

立体構造解析を目指した無細胞タンパク質合成系による タンパク質複合体調製への期待

深井 周也

X線結晶構造解析の手法はこの十数年で劇的に進歩しており、構造決定されるタンパク質の数は指数関数的に増加している。これは単に構造決定の速度が速くなっただけではなく、最近まで原子モデルを構築するのが困難だと思われてきた膜タンパク質や巨大複合体などの結晶構造が報告される頻度が高くなってきていることによる。本稿では、これまでに報告されている超分子複合体の立体構造決定において、どのような試料調製法が用いられているかの実例を示すと共に、超分子複合体の調製における現状での課題を示す。最後に、現状の課題に対して無細胞タンパク質合成系を用いて課題を克服していくことのメリットと今後の可能性について触れたい。

はじめに

X線結晶構造解析により構造決定されるタンパク質の数は、この十数年で指数関数的に増加している。第三世代の大型放射光施設が利用できるようになったことが、その理由として挙げられることが多いが、最近では第二世代の大型放射光施設でも挿入光源の改良などにより、微小結晶や従来では十分な強度をもつ回折を観測できなかった結晶でも測定が可能になってきている。放射光施設では、ユーザーが波長を自由に変更でき、簡便に XAFS (X-ray absorption fine structure; X線吸収微細構造) 測定を行えるようになっており、誰でも多波長異常分散法による位相決定が可能になっている。重原子標識の方法も、メチオニン残基の代わりにセレンメチオニンを組換え体タンパク質に導入し、セレン原子の異常分散を利用して位相決定を行うこと

が普通になっている。一方、実験室系でも十分な強度をもつX線発生機および十分な感度をもった回折計が利用でき、また、タンパク質自体のもつ硫黄原子の異常分散を利用した位相決定法の開発も進んでおり、実験室で身近に立体構造を決定する時代になってきているともいえる。これら測定技術の発展だけではなく、劇的に処理速度が向上したコンピュータのパワーを利用して、回折像のプロセッシング、重原子位置の同定、重原子位置の精密化と位相決定、電子密度改良による位相の改善、原子モデル構築、原子モデルの精密化の全ての過程においてプログラムの改良が進んでいる。このような構造決定方法の発展・改良により、単に構造決定の速度が速くなっただけではなく、これまで原子モデルを構築するのが困難だと思われてきた膜タンパク質や巨大複合体などの結晶構造が報告される頻度が高くなってきている。本稿では、巨大複合体の立体構造解析を行うにあたっての課題を示すとともに、タンパク質複合体調製における無細胞タンパク質合成系の可能性に触れていきたい。

東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター (〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259 B66)

Expectation for the cell-free synthesis of the multisubunit complex towards the three-dimensional structure determination

Shuya Fukai (Center for Biological Resources and Bioinformatics, Tokyo Institute of Technology, B66 4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan)

