

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」  
平成 17 年度採択研究代表者

森 勇介

大阪大学大学院工学研究科・教授

タンパク質完全結晶創成

## 1. 研究実施の概要

本研究では、我々がこれまでに開発した新しいタンパク質結晶化手法である①レーザーによる結晶核発生方法、及び②溶液攪拌による高品質化技術に関しての高度化を行うとともに、結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメータの探索を行い、難結晶化タンパク質の高品質大型結晶育成技術の確立を目指している。本年度では以下の結果が得られている。

レーザー核発生については、これまでの研究からキャビテーション表面における分子の高濃度化が結晶核発生を促進することが示唆されていたが、本年度の結果から、粘性等の溶液状態制御が結晶核発生確率向上には重要であり、溶液の高粘性化が結晶核発生確率向上に効果的であることが示唆された。さらに、タンパク質だけでなく有機低分子化合物においても結晶核発生を促進できるという結果が得られた。溶液攪拌技術に関しては、結晶多形によってはステップ成長速度が低減する場合も存在するが、一方でそれを補うように表面での核発生数が増加するため、結果的に成長速度が向上することがわかった。

難結晶化タンパク質高品質結晶化に関しては、中性子回折測定用大型 HIV protease 結晶の育成と中性子線構造解析 (1.9 Å 分解能の中性子回折強度データ) に成功し、KNI-272 との相互作用に重要なプロトンの位置とその役割を示すなど、4 種類のタンパク質の高品質結晶を育成した。膜タンパク質の結晶化技術の汎用化をめざすために、多剤耐性化に関わる薬剤排出トランスポーターのクローニング (約 40 種類)、大量発現から結晶化の検討を行ったところ、緑膿菌 (MDRP) の持つ最も強力な薬剤排出トランスポーターである MexB について、結晶化に成功した。

## 2. 研究実施内容

### 【新しい結晶化技術の原理解明と高度化】

(レーザー核発生技術)

より効果的なレーザー核発生条件の探索を目的とし、レーザー核発生に必要なキャビテーションの挙動や溶質拡散に大きな影響を与えるる、粘性をパラメータとして核発生への影響を調べた。

リゾチームを用いて実験したところ、図1に示すようにアガロースを添加した高粘性溶液において結晶核発生確率が向上することが示された。一般的にアガロースを添加するとそれだけで結晶核発生確率は向上すると言われているが、図1ではアガロースを添加する効果以上にアガロース添加後のレーザー照射の効果が大きいことが示されている。さらに、蛍光分子を修飾したリゾチームを用いて、レーザー照射直後(~ $\mu$ s)

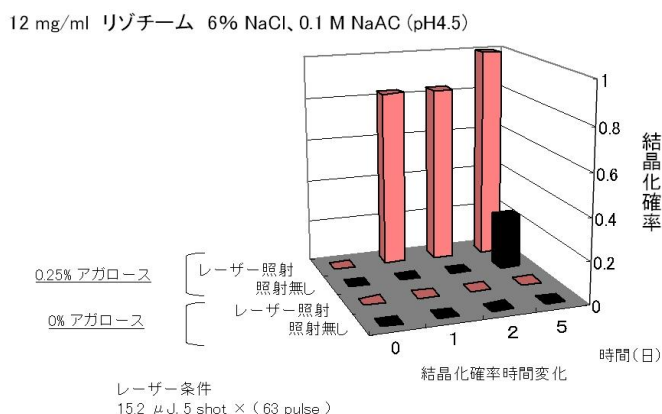


図 1 アガロース添加によるリゾチームの結晶化確率の向上

におけるゲル中のタンパク質濃度分布を測定したところ、キャビテーションの収縮時に蛍光タンパク質の凝集と思われる強い蛍光信号が観察された。これより、キャビテーションの収縮過程が分子を濃縮し、核発生を促進するというメカニズムが示唆された。また、この分子凝集は通常の低粘性溶液では観察されなかったことから、溶液の高粘性化により、溶質拡散が抑制されて局所的な高濃度状態が維持されやすくなったと考えられる。また、この時のキャビテーションの挙動を高速度カメラを用いて観察したところ、キャビテーション収縮後の再膨張及び崩壊が無くなり、崩壊時に発生する熱や高圧化などの核発生を阻害する要因が抑制されていることがわかった。以上の結果から、高粘性な溶液条件が核発生誘起に適していることが示唆された。

