トピックス

無細胞タンパク質合成を利用した迅速結晶化と構造解析

安部 聡

東京工業大学生命理工学院 〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 B-55

上野隆史

東京工業大学生命理工学院 〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 B-55

要旨

細胞内タンパク質結晶化は、煩雑な精製過程や大規模な結晶化スクリーニングを必要としないことから、次世代の 構造生物学ツールとして近年研究が進められている。しかしながら、構造決定に必要な宿主となる細胞が必要なこ と、構造決定に必要な品質と量の結晶合成が困難なことなど、解決すべき課題が依然として残されていた。そこ で、我々は、無細胞タンパク質合成系を用い、タンパク質合成と結晶化を同じ反応容器の中で実現する無細胞タン パク質結晶化手法(Cell-free protein crystallization, CFPC)を開発した。この手法の利点は、迅速かつ微量での 結晶化ができること、反応中に結晶化を制御する試薬を添加できることである。まず、本手法を実証するために、 昆虫細胞内で形成される多角体結晶をモデルタンパク質として、200 µL,6時間以内に構造解析が可能な品質で得 ることに成功した。この技術を用いてこれまで構造未知であった Crystalline inclusion protein A (CipA)の構造 決定に適用した。反応溶液に双晶阻害剤を添加することで,双晶形成を阻害し,2.11 Åの分解能で構造を決定し た。細胞内結晶化と in vitro での結晶化を統合した本技術は、ハイスループットなタンパク質構造決定、特に従来 の方法では解析が困難であった不安定タンパク質、低収量タンパク質の他、基質結合タンパク質の構造決定へと様 々な応用が期待される。

1. はじめに

細胞内で結晶を形成するタンパク質はこの数十年の間に 多数報告されている。これらのタンパク質結晶は、タンパ ク質の保存や保護、固体触媒、免疫の活性化など、生物学 的機能を持つことが知られている¹⁻³⁾。2007年に細胞内結 晶のひとつである,多角体の結晶構造が報告されて以来, 細胞内タンパク質結晶化は、次世代の構造生物学ツールと して注目されている4)。その理由は、タンパク質の精製過 程や結晶化スクリーニングが不要であり、迅速な構造決定 が可能なためである。2013年には、組換えタンパク質の 結晶構造を決定した最初の例として、Trypanosoma brucei 由来のカテプシン B の結晶構造が昆虫細胞内で形 成した結晶を用いて決定された5)。その後、細胞内で結晶 化するタンパク質の構造決定例はいくつか報告されている ものの、その数はまだ限られている。この理由は、結晶が 細胞内で偶発的に形成されることが多く、そのサイズや品 質が構造解析には不十分なためである。そのため、細胞内 結晶化をタンパク質の構造決定手法に応用するためには、 まだ技術的課題を克服する必要があった。これまでにもこ れらの課題を解決するために、ハイスループットスクリー ニングや細胞培養プロセスの最適化などの手法が開発さ れ、昆虫細胞を利用した結晶化から構造解析までのパイプ ライン構築や微小結晶の結晶化スクリーニング手法の開発 が報告されている6-8)。しかしながら、これらの哺乳類細

胞や昆虫細胞を利用した結晶化は、高品質の微結晶を迅速 かつ大量に合成する手法としては、依然として大きな課題 が残されている。また, in vitro での結晶化制御に用いら れる、結晶化制御剤の細胞内結晶化系への添加も試みられ ているものの、細胞膜を透過する効率や細胞機能への影響 が不明であるため、細胞内結晶化の改善には至っていな い9)。したがって、筆者らは、細胞を利用している限り、 これらの課題は解決できないと考えた。そこで, in-vitro 結晶化法の優れた点を細胞内結晶化に組み込むことができ れば、より実用的な構造解析技術になると思い、無細胞タ ンパク質合成 (Cell-free protein synthesis, CFPS) を用い た,結晶化,構造解析手法の開発を試みた。CFPS は、タ ンパク質合成の迅速なスクリーニングに非常に有用であ る¹⁰⁾。しかしながら、結晶化など大量のタンパク質を必 要とする構造生物学への利用は不向きであるとされてき た11-13)。本手法は、タンパク質を発現させ、その反応溶 液内で結晶化を行うため, CFPS の利点を活かすことがで きると考えられる。本研究では、CFPS を利用し、(1)小 規模かつ迅速なタンパク質結晶化手法の確立,(2)有機 化合物を反応系に添加することによる結晶化制御を実現 し, 無細胞タンパク質結晶化 (Cell-free protein crystallization, CFPC) 手法を確立した (Fig. 1a)。以下, 詳細を示 す。