1. 構造決定に向けた複合体調製の方法

多くの異なるサブユニットから構成されるヘテロ多量体を形成するタンパク質の構造解析に向けた試料調製の方法としては、生体試料からの調製、精製した組換え体サブユ

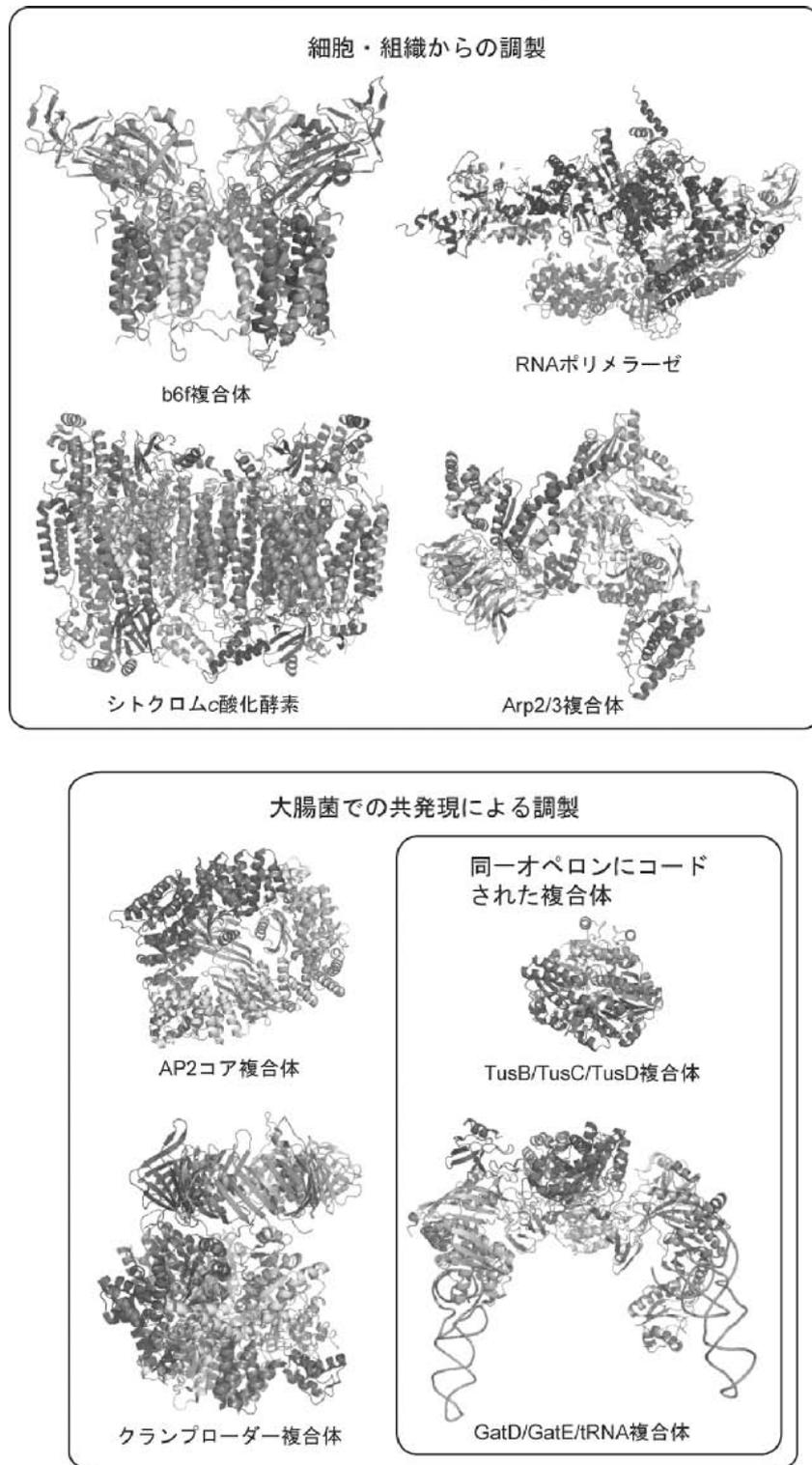


図1 これまでに結晶構造が決定されたタンパク質複合体の例

ニットからの再構築，そして本稿で重点的に述べる共発現系の構築の三つが挙げられる．生体試料からの複合体調製では，リボソーム¹⁾，RNAポリメラーゼ^{2,3)}のようないわゆるセントラルドグマで働く主要なタンパク質複合体や脂肪酸合成酵素^{4,5)}のような代謝系で働くタンパク質複合体のみ

ならず，アクチン伸長の核形成を行い細胞骨格のブランチングを起こす Arp2/3 複合体⁶⁾などの高次機能を担う複合体などでも結晶構造が決定されている (図1)．呼吸や光合成に関わる膜タンパク質複合体群でも，生体試料から精製されたタンパク質複合体の結晶構造が決定されてい

