

創薬スクリーニングを目指した新規蛋白質結晶強化技術

大阪大学大学院 理学研究科 化学専攻
杉山 成

1. はじめに 目的 背景

薬剤となりうる様々の低分子化合物とタンパク質との相互作用を立体構造情報を基に議論し、生体内における種々の生物反応を考察することは、今や生命現象の理解や創薬にとって必要不可欠である。このタンパク質の立体構造情報を、原子レベルで得るための最も強力な手段はX線構造解析であるが、良質なタンパク質の結晶を必要とする。ところが、タンパク質結晶は豆腐のように脆く、非常に壊れやすい。この不安定性の問題は、タンパク質と化合物との複合体結晶を作製する場合に大きな問題となる。通常、複合体結晶を作製するためには、タンパク質結晶を化合物溶液に浸し、結晶中のタンパク質に化合物を結合させる必要がある。しかし、一般的にタンパク質結晶は成長した環境と著しく異なる高イオン強度を持った溶液中へソーキングすると浸透圧ショックによって直ちに結晶が崩壊してしまう。このことによってX線回折データの取得が困難となり、いくつもの重要なタンパク質と化合物との複合体構造情報が得られず、それが構造を基盤とした医薬品開発のハイスループット化を妨げてきた。これらの問題解決のために、従来、溶液中で行うことが常識とされてきたタンパク質の結晶化実験を完全に固化したアガロースゲル中で育成させる技術を開発した。さらに、この技術によって育成した結晶は、機械的強度が溶液中で得られた同じ結晶に比べ10倍以上に上昇し、高濃度有機溶媒に浸しても破壊されずに長時間品質を保つ（一晩静置後、X線回折で確認）ことを見出した。しかし、この方法には解決すべき課題が存在する。それは、固相ゲル中結晶化法には、流動性のあるアガロースゾル溶液とタンパク質溶液を混合させる必要があるが、アガロースのゲル化温度は通常35℃以下であるため、ゾル状態を維持できる35℃以上では、混合時に多くのタンパク質が損傷してしまうことである。この課題を克服するために、申請者はアガロースゲルとは正反対のゾルゲル温度相転移を起こすメビオールに着目した。メビオール（市販品、発売元：池田理化）は、低温（0℃以上15℃以下）で流動性のあるゾル、室温（約20℃以上）でゲルになる化学合成ポリマーである。このメビオールゲルを使用することによって、低温下で、メビオールゾル溶液とタンパク質溶液の混合溶液を作製することが可能となる。これによりタンパク質を損傷させることなく、安定に結晶化させることができる。その結果、固相ゲル中結晶化技術の汎用性が高まり、構造ゲノム研究の促進および創薬プロセスの飛躍的進展が見込まれる。

2. 方法

2. 1 固相ゲル中結晶化技術の確立

メビオールゲルは、これまで結晶化実験に使用されることがないため、4種類のタンパク質（ELS、GI、LZM、インシュリン）を用いて、最適なゲル濃度、温度コントロール、およびタンパク質溶

液との混合方法を検討した。具体的には、24%メビオールゲルを準備し、同等量のタンパク質溶液と結晶化試薬を氷上で混合させ、室温でゲル化させた後、結晶化実験を行った。

2. 2 固相ゲル中結晶化技術の評価

固相メビオールゲル中で育成したタンパク質結晶を用いてX線回折実験を行い本技術の有効性を検証した。評価に使用したタンパク質結晶は、4種類のタンパク質（ELS、GI、LZM、インシュリン）から得られた結晶で行った。具体的には、固相メビオールゲル中で育成した4種類のタンパク質結晶の評価のための指標として、X線強度データの統計値である結晶学的データに設定した。さらに、それらの値を溶液中で成長した結晶と比較することによって、固相メビオールゲル中で育成した結晶化技術の優位性を評価した。

3. 結果 研究成果

3. 1 固相ゲル中での結晶化

4種類のタンパク質（ELS、GI、LZM、インシュリン）を用いて、固化した8.0 wt%メビオールゲル中(固相ゲル中)での結晶化を実施した。対照実験として従来法である溶液中での結晶化(溶液中結晶化)も同時に実施した。その結果、固相ゲル中で4種類のタンパク質全てで結晶が観察された(図1)。これは本結晶化技術が、従来法と同じ結晶化条件で結晶を作製できる技術であることを示す初めての結果であった。