Fig. 1 (Color online) (a) Schematic illustration of cell-free protein crystallization (CFPC) of polyhedrin monomer (PhM) using the Wheat Germ Protein Synthesis kit. (b) Photograph of the tube after CFPC. (c) Differential interference contrast (DIC) image of Polyhedra crystal (PhC)_CF. (d) A scanning electron micrograph of PhC_ CF. Size distribution of PhC_CF determined by the SEM image.

2. 多角体結晶の構造解析

2.1 CFPC 手法による多角体タンパク質の結晶化

まず、細胞内タンパク質結晶の一つである、多角体タン パク質を用いた CFPC による結晶化を試みた¹³⁾。様々な 無細胞タンパク質発現系を試した結果、セルフリーサイエ ンス社のコムギ胚芽の合成系(Wheat Germ Protein Synthesis Kit) を用いて、タンパク質合成を行なった¹⁴⁾。1.5 mLマイクロチューブ内で、抽出液10 µLとmRNA 溶液 10 µL の混合液を翻訳反応溶液である, SUB-AMIX SGC (SGC) 溶液200 µL の下層に加え, 20°C 24時間反応させ る重層反応を行なった。24時間後、遠心分離すると白い 沈澱物が析出した。この沈澱物を顕微鏡で観察すると立方 体の集合体が観察された(Fig. 1b, 1c)。その平均サイズは 580 nmであり, 昆虫細胞で得られる結晶のサイズの1/5 ほどの大きさであった (Fig. 1d)。また,ポリアクリルア ミド電気泳動(SDS-PAGE)やマトリックス支援レーザー 脱理イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS) 測定では、多角体タンパク質の分子量と一致するバンドや ピークが得られた。以上の結果より、多角体タンパク質を 無細胞合成により結晶化すると24時間後には、多角体タ ンパク質からなる固体の結晶性集合体が得られた。

2.2 多角体タンパク質結晶化の時間と温度依存性

次に, CFPC 法を用いた多角体結晶化の時間依存性を検 討した。翻訳反応開始から0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 12, 24時間後に反応を停止後,走査電子顕微鏡(SEM)観察 を行なった。20℃で翻訳反応を行なった場合, 2時間後に 立方体結晶が初めて観察された。2, 4, 6, 12, 24時間反 応した結晶の平均サイズは, 340, 400, 470, 580 nmで あり,時間の経過に伴い徐々に大きな結晶が形成された

(Fig. 2)。1.5時間の時には SEM では結晶が観察されなか った。SDS-PAGEでは、1時間の反応で多角体タンパク 質のモノマーに相当するバンドが観測されたが、0.5時間 では観測されなかった。この結果から多角体タンパク質 は、タンパク質合成からわずか2時間で結晶を形成する のに十分な量のタンパク質を合成し、結晶化することがわ かった。次に、結晶化の温度依存性を評価するために、4、 10, 15, 20, 25℃の温度で24時間翻訳反応を行なった。 その結果, それぞれ, 330, 390, 450, 580, 1170 nm の サイズの結晶が合成された(Fig. 3)。15, 20, 25℃では立 方体の結晶が多く、4、10℃では丸い結晶が多く観測され た。発現量は、10-20℃では大きく変化なかった。また、 CFPC 後の反応溶液,遠心分離後の上澄み液,精製した結 晶を SDS-PAGE で解析した結果, 10-20℃では約70-80% の多角体モノマーが PhC を形成することがわかった。し たがって、結晶のサイズや形態は各温度において合成され て多角体モノマーの量や結晶化速度に影響されると考えら れる。

