンパク質 (lysozyme, glucose isomerase, xylanase, ID11492, および ID70067) の結晶化を行った結果、全てのサンプルで結晶を得ることに成

功した。これら 0.5 μl のサンプル分注により形成されたゲルカプセルの直径は 0.5-0.9 mm 程度であった。

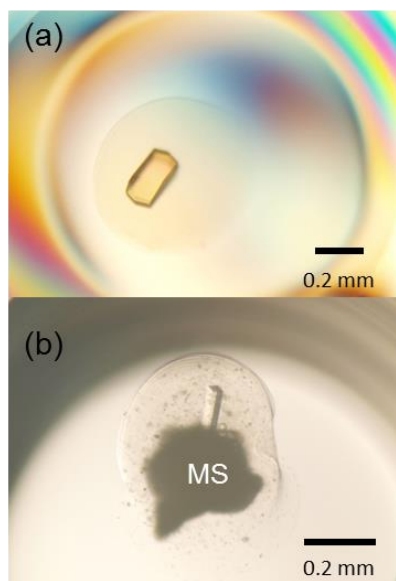


図 1. ゲルカプセル内で析出したタンパク質結晶。(a)アルギン酸ゲルカプセル内で析出した lysozyme の結晶。(b) アルギン酸ゲルカプセル内に導入した MS の表面から析出した glucose isomerase の結晶。

タンパク質結晶含有ゲルカプセルをそのまま用い(図 2)、結晶非接触による回折データの収集を SPring-8 BL26 で行った。その結果、lysozyme では回折分解能 1.18 Å, mosaicity 0.19° のデータ収集に成功した。一方、カラギーナンゲルから析出した ID70067 タンパク質でも、回折分解能 2.4 Å, mosaicity 0.19° の良質回折データ収集に成功した。結晶化の際、タンパク質含有アルギン酸溶液 1 μl の分注では得られるゲルカプセルのサイズが大きく、その回折データにおいては mosaicity が 0.5° 以上と高い値を示した。これは、クライオ処理時において、その体積ゆえにゲルカプセルの冷却速度が遅くなるためと考えられる。したがって、サンプル分注量は 0.5 μl で行うのが良い。次に、タンパク質結晶含有ゲルカプセルを用いて、室温での回折データ収集を試みた。しかしながら、室温では約 5 分程度でゲルカプセル表面から塩の結晶が析出した。室温での回折実験を行うにあたっては、ゲルカプセルをパラトン等のオイルでコートすることで、塩の析出を防ぐことができる。次に、インハウス回折計 (CuK α 線) を利用し、lysozyme 結晶含有ゲルカプセルからの回折データ収集を行った。その結果、タンパク質が有する硫黄原子を利用した単波長異常散乱法 (S-SAD 法) による構造決定に成功した。この結果から、ゲルカプセルに由来する散乱バックグラウンドノイズは回折データの質に大きく影響を及ぼすことはな

いと考えられる。また、ゲルカプセル内結晶への白金重原子ソークを試みた結果、SAD 法による構造決定に成功した。これら結果から、ゲルカプセル内での良質タンパク質結晶の獲得に加え、クライオプロテクタント、重原子処理における浸透圧による結晶損傷の低減が確認でき、良質回折データの収集が本手法により可能であることを実証した。



