

平成 25 年度

# 博 士 論 文

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

千葉科学大学

大学院薬科学研究科

薬科学専攻

菊地 正樹

平成 26 年 3 月

## 目次

【略号】	1
【序論】	3
第一章 八面体粒子を形成する B 型肝炎ウイルスコア融合蛋白質の 発現、精製、結晶化と X 線結晶学的研究	
【1-1 背景と目的】	9
【1-2 実験方法】	14
【1-3 結果】	24
【1-4 考察】	37
第二章 GFP を挿入したペプチドリンカーを介して二量体化した B 型肝炎ウイルスコアプロテインの発現、精製、結晶化と X 線結晶学的研究	
【2-1 背景と目的】	41
【2-2 実験方法】	44
【2-3 結果】	50
【2-4 考察】	60
【引用文献】	62

【総括と結論】----- 65

【今後の展望】----- 66

【謝辞】----- 69

【発表論文目録】----- 70

## 【略号】

本文中あるいは表中で使用した略号は以下の通りである。

aa	Amino acid
AFM	Atomic force microscopy
BSA	Bovine serum albumin
CCPD	Covalent coat protein dimer
CPD	Core protein dimer
CPDm	Core protein dimer mutant
Cryo-EM	Cryo-electron microscopy
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ competent cells (Clontech Laboratories)
DW	Distilled water
EDTA	Ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> tetraacetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FBDD	Fragment based drug design
GFP	Green fluorescent protein
HBc149	Hepatitis B core antigen (1–149 amino acid)
HBV	Hepatitis B virus
HTS	High throughput screening
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside
MES	2-Morpholinoethanesulfonic acid
NMR	Nuclear magnetic resonance
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol

PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
SBDD	Structure based drug design
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SRF	Self rotation function
TEM	Transmission electron microscope
Tris-HCl	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol hydrochloride
VLPs	Virus like particles

## 【序論】

現在の薬のほとんどは、細胞膜受容体や酵素といった蛋白質に作用している。従って、これらの蛋白質と基質相互作用の制御をベースとし、スーパーコンピュータを用いたドッキングデザイン（SBDD、FBDD）において、薬剤と蛋白質複合体の立体構造解析は必須である。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。また、X線結晶構造解析を利用した薬剤とそのターゲット蛋白質との複合体を構造生物学的に理解する方法としては、ソーキング法：ターゲット蛋白質単結晶を標的薬剤溶液（極低温X線回折強度測定用クライオプロテクタント含有）に数分から数日間浸すことで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。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、場合によっては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、ソーキング法においては、溶媒条件が変化するため結晶が崩壊・融解してしまい、共結晶化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も多い。そのため、ソーキングに対して安定である結晶を作製する、若しくは表面構造を変化さ

せることなく薬剤との複合体結晶を作製することが必要となる。これらの結晶化に関する問題を解決するための技術開発が急務である。

一般に、結晶を形成する際、蛋白質間の表面の相互作用が重要であり、その相互作用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標的蛋白質分子を配置させる結晶作製方法を考案した（特許 1、2）。この方法を用いることで、標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に関わらず、殻の結晶化条件において結晶を作製することが可能になると考えられる（図 1）。

三次元格子となる殻として、正二十面体ウイルスキャプシドに着目した。ウイルスキャプシドは、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期待されている（Douglas & Young, 2006、Singh *et al.*, 2006、Choi *et al.*, 2011）。キャプシドにはウイルスにより様々な大きさのものがあり、標的蛋白質が水溶性低分子量である場合、ヒト由来 B 型肝炎ウイルスのキャプシド（直径約 35 nm、Wynne *et al.*, 1999）を用い、分子量が大きい蛋白質の場合はより大きなウイルス粒子径の稲ウイルスキャプシド（直径約 70 nm）等を用いることができる。さらに、薬物受容体などの膜蛋白質については脂質二重膜をキャプシド内部に取り込んだバクテリオファージ PM2（Abrescia *et al.*, 2008）や PRD1（Abrescia *et al.*, 2004）などを用いると、同様な手法で膜蛋白質を生体膜に内包した状態で結晶化が可能である。また、結晶内でのパッキングの効果でその立体構造を制限することなく構造解析を行うことができるため、生体内での溶液構造により近いデータが得られる。さらに、ウイルスのキャプシドを結晶化プラットフォームとして用いた場合、キャプシドの表面にキャプシド蛋白質間の隙間があり、多数の穴が空いている。結晶析出後、同じ溶液に薬剤分子を導入するだけで、その薬剤分子はその穴を通り抜けキャプシド内部に進入し、標的の酵素分子に結合し自動的に複合体結晶を形成する。これにより、薬剤分子と酵素蛋白質との構造活性相関の解析を自動的に行えることになる。