る^{7,8)}。生体試料からの調製がうまく機能するかどうかは生体内での実際の発現量に依存する。また、生体内にアイソフォームが存在する場合には試料の均一性に問題が生じるため、立体構造解析を行うためには組換え体タンパク質が必要であることがしばしばである。

一方、二番目に述べた各コンポーネントを組換え体タンパク質として調製し、*in vitro* で再構成するという手法は、以下に述べる二つの原因のいずれかにより困難な場合が多い。第一の原因は、サブユニット単独では各サブユニットがタンパク質分解酵素に感受性が強く、容易に分解してしまうためである。そして、第二の原因は、サブユニット単独では他のサブユニットとの相互作用部位の疎水性が高いために、封入体として発現してしまったり、可溶化したとしても凝集を起こして沈殿してしまったり、あるいは、数MDaを超えるような立体構造解析には不適切な会合体を形成するためである。例えば、転写メダイエータのサブユニットは、一番目の例にあてはまり、サブユニットのいくつかはそれ自身では分解されやすいが、サブユニットの組み合わせを変えることによって安定なサブ複合体として調製することが可能であると報告されている。一方、我々が取り組んでいる exocyst 複合体（詳しくは後半で紹介する）は、二番目の例にあてはまる。各サブユニットを大腸菌で単独に発現させた場合、大量に発現はされるものの、いずれも封入体を形成してしまう。このようなタンパク質複合体の場合では、三番目に述べたタンパク質の共発現が大量調製に有効である。目的は異なるが、発現がホストの生育を阻害する場合、例えばバクテリアに対するトキシンの発現でも、アンチトキシンなどの阻害剤との共発現は有効である⁹⁻¹¹⁾。

2. 組換え体を用いた複合体調製

筆者の記憶では、DNA複製で働く酵母由来のクランプローダー¹²⁾やクラスリン小胞のアダプター分子である AP2 複合体のコア部分¹³⁾などが大腸菌の共発現系を用いてヘテロ多量体の結晶構造決定に成功している（図1）。これらは薬剤耐性の異なる二つの発現ベクターに複数の遺伝子を挿入し、ポリシストロニックに発現させた例である。バクテリア内でオペロンとしてポリシストロニックに発現している遺伝子群の場合は、一つのオペロンをそのまま発現ベクターに挿入することによって、比較的容易に複合体を発現させることが可能である。我々の研究室においても tRNA のチオ化修飾に関わるタンパク質 TusB/TusC/TusD 複合体¹⁴⁾や tRNA^{Gm} に結合したグルタミン酸にアミド基を導入してグルタミンに変換する酵素 GatD/GatE 複合体¹⁵⁾の結晶構造決定に成功している。また、構造決定には至っていないが分子シャペロン複合体なども同様の方法で大量調製および結晶化に成功している。昆虫細胞とバキュロウイ

ルスを用いた発現系では、ウイルスの共感染を用いたタンパク質の共発現が広く利用されている。極低温電子顕微鏡による二次元投影像に基づいた立体像の再構成では、COPII 小胞のコートタンパク質である Sec13/Sec31 複合体¹⁶⁾や転写メダイエータ複合体¹⁷⁾などの立体像の再構成が二次元の投影像を基に行われている。驚くべきことに、転写メダイエータでは20を越えるサブユニットの共発現および再構成に成功している。

