

蛋白質結晶作製プラットフォームとしてのヒト B 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化
Crystallization of human hepatitis B virus like particles
as a platform for protein X-ray crystallography

薬科学専攻 菊地 正樹
Masaki Kikuchi

【背景】蛋白質と基質相互作用の制御をベースとしたドラッグデザインにおいて、薬剤：蛋白質複合体の立体構造解析は必須である。その生体高分子の立体構造解析には主として、X 線結晶構造解析、NMR 解析、極低温電子顕微鏡 (Cryo-EM) がある。その中で X 線結晶構造解析は、分子量に制限がないことで NMR より、分解能の点で Cryo-EM より有利である。さらに極低温 X 線回折強度測定システムの実用化や巨大放射光実験施設の発展によりますます、必須な解析方法となってきた。

蛋白質の X 線結晶構造解析には、クローニングした遺伝子の大規模な発現系を構築し、蛋白質の可溶化、精製、結晶化のステップが必要である。蛋白質の結晶化については、結晶化用微量分注ロボットや全自動蛋白質結晶化観察システムを用いた結晶化スクリーニングなど、様々な試みがなされている。しかしながら、良質な結晶を得るための詳細な結晶化条件の探索は未だ研究者の勘と経験によるところが大きく、クローニングした遺伝子の蛋白質が結晶化に成功した割合は 10 分の 1 に過ぎない。また、その結晶化に要する時間は数時間から数ヶ月、場合によれば数年かかるものまであり、系統的な創薬研究の通常ツールとして用いることは難しい。さらに、薬剤：蛋白質複合体結晶を作製する方法としては、ソーキング法：ターゲット蛋白質単結晶を目的薬剤溶液 (極低温 X 線回折強度測定用不凍剤含有) に数分間浸し複合体を形成させる方法と、共結晶化法：薬剤溶液と蛋白質溶液を混合し結晶化することで複合体結晶を得る方法がある。ソーキング法においては、溶媒条件が変わるため一般には結晶が崩壊・融解してしまい、共結晶化法においては薬剤が蛋白質に結合することにより、その表面構造が変化するため蛋白質のみで結晶化できても、複合体では結晶が析出しなくなる場合が多い。これらの問題を解決するために、新しい結晶化方法を考案する必要がある。

一般に、結晶を形成する際、蛋白質間の表面での相互作用が重要であり、これに基づき蛋白質分子が三次元的に規則正しく配列される。そこで、蛋白質で構成された三次元格子 (殻) を作製し、その内部へ解析対象とする目的蛋白質分子を配置させた結晶を作製する方法を考案した^{1, 2)}。この方法を用いることで、目的蛋白質が薬剤と複合体を形成した場合でも、その複合体蛋白質の表面構造とは無関係に殻の結晶化条件で結晶を作製することができると考えた。三次元格子となる殻として、マテリアルサイエンスや生物医薬品の分野において様々なアプリケーションのナノプラットフォームとしても期待されているウイルスキャプシドに着目した。

本研究におけるウイルスキャプシドとして検討したのは、ヒト由来 B 型肝炎ウイルス (HBV) キャプシドである。HBV キャプシドは、二量体のコアプロテインのみで構成され、その C 末端が欠損したコアプロテイン (HBc149) のキャプシドは既に詳細な結晶構造 (分解能 3.3 Å) が明らかにされている³⁾。また、C 末端や分子表面の c/e1 エピトープに外来の分子配列を配置させた HBc149 融合蛋白質は、自己集積によりウイルス様粒子 (Virus Like Particles: VLPs) を形成する。これらの融合蛋白質から構成される VLPs はワクチン、DDS、それにナノテクノロジー分野において多くの研究がなされており、分子生物学的、生化学的に多くの知見が得られているため、結晶化プラットフォームとして応用できると期待される。

[目的] これまでに報告されている HBc149 融合蛋白質では、分子量が大きい蛋白質を融合させた場合、立体障害のために VLPs を形成できないということがあった。例えば、HBc149 の C 末端にオワンクラゲ由来緑色蛍光蛋白質 (GFP、27 kDa) を結合させた融合蛋白質は VLPs を形成することができない⁴⁾。また、黄色ブドウ球菌由来ヌクレアーゼ (17 kDa) を結合させた場合は不安定な構造をもつ粒子を形成し、その粒子は不均一な粒子であると推測され、結晶化サンプルとしては適していない⁵⁾。