レーザー核発生技術を有機低分子化合物に適用したところ、東北大学・土井隆行教授との共同研究(分子量 1012:新規アザ環状化合物)において、レーザー核発生技術により初めて結晶化に成功し、X線結晶構造解析で立体構造が初めて決定できた。このように、タンパク質だけでなく、有機低分子化合物においてもフェムト秒レーザー照射は結晶核発生を促進でき、多形探索等に有効と成り得ることが分かった。

1) Femtosecond laser-induced nucleation of protein in agarose gel, J. Cryst. Growth, 311, 956-959 (2009)

#### (溶液攪拌技術)

溶液攪拌技術は、タンパク質結晶の大型化・高品質化に有効かつ重要な技術であるが、高品質結晶化の原理や最適攪拌条件の検討指針については良く分かっていない。これらを明らかにするために、溶液流れ下における結晶成長プロセスの観測に取り組んでいる。

これまでの研究で、溶液の流れは結晶成長面における分子の吸着密度を増加させることが明らかになった。うずまき成長モードが支配的なリゾチーム単斜晶表面では数-100  $\mu$ m/s 程度の流れは結晶成長面のステップ前進速度を向上させるが、一方で 2次元核成長モードである正方晶表面では前進速度は低下するというように溶液攪拌効果の結晶多形依存性が存在する。ところが、正方晶表面では溶液攪拌により表面における核発生数が増加するため、結果的に溶液攪拌により、正方晶でも成長速度が向上することが分かった。

現在の結果からは、溶液攪拌が結晶成長に及ぼす効果についてはまだ良く分からないが、各種難結晶化タンパク質の大型化・高品質化において、一般的な結晶化プレートを用いる場合、回転数 50~100rpm の間に適値が存在するケースが多いことが明らかとなってきている。

#### 【難結晶化タンパク質の完全結晶育成技術創成のための要素技術開発とその実証研究】

本研究では、我々の技術の汎用性を様々なタンパク質において検証し、その知見を結晶化手法の高度化へとフィードバックすることを目的とし、膜タンパク質をはじめ多種にわたる生体高分子について、国内外の大学や公的研究機関との共同研究も展開しながら高品質結晶化に取り組んでいる。現在、これらサンプルの内、核酸類や複合体を含む4種類のタンパク質については以下に示すように構造解析可能である良質な結晶が得られ、膜タンパク質についてはクローニングを終え、結晶核を得ることに成功している。

##### (1) HIV protease 結晶の大型化(日本原子力研究開発機構との共同研究)

中性子回折測定を目的とした HIV-1 protease と高活性阻害剤 KNI-272 との複合体結晶の大型化は、溶液攪拌法を活用することによって大型結晶を作製することに成功した。その後、図2に示すように、その大型結晶から得られたデータから原子力研究所にて中性子線構造解析にも成功し、KNI-272 との相互作用に重要なプロトンの位置とその役割を明確に示すことを可能にした<sup>2,3)</sup>。

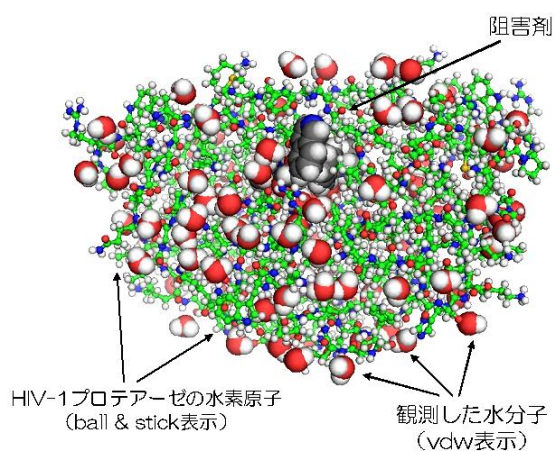


図 2 中性子回折法により得られた HIV protease の構造

##### 2) Crystallization and preliminary

neutron diffraction studies of HIV protease cocrystallized with inhibitor KNI-272, Acta Cryst., F64, 1003-1006 (2008)

3) Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 4641-4646 (2009)

##### (2) RNA アプタマー(AML38) - AML-1 複合体の結晶化と構造解析(東京大学医科学研究所・中村義一先生、千葉工業大学・坂本泰一先生との共同研究:平成 17 年度 CREST「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」採択課題)

急性骨髄性白血病に関与している AML-1 と RNA アプタマー(AML34)との複合体結晶化を試みたところ、従来法では X 線構造解析の分解能は 10 Å 分解能までであったが、溶液攪拌法では、分解能が 3.0 Å と飛躍的に向上した。現在、構造解析が進行中である。

##### (3) 抗酸化タンパク質 peroxiredoxin(Prx) 結晶の大型化((独)産業技術総合研究所・中村努先生、日本原子力研究開発機構との共同研究)

中性子回折測定を目的とした過酸化水素を水に還元する抗酸化タンパク質 Prx 結晶の大型化

は、従来法では大型結晶育成は困難であったが、我々の結晶育成技術により、 $2.0 \times 2.0 \times 0.8\text{mm}$  の良質な大型結晶を得ることに成功した。この結晶から、 $4 \text{ \AA}$  分解能の中性子回折強度データを収集することができた。現在、更なる分解能向上を目指している。

(4) Minichromosome Maintenance (MCM) タンパク質と DNA 複合体の結晶化と構造解析(イギリス ケンブリッジ大学との共同研究)

DNA の複製過程(開始および伸長過程)で DNA 開裂を担う MCM タンパク質と DNA 複合体の高品質結晶化に成功した。これまで低分解能( $\sim 4.5 \text{ \AA}$ )かつ低品質(mosaicity :  $1.0^\circ$  以上)の結晶しか得ることができなかったが、溶液攪拌技術を用いることによって解析可能な高品質結晶を得ることに成功した。現在、高分解能( $3.1 \text{ \AA}$  分解能、mosaicity :  $0.2\text{-}0.4^\circ$ )の回折強度データを収集し、構造解析が進行中である。

(5) 膜タンパク質薬剤排出トランスポーターのクローニング、及び精製・結晶化条件の検討  
異なるいくつかの膜タンパク質の結晶化を試み、結晶化技術の汎用化をめざすために、膜タンパク質 AcrB のホモログやオルソログをクローニングし、精製法の確立を行った。具体的には、大腸菌 AcrB など、多剤耐性化に関わる薬剤排出トランスポーターで、大腸菌やその他のグラム陰性細菌の持つ同種の薬剤排出トランスポーターのクローニングを約 40 種類行っている。これらを、大量発現、細胞膜への移行性、細胞膜からの界面活性剤を用いた適切な可溶化、高度精製、会合状態の観察による結晶化能、の各段階でふるいをかけて残ったものについて結晶化条件の検討を行った。その結果、院内感染の主たる原因菌である緑膿菌(MDRP)の持つ最も強力な薬剤排出トランスポーターである MexB について、結晶化に成功した。

### 3. 研究実施体制

(1)「大阪大学」グループ

①研究分担グループ長:森 勇介(大阪大学大学院、教授)

②研究項目

タンパク質完全結晶創成のための要素技術の開発と実証研究

本研究では、フェムト秒レーザー照射による核発生技術や溶液攪拌による結晶高品質化技術などの新しいタンパク質結晶化手法の高度化、及び結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメータの探索を行い、膜タンパク質や水溶性タンパク質をはじめ、様々な難結晶化タンパク質の完全結晶育成技術創成のための要素技術開発とその実証研究を行う。

(2)「東京工業大学」グループ

①研究分担グループ長:村上 聡(東京工業大学大学院、教授)

②研究項目

膜タンパク質完全結晶創成

タンパク質結晶化のなかでもとりわけ困難であると言うことが良く知られている膜タンパク質の結晶化は、構造生物学分野での最後の開拓地であると表現されている。我々がこれまで開発してきた高品質結晶化支援のための技術を、膜タンパク質に対して適用させる為に、より多くの膜タンパク質結晶化に対して結晶化を実施し、技術の一般化を目指す。大腸菌多剤