このように成功例をピックアップしてみると、組換え体タンパク質によるマルチサブユニット複合体の大量調製は、やればできるものといった印象を受けるが、実際に発現系を構築するとなると様々な困難に直面するものである。例えば、大腸菌での共発現は、ホスト自身に大きな負荷がかかるらしく、発現させるサブユニットの数を増やすとタンパク質の全発現量が目に見えて減っていくのはよくあることである。これまでに成功している例を見ると、一つのサブユニットの分子量が3万以下の場合にうまくいっている例が多い。共発現による発現量の低下は、昆虫細胞の系を用いることで解消できるように見える。例えば、我々が経験した例では、大腸菌の共発現が困難であった分子量 100kDa および 80kDa の二つのサブユニットを昆虫細胞の系で容易に大量発現させることができた。昆虫細胞の系は、大腸菌の中で組換えバクミド (Bacmid) を調製できるインビトロゲン社の Bac-to-Bac のキットを用いることにより容易にタンパク質を発現させることができるようになっている。ただし、Sf9 の中でバクミドと目的遺伝子断片の挿入されたベクターとで組換えを起こさせる従来のシステム (BD バイオサイエンス社の BaculoGold など) で調製する組換えバクミドの方が、Bac-to-Bac のシステムで調製するバクミドよりも安定した発現が得られると感じている研究者も少なからずいるようである。生化学をやっている研究室では、フラスコかディッシュを用いた静置培養、そうでなければ、スピナーフラスコを用いた浮遊培養のどちらかでやっている場合が多いようであるが、大腸菌の大量培養同様に振とう培養が最も簡便で有効な方法のように感じている。ただし、m.o.i. (multiplicity of infection; 感染多重度) を高めに確保しなくてはいけないので、高タイターのウイルスを用いることに起因する変異のリスクはあると思われる。どの系を用いるにせよ、各サブユニットの発現を確認するには、1カ月近くかかるわけであり、また、新規に始めるには、安全キャビネットの導入、振とう培養器の確保など費用も場所もかかるわけであるが、うまくいかかわからない系に費用、場所、人材をかけるのは、無駄に思ってしまう場合もあるであろう。

例え昆虫細胞の発現系が使えるとしても、分子量の増加は発現系構築の困難さを高めることになる。さまざまな酵素やキットが容易かつ安価に利用できる現在では、遺伝子

操作はルーティンワークであり、誰でも簡単にできるというのが常識である。しかし、構造解析を目的とした発現系構築となると難しい場面がある。発現するタンパク質に余分な配列が付加されるような発現コンストラクトは避けなくてはならないし、使える制限酵素も限られる場合がほとんどである。とにかくどんな形でも発現すればよいという発現系ではなく、目的のものが正確に且つ大量に発現できる発現系を構築しなくてはいけない。この条件を満たすように発現系を構築しようとする、発現させるサブユニットの分子量が大きくなると困難さが増すことになる。さらに、このような困難さが引き起こす副産物的な問題点として、困難さ故に難しいターゲットに対して取り組む人材が確保できない点がある。苦勞して作った発現プラスミドがうまく機能するかどうかはやってみないとわからないことであり、さらに、うまく発現したとして複合体が可溶化した状態で調製できるのか、はたまた、結晶化できる濃度まで濃縮可能なのか、さらに、そこまですまくいったとして結晶解析に適する結晶が得られるのかと心配をし始めたらしきがないわけである。最近では、学生さんでさえ研究を始める前から自分が構造解析しようとするタンパク質がいわゆる一流紙に載るのかどうか考えたりするような状況なわけであり、多大な苦勞をして発現系からやらなくては行けない系に手を出すのか？といえ、答えはおのずと No になってしまう。超分子複合体でなくてもインパクトのある仕事はできるわけであり、発現系構築で苦勞するような試料を避けるのは当然といえ、当然なのである。安定な立場にある大学の教員や研究所の研究員（といっても近年では任期制が取り入れられていることが多いのでもはや安定とはいえないのかもしれないが）ならばとにかく、1年ごとに更新があるようなポジションでは、大きな賭けに出にくいのは確かである。実際、私がアメリカでポスドクをしていた時には、留学先で結晶構造を一つ決定した後に、2種類の巨大複合体を構造解析のターゲットとしていたが、飲み会の時などには、ラボの仲間から「止めたほうがいいんじゃない？」というニュアンスの親切な(?)アドバイスももらったものである。