2.3 多角体タンパク質の構造解析

次に、CFPC法によって合成したナノサイズの多角体結 晶の回折データを収集するため、精製した結晶を SPring-8 BL32XU で SSROX (Serial Synchrotron Rotation Crystallography) 法を用いて測定した¹⁵⁻¹⁶⁾。SSROX 法は、多 量の微結晶を含んだループを回転させながら二次元走査し て網羅的に X 線を照射してデータ収集する方法である。 SEM で結晶形態を測定したように、CFPC 法で合成した 多角体結晶は、平均サイズが580 nm と超微小な結晶であ るため、実験室系の X 線回折装置はもちろん、放射光の ビームサイズが50 μ m ほどの一般的なビームラインでの構 造解析は不可能であった。SPring-8 の BL32XU で1.3 μ m



Fig. 2 Time-dependent CFPC of PhC_CF. SEM images and size histograms of the purified PhC_CF after translation at 20°C for (a) 2 h, (b) 4 h, (c) 6 h, (d) 12 h, and (e) 24 h. (f) The crystal size of purified PhC_CF over time. Error bars = SD.



Fig. 3 Temperature-dependent CFPC of PhC_CF. SEM images and size histograms of the purified PhC_CF after translation at (a) 4°C, (b) 10°C, (c) 15°C, (d) 20°C, and (e) 25°C for 24 h. (f) The crystal size of purified PhC_CFs over temperature. Error bars = SD.

のビームを利用し,SSROX 法により測定,データ収集す ることによって,初めて構造決定することができた。20 ℃,24時間の翻訳反応で合成した結晶は,1.8 Å の高分解 能でデータを収集することができ,空間群(I23)と格子 定数は,昆虫細胞で合成した結晶と同一であることがわか った。大きな違いは,昆虫細胞で合成した結晶には,分子 界面に結合し結晶化に重要だと考えられていた,アデノシ ン三リン酸(ATP),シチジン三リン酸(CTP),グアノ シン三リン酸(GTP)に対応する電子密度がCFPCによ って合成した結晶内には観測されずに,これらの分子が結 合していないことである(Fig.4)⁴⁾。これらの結果から多 角体タンパク質の結晶化には,ヌクレオチドの結合は必須 ではないことが示された。様々な翻訳条件で結晶化した結 晶の構造解析の結果,わずか6時間の翻訳反応によって 合成した結晶からもデータ収集が可能であり,2.5 Å の分 解能での構造決定ができた。この反応時間は,昆虫細胞を 用いて,同等の品質の結晶を得るのに必要な培養時間(3 日以上)から劇的に短縮されていることが示された。

また、CFPC の最も重要な特徴の一つに反応スケールの 最小化がある。細胞抽出液(5 μ L), mRNA 溶液(5 μ L), 10 μ L の翻訳バッファーの混合物を小型の透析カップにい れ、1.0 mL の翻訳バッファーで透析することにより、多 角体結晶の合成に成功した。結晶サイズ(610 nm)は、 重層法とほとんど変わらなかった。驚くべきことに、この 量で合成した結晶でも構造決定に十分な回折ピークと結晶 量が得られ、1.95 Å の分解能で構造決定することができ た。つまり、CFPC 法を利用することで、わずか20 μ L の 容量でタンパク質の発現と構造解析が可能な結晶合成を行 うことができる。



Fig. 4 (Color online) Comparison of crystal structure between PhC_CF20°C/24 h and PhC_IC (PDB ID: 5 gqm). (a) Superimposed structures of PhC_CF20°C/24 h (green) and PhC_IC (magenta). (b, c) Close-up views of (b) CTP and (c) ATP/GTP binding sites in PhC_CF20°C/24 h, (d, e) Close-up views of (d) CTP and (e) ATP/GTP binding sites in PhC_IC. The selected 2|Fo|-|Fc| electron-density maps at 1.0σ are shown in blue. Hydrogen bonds are indicated with yellow dotted lines.



