

# 研究報告書

## 「超巨大蛋白質会合体の内部空間を利用した結晶化デバイスの創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月 ~ 2019年3月

研究者: 田中 良和

### 1. 研究のねらい

X線結晶構造解析は分子の立体構造を迅速かつ高精度に決定できる優れた手法であり、低分子化合物から蛋白質などの生体高分子にいたる、様々な分子の構造決定に広く用いられている。しかし、X線結晶構造解析を行うには、目的の分子の良質な結晶を作製する必要があり、これが結晶構造解析の成功率を下げる最も深刻な要因の一つとなっている。このため、結晶化を効率よく行う新手法の開発が切望されている。本研究では、本研究では、現存する最大級のサイズ(分子量約4 MDa)の蛋白質会合体ヘモシアニンの巨大な内部空隙に任意の生体高分子を包摂したヘモシアニンを丸ごと結晶化させる手法を開発することを目指す。ヘモシアニンは、ほぼすべての生体高分子を包摂できるだけの広大な空隙(直径約220 Å)をもつ上、結晶化する際には外壁同士の相互作用のみで集積するため、内部に包摂したゲスト分子の種類にかかわらず、画一的な条件で結晶化できると考えられる。内部の特定の位置に目的分子を包摂したヘモシアニンの結晶が得られれば、そのX線回折データからヘモシアニンとともに内部の分子の立体構造も決定できるため、あらゆる分子のX線結晶構造解析が可能となる。更に、ヘモシアニンは高度な対称性を持つ会合体であるため、対称性を利用して電子密度を平均化することにより、内部に包摂した分子の明瞭な電子密度を得ることが可能となる。本研究では、ヘモシアニンの持つこれらの有用な特性を生かし、既存の金属有機化合物を結晶のフレームワークとして用いた手法では実現できなかった、生体高分子化合物の立体構造決定を目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ヘモシアニンの結晶中の中空状の空隙中に、3種類の方法((1)包摂-結晶化、(2)ソーキング、(3)共結晶)にてゲスト蛋白質を効率よく包摂する手法の開発に取り組んだ。ゲストの自由拡散が駆動力の(2)、(3)の方法では、物理的性質の異なるゲストの包摂効率を比較し、250kDa程度までのゲストを包摂できること、負に帯電した分子ほど包摂されやすいことを明らかにした。また、一度包摂されたゲストは、ホスト-ゲスト間の非特異的な相互作用により、ヘモシアニン結晶内部では移動することなく一定の位置に止まっていることが示された。(1)のアンカー分子を用いてゲストをヘモシアニン内部に包摂させてから結晶化する試みでは、ビスマレイミドをはじめとした化合物によるクロスリンク反応では効率よくゲストを結合させることができなかったが、Ni-NTA基やビオチンを介して、ゲスト蛋白質の特異的結合活性を利用することで部位特異的にゲストを結合させることが可能となり、また、この複合体を用いて結晶を得た。

一方で、電子顕微鏡を用いた解析にも取り組んだ。クライオ電顕単粒子解析法により、ホ

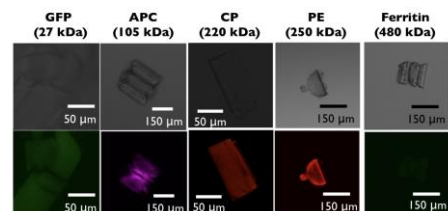
ストのヘモシアニンの内部構造を解析した結果、非対称な構造を形成していることが明らかになった。さらに、ネガティブ染色法により、蛋白質同士をリンカーで結合した場合の、リンカー長がフレキシビリティに及ぼす影響についての知見を得た。ヘモシアニン内にリンカーを介してゲスト蛋白質を結合させて結晶構造解析する場合には、リンカー長を極限まで短くする必要があることが示された。

