

多孔性タンパク質結晶の空隙を利用した新規な結晶構造解析法

A novel strategy for crystal structure determination using highly-porous protein crystal.

真板 宣夫*

徳島大学 先端酵素学研究所, 〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15

Nobuo Maita

Institute of Advanced Medical Sciences, University of Tokushima,
3-18-15 Kuramotocho, Tokushima, 770-8503, Japan

1 はじめに

タンパク質の結晶構造解析では良質の結晶が必須だが、結晶化条件を見つけるためには数多くの条件を試す必要があるため、結晶化が一番のボトルネックになっている。空隙の大きい結晶格子を作りその内部に構造解析したい分子をうまく結合させることが出来れば、結晶化条件探索の困難を解消することが出来る。このアイデアは低分子化合物においては“結晶スポンジ法”ですでに実現されている[1]が、分子量の大きいタンパク質では困難であった。

克服すべき課題は、(1)タンパク質が入る十分な大きさの格子が必要、(2)構造解析したいタンパク質を高い占有率で格子内に結合させること、の2点であるが、溶媒領域の大きな結晶を作るタンパク質に、遺伝子工学により融合させればこれを達成することが出来る。私が以前構造解析した R1EN は内径 110 Å のハニカム構造の結晶格子で[2]、これを利用して融合させたタンパク質の結晶構造解析が可能かどうか試みた[3]。

2 結果と考察

R1EN 結晶格子の空隙には理論上 21kDa 程度までのタンパク質を融合させることが出来る。融合させるモデルタンパク質としてユビキチンを用いた。R1EN のコア部分からリンカーの長さを 3, 5, 7, 11 残基のコンストラクト（それぞれ R1EN₂₂₃-Ub, R1EN₂₂₅-Ub, R1EN₂₂₇-Ub, R1EN₂₃₁-Ub）を作製し、これにユビキチンを融合させた。それぞれのタンパク質を精製し、R1EN 単独の場合と同じ結晶化条件で結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。そこでまず R1EN 単独の結晶を作り、これを種結晶としてマイクロシーディングを行ったところ、外見が R1EN 単独と全く同じ結晶が成長した。

これらの結晶を Photon Factory (AR-NE3A)または SPring-8 (BL44XU)でX線を照射し、R1EN₂₂₃-Ub は 1.7 Å、R1EN₂₂₅-Ub、R1EN₂₂₇-Ub、R1EN₂₃₁-Ub は 2.4 Å までの回折データを取得した。単位胞、空間群の値は R1EN 単独の結晶と同一であった。R1EN 構造を用いた分子置換で処理したところ、R1EN₂₂₃-Ub、R1EN₂₂₅-Ub、R1EN₂₂₇-Ub はユビキチンの電子密度が確認できたが、R1EN₂₃₁-Ub は見えなかった。これはリンカーが長くユビキチンの可動域が大きくなったためと考えられる。また、R1EN₂₂₃-Ub はユビキチン

の電子密度が 1 分子(Ub1)見えたが、R1EN₂₂₅-Ub、R1EN₂₂₇-Ub は 2 分子(Ub1&Ub2)見えた。これは、空隙内にユビキチンが結合しうる場所が 2 か所あり、リンカーが短い場合は片方にしか届かないためと考えられた。これらのユビキチンの構造は、既に報告されているものと比較して、ほとんど同じ (C α の RMSD : ≤ 0.53 Å) であり、この手法の有用性が示された。R1EN の分子置換だけでユビキチンの構造が得られるか試したところ、R1EN₂₂₃-Ub のデータで buccaneer を用いて 90%以上の残基を正しくモデリング出来た。

結晶中のユビキチンの相互作用を詳しく見ると、 $\alpha 1$ の部分でお互いが衝突しているように見えた。R1EN₂₂₅-Ub、R1EN₂₂₇-Ub から推察すると、4 分子の R1EN-Ub が 1 つのユニットを形成しており、Ub1 と Ub2 それぞれ 2 分子ずつの構造を取っていると考えられる。ハニカムの c 軸に沿った柱はそれぞれ独立であるため、それらが混ざった状態で衝突しているように見えていると考えられる。