図 2. 回折実験のために、シリンジニードル先端でマウントしたタンパク質結晶含有ゲルカプセルの写真。

MS は 30 種以上のタンパク質の結晶化を促進するが、結晶が得られないタンパク質もある。そこで本研究では、金属有機構造体 (MOF) をタンパク質結晶化に導入し、タンパク質結晶化促進物質としての有用性を調査した。MOF は MS 同様に、マイクロ孔、および金属を有する結晶性物質である。MOF 共存下でタンパク質結晶化を行った結果、aluminum terephthalate, 2-methylimidazole zinc, および magnesium formate が幾つかのタンパク質の結晶化を促進し、回折高分解能を有する良質単結晶が得られた(図 3)。また、lysozyme の場合、MS よりも MOF の方が結晶化を促進した。これら多くの場合、同一結晶化条件にも関わらず、MOF と MS 共存下で得られる各結晶は空間群、もしくは格子定数が異なった。これは、タンパク質結晶がヘテロエピタキシャル結晶成長により析出するため、結晶性物質である MS、および MOF との格子整合に大きく依存した結果であると考えられる。結晶化の結果、MS、および MOF は、それぞれ結晶化を促進するタンパク質が異なった。また、MS は MOF よりも様々なタンパク質結晶化を促進し、ポリエチレングリコール等の高粘度結晶化条件で良質単結晶が析出する傾向があるが、塩化ナトリウム等の高濃度塩含有結晶化条件では塩結晶のみが MS 表面上で析出した。一方、MOF は高濃度塩含有結晶化条件でも良質タンパク質結晶を析出する傾向があった。したがって、MS と MOF を相補的に利用することで効率良く

タンパク質結晶を獲得できるであろう。また、これら幾つかの結晶化促進物質を導入して3種の膜タンパク質の結晶化を行った結果、2サンプル（内1サンプルは lipidic cubic phase 法による）については結晶化促進物質としての効果を確認することができなかったが、1サンプルでは結晶化促進物質非共存下の場合と比較して、得られる結晶のサイズが2~3倍大きくなった。しかしながら、回折分解能の大幅な向上は確認できなかった。結晶化促進物質を導入した膜タンパク質の結晶化については、適した結晶化条件等の更なる調査が必要である。

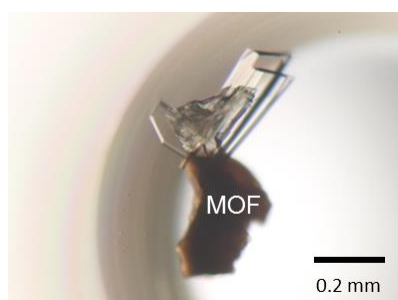


図3. MOFの aluminum terephthalate 表面から析出したタンパク質結晶。MOF非共存下で得られる結晶と比較して、良質結晶が析出する。

次に、タンパク質結晶化促進物質をゲルカプセル内に導入した結晶化を行った。その結果、ゲルカプセル内の結晶化促進物質（MS）表面からタンパク質結晶を析出させることに成功した（図1b）。得られた結晶含有ゲルカプセルをそのまま用いて SPring-8 BL26 で回折データ収集を行い、ゲルビーズ、およびタンパク質結晶化促進物質を併用することで良質回折データを得ることができた。

研究期間全体を通じて、ゲルカプセル内でのタンパク質結晶化、さらにタンパク質結晶化促進物質をゲルカプセル内に導入したタンパク質結晶化法を確立した（発表論文 No. 3）。また、タンパク質結晶含有ゲルカプセルを用いて重原子等のリガンドソーキングが行えることを実証し、凍結保存から放射光を利用した回折データ収集を可能にした。さらに、自動結晶化装置 mosquito (TTP LabTech) を用いてゲルカプセル内タンパク質結晶化を試みた結果、ゲル化剤含有タンパク質溶液0.5 μ lでの微量分注による初期スクリーニングが可能であることを実証した。

本研究においてゲルカプセル材料として検討したハイドロゲル等の高粘度物質は、X線自由電子レーザー（XFEL）施設 SACLA を利用した連続フェムト秒結晶構造解析（SFX）において、タンパク質結晶輸送媒体として利用できることを見出した（発表論文 No. 1, 2）。

SFX では、サンプルインジェクターから噴出した多数の微小結晶を含む液体に X 線レーザーを照射し、各結晶からの回折データを連続的に収集する。SFX は常温で実験を行え、また試料の放射線損傷の問題も解決できる。しかしながら、タンパク質結晶を連続的に X 線レーザーの照射ポイントに供給するには大量の試料が必要であった。そこで、結晶輸送媒体として高粘度のハイドロゲル等を利用することで結晶試料を低速で吐出し、その結果、従来の吐出方法と比べて約 1/10~1/100 のタンパク質消費量（1 mg 程度）で結晶構造を決定することが可能になった。この様に、ハイドロゲルはゲルカプセルにおける良質タンパク質結晶の獲得から、ハンドリングにおける結晶の保護に利用でき、また、タンパク質結晶に損傷を与えにくいハイドロゲル等はそのまま SFX におけるタンパク質結晶輸送媒体として利用できた。