## (2) 詳細

### ・ヘモシアニン結晶中へのゲスト蛋白質の導入

円筒状のヘモシアニンはストロー状に積層しながら結晶化するため、ヘモシアニンの結晶をゲスト溶液にソーキングすることで、自由拡散により結晶内部にゲストを包摂できると考えられる。サイズの異なる様々な蛍光蛋白質(GFP (27kDa)、APC (105kDa)、CP (220kDa)、PE (250kDa)、フェリチン(480kDa))をソーキングし、分子の包摂を共焦点レーザー顕微鏡にて評価した結果、250kDa までのゲスト蛋白質を包摂できることが明らかになった。また、鎖長の異なる DNA 断片を包摂させたところ、200bp の DNA (分子量は 123kDa) も十分に包摂できることが示された(図 1)。興味深いことに、鎖長の長い DNA 断片ほど包摂されやすい傾向があった。DNA は負に帯電した生体高分子であることから、ゲストの表面電荷が包摂効率に強く影響していることが示唆されたため、電荷特性の異なる 2 種類のゲスト(Q-dot525(+), Q-dot525(-))の包摂効率を比較したところ、負に帯電したゲストの方が包摂されやすいことが示された。フォトブリーチングの結果からは、一度包摂されたゲスト蛋白質は、結晶中では移動できず、長期にわたり一定の位置に滞在することがわかった(図 2)。これらの結果から、ヘモシアニン内部では、ゲスト蛋白質とヘモシアニンの間に非共有結合が生じて、安定な部位に止まっていることが示唆された(特許 1、論文 1)。

ソーキング法によりゲストを包摂したヘモシアニン結晶は、グルタルアルデヒドによる補強やソーキングによる結晶へのダメージにより、X 線回折能が著しく低下することがわかったため、結晶にダメージを与えることなくゲストを包摂する手法として、共結晶法による包摂手法の開発に取り組んだ。ソーキングの場合と同様に、250kDa のゲストまで包摂することが確認できた(図 3)。共結晶法により GFP を包摂した結晶については、14 個の結晶から得られた X 線回折データを統合して 1 つのフルデータとして処理することにより、6.2 Å 分解能の X 線



### 250 kDaの蛋白質まで包摂できる

図1. ソーキング法によるヘモシアニン結晶中へのゲスト分子の包摂

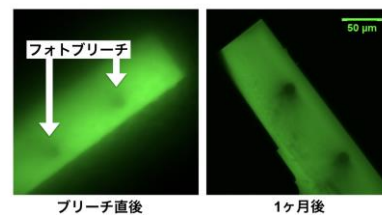
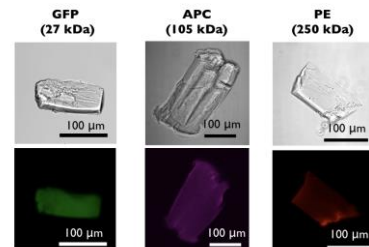


図2. フォトブリーチングにより包摂させたGFPを局所的に退色させた結晶



### ソーキングと同様250 kDaの蛋白質まで包摂できる

図3. 共結晶法によるヘモシアニン結晶中へのゲスト分子の包摂

回折データを収集できた。ヘモシアニンをサーチモデルに用いた分子置換法により解を得て、構造精密化を行なった結果、不明瞭ながらも内部に電子密度を確認できた。今後、より高分解能の X 線回折データを収集して構造解析し、内部の電子密度を確認する必要がある。

### ・部位特異的な結合を介したゲスト蛋白質のヘモシアニン結晶中への導入

ソーキング、共結晶により分子を包摂させた場合、その効率はゲスト蛋白質の濃度と、拡散効率に依存するため制御することが難しい。そこで、ヘモシアニン内部に存在する、反応性の Cys (Cys3246) にクロスリンカーを結合させ、これにゲスト蛋白質を得意的に結合させることで、効率よくゲスト蛋白質を包摂させることに取り組んだ。マレイミド基やサクシイミド基、クリック反応を用いたゲスト蛋白質の結合に取り組んだが、いずれの場合も十分な効率でゲストを結合させることはできなかった。しかし、Cys3246 にリンカーを介して Ni-NTA 基を結合させ、これに His タグ付き GFP を結合させたと、GFP を結合させることができ、さらに、これを用いて GFP を包摂したヘモシアニンの結晶を調製することができた(図 4)。同様に、リンカーを用いてヘモシアニンに結合させたビオチンにストレプトアビジンを結合させ、その結晶を得ることに成功した。これにより、ゲスト蛋白質を高い包摂率で結合させて結晶化することが可能となった。マレイミド-Cysなどの化学反応では実現できなかったゲスト蛋白質の包摂を、Ni<sup>2+</sup>-His やビオチン-ストレプトアビジン相互作用のような生体分子の特異的結合活性を生かして達成することができたことから、生体分子のホスト-ゲスト化学には生体分子間相互作用の知見に基づいて設計することの重要性が示された。