3. 2 メビオールゲルによる結晶核発生

4種類のタンパク質（ELS、GI、LZM、インシュリン）を用いて、ゲル濃度0 - 4.0% (w/v)の範囲内で結晶化実験を行い、ゲル濃度と晶出した結晶数との相関を検証した。その結果、ゲル濃度の上昇に従い、晶出する結晶数が増加する傾向が示された(図2)。メビオールゲルは結晶の核発生を促進する効果を持つことが明らかとなった。しかし、その増加傾向はゲル濃度が2.0%までは直線的であるものの、2.5~3.5%ゲル濃度では減少傾向になり、再び4.0%から上昇に転じることが分かった。これらの結果は、以前の固相アガロースゲル中結晶化実験でも良く似た傾向が報告されている。

3. 3 ソーキングでの浸透圧ショックの軽減

通常、タンパク質結晶は成長した環境と著しく異なる高イオン強度を持った溶液中へソーキングすると浸透圧ショックによってクラックを生じ致命的なダメージを受ける。ところが、固相メビオールゲル中で育成したELS、GI、LZM結晶は、それらの溶液中でも10分以上安定であった。対照的に、溶液中結晶は直ぐにクラックして溶け始めた(図3)。また放射光を用いた回折実験では、伸びや割れの無いシャープな回折点を示し、高精度構造解析に使えるデータを100%近いcompletenessで収集することができた。固相ゲル中結晶は、溶液中結晶と比べて浸透圧ショックによる損傷を大きく軽減できる特性を持っていると考えられる。

3. 4 固相ゲル中結晶のX線回折実験

固相ゲル中結晶の品質を評価するためX線回折実験を行った。特に、固相ゲル中結晶の凍結の

可否の確認および溶液中結晶と固相ゲル中結晶から得られた結晶学的データの比較を行った。その結果、全ての固相ゲル中結晶は低温窒素ガス気流下で問題なく凍結させることが可能であった。また、それらの結晶から得られた回折強度データは、溶液中結晶と比べて結晶学的データの著しい差を生じなかった。

3. 5 固相ゲル中結晶の構造解析

これまでの研究から、固相ゲル中結晶は、ゲル繊維を取り込んだまま成長していることが分かっている。そのため、タンパク質分子表面に存在しているアミノ酸とゲル分子が相互作用し、それらがタンパク質の立体構造に大きな影響を与えている可能性がある。我々はそれらを検証するため、高分解能のELS、ThM、GI結晶のX線回折データを用いて、それぞれ構造解析を行った。その結果、溶液中結晶から得られた構造と比べて、大きな構造変化は観察されず、それらのタンパク質分子の平均二乗偏差 (RMSD) は 0.15\AA 以下であった。また分子表面に存在するアミノ酸側鎖にも大きな構造変化は観察されなかった。さらに、それらと相互作用していると考えられるゲル繊維の電子密度も特定することはできなかった。