また、R1EN の N 末端とユビキチンが相互作用していたが、この N 末端は R1EN 単独構造ではディスオーダーしていた領域であり、ユビキチンとの相互作用で構造が固定された事がわかる。

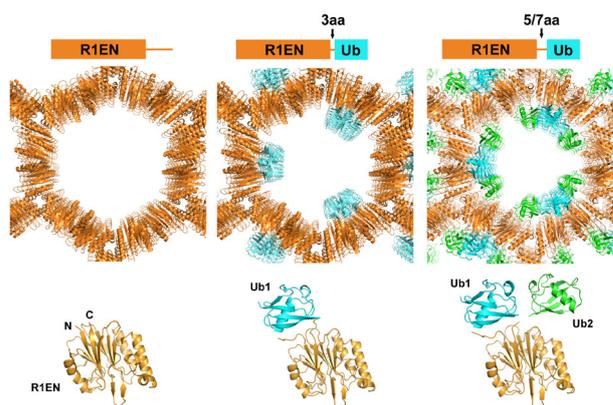


図 1 : R1EN 単独 (左) と R1EN-Ub の結晶格子 R1EN₂₂₃-Ub (中央) と、R1EN₂₂₅-Ub、R1EN₂₂₇-Ub (右) を示す。

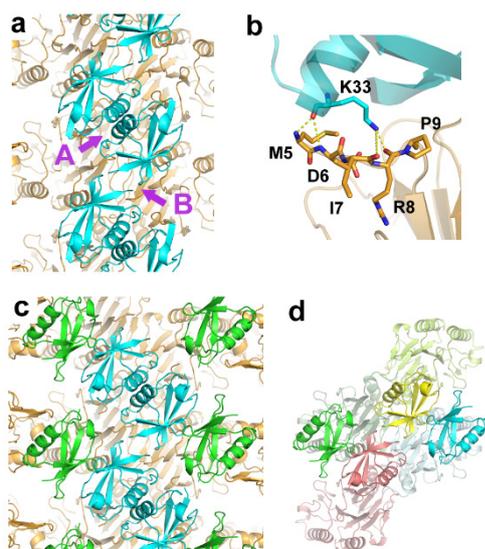


図2：ユビキチンの相互作用

(a) R1EN₂₂₃-Ub では、ユビキチン同士の相互作用面が 2 箇所 (A, B) 見られたが、A は衝突している。(b) R1EN N 末端とユビキチンの相互作用。(c) R1EN₂₂₅-Ub、R1EN₂₂₇-Ub ではもう一つのユビキチン分子 (緑) が見られた。(d) R1EN-Ub は図のような 4 分子で一つのユニットを形成していると考えられる。

4 まとめ

多孔性結晶を作る R1EN にユビキチンを融合させて、結晶格子や結晶化条件がそのまま、ユビキチンを空隙に配置させることに成功した。さらに、X 線データを取り、ユビキチンの構造解析にも成功した。分子量の上限や、衝突した電子密度が見えてしまう問題点はあるものの、この手法はこれまで結晶を得ることが難しかったタンパク質の構造解析を推進すると期待される。

謝辞

本研究は有吉眞理子助教(大阪大学)、PF 構造生物学研究センター及び SPring-8 BL44XU のスタッフに協力を頂きました。本研究は PF の課題番号 2013G075、2017G615 および SPring-8 の課題番号 20156537、20166637 の下に放射光実験を行いました。また、本研究は挑戦的萌芽研究(15K13747)および基盤研究(C) (19K05696)のサポートを受けました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- [1] Y. Inokuma *et al.*, Nature **495**, 461 (2013).
- [2] N. Maita *et al.*, Nucl. Acids Res. **35**, 3918 (2007).
- [3] N. Maita, J. Am. Chem. Soc., **140**, 13546 (2018).