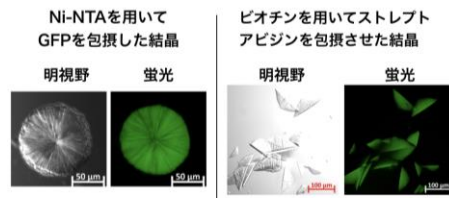
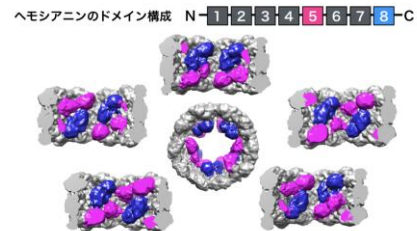


図4. 生体分子の特異的相互作用を利用してゲストを結合したヘモシアニンの結晶

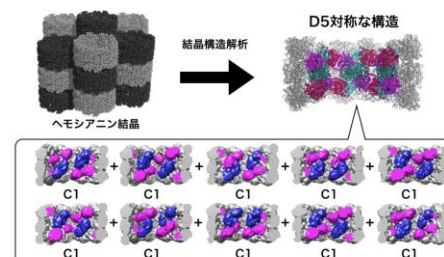
### ・「電子顕微鏡を用いたヘモシアニンのホスト-ゲスト化学の理解に向けた取り組み」

ヘモシアニンをホストに用いた蛋白質分子のホスト-ゲスト化学研究を実施する過程で、ヘモシアニンの内部構造を正確に決定する必要性が生じたため、その解明に取り組んだ。結晶中では、円筒状のヘモシアニンは上下の向きがランダムに配向してパッキングするため、X 線結晶構造解析法では上下の2つのコンフォメーションが混在した複雑に重なり合った電子密度が得られるという問題があったため、近年、発展の著しい、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法に



外壁はD5対称だが、内部ドメインは非対称

図5. クライオ電子顕微鏡解析により得られたヘモシアニンの構造

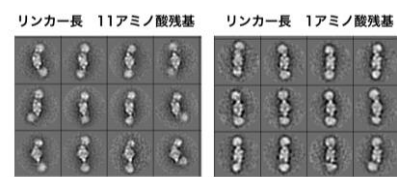


結晶構造解析でのD5対称の構造は、10種類の異なる非対称なヘモシアニンが混在した結果

図6. 結晶構造とクライオ電顕構造の比較

より内部構造の解明に取り組んだ。最新鋭のクライオ電子顕微鏡を用いて約 5000 枚の粒子のクライオ電顕写真を取得し、約 200,000 粒子のヘモシアニンの単粒子投影像から 3 次元の立体構造を再構築した結果、先行研究における X 線結晶構造解析からは C5 の対称性を有すると考えられてきたヘモシアニンの内部構造が、実際は、非対称な構造を形成していることが明らかになった(図 5)。円筒の外部の構造はいずれの解析法でも D5 の対称性を有しており、以上の結果から、結晶中では、D5 対称な外壁同士の相互作用により、上下 2 通りと 5 回軸の方位の異なる 10 種類のコンフォメーションが混在した結果、対称性のない内部ドメインが、D5 対称な電子密度を与えたと結論した(図 6、論文 2)。

さらに、電子顕微鏡解析により、蛋白質同士をリンカーで結合した場合、リンカー長がフレキシビリティに及ぼす影響についての知見を得た。ドメイン同士を 11 残基のペプチドリンカーで連結させた場合、ドメイン間の相対配置は大きく変化した。リンカー長を 10 残基短くすることによりドメイン間の動きを有意に抑制することができた。以上の結果より、ヘモシアニン内にリンカーを介してゲスト蛋白質を結合させて結晶構造解析する場合には、リンカー長を極限まで短くする必要があることが示された(図 7、論文 3)。



