

中空状の蛋白質結晶へのタンパク質ゲストの包摂 Encapsulation of proteinous guest into hollow protein crystal

橋本翼¹, 早河瑞希¹, 松井崇¹, 田中良和^{1,2,*},

¹東北大学大学院生命科学研究所 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

²さきがけ, JST, 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

Tsubasa HASHIMOTO¹, Mizuki HAYAKAWA¹, Takashi MATSUI¹ and Yoshikazu TANAKA^{*1,2}

¹Faculty of Life Sciences, Tohoku University,

2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, 980-8577, Japan

²Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency (JST), 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, 980-8577, Japan

1 はじめに

タンパク質の三次元立体構造は NMR, X 線, 電子顕微鏡により決定できる。しかし, NMR と電子顕微鏡はそれぞれ対象とする分子量が 2 万ダルトン以下または数十万ダルトン以上と, 分子量的な制約のため多種多様なタンパク質の立体構造解析には適用できない。一方, X 線結晶構造解析によるタンパク質の立体構造決定には分子量の制約はないものの, タンパク質を結晶化させることが必須とある。しかし, すべてのタンパク質やタンパク質-基質複合体, タンパク質複合体などが容易に結晶化するわけではなく, 結晶化は X 線結晶構造解析におけるボトルネックとなっている。低分子化合物においては, 近年, 結晶スポンジ法が開発され, 予め用意しておいたケージ構造を持つ結晶に目的化合物を吸い込ませることにより, 目的化合物の結晶化条件を探索することなく, ケージ内にトラップされた目的化合物の構造を決定できるようになった [1]。そこで, 本研究ではこの概念をタンパク質の立体構造解析に適応するための方法論の確立を目指した。

2 実験

我々は分子量約 4MDa からなるスルメイカ由来の酸素運搬タンパク質, ヘモシアニンの結晶構造解析に成功している [2]。ヘモシアニンの構造はドーナツ状の中空構造を持つ。中空領域は 110 Å の内径と, 高さが 330 Å の空間である。また, 結晶のパッキングから, この中空構造は結晶軸上に平行に配列することでストロー状の構造を取る (図 1A)。この結晶構造の特徴から, ストロー状の中空構造はタンパク質に対する『結晶スポンジ』として利用できると考え, はじめにヘモシアニン分子中に GFP を取り込んだ結晶を作成した。

PEG400 を含む結晶化溶液を用い, 精製したスルメイカ由来ヘモシアニンと GFP の共結晶を作成した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶中に GFP が取り込まれていることを

共焦点レーザー顕微鏡により確認した (図 1B)。これらの結晶を液体窒素下で急速冷凍して Uni-Puck に充填し, Photon Factory BL-1A にて X 線回折像を取得した。

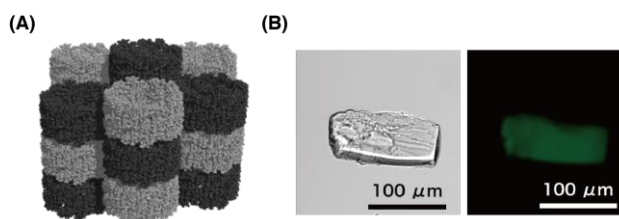


図 1. ヘモシアニン結晶. (A) ヘモシアニン結晶中のパッキングの様子. (B) GFP 共結晶の明視野および GFP 蛍光の様子.

3 結果および考察

得られた結晶は X 線により損傷しやすく, また, 結晶の部位によってモザイシティが高いために 1 個の結晶からでは解析可能なデータセットを取得できなかった。そこで, 複数の結晶のデータセットを取得し, 微小結晶用の自動処理システム kamo [3] によって処理することで同型性の高い 7 つの結晶データをマージした (表 1)。さらに, ヘモシアニンの 5 回対称性をもとに NCS アベレージングした結果, 中空構造中に大きさのある blob 状の電子密度を確認した。今後, SeMet 標識 GFP との共結晶を作成し, この電子密度が GFP に由来するものであることを確かめ, GFP の構造決定へと繋げていく。

表 1. 同型性の 7 個の結晶をマージした統計値

分解能 (Å)	50.0-6.00 (6.36-6.00)	Completeness (%)	97.3 (97.8)
I/σ(I)	4.52 (2.18)	CC(1/2)	96.7 (68.4)
R _{factor} (%)	31.4% (87.1%)	Multiplicity	6.64 (6.73)

参考文献

- [1] Y. Inokuma, et al., *Nature* **495**, 461-466 (2013).
- [2] Z. Gai, et al., *Structure*. **23**, 2204-2212 (2015).
- [3] K. Yamashita, et al., *Acta Cryst.* **D74**, 441-449 (2018).

* yoshikazu.tanaka@tohoku.ac.jp