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、183 か 185 アミノ酸残基からなる一種類のコアプロテイン二量体で構成されており (Tiollais *et al.*, 1981)、ゲノムが存在しない場合でも 180 分子のコアプロテインが会合した  $T=3$  (直径約 320 Å)、または 240 分子が会合した  $T=4$  (直径約 350 Å) に対応する二つのサイズの正二十面体キャプシドに自己集積する (Crowther *et al.*, 1994) ことが知られている。また、核酸との結合領域であるアルギニンを多く含む C 末端配列を欠損した 1-149 aa 組み換え型コアプロテイン (HBc149) もまた  $T=4$  キャプシドを形成し (Birnbaum *et al.*, 1990、Crowther *et al.*, 1994)、この立体構造は X 線結晶構造解析により 3.3 Å の分解能で決定されている (PDB ID 1QGT、Wynne *et al.*, 1999、図 2)。さらに、その構造を基にコアプロテイン分子表面の c/e1 エピトープ (Skamel *et al.*, 2006、Vogel *et al.*, 2005)、もしくは C 末端 (Koletzki *et al.*, 1997、Choi *et al.*, 2011) に外来の分子配列を配置された HBc149 の融合蛋白質は自己集積によりウイルス様粒子 (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、生化学的に多くの知見が得られており、結晶化プラットフォームへの応用も期待される。結晶化プラットフォームとして利用するために有用な知見を得るため、コアプロテインの融合蛋白質のコンストラクトを検討・作製し、その融合蛋白質の発現、精製、結晶化を試みた。以下、それらの知見について二章に分けて論述する。