本研究では、分子量のより大きい蛋白質を VLPs 内側に配置させるために、二分子の HBc149 を互いにフレキシブルなペプチドでつないだコアプロテインダイマー (Core Protein Dimer: CPD) を作製した。さらに、HBc149 の 48、61、107 番目のアミノ酸であるシステインをアラニンに置換し、150 番目にシステインを付加したコアプロテイン (HBc150) から変異体 CPD (CPDm) を作製することで VLPs の安定性と形成効率の向上を図った。この CPDm に融合させる蛋白質として GFP を選んだ。GFP を選んだ理由として、次の二点が挙げられる。

(1) 前述の通り単量体の HBc149 の C 末端に融合させた場合に VLPs を形成できない蛋白質であり、HBc149 融合蛋白質と比較することで結晶化プラットフォームとしての有用性が評価できる、(2) 既に結晶構造が明らかにされているため、蛍光の測定と結晶構造解析の結果から、VLPs 内側に蛋白質を配置させたときに蛋白質の機能と構造が保持されているかの確認が容易である。GFP の融合位置が異なる二種類の CPDm 融合蛋白質 (CPD1、CPD2) の発現系構築、精製を行い VLPs の結晶化を試みることで結晶化プラットフォームとしての有用性を検討することを目的とした。

[方法] CPD、CPDm 遺伝子配列の作製と、大腸菌による発現・精製・結晶化

PCR 法により CPD (図 1A)、CPDm (図 1B) 遺伝子配列を作製し、pET28a(+)ベクターに組み込んだ。作製されたプラスミドを大腸菌へ形質転換し、大量培養することで目的蛋白質を発現させた。この蛋白質を、ゲルろ過クロマトグラフィー、スクロース密度勾配超遠心分離法により精製し、蛋白質を濃縮した。濃縮された蛋白質を野生型の結晶化条件³⁾を基に結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶の不凍剤に対する安定性を確認するため、不凍剤含有結晶化溶液に浸けて観察した。

CPDm の C 末端 (CPD1) と Linker 間 (CPD2) に GFP を配置させる融合蛋白質遺伝子配列の作製と、大腸菌による発現・精製・結晶化

CPDm 遺伝子に GFP 遺伝子を挿入することで、CPD1 遺伝子配列 (図 1C) を作製し、ペプチドリンカー遺伝子間に GFP 遺伝子を挿入することで、CPD2 遺伝子配列 (図 1D) を作製した。各プラスミドを大腸菌へ形質転換し、CPD と同様の方法で精製した。超遠心分離法により分離された VLPs の蛍光強度測定により VLPs 形成効率を計測した。野生型の結晶化条件を基にスクリーニングを行い、CPD と同様に得られた結晶が不凍剤に対して安定であるか観察した。

蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡 (オリンパス社製、IX71) により、明視野、励起光下の双方で結晶を観察した。

CPD1、CPD2 結晶の X 線回折データ収集

リガク社製 X 線発生装置 MicroMax、高速イメージングプレート R-AXIS VII システムを用いて、得られた結晶を液体窒素で凍結し、これに X 線 (発生条件 40 kV、20 mA) を照射し、ディテクター距離 250 mm、振動角 0.2 °、露光時間 1 時間の測定条件で 45 ° 毎に回折データを収集し結晶学的データを測定した。さらに高分解能での X 線結晶構造解析をするために Photon Factory BL-17A (高エネルギー加速器研究機構、つくば) において回折実験を行った。得られた回折データをプログラム *MOSFLM* 処理し、プログラム *MOLREP* を用いて分子置換法を行うことにより CPDm 融合蛋白質の初期構造を求めた。

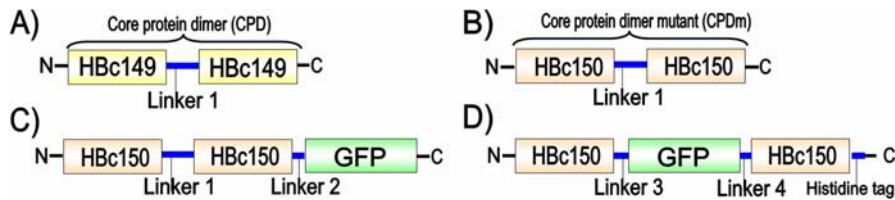


図1 本研究で作製した蛋白質の遺伝子ブロック図 A) CPD、B) CPDm、C) CPD1、D) CPD2

Linker 1 のペプチド配列：GGSEEE (GGG)₇、Linker 2 のペプチド配列：GGSKL、
Linker 3 のペプチド配列：(GGG)₃KL、Linker 4 のペプチド配列：(GGG)₃