3. 複合体調製の実際

さて、ここまで述べてきた超分子複合体の調製の実際状況を、我々が現在取り組んでいる超分子複合体を例として紹介したい。我々の構造解析のターゲットの一つとして小胞と標的膜をつなぎとめる tethering factor (繫留因子) と呼ばれる超分子複合体がある¹⁸⁾。輸送経路に対応して数種類の超分子複合体があることが知られているが、我々が取り組んでいるのは、開口放出で働く繫留因子 exocyst 複合体である¹⁹⁾。構造解析を行うにあたってまず考える方法は、各サブユニットを大腸菌で発現させ、それらを精製し

た上で再構成する方法であるが、どのサブユニットも可溶化できないため、exocyst 複合体ではこの方法は利用できない。ヘテロ八量体であるため、大腸菌で全てのサブユニットを発現させることは難しく、さらに、先に述べたように二つのサブユニットの共発現でも劇的な発現量の低下が起きてしまう。そこで、昆虫細胞へのバキュロウイルスの共感染を使った方法に手を付けたが、発現系構築に時間がかかることから、並行して生体試料からの精製を行うことにした。幸いにも結合タンパク質を用いたアフィニティー精製が適用可能であり電子顕微鏡を使った負染色像の撮影に必要な複合体を得ることはできるのだが、均一な粒子像が得られず、それぞれの大きさの粒子に含まれるサブユニット構成の同定が必要な状況である。サブユニット構成を正確に把握するのは難しく、例えコアとなるサブ複合体が見つかったとしても、全てのサブユニットに対する抗体がなければ、そのサブ複合体がどのサブユニットから構成されているのかを決定するのは困難である。そこで、やはりサブユニットの出し入れが可能なりコンビナントによる再構成を行うわけであるが、ほとんどのサブユニットが分子量 80kDa を超えており、思うように発現系構築が進まないのが現状である。

4. 超分子複合体の立体構造決定における無細胞タンパク質合成の可能性

ようやくここに至って、無細胞タンパク質合成の話になるわけである。*in vitro* 合成という言葉からは、RNA とタンパク質の複合体の結晶構造決定を行ってきた我々には T7 RNA ポリメラーゼを使った RNA 鎖の大量調製がすぐに頭に浮かぶ。どこの研究室でもうまくいっているというレベルでないにせよ、*in vitro* 合成が、最近の RNA の立体構造決定数の増加に大きく寄与していることは疑う余地も無い。RNA とタンパク質は物性が異なっているため同様に考えることはできないが、*in vitro* 合成のもつ可能性という点では同様の期待を抱かせても不思議ではない。構造解析に向けては、無細胞タンパク質合成系には、二つの利用法が考えられている。一つは、スクリーニングの系としての利用法であり、もう一つは、実際に構造解析に用いるに十分な大量発現系としての利用法である。もちろん、我々としては後者に大きく期待したいが、無細胞タンパク質合成に必要な因子を含む溶液（大腸菌やコムギ胚芽の抽出液であったり、あるいは、精製した因子群の混合液であったりする）の費用が高く、なかなか難しい点もあるかと思う。その点に関しては、無細胞タンパク質合成が構造解析に有用であることが広く知れわたり利用が増えることにより解決できるのではないかと楽観的に考えることにする。