Fig. 5 (Color online) (a) E.coli produced CipAC. (b) SEM image and size histogram of purified CipAC_EC. (c) Photograph of the tube after CFPC of CipA. (d) SEM image and size histograms of purified CipAC_CF.

3. CipA 結晶の構造解析

CFPC 法による多角体タンパク質の結晶化と構造決定に 成功したので、次に、タンパク質合成時に化合物を添加で きるこの手法の特徴を利用し、Crystalline inclusion protein A (CipA)の構造決定にとりかかった。CipA は104の アミノ酸残基からなる疎水性タンパク質で昆虫病原性細菌 である Photorhabdus luminescens 内で自発的に結晶性凝 集体を形成する¹⁷⁾。大腸菌内でも凝集体を形成すること ができ,固体材料構築の鋳型としても利用されてい る¹⁸⁾。しかしながら,その構造は決定されていなかっ た。我々も大腸菌内での結晶化を試み,平均サイズ410 nmの結晶が得られ(Fig. 5a, b),SPring-8 BL32XUで SSROX 法を用いて回折実験をしたところ,2.8 Åの分解 能でデータ収集できた。しかしながら,予測される AlphaFold2 で作成したモデル構造を用いても分子置換法に



Fig. 6 (Color online) (a) Crystal structure of CipAC-CF with 1,4-dioxane. The structure of (a) monomer and (b) tetramer. (a) CipA monomer consists of the N-terminal arm followed by three β -strands $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, α -helix, and β -strands $\beta 4$ and $\beta 5$. (b) the interactions between monomers (i, ii, iii, and iv) in the tetramer. (c) Lattice structure and interactions between tetramers. Hydrogen bonds are indicated with black dotted lines.

より解を見つけることができなかった。その理由は, CipA 結晶は, ツイン率が0.42と大きかったためである。 そこで, CFPC 法により, その問題の解決を試みた。

透析法により CipA タンパク質を発現したところ、多角 体と同様に白い沈澱物が得られ、顕微鏡観察から3400 nm ほどのサイズの固体であることがわかった。これは大腸菌 で合成した結晶の8倍の大きさである(Fig. 5c, d)。この 結晶を用いて, BL32XU にてデータ収集を行ったところ, 1.61 Å の分解能でデータが得られたものの,大腸菌の結 晶と同様の高いツイン率(0.42)のため、構造を決定する ことができなかった。そこで、エタノール、1,4-ジオキサ ン,ポリエチレングリコール (PEG),デキストラン,テ トラエチレングリコール(TEG)などを添加剤として翻 訳反応時に混合し、結晶化することによりツインの問題の 解決を試みた。これらの化合物存在下でも結晶化でき、 SEM 像から同等サイズの結晶が得られることがわかっ た。このことから CPFC 法は、様々な化学的操作や結晶 合成時への化合物やタンパク質の添加など、拡張性が高い ことが示された。

添加剤存在で合成した CipA 結晶の X 線回折実験から 3 v/v%の1,4-ジオキサン存在下で結晶化したところ,ツイ ン率は0.10まで劇的に減少し,分解能2.11 Å でデータ収 集ができた。空間群は I4 で結晶格子は a=b=60.1 Å, c=50.4 Å, $\alpha=\beta=y=90^\circ$ であった。このタンパク質には分子 モデルがなかったため,Alphafold2 による予測構造を利 用し分子置換法により構造決定に成功した。モノマーは典 型的なオリゴヌクレオチド/オリゴ糖結合フォールドであ る。N 末端の Met1-Asn3 と Asp12-Val19 の構造は電子密 度がディスオーダーしていて構造を決定することができな かった。この領域は、結晶内で構造がfix されていないこ とがわかる。結晶パッキング上では、4 つの単量体が集積 し、4本の α へリックスがへリックスバンドルを形成する ことで4量体がビルディングブロックとなっている。4量 体を形成する相互作用は、分子間での水素結合によりへリ ックス間相互作用や β シートを形成している。また、 CipA 結晶は、4量体を構成要素とする多層構造を形成し ている。層間では、Asp4-Ser8 が別の層と相互作用して結 晶を安定化させる。4量体が層状に積み重なることで、格 子構造中に細孔空間が形成され、電子密度が観測されなか った、Asp12-Val19の領域は、その空間に位置すると予 想される(**Fig. 6**)。