【結果】CPDの精製とCPDmの結晶化

CPDm は VLPs 形成効率が改善され、結晶化に必要な濃度が得られた。スクリーニングの結果、平板結晶と八面体結晶の二つの結晶が得られた。平板結晶は不凍剤（2,3-ブタンジオール）溶液に浸すとすぐに溶解したが、八面体結晶は不凍剤に対して溶解せずに結晶形を保っていた。

CPDm 融合蛋白質の VLPs 形成効率向上

HBc149 を用いた融合蛋白質では、Linker の長さやヒスチジンタグが付加される位置（N 末端、C 末端）により VLPs の形成効率が変化した。CPD1 は Linker1 が GGSEEE (GGG)₇ の配列、CPD2 は Linker 3 が (GGG)₃KL、Linker 4 が (GGG)₃ の配列で C 末端にヒスチジンタグが付加されている融合蛋白質が最も効率良く VLPs を形成することを見出した。システインが付加された HBc150 を用いた融合蛋白質である CPD1 と CPD2 を作製したところ、ともに VLPs 形成効率が向上し結晶化に必要な濃度が得られた。

CPD1、CPD2 の結晶化と不凍剤溶液へのソーキング

CPD1 は 0.5-1 % PEG20000、1.0-1.4 M 硫酸アンモニウム、0.1 M MES pH 6.5 で、CPD2 は 2 % PEG20000、1.3-1.6 M 硫酸アンモニウム、0.1 M MES pH 6.5 の結晶化条件で、ハンギングドロップ蒸気拡散法により良好な結晶が得られた。試みた不凍剤（2,3-ブタンジオール、イソプロパノール、グリセロール）に浸してもこの結晶は影響を受けなかった。最終的に用いた不凍液は 2,3-ブタンジオールである。

CPDm 融合蛋白質結晶の蛍光顕微鏡観察

CPD1 と CPD2 の八面体結晶を蛍光顕微鏡により観察すると両者とも GFP 由来の蛍光が確認された（図 2）。

CPDm 融合蛋白質結晶の X 線解析

不凍剤にソーキングした結晶を極低温下で X 線回折測定することにより空間群と格子定数を決定した（表 1）。両者は同型であった。Photon factory にて、高分解能（CPD1: 2.15 Å、CPD2: 2.8 Å）な回折データを測定し^{6,7)}、分子置換法により CPD1 と CPD2 の初期構造を算出した（電子密度図：図 3A-1）。CPD1、CPD2 の結晶内での分子配列は、24 分子で八面体を構成する粒子構造を持つことが明らかになった（図 3A-2）。この八面体粒子構造は、B 型肝炎ウイルス粒子としてはじめて観察されたもので、元の正二十面体構造の結晶よりはるかに高分解能の回折データを収集できたので、より詳細なウイルス蛋白質自身の構造研究にも有用である。図 2 に示すように結晶から蛍光が確認され、粒子外側に GFP が存在する空間が見当たらないため、八面体構造内部に GFP が内包されていることがわかった（図 3B）。

	空間群	格子定数	分解能	completeness
CPD1	F432	a = b = c = 219.7 Å, α = β = γ = 90°	2.15 Å	99.9%
CPD2	F432	a = b = c = 218.6 Å, α = β = γ = 90°	2.8 Å	96.6%

表1 放射光施設による回折データ収集から得られた結晶学的データ

【結論】CPD1、CPD2 の結晶から蛍光が確認され（図 2）、結晶中の GFP は活性を保持した状態で存在していることが明らかになった。任意の蛋白質を活性が保持された状態で結晶化させるシステムが構築された。