スクリーニングに関しては、少なくとも1本のポリペプ

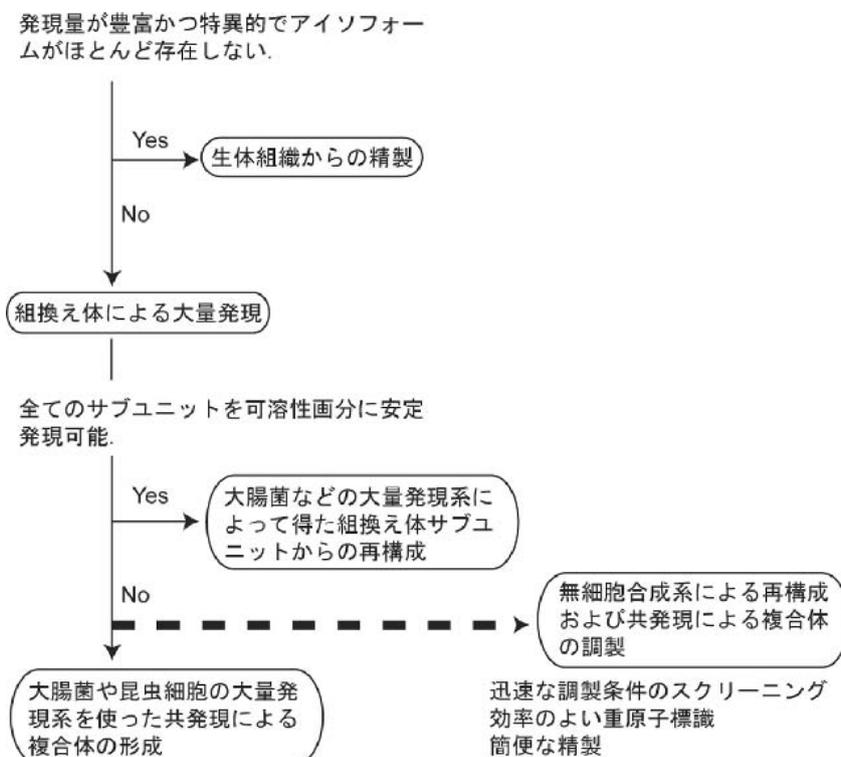


図2 超分子複合体調製の選択のフローチャート

チド鎖の合成の場合は、NMR スペクトルの測定と組み合わせる形でうまく機能していると思われる。この延長上で、反応液を混合することで複合体を調製できることが期待される。それぞれのサブユニットの発現系の反応液を混合するだけで複合体が調製できてしまうことのメリットは非常に大きい。安定なサブ複合体のスクリーニングを素早く行うことができれば、無細胞タンパク質合成での大量調製が難しいとしても、他の発現系を容易に構築できるはずである。あるいは、不安定な複合体であっても、少量でも試料を得ることができれば、プロテアーゼによる限定分解の手法を用いて、複合体を形成した状態での各サブユニットの安定な領域の同定が可能である。また、混合する順番を変えて複合体形成の効率を検討することにより、複合体が構成される順序を推測することができる。これらは、昆虫細胞へのウイルスの多重感染でも同様に可能であるが、各ウイルスのタイターを揃える必要があり、また、混合した際に各ウイルスの感染率がどうなるかは全く予想がつかない。また、無細胞タンパク質合成の場合、新たに設備を揃えること無しに安定な複合体を調製できる条件を検討することができる点は有効である。仮に費用は潤沢にあったとしても、もともと手狭な研究スペースの中に、使えるかどうかかわからない発現系に必要な安全キャビネットやインキュベーターを置くことは避けたいであろう。また、これはタンパク質複合体だけではないことであるが、精製の手間がかからない点も非常に大きい。夾雑タンパク質が少な

いため、非特異的に相互作用するタンパク質の混入を避けられると考えられる。我々が試したいいくつかのタンパク質では、大腸菌での発現と同様に、やはり分子量が大きいと発現量が減少する傾向にあるので、その点は更なる改善が期待される。一方、大腸菌での発現が困難で、多数の分解物が検出されるようなタンパク質で、無細胞タンパク質合成での発現では分解が減り結果的に得られるタンパク質の量が増加したといったうれしい例もあった(残念ながら精製途中で凝集してしまい、結晶化には至らなかったが)。結晶構造解析における位相決定では、セレノメチオニン化タンパク質の調製はいまや必須ともいえるが、野生型タンパク質では結晶化に十分量発現していたものが、セレノメチオニン化タンパク質になった途端に発現が激減してしまう例がある。このような場合も、無細胞タンパク質合成系が有効である可能性がある。すでに、無細胞タンパク質合成系を使った重原子標識法もいくつか報告されており^{20,21)}、これらの重原子標識は位相決定が困難な例に対して一つの可能性を示している。