4. おわりに

本研究では、タンパク質の複雑な精製や結晶化を必要と せず、数時間以内に数十µL-数百µLの反応溶液でタンパ ク質の結晶を迅速に合成する CFPC 法を確立した。さら に、この手法で合成したナノ結晶の高分解能での構造決定 に成功した。本手法は、小スケールでの反応が可能で、効 率よく結晶構造解析が可能な高品質の結晶を合成できる。 さらに、一度に複数種類のタンパク質の結晶化や温度、時 間、添加剤の影響など、反応条件を迅速にスクリーニング することが可能となる。従って、細胞内結晶化で高品質結 晶の収率が低い問題点を解決する手法であり、従来の in vitro でのタンパク質結晶化や細胞内結晶化では実現不可 能な結晶化を容易に行うことが期待できる。現在すでに、 有機分子からタンパク質複合体まで,様々な分子をターゲ ットとする鋳型結晶のライブラリーの作成を行なっている (投稿準備中)。

謝辞

X線回折データ収集は、大型放射光施設 SPring-8の BL32XUにて行った。種々のサポートをいただいた、理 化学研究所の平田邦生専任技師、山下恵太郎博士(現 MRC分子生物学研究所)に感謝いたします。SPring-8で の測定は、課題番号2019B2561, 2020A2541, 2021B2744 にて行なった。また、本研究は、JSPS科研費 JP19H02830, JP22H00347, JP18H05421, JP18K05140, JST A-step 産学共同(育成型) JPMJTR20U1, AMED 創 薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業創薬等先端技術支 援基盤プラットフォーム(BINDS)の課題番号 JP21am0101070(支援番号 1854)の支援を受けて実施し た。

参考文献

- R. Schonherr, J. M. Rudolph, and L. Redecke: Biol. Chem. 399, 751 (2018).
- C. N. Mudogo, S. Falke, H. Brognaro, M. Duszenko and C. Betzel: Traffic 21, 220 (2020).
- M. Kojima, S. Abe and T. Ueno: Biomater. Sci. 10, 354 (2022).
- F. Coulibaly, E. Chiu, K. Ikeda, S. Gutmann, P. Haebel, C. Schulze-Briese, H. Mori and P. Metcalf: Nature 446, 97 (2007).
- L. Redecke, K. Nass, D. P. DePonte, T. A. White, D. Rehders, A. Barty, F. Stellato, M. N. Liang, T. R. M. Barends, S. Boutet, G. J. Williams, M. Messerschmidt, M. M. Seibert, A. Aquila, D. Arnlund, S. Bajt, T. Barth, M. J. Bogan, C.

Caleman, T. C. Chao, R. B. Doak, H. Fleckenstein, M. Frank, R. Fromme, L. Galli, I. Grotjohann, M. S. Hunter, L. C. Johansson, S. Kassemeyer, G. Katona, R. A. Kirian, R. Koopmann, C. Kupitz, L. Lomb, A. V. Martin, S. Mogk, R. Neutze, R. L. Shoeman, J. Steinbrener, N. Timneanu, D. J. Wang, U. Weierstall, N. A. Zatsepin, J. C. H. Spence, P. Fromme, I. Schlichting, M. Duszenko, C. Betzel and H. N. Chapman: Science **339**, 227 (2013).

