

タンパク質シェル構造体エンカプスリンの構造化学的研究

Structural studies on protein-based microcompartment (encapsulin)
from *Rhodococcus erythropolis* N771野口恵一^{1*}, 藤井基子², 福谷洋介², 尾高雅文³, 養王田正文²¹東京農工大学機器分析施設 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16,²東京農工大学大学院工学研究院, 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16³秋田大学大学院工学資源学研究科 〒010-8502 秋田県秋田市手形学園町 1-1,Keiichi Noguchi^{1*}, Motoko Fujii², Yosuke Fukutani², Masafumi Odaka³ and Masafumi Yohda²¹Instrumentation Analysis Center, Tokyo University Agriculture & Technology,
2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan²Graduate School of Technology, Tokyo University Agriculture & Technology,
2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan³Graduate School of Engineering and Resource Science, Akita University,
1-1 Tegata Gakuen-machi, Akita City, Akita 010-8502, Japan

1 はじめに

酵素や基質の濃度を高め、特定の反応や一連した反応を効率的に行うために、全ての生命体は細胞内の区画化を行っている。真核生物では、ミトコンドリア、リソソーム、ペルオキシソームといった生体膜で囲まれた細胞内小器官がその区画に相当し、一方、ある種の微生物は細胞内にタンパク質のサブユニットのみから構成された微小区画を有することが知られている。微生物の微小区画（バクテリアマイクロコンパートメント、以下 BMC）は、4~7 種のサブユニットが集合することにより形成された直径 100~150 nm の多面体の殻（シェル）構造中に特定の代謝反応に関与するタンパク質を内包したものであり、その代表例として、炭素固定を行う反応場として機能するカルボキシソームや、細胞毒性が高い代謝反応中間生成物を隔離し、エタノールアミン、または、1,2-プロパンジオールの代謝を行うメタボロソームが挙げられる。

近年、好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来の機能未知タンパク質の構造学的研究により、BMC よりも小さな球状ナノ構造体が発見された[1]。エンカプスリンと命名されたこの構造体は、5 個のサブユニットにより形成された五角形構造が 12 個集合した直径 20 nm 程度のホモ 60 量体であり、内部にペルオキシダーゼ、またはフェリチン様タンパク質を内包し、有害物質から細胞を保護すると考えられている。また、ウィルスのカプシドという観点から構造研究が行われてきた超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来のウィルス様粒子構成タンパク質[2]やバクテリオファージ HK97 カプシドタンパク質 gp5 は[3]、それぞれ、直径 30 nm 程度のホモ 180 量体、直径 55 nm 程度のホモ 420 量体というエンカプスリンより大きな構造体を形成することが知られているが、これらのサブユニット構造はエンカプスリンに極めて類似

している。従って、エンカプスリンサブユニットと同じファミリーに属するタンパク質はサイズ、内包する酵素、機能等の異なるシェル構造体を構成する可能性が予想されるが、関連した構造的知見は上記の 3 例のみであり、その詳細に関してはほとんど明らかとなっていない。

最近、我々は、放線菌 *Rhodococcus erythropolis* N771 から *T. maritima* 由来エンカプスリンと相同性の高い遺伝子の単離、大腸菌を用いた組換え体としての発現、目的タンパク質（分子量 30 kDa）の精製に成功し、精製物の電子顕微鏡観察を行ったところ、直径 20nm 程度の球状粒子の形成を確認することができた（図 1）。さらに、流動場分離多角度光散乱法により測定した分子量が約 1.8 MDa であったことから、観察された構造体は *T. maritima* 由来エンカプスリンと同様にホモ 60 量体を形成していると考えられた[4]。

