

ヒトノイラミニダーゼの X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of the human neuraminidase

小祝孝太郎^{1*}, 湯本史明¹, 千田俊哉¹

¹高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・構造生物学研究センター,
〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Kotaro Koiwai¹, Fumiaki Yumoto¹ and Toshiya Senda¹

¹Structural Biology Research Center, Institute of Materials Structure Science, KEK/High Energy
Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

1 はじめに

糖鎖の蓄積は、特定疾患難病ガラクトシアリドーシス (GSD)・シアリドーシス (SD) を引き起こす。GSD・SD は日本人の約 10 万人に 1 人の割合で発症するが、世界の症例の約 60%が日本人で占められている。GSD・SD 患者は出生後、重度の発育・知的・運動障害を発症する。その原因は、糖鎖分解酵素ノイラミニダーゼ NEU1 の変異によるノイラミニダーゼ活性の減少と、それに伴う細胞内での糖鎖の蓄積である [1]。

ノイラミニダーゼ (NEU) は、タンパク質や脂質に付加された糖鎖を加水分解する酵素である。ヒトは 4 種類の NEU をもち、その内 NEU1 は細胞内でタンパク質や糖鎖を分解するリソソームに局在する。これまでに、GSD・SD 患者の NEU1 変異は 25 変異が報告されているが、多くの変異は活性中心とは異なる領域に局在しており、どのような分子機構で NEU1 変異が GSD・SD の発症に起因するのかが不明である。このような背景の下、GSD・SD の治療法の確立を目指し、ヒト NEU の構造決定が挑戦されているが、NEU1 が 1967 年に発見されて以来 [2]、未だそれに成功していないのが現状である。

NEU1 は、大腸菌発現系のポリペプチドでは NEU 活性がなく、昆虫細胞発現系のポリペプチドでは自己凝集するために結晶どころか十分なサンプルを調製することも困難である。これは NEU1 自身の糖鎖修飾と、リソソーム内でのカセプシン A との相互作用が必要であるためである [3]。

連携研究者である徳島大学 伊藤孝司 教授は、これらの問題を解決するために、哺乳動物細胞発現系を用いた NEU1 の精製を試みた。驚くべきことに、過剰発現させた NEU1 は細胞内で結晶化した。細胞内結晶は稀にはあるが、タンパク質を細胞内に過剰発現させると創出する例があり、近年では、非常に小さな細胞内結晶からでも構造解析が可能となっており、構造解析のための有用な手段となりつつある。

本研究は、NEU1 結晶構造を決定し、GSD・SD 患者の NEU1 変異がなぜノイラミニダーゼ活性を減少させるのかを解明することによって、その治療法の確立の基盤を構築することを目的としている。本実験課題期間内において、NEU1 細胞内結晶の作成法および調製法を、抽出条件と X 線回折データと比較することで確立し、NEU1 タンパク質の結晶構造

を、細胞内結晶化法によって得られた NEU1 結晶から、放射光を用いて解明することを目的とした。

2 実験

本研究に用いた手法の概略は以下の通りである。

哺乳動物細胞を用いて、NEU1 タンパク質を過剰発現させることによって細胞内で結晶を創出させ、細胞内から結晶を抽出・調製した。抽出した結晶を抗凍結処理し X 線回折実験と結晶構造解析を行った。また、抽出した結晶を溶解させ、NEU1 タンパク質を精製した。精製 NEU1 タンパク質を用いて、試験管内で結晶化条件を網羅的に探索した。

各段階において、条件検討を行い、NEU1 タンパク質の結晶構造の解明を目指すとともに、細胞内結晶化という新しいタンパク質結晶調製法の確立を行った。

3 結果および考察

本研究において、最も重要な点は、いかに結晶創出細胞数を増やし、最終的な結晶をいかに多く抽出するか、であった。

細胞内での結晶化の効率の向上のために、まず、各種培養細胞株の検討を行った。ヒト胎児腎臓細胞株、CHO 細胞株、HeLa 細胞株を検討したところ、ヒト胎児腎臓細胞株 (HEK 293FT 細胞株) が最も高収率で NEU1 細胞内結晶を抽出することができることを突き止めた。

HEK 293FT 細胞株を用いても、結晶創出の効率は全培養細胞のうち 1%程度の結晶創出効率であった。我々は、細胞内でのタンパク質の結晶化には、タンパク質のターンオーバー以上の、過剰なタンパク質発現が必要であると考え、まず、NEU1 安定過剰発現細胞を作成した。NEU1 安定過剰発現細胞は、NEU1 タンパク質の発現量は向上したが、通常の培養条件下では、結晶を十分には創出しなかった。

そこで、我々は、NEU1 安定過剰発現細胞に NEU1 過剰発現プラスミドを再度遺伝子導入することで NEU1 をさらに過剰に発現させた。その結果 5 倍の効率で NEU1 細胞内結晶を創出させることに成功した。また、細胞培養方法を検討し、より簡便かつ高純度に細胞内結晶を抽出し、精製する手法を開発した。

X 線回折実験および、その後のタンパク質溶液の調製には、高純度で結晶を調製することが重要な課

題であった。細胞から結晶を抽出するには、界面活性剤を用いて、細胞膜を溶解させる必要があり、既に連携研究者である徳島大学伊藤孝司教授が確立していた緩衝液の条件を採用した。しかしながら、その手法では、結晶の濃縮の妨げとなる細胞の核を破碎することはできず、大きな問題となっていた。そこで、本研究者は、抽出バッファー条件を検討することで、細胞の核は破碎されるが、結晶が安定に保存できる条件を見出した。これによって、これまでの100倍以上の高純度の結晶懸濁液を調製することが可能となった。

調製した NEU1 細胞内結晶を用いて、BL-1A にて X 線回折実験を行った。BL-1A での X 線回折実験によって初めて放射光を用いた NEU1 細胞内結晶の X 線回折像を取得することに成功した。X 線による損傷が激しかったため、回折像は各結晶につき1枚が限界であったが、およそ 9 - 20 Å の分解能の回折斑点を観測することに成功した。

また、本研究内にて改善された手法を用いることで、安定かつ定期的に細胞内結晶を抽出することが可能となったため、タンパク質として精製するための条件検討が容易となった。結晶を溶解する際のバッファー条件と、カラムクロマトグラフィの条件を検討することで、定期的に良質な NEU1 蛋白質溶液を調製することが可能となった。

4 まとめ

上述の結晶調製法と、タンパク質精製法を用いることで、現在、網羅的な結晶化条件の探索を行うまでに至っている。

研究期間内に、NEU1 分子構造を決定するに足りうる良質な結晶を作成するには至らなかったが、本研究中で確立した NEU1 蛋白質溶液調製法と、NEU1 蛋白質再結晶化条件を基にして、近い将来 NEU1 蛋白質の分子構造を決定することが期待出来る。

謝辞

本研究は、創薬等支援技術基盤プラットフォームおよび高エネルギー加速器研究機構の多くの方々のご支援を受けて本研究を実施することができました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Monti *et al.*, *Adv Carbohydr Chem Biochem* (2010).
- [2] Mahadevan *et al.*, *J Biol Chem* (1967).
- [3] Bonten *et al.*, *J Biol Chem* (2009).

* koiwaiko@post.kek.jp