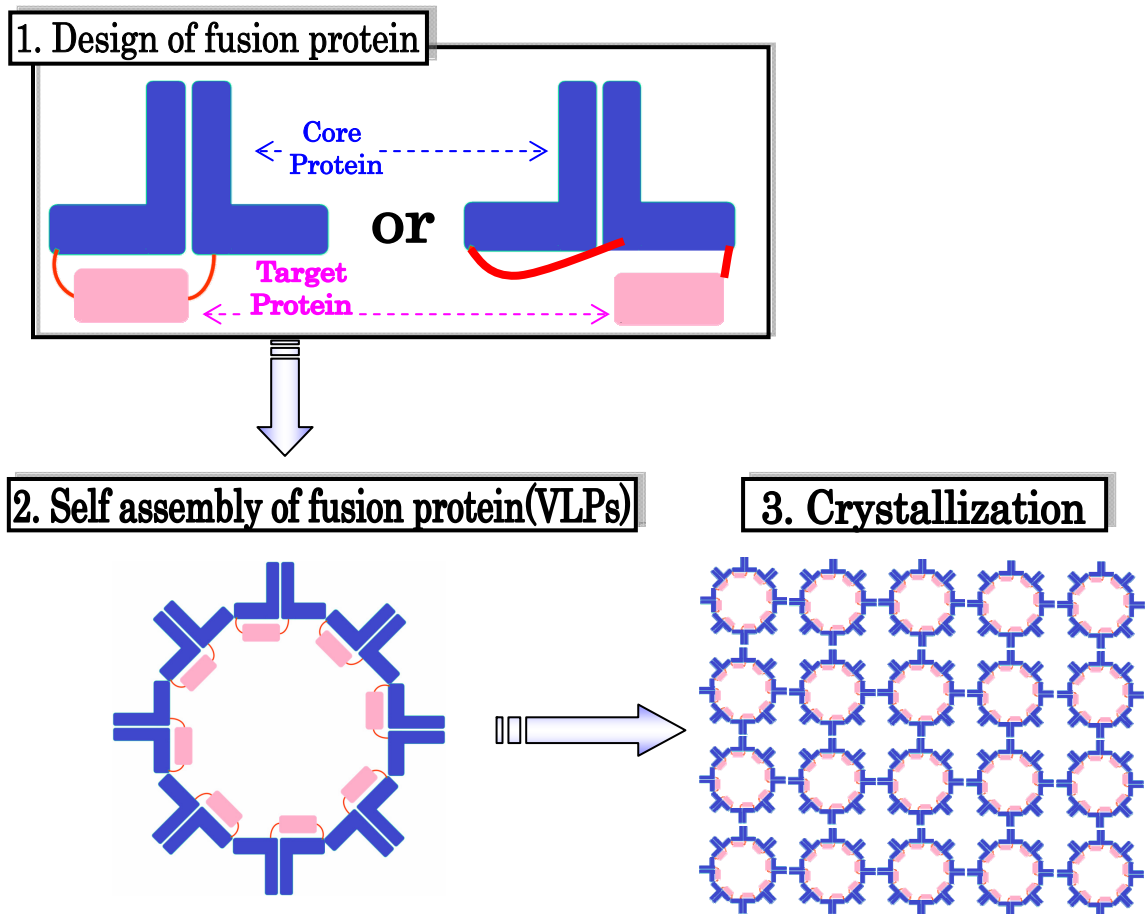


図1 ウイルスキャプシドを用いた結晶化法のアウトライン

1. 解析を行いたい標的蛋白質を、既に X 線結晶構造解析されたウイルスキャプシドの内側に配置されるようにコンストラクトを設計・作製し、融合蛋白質を発現する。
2. 融合蛋白質を精製し、VLPs に自己集積させる。
3. 融合蛋白質で構成される VLPs とウイルスキャプシドの表面構造が一定であることを利用して、ウイルスキャプシドの結晶化条件を基に VLPs を結晶化する。

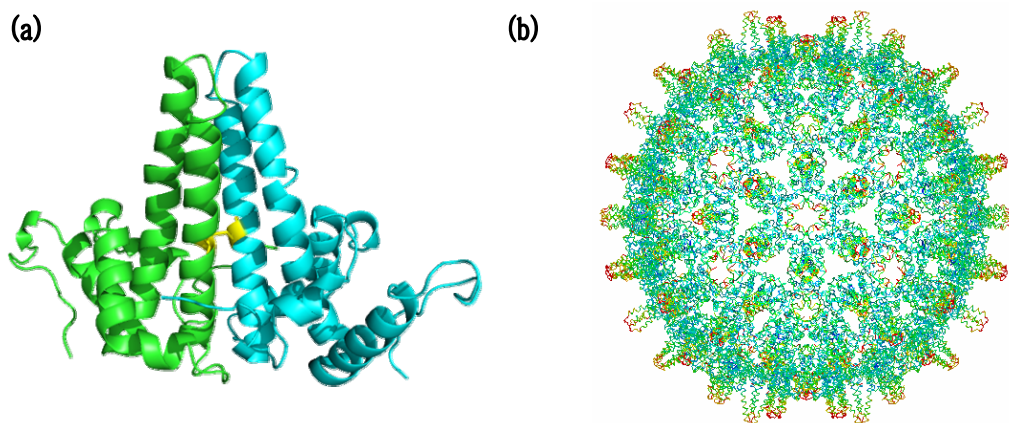


図2 本研究で用いたヒトB型肝炎ウイルス capsid と capsid を構成するコアプロテインの立体構造 (PDB ID 1QGT)

- (a) capsid を構成するコアプロテインの二量体 (HBc149)
- (b) 240 分子の HBc149 により形成された  $T=4$  ヒト B 型肝炎ウイルス capsid

## 第一章

八面体粒子を形成する B 型肝炎ウイルスコア融合蛋白質の  
発現、精製、結晶化と X 線結晶学的研究

## 【1-1 背景と目的】

これまでに報告されている HBc149 融合蛋白質 (Beterams *et al.*, 2000、Vogel *et al.*, 2005) 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 を形成することができない。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、Vogel *et al.*, 2005) 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。また、黄色ブドウ球菌由来ヌクレアーゼ (17 kDa、Beterams *et al.*, 2000) 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。

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 (CPD、図 3a) を作製した。CPD に一分子の標的蛋白質を結合させることで、VLPs 形成時に生じる立体障害を軽減できると考えられる (図 4)。VLPs に標的蛋白質を内包させるため、標的蛋白質は CPD の C 末端に融合させた (CPD1\_HBc149、図 3b)。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改変体コアプロテイン (HBc150、Zlotnick *et al.*, 1997) から改変体 CPD (CPDm、図 3c) を作製することで、VLPs の安定性と形成効率の向上を図り、その C 末端に標的蛋白質を融合させた (CPD1、図 3d)。この CPDm に融合させる標的蛋白質として GFP を選んだ (図 5)。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 を形成できないが、二分子のコアプロテインを融合し、対応する空間を広げることで GFP を配置できる十分な空間が確保された。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。