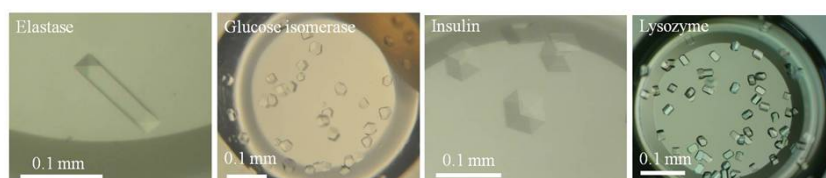


図1 固相ゲル中結晶

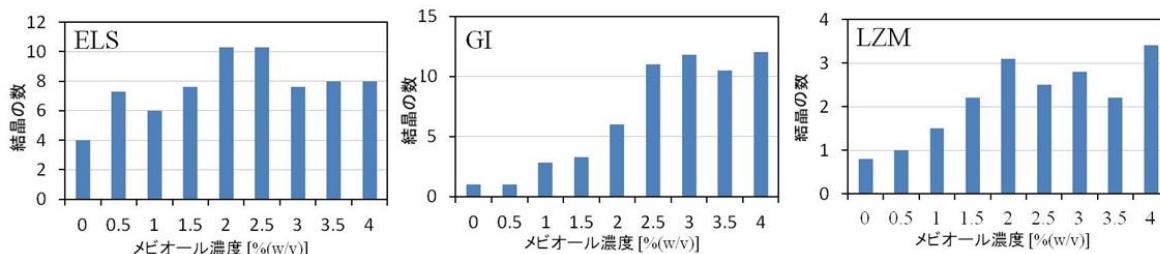


図2 ゲル濃度と結晶析出数のグラフ

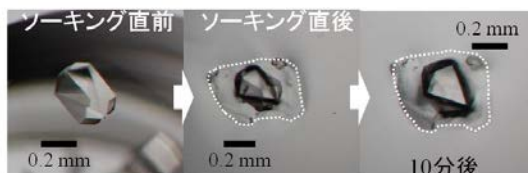


図3 ゲル濃度と結晶析出数のグラフ

4. 考察 まとめ

固相ゲル中結晶化技術は、従来法と比べて結晶化条件に大きな変化はなく、またその結晶学的データや立体構造情報においてもハイドロゲルの存在による影響は殆ど観察されていない。むしろ結晶の周りや内部に存在する凝固したゲルが、脆いタンパク質結晶を鉄筋コンクリートの鉄筋のように補強材として機能しているように思える。実際に、固相ゲル中結晶は従来の結晶よりも遥かに乾燥に強い。また核発生を促進させる効果もあり、核発生確率の低いタンパク質にとって網羅的な結晶化条件スクリーニングを

行う際の有効な技術になることが期待される。さらに、X線結晶構造解析の完全なオートメーション化に向けたマニピュレーション法の一つに成り得る技術と考えられる。特に、浸透圧ショックに対する耐性は、難水溶性化合物とタンパク質との複合体結晶を容易に準備できる可能性が大きい。実際に、固相ゲル中で得られたアボ型アビジン結晶をソーキング法によって複合体結晶にできたことは、膨大な化合物ライブラリーから新薬候補化合物を探し出す「創薬スクリーニング」への応用へ向けた第一歩になると確信している。ただ、そのためにはまだまだ解決すべき多くの課題が残されている。例えば、ハイドロゲルのゾル状態での粘度の高さは結晶化実験での取り扱いを困難にし、汎用性への大きな障害となっている。今後もアガロースやメビオールの更なる汎用性の向上をはかると同時に、それら以外の材料を用いた結晶化実験の可能性を探っていく必要がある。

5. 発表論文、参考文献

- ① **S. Sugiyama**, N. Shimizu, G. Sazaki, M. Hirose, Y. Takahashi, M. Maruyama, H. Matsumura, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, and Y. Mori, “A novel approach for protein crystallization by a synthetic hydrogel with thermoreversible gelation polymer”, *Cryst. Growth Des.*, **13**, (2013), 1899-1904
- ② S. Nakayama, H. Yoshikawa, R. Murai, M. Kurata, M. Maruyama, **S. Sugiyama**, Y. Aoki, Y. Takahashi, M. Yoshimura, S. Nakabayashi, H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori, “Effects of Gel-Solution Interfaces on Femtosecond Laser-Induced Nucleation of Protein”, *Cryst. Growth Des.*, **13**, (2013), 1491-1496
- ③ **杉山成**、松村浩由、丸山美帆、佐崎元、廣瀬未果、安達宏昭、高野和文、村上聡、井上豪、森勇介 「固相ハイドロゲル中でのタンパク質結晶化」 日本結晶学会誌、**54**巻、(2012)、300-303
- ④ **S. Sugiyama**, M. Maruyama, G. Sazaki, M. Hirose, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, and H. Matsumura, “Growth of protein crystals in hydrogels prevents osmotic shocks”, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, (2012), 5786-5789
- ⑤ N. Nishizawa, S. Ishida, M. Hirose, **S. Sugiyama**, T. Inoue, Y. Mori, K. Itoh, and H. Matsumura, “Three-dimensional, non-invasive, cross-sectional imaging of protein crystals using ultrahigh resolution optical coherence tomography”, *Biomedical Optics Express*, **3**, (2012), 735-740