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) Michihiro Sugahara, Changyong Song, Mamoru Suzuki, Tetsuya Masuda, Shigeyuki Inoue, Takanori Nakane, Fumiaki Yumoto, Eriko Nango, Rie Tanaka, Kensuke Tono, Yasumasa Joti, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Makina Yabashi, Osamu Nureki, Keiji Numata & So Iwata, Oil-free hyaluronic acid matrix for serial femtosecond crystallography. *Scientific Reports*, **6**, 24484 (2016). 査読有
DOI:10.1038/srep24484
- (2) Takanori Nakane, Changyong Song, Mamoru Suzuki, Eriko Nango, Jun Kobayashi, Tetsuya Masuda, Shigeyuki Inoue, Eiichi Mizohata, Toru Nakatsu, Tomoyuki Tanaka, Rie Tanaka, Tatsuro Shimamura, Kensuke Tono, Yasumasa Joti, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Makina Yabashi, Osamu Nureki, So Iwata & Michihiro Sugahara, Native sulfur/chlorine SAD phasing for serial femtosecond crystallography. *Acta Crystallogr. D* **71**, 2519–2525 (2015). 査読有
DOI:10.1107/S139900471501857X
- (3) Michihiro Sugahara, A technique for high-throughput protein crystallization in ionically cross-linked polysaccharide gel beads for X-ray diffraction experiments. *PLoS ONE*, **9**, e95017 (2014). 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0095017

〔学会発表〕（計 6 件）

- (1) 菅原道泰, 「シリアルフェムト秒結晶構

造解析のための汎用的タンパク質キャリア「グリースマトリックス」第15回蛋白質科学会年会（2015年6月24日～26日，発表日24日，徳島あわぎんホール）

- (2) 菅原道泰，国島直樹，「結晶化促進物質を利用したタンパク質結晶化」平成26年度日本結晶学会年会（2014年11月1日～3日，東京大学農学部）
- (3) 菅原道泰，国島直樹，「自動ゲルビーズ内タンパク質結晶化スクリーニング」第87回日本生化学会大会（2014年10月15日～18日，京都国際会議場）
- (4) 菅原道泰，国島直樹，「多糖ゲルビーズ内タンパク質結晶からのX線回折データ収集」第14回日本蛋白質科学会年会（2014年6月25日～27日，ワークショップ横浜/横浜産貿ホール マリネリア）
- (5) 菅原道泰，国島直樹，「結晶非接触操作を可能にするゲルカプセル内でのタンパク質結晶化法」平成25年度日本結晶学会年会（2013年10月12日～13日，熊本大学 黒髪キャンパス）
- (6) 菅原道泰，国島直樹，「多糖ゲルカプセル内でのタンパク質結晶化」第86回日本生化学会大会（2013年9月11日～13日，パシフィコ横浜）

〔図書〕（計 1件）

- (1) タンパク質結晶の最前線【第V編 総合編】タンパク質結晶の設計を目指した要素技術開発，菅原道泰，国島直樹，ページ249-256，監修：杉山成，シーエムシー出版，発行日：2013年12月25日。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2件）

名称：METHOD FOR FORMING PROTEIN CRYSTAL

発明者：菅原道泰

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：出願

番号：US 13/474,984

出願年月日：平成24年5月18日

国内外の別：国外

名称：タンパク質結晶製造方法

発明者：菅原道泰

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特願

番号：2012-107521

出願年月日：平成24年5月9日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 道泰 (SUGAHARA MICHIHIRO)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・特別研究員

研究者番号：00415192