本研究では、CPDm の発現系を構築し、ペプチドリンカーが VLPs 形成や結晶化に影響するかを確認するために、HBc149 と同様の方法で発現、精製、結晶化を行った。さらに、結晶化プラットフォームとしての有用性を検討するため、CPD1 の発現系を構築、精製を行い、VLPs の結晶化を試みた。

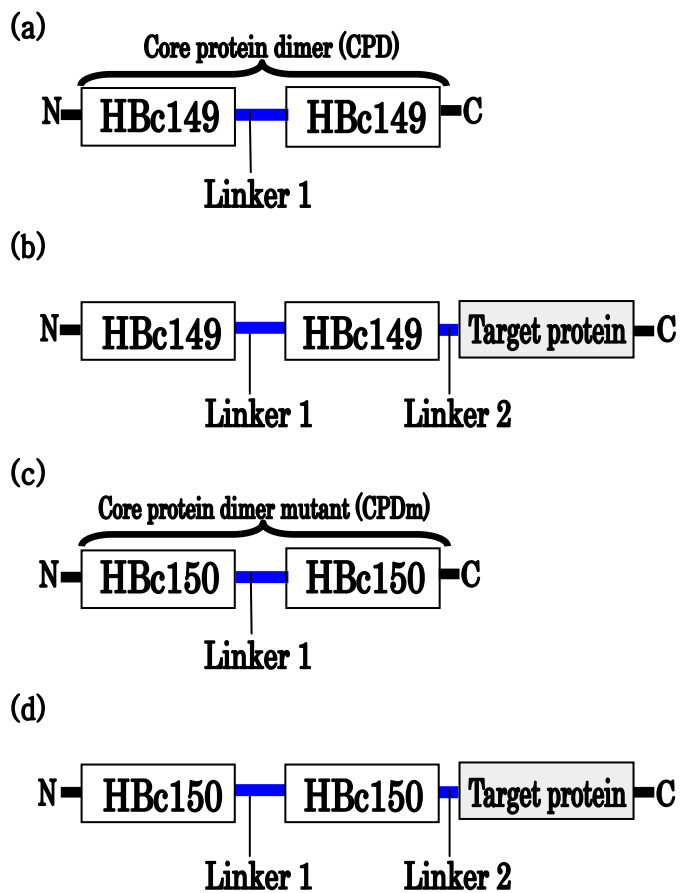


図 3 本研究で作製した融合蛋白質の遺伝子ブロック図  
 (a) CPD、(b) CPD1\_HBc149、(c) CPDm、(d) CPD1  
 Linker1 のペプチド配列: GGSEEE(GGS)<sub>7</sub>  
 Linker2 のペプチド配列: GGSKL