さらに、構造解析の結果から CPDm の八面体粒子の構造が得られた（図 3B）。ヒト B 型肝炎ウイルスコアプ

ロテインの他に、バクテリオファージ MS2 コートプロテインの CCPD (Covalent Coat Protein Dimer) においても、八面体粒子構造を形成することがソーキング法・X線結晶解析によって明らかにされている⁸⁾。一般にウイルスキャプシドの結晶は不凍剤に対して溶解・崩壊性を示す、若しくはソーキングに耐えられたとしても低分解能であることが多い。これらの八面体結晶は、安定な VLPs 結晶の形成制御法として有効である可能性があり、将来的にソーキングによる薬剤複合体の結晶化プラットフォームとすることができる。

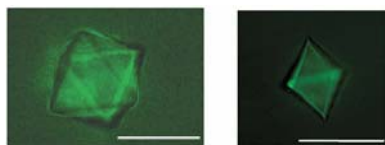


図2 結晶の明視野／蛍光
顕微鏡写真

左) CPD1、右) CPD2
(スケールバー = 0.1 mm)

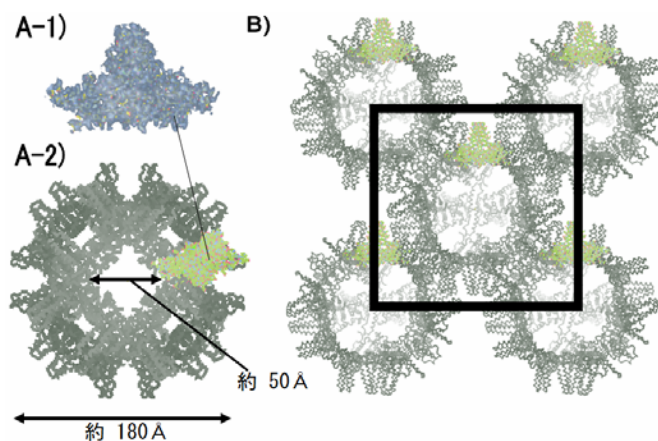


図3 CPD1の八面体結晶から得られたCPDmの構造と、それが24分子集合した八面体粒子の構造

A-1) CPD1結晶から得られたCPDmの電子密度図(2Fo-Fcマップ)

A-2) CPD1結晶から得られたCPDmの結晶中の八面体構造

B) 単位格子内でのCPDm八面体粒子構造(太線:単位格子)

[参考文献]

- 1) (発明者) 菊地正樹, 岩淵紳一郎, 亀甲龍彦, 松本治 (出願人) 学校法人加計学園. 会合ユニット作製用リンカーペプチド. 2012-07-05 特開.
- 2) (発明者) 菊地正樹, 岩淵紳一郎, 亀甲龍彦, 松本治 (出願人) 学校法人加計学園. 八面体構造を有するB型肝炎ウイルス様粒子結晶. 特願2013-91823号.
- 3) Wynne, S. A., *et al.* (1999). *Mol. Cell.* **3**, 771-780.
- 4) Vogel, M., *et al.* (2005). *FEBS Lett.* **579**, 5211-5216.
- 5) Beterams, G., *et al.* (2000). *FEBS Lett.* **481**, 169-176.
- 6) Kikuchi, M., *et al.* (2013). *Acta cryst.* **F69**, 165-169.
- 7) Kikuchi, M., *et al.* (2013). *Acta cryst.* **F69**, 942-945.
- 8) Plevka, P., *et al.* (2008). *Protein Sci.* **17**, 1731-1739.

[謝辞] 本研究において、HBc149 遺伝子を分与して頂いた英国 MRC 教授アンドリュー・W・レズリー博士に深く感謝いたします。Photon Factory での X 線回折データ収集に際しお世話になりました東京農工大学大学院 教授 養王田正文博士、准教授 尾高雅文博士、准教授 野口恵一博士に謹んで深く感謝の意を表します。GFP 遺伝子を分与して頂いた本学薬学部 教授 松岡耕二博士に深く感謝いたします。共同機器利用に当りお世話になりました、本学薬学部の関係各位に感謝いたします。

本研究に際して御指導、御鞭撻を賜りました本学薬学部 教授 松本 治博士、准教授 岩淵紳一郎博士、助教 亀甲龍彦博士に心より謝意を表します。実験にご協力して頂いた薬品物理化学研究室員一同に感謝いたします。

最後に御助言と御指導を賜りました本学薬学部 教授 浜名洋博士に謹んで深く感謝の意を表します。