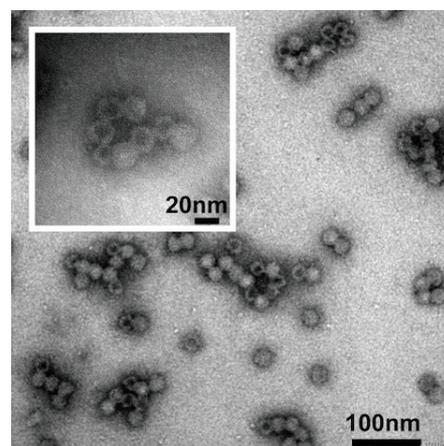


図 1 : 放線菌 *Rhodococcus erythropolis* N771 由来エンカプスリンの透過電子顕微鏡観察像（ネガティブ染色）。

そこで、エンカプスリンの構造形成原理を明らかにすることを目的に、獲得した安定な構造体である *R. erythropolis* N771 由来エンカプスリンを出発材料として、変異導入による構造やその安定性、内包酵素の選択性などに与える影響について検討を行っているが、その詳細を明らかにするには放射光を用いて収集・解析した高分解能構造データに基づいた議論が必須であることから、結晶化と構造解析を進めている。

2 実験

野生型エンカプスリンについて結晶化条件のスクリーニングを行い、X線回折測定に適した外形と大きさの結晶が成長する2種類の条件を得た。X線回折測定は高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設の BL-5A、BL-17A ビームラインで行い、回折データの処理にはデータ処理ソフトウェア HKL2000 を用いた。

3 結果および考察

2014年10-12月期のビームタイム中に結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果をもとに、比較的高分解能の回折像を与えた結晶について結晶化条件の検討を進め、2015年5-6月期のビームタイム中に、単位格子が、三方晶、 $a = 235.5 \text{ \AA}$, $\alpha = 63.2^\circ$ の結晶について、分解能 3.3 \AA の回折データを収集することができた。

自己回転関数の計算を行った結果(図2)、60量体構造を示唆する2回軸、3回軸、5回軸の存在を確認することができた。現在構造解析を進めている。

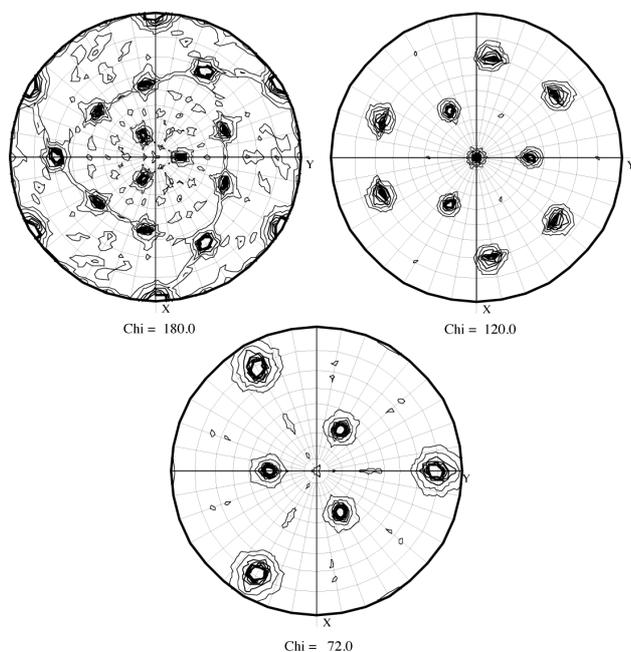


図2：自己回転関数の計算結果（2回軸、3回軸、5回軸の確認）。

4 まとめ

さらに結晶化条件の最適化を進め、2015年10月以降のビームタイムでは、マイクロビームラインを用いてより高分解能データの収集を行う予定である。

参考文献

- [1] M. Sutter et al., *Nat. Struct. Biol.*, **15**, 939 (2008).
- [2] F. Akita et al., *J. Mol. Biol.*, **368**, 1469 (2007).
- [3] C. Helgstrand et al., *J. Mol. Biol.*, **334**, 885 (2003).
- [4] A. Tamura et al. *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 13 (2015).

* knoguchi@cc.tuat.ac.jp