大腸菌だけではなく、酵母、昆虫細胞、動物細胞などの発現系も最近では比較的容易に使えるようになってきているものの、超分子複合体や、今回は触れなかった膜タンパク質など、まだまだ大量調製が難しい試料は残されており、そのような試料調製に無細胞タンパク質合成の手法が大きく貢献することを期待したい。

文 献

- 1) Selmer, M., Dunham, C.M., Murphy, F.V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A.C., Weir, J.R., & Ramakrishnan, V. (2006) *Science*, **313**, 1935–1942.
- 2) Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., & Yokoyama, S. (2002) *Nature*, **417**, 712–719.
- 3) Cramer, P., Bushnell, D.A., & Kornberg, R.D. (2001) *Science*, **292**, 1863–1876.
- 4) Maier, T., Jenni, S., & Ban, N. (2006) *Science*, **311**, 1258–1262.
- 5) Jenni, S., Leibundgut, M., Maier, T., & Ban, N. (2006) *Science*, **311**, 1263–1267.
- 6) Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., & Pollard, T.D. (2001) *Science*, **294**, 1679–1684.
- 7) Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., & Yoshikawa, S. (1996) *Science*, **272**, 1136–1144.
- 8) Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J.L., & Cramer, W.A. (2003) *Science*, **302**, 1009–1014.
- 9) Kamada, K., Hanaoka, F., & Burley, S.K. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 875–884.
- 10) Takagi, H., Kakuta, Y., Okada, T., Yao, M., Tanaka, I., & Kimura, M. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 327–331.
- 11) Yajima, S., Nakanishi, K., Takahashi, K., Ogawa, T., Hidaka, M., Kezuka, Y., Nonaka, T., Ohsawa, K., & Masaki, H. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **322**, 966–973.
- 12) Bowman, G.D., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2004) *Nature*, **429**, 724–730.
- 13) Collins, B.M., McCoy, A.J., Kent, H.M., Evans, P.R., & Owen, D.J. (2002) *Cell*, **109**, 523–535.
- 14) Numata, T., Fukai, S., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., & Nureki, O. (2006) *Structure*, **14**, 357–366.
- 15) Oshikane, H., Sheppard, K., Fukai, S., Nakamura, Y., Ishitani, R., Numata, T., Sherrer, R.L., Feng, L., Schmitt, E., Panvert, M., Blanquet, S., Mechulam, Y., Soll, D., & Nureki, O. (2006) *Science*, **312**, 1950–1954.
- 16) Stagg, S.M., Gurkan, C., Fowler, D.M., LaPointe, P., Foss, T. R., Potter, C.S., Carragher, B., & Balch, W.E. (2006) *Nature*, **439**, 234–238.
- 17) Takagi, Y., Calero, G., Komori, H., Brown, J.A., Ehrensberger, A.H., Hudmon, A., Asturias, F., & Kornberg, R.D. (2006) *Mol. Cell*, **23**, 355–364.
- 18) Whyte, J.R. & Munro, S. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 2627–2637.
- 19) Hsu, S.C., Hazuka, C.D., Roth, R., Foletti, D.L., Heuser, J., & Scheller, R.H. (1998) *Neuron*, **20**, 1111–1122.
- 20) Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, K., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Ishitani, R., Nureki, O., & Yokoyama, S. (2002) *J. Struct. Funct. Genomics*, **2**, 29–35.
- 21) Kodama, K., Fukuzawa, S., Sakamoto, K., Nakayama, H., Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Shirouzu, M., Takio, K., Tachibana, K., & Yokoyama, S. (2006) *Chembiochem.*, **7**, 1577–1581.