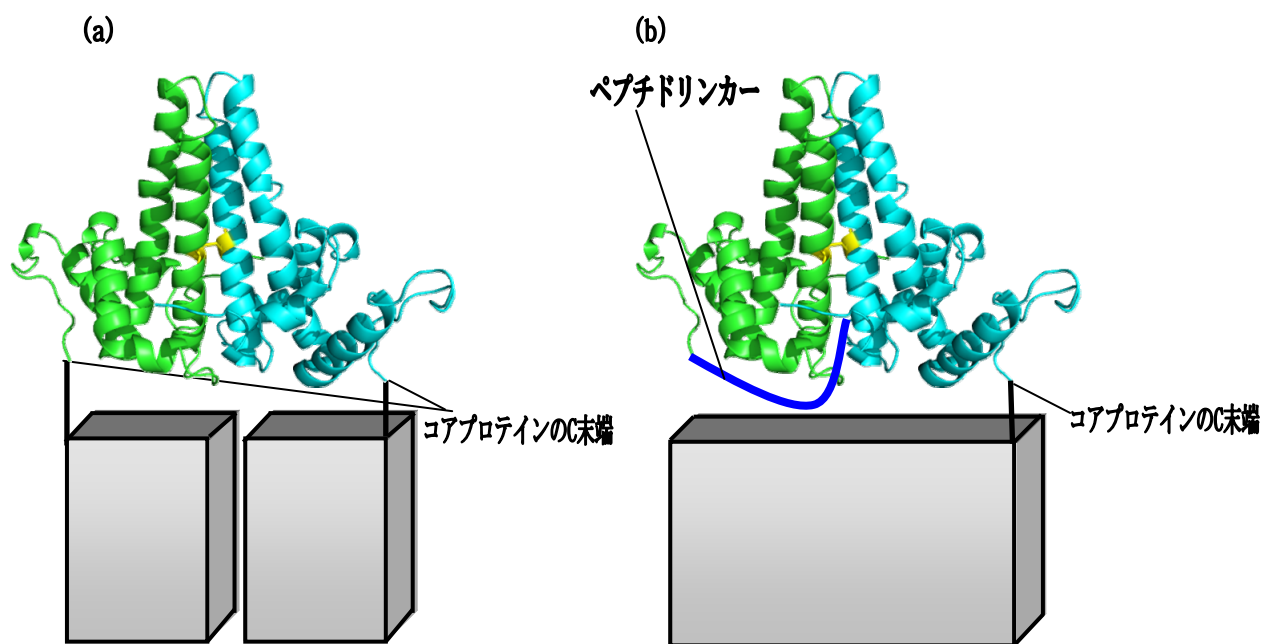


図 4 コアプロテインの立体構造から予測される、外来蛋白質が C 末端に融合することが可能な体積

- (a) 一分子のコアプロテインの C 末端に融合させた場合に考えられる外来蛋白質の許容体積 (図の四角形部分)
- (b) CPDm の C 末端に融合させた場合に考えられる外来蛋白質の許容体積 (図の四角形部分)

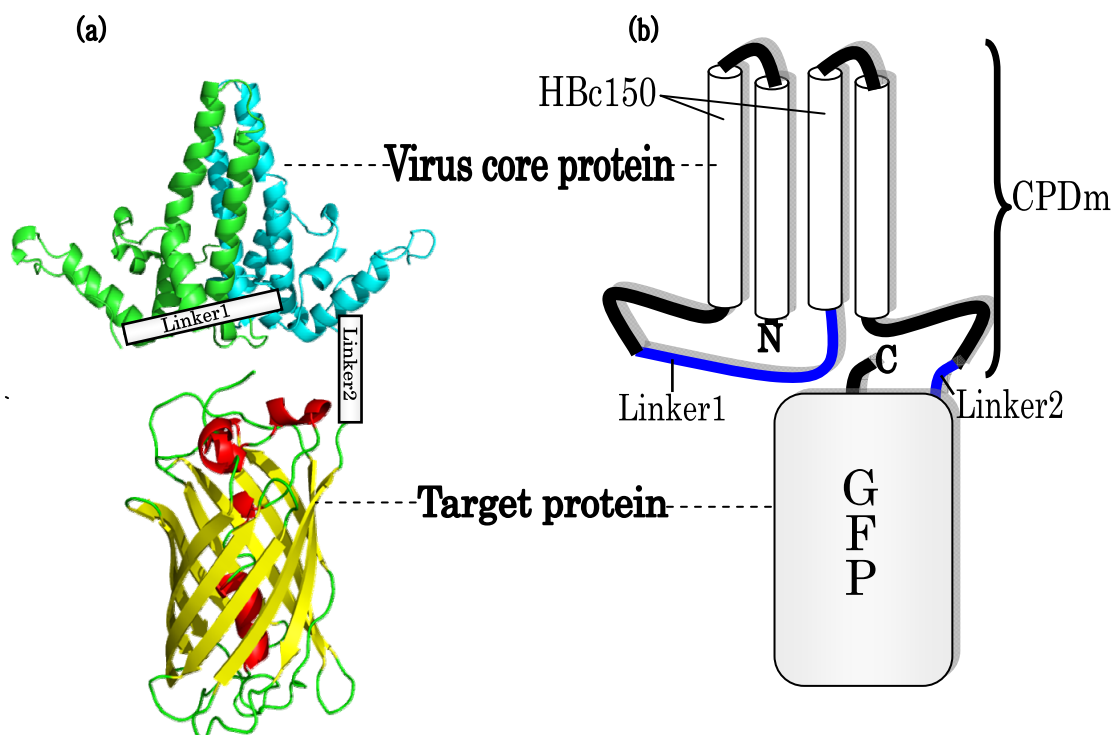


図5 本研究で作製した融合蛋白質の模式図

- (a) PDBに登録されているコアプロテイン (1QGT) と GFP (1GFL) から作製した CPD1 の模式図
- (b) PDBに登録されている立体構造から考えられる GFP と Linker の配置を表す CPD2 の概略図