リンカーの長さによってドメインの動きが大きく変わる

図7. 電子顕微鏡解析により明らかになった蛋白質ドメイン間のフレキシビリティ

### 3. 今後の展開

本研究により、様々な方法でヘモシアニン結晶内部に分子を包摂させることができるようになった。いずれの方法においても、フレームワークのヘモシアニン結晶の結晶性に影響が及び、ゲストを包摂した結晶の X 線回折データを十分な分解能で得ることができなかつた。今後は、その分解能の改良が重要となる。

一方で、結晶化を必要としないクライオ電顕解析法による構造解析を用いれば、ゲストを包摂した試料をクライオ電顕で観察すれば構造決定できると期待される。クライオ電顕解析に応用する場合は、ゲストの包摂率の高い Ni-NTA を用いて His タグ蛋白質を結合させる方法が適していると考えられる。His タグ蛋白質は、もっとも汎用的に用いられている蛋白質融合タグであるため、His タグ融合蛋白質を融合できることのできる手法により、あらゆる蛋白質の構造解析に応用可能な汎用的な手法が開拓できると期待する。

### 4. 自己評価

さきがけ研究 2 年目にクライオ電顕解析のために海外留学し、その後、独立研究室を立ち上げるなど、大きく環境が変化する中で本さきがけ研究に取り組み、1 件の特許出願と、3 報の論文発表(投稿中 1 件、執筆中 1 件を含む)につながる研究成果を得ることができた。本研究を通して、蛋白質を材料の一つとみなし、化学修飾を施しながら新たな機能を付加するという材料化学的な視野や、クライオ電顕解析法を自身の研究の新たな軸として加えることができた。これまでの研究と大きく方向の異なる研究に没頭し、成果発表につながられたのは、今後の研究生活における大きな糧となると信じる。また、専門分野の離れたさきがけ研究者とのインタラクションを通して、ゲスト蛋白質の一つが保持する金属補因子の性質を突き止めることに成功するなど

(文献 4)、さきがけ研究から派生した研究を成果発表につなげられたことも、本さきがけにより得られた成果の一つと考えている。ヘモシアニンの構造に関する総説を執筆し、ヘモシアニンに関する研究者としての存在を示すこともできた(著作物 1)。

研究内容に関しては、ヘモシアニン内部に包摂したゲストの構造決定には至らなかったが、化合物では達成できなかったヘモシアニンとゲスト蛋白質の結合を、Ni<sup>2+</sup>-His タグ間の相互作用を利用して実現するなど、生化学的特性も生かした化学反応により、いくつかの課題を解決できた。本研究により得られた知見を生かし、今後は、ヘモシアニンに限らず、様々な生体材料を化学の視点で捉え、生体分子を用いた材料化学研究を開拓していきたいと考えている。本さきがけにより、今後の研究テーマの芽を作り、また、その土台となる研究環境を整備できたと確信している。

生体高分子の結晶スポンジ法の実現に向けた取り組みとしては、ヘモシアニンよりも結晶性の良いフレームワークに本研究の成果を応用することを今後の研究研究展開の一つと考えている。一方で、ゲストを包摂したヘモシアニンをクライオ電顕で観察するという研究の方向性も見いだすことができた。本さきがけ研究で整備した環境を生かして、これらを推進していきたい。ヘモシアニン結晶のストロー状の空隙を微小な化学反応場として用いるという研究展開も見えてきた。本さきがけ領域の村井俊介氏、久保祥一氏との連携のもと、物質・材料研究機構の連携拠点推進制度のサポートを受け、蛋白質中の空間を用いて金属ナノ構造体を作るという連携研究もスタートさせた。これらの研究は、さきがけ研究採択当初は考えもしなかったものであり、本さきがけ研究を通して新たに得られた研究シードである。