- 6) J. M. Lahey-Rudolph, R. Schonherr, C. M. Jeffries, C. E. Blanchet, J. Boger, A. S. F. Ramos, W. M. Riekehr, D. P. Triandafillidis, A. Valmas, I. Margiolaki, D. Svergun and L. Redecke: J. Appl. Crystallogr. 53, 1169 (2020).
- Y. Tang, J. Saul, N. Nagaratnam, J. M. Martin-Garcia, P. Fromme, J. Qiu and J. LaBaer: Sci. Rep. 10, 13323 (2020).
- M. Boudes, D. Garriga, A. Fryga, T. Caradoc-Davies and F. Coulibaly: Acta Crystallogr. Sect. D: Struct. Biol. 72, 576 (2016).
- 9) H. Hasegawa: Exp. Cell Res. 379, 92 (2019).
- 10) M. Harbers: FEBS Lett. 588, 2762 (2014).
- M. L. Fogeron, L. Lecoq, L. Cole, M. Harbers and A. Bockmann: Front. Mol. Biosci. 8, 639587 (2021).
- N. E. Gregorio, M. Z. Levine and J. P. Oza: Methods Protoc.
 2, 24 (2019).
- 13) I. V. Novikova, N. Sharma, T. Moser, R. Sontag, Y. Liu, M. J. Collazo, D. Cascio, T. Shokuhfar, H. Hellmann, M. Knoblauch and J. E. Evans: Adv. Struct. Chem. Imag. 4, 13 (2018).
- 14) J. G. Perez, J. C. Stark and M. C. Jewett: Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 8, a023853 (2016).
- 15) K. Hasegawa, K. Yamashita, T. Murai, N. Nuemket, K. Hirata, G. Ueno, H. Ago, T. Nakatsu, T. Kumasaka and M. Yamamoto: J. Synchrotron Rad. 24, 29 (2017).
- 16) K. Hirata, K. Yamashita, G. Ueno, Y. Kawano, K. Hasegawa, T. Kumasaka and M. Yamamoto: Acta Crystallogr. Sect. D: Struct. Biol. 75, 138 (2019).
- 17) S. B. Bintrim and J. C. Ensign: J. Bacteriol. 180, 1261 (1998).
- 18) Y. Wang, R. Heermann and K. Jung: ACS. Synth. Biol. 6, 826 (2017).



安部 聡 東京工業大学 生命理工学院 助教 E-mail: saabe@bio.titech.ac.jp 専門:生体機能関連化学,タンパク質結晶 工学

[略歴]

2008年3月名古屋大学理学研究科 博士 課程(後期課程)物質理学専攻修了。 2008年4月名古屋大学物質国際研究セン ター 博士研究員。2008年8月京都大学 物質-細胞統合システム拠点 博士研究員。 2012年5月より現職。



著者紹介

上野隆史

東京工業大学 生命理工学院 教授 E-mail: tueno@bio.titech.ac.jp 専門:生物無機化学,生体機能材料設計 **[略歴]**

1998年3月大阪大学大学院理学研究科高 分子学専攻博士後期課程修了。1998年4 月から2000年3月まで三菱化学株式会社。 2000年4月分子科学研究所助手。2002年4 月名古屋大学大学院理学研究科助教。 2008年8月京都大学物質-細胞統合システ ム拠点准教授。2012年3月より現職。

Cell-free protein crystallization for structure analysis

Satoshi ABE	School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, B-55, 4259, Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226–8501, Japan
Takafumi UENO	School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, B-55, 4259, Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226–8501, Japan

Abstract In-cell protein crystallization has recently been studied as a next-generation structural biology tool because it does not require complicated purification processes or large-scale crystallization screening. However, significant issues remain to be solved, such as the requirement for host cells and the difficulty in synthesizing the protein crystals with the quality and quantity required for structure determination. Here, we report the development of cell-free protein crystallization (CFPC), a direct protein crystallization technique that uses cell-free protein synthesis. The advantages of this method are that reaction scale and time can be minimized and that various reagents can be added during the reaction. We obtained high-quality nano-sized polyhedra crystals (PhC) produced in insect cells by infection with cytoplasmic polyhedrosis virus at a 200 µL reaction scale within 6 h. We applied this method to the structure determination of crystalline inclusion protein A (CipA) by suppressing twin crystal formation by adding an inhibitor to the reaction solution. We determined a 2.11 Å resolution structure from the nanocrystals of CipA. This technology integrates in-cell and in-vitro crystallization and significantly expands the tools available for high throughput protein structure determination, particularly unstable, low-yield, or substrate-binding proteins, which are difficult to analyze by conventional methods.