排出トランスポーターAcrB をサンプルとして、結晶化技術を改良すると共に、他の膜タンパク質標品の大量精製の為の遺伝子組み換え実験や、生化学実験を行う。

### (3)「創晶」グループ

①研究分担グループ長:安達 宏昭(株式会社創晶、代表取締役社長)

#### ②研究項目

タンパク質・難結晶化材料結晶化受託

依頼されたタンパク質・難結晶化材料の結晶化を、レーザー核発生技術や溶液攪拌技術などを駆使して行うとともに、本 CREST で開発された技術の実用化を積極的に進める。

## 4. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表 (原著論文)

1. Effect of solution flow by rotary shaker on protein crystallization *J. Cryst. Growth* 310 (2008) 2168-2172 R. Murai, H. Y. Yoshikawa, H. Kawahara, S. Maki, S. Sugiyama, T. Kitatani, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, T. Sasaki and Y. Mori
2. Protein crystallization in a 100 nl solution with new stirring equipment *J. Synchrotron Rad.* 15 (2008) 269 – 272 S. Maki, R. Murai, H. Y. Yoshikawa, T. Kitatani, S. Nakata, H. Kawahara, H. Hasenaka, A. Kobayashi, S. Okada, S. Sugiyama, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, T. Sasaki and Y. Mori
3. Multidrug efflux transporter, AcrB-the pumping mechanism *Current Opinion in Structural Biology* 18 (2008) 459-465 S. Murakami
4. Laser energy dependence on femtosecond laser-induced nucleation of protein *Appl. Phys. A* 93 (2008) 911-915 H. Y. Yoshikawa, R. Murai, S. Maki, T. Kitatani, S. Sugiyama, G. Sasaki, H. Adachi, T. Inoue, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Sasaki and Y. Mori
5. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of an RNA aptamer in complex with the human IgG Fc fragment *Acta Crystallogr. F* 64 (2008) 942-944 S. Sugiyama, Y. Nomura, T. Sakamoto, T. Kitatani, A. Kobayashi, S. Miyakawa, Y. Takahashi, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, Y. Nakamura and H. Matsumura
6. Crystallization and preliminary neutron diffraction studies of HIV-1 protease cocrystallized with inhibitor KNI-272 *Acta Crystallogr. F* 64 (2008) 1003-1006 H. Matsumura, M. Adachi, S. Sugiyama, S. Okada, M. Yamakami, T. Tamada, K. Hidaka, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, T. Kitatani, S. Maki, H. Y. Yoshikawa, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, R. Kuroki and Y. Mori

7. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Ca<sup>2+</sup>-free primary Ca<sup>2+</sup>-sensor of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger Acta Crystallogr. F64 (2008) 1125-1127 M. Mima, C. Kawai, K. Paku, K. Tomoo, T. Ishida, S. Sugiyama, H. Matsumura, T. Kitatani, H. Y. Yoshikawa, S. Maki, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, S. Kita and T. Iwamoto
8. Evaluation and Improvement of a Technique to Manipulate Protein Crystals in Solution Jpn. J. Appl. Phys. 47 (2008) 8995-8997 T. Kitatani, H. Adachi, S. Sugiyama, H. Matsumura, R. Murai, Y. Takahashi, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori and K. Takano
9. Femtosecond laser-induced nucleation of protein in agarose gel J. Cryst. Growth 311, 956-959 (2009) H. Y. Yoshikawa, R. Murai, S. Sugiyama, G. Sasaki, T. Kitatani, Y. Takahashi, H. Adachi, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, K. Takano, Y. Mori
10. Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 4641-4646 (2009) M. Adachi, T. Ohhara, K. Kurihara, T. Tamada, E. Honjo, N. Okazaki, S. Arai, Y. Shoyama, K. Kimura, H. Matsumura, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, Y. Mori, K. Hidaka, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, R. Kuroki
11. Dynamic nature of disulphide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB. EMBO J. 28, 779-91 (2009) K. Inaba, S. Murakami, A. Nakagawa, H. Iida, M. Kinjo, K. Ito, M. Suzuki.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)