以上を総括し、本さきがけ研究を通して、ヘモシアニンを用いたホスト-ゲスト研究の成果のみならず、自身の今後の研究の礎となる基盤環境を築くことができた結論する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hashimoto, T., Ye, Y., Ui, M., Ogawa, T., Matsui, T., and **Tanaka, Y.**, Protein encapsulation in the hollow space of hemocyanin crystals containing a covalently conjugated ligand, *under review*.
2. Matsui T., Kamata S., Ishii K., Maruno T., Ghanem N., Uchiyama S., Kato K., Suzuki A., Oda-Ueda N., Ogawa T., **Tanaka Y.**, SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A2 from snake venom, *Sci. Rep.*, 9, 2330 (2019)
3. Hashimoto, T., Ye, Y., Matsuno, A., Ohnishi, Y., Kitamura, A., Kinjo, M., Abe, S., Ueno, T., Yao, M., Ogawa, T., Matsui, T., and **Tanaka, Y.**, Encapsulation of biomacromolecules by soaking and co-crystallization into porous protein crystals of hemocyanin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 509, 577-584 (2019)
4. **Tanaka, Y.**, Kato, S., Stabrin, M., Matsui, T., Raunser, S., and Gatsogiannis, C., CryoEM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin, *IUCRj*, in press (2019).

5. Chen, M., Kubo, M., Kato, K., **Tanaka, Y.**, Liu, Y., Long, F., Whitman, W., Lill, P., Gatsogiannis, C., Raunser, S., Shimizu, N., Shinoda, A., Nakamura, A., Tanaka, I., and Yao, M., Structural basis for tRNA-dependent cysteine biosynthesis, *Nat Commun.*, 8, 1512 (2017)

6. Chen, M., Asai, S., Narai, S., Nambu, S., Omura, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Ikeda-Saito, M., Watanabe, K., Yao, M., Shigi, N., and, **Tanaka, Y.**, Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by the iron-sulfur protein TtuA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, 4954-4959 (2017)

## (2)特許出願

研究期間累積件数:1件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1.

発明者: 田中良和,松野明日香,北村朗,金城政孝,姚閔,上野隆史,安部聡

発明の名称: ヘモシアニン会合体を用いた包摂体の製造方法

出願人: 北海道大学,東京工業大学

出願日: 2016/6/1

出願番号: 特願 2016-110309

## (3)その他の成果(主要な学会発表,受賞,著作物,プレスリリース等)

### 学会発表

1. **Yoshikazu Tanaka**, 43rd International Conference on Coordination Chemistry, Encapsulation of protein in a hollow protein crystal, Sendai, Japan, 2018年8月4日 (Invited lecture)
2. **Yoshikazu Tanaka** 2nd Joint International Symposium of NSRRC and IPR, Investigating a novel tRNA thiolational modification mechanism involving an [4Fe-4S] cluster, Hsinchu, Taiwan, 2017年12月6-7日 (Invited lecture)
3. **田中良和**,分子量 4MDa の巨大蛋白質会合体ヘモシアニンの結晶への蛋白質の包摂,JST-ACCEL プロジェクト「革新的分子構造解析」公開シンポジウム 2017年10月31日 東京 (招待講演)
4. **Yoshikazu Tanaka**, Hokkaido University/Pusan National University Joint Symposium 2016, Molecular mechanism of staphylococcal pore forming toxin, Busan, Korea, 2016年3月8-9日 (Invited lecture)

### 著作物

1. Minghao Chen and **Yoshikazu Tanaka**, Sulfur transferase TtuA, Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, in press
2. \*Kato, S., Matsui, T., Gatsogiannis, C., and \***Tanaka, Y.**, Molluscan Hemocyanin: Structure, Evolution, and Physiology, Biophysical Reviews, 10, 191-202 (2018)
3. 加藤早苗,松井崇,**田中良和**, 3.8MDa の超巨大酸素運搬蛋白質ヘモシアニン会合体の結晶構造, 生化学 Vol.90,238-243(2018)
4. 松野明日香,田中良和, 超巨大蛋白質会合体ヘモシアニンの X 線結晶構造解析, 日本結晶学会誌 Vol.58,91-95(2016)