## 【1-2 実験方法】

### 1 プラスミドのコンストラクト作製

#### 1-i CPD、CPD1\_HBc149 のコンストラクト作製

HBc149 (UniProtKB accession No. Q67855、表 2-1: アミノ酸配列) をコードしている PT7-SC ベクターを鋳型とし、DNA ポリメラーゼは KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いて PCR を行った (以下 PCR は全て KOD-Plus-Neo を用いた)。表 1 に記したプライマーの Primer1 と Primer2 を用いて HBc149-GGSEEEGGS 遺伝子配列 (HBc149\_L3 fragment) を PCR で増幅した。PCR 溶液をアガロースゲルによる電気泳動後、目的とする PCR 産物 HBc149\_L3 fragment のゲルを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した (以下 PCR の精製は全て QIAquick Gel Extraction Kit を用いた)。pET-28a(+) vector (Merck Millipore) に *Nco*I、*Bam*H I (Takara Bio) の制限酵素を加え 37 °C、3 時間インキュベートし、アガロースゲル電気泳動後、ゲルを切り出し、精製を行った。HBc149\_L3 fragment は、pET-28a(+) vector (Merck Millipore) の *Nco*I-*Bam*H I 制限酵素切断部位へ DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Clontech Laboratories) を用いて 16°C で 30 分反応させることで挿入し、HBc149\_L3 plasmids を作製した (以降、ライゲーション反応はすべて DNA Ligation Kit <Mighty Mix> を用いた)。作製されたプラスミドを用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した。寒天培地で培養させた大腸菌のコロニーを 5 ml LB 培地で 37 °C、16 時間培養し Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) によりプラスミドを精製した (以下プラスミドの精製は全て Qiaprep Spin Miniprep Kit Gel Extraction Kit を用いた)。

CPD の配列を作製するために、Primer3 と Primer4 を用いて (GGG)<sub>6</sub>-HBc149-GGSKL の遺伝子配列 (L6\_HBc149 fragment) を PCR で増幅させ、アガロースゲル電

電気泳動により精製した。精製された L6\_HBc149 fragment を HBc149\_L3 plasmids の *Bam*H I–*Hind* III 制限酵素切断部位へ挿入し、CPD plasmids を作製した。作製されたプラスミドを用いて上記と同様の方法で大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した後、プラスミドを精製した。

pEGFP-C1 vector (Clontech Laboratories、GenBank accession no. U55763) を鋳型とし、C 末端を欠損させた 229 アミノ酸残基の GFP の遺伝子配列に 4 つのアルギニンを付加した GFP-RRRR 遺伝子配列 (GFP\_R<sub>4</sub> fragment) を Primer5 と Primer6 を用いて PCR で増幅させ、アガロースゲル電気泳動により精製した。精製した GFP\_R<sub>4</sub> fragment を CPD plasmids の *Hind* III–*Xho* I 制限酵素切断部位へ挿入し、CPD1\_HBc149 遺伝子配列のコンストラクトを作製した。作製されたプラスミドを用いて上記と同様の方法で大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した後、プラスミドを精製し、BigDye Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を確認した。全ての遺伝子配列のシーケンシングには BigDye Terminator v3.1 CycleSequencing Kit を用いて、精製した 4 ng/ $\mu$ l プラスミド 2.5  $\mu$ l、10 pmol/ $\mu$ l Primer7 または Primer8 1  $\mu$ l、BigDye Sequencing buffer 3.5  $\mu$ l、Ready Reaction premix 1  $\mu$ l、Distilled water 12  $\mu$ l を混合し、Denature は 96°C で 10 秒、Annealing は 50°C で 5 秒、Extention は 60°C で 4 分の条件で 25 サイクル行い、DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) で精製後、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンス解析を行い、塩基配列を決定した (表 2-2: CPD1\_HBc149 アミノ酸配列)。

## 1-ii HBc150 のコンストラクト作製

HBc149 をコードしている PT7-SC ベクターを鋳型とし、Site-directed mutagenesis PCR 法 (Higuchi *et al.*, 1988) により 48、61、107 番目の三つのシステイン残基をアラニンに置換した。プライマーは、48 番目の置換には Primer9 と Primer10、61 番目の置換には Primer11 と Primer12、107 番目の置換には Primer13 と Primer14 を使用した。150 番目のシステインの付加は Primer15 と Primer16 を用いた。各反応は 4 ng/ $\mu$ l の鋳型 5  $\mu$ l、100 pmol/ $\mu$ l のプライマー 各 1  $\mu$ l、MgSO<sub>4</sub> 4  $\mu$ l、10x dNTP 5  $\mu$ l、10x KOD-plus-buffer 5  $\mu$ l、DW 33  $\mu$ l、1 U/ $\mu$ l KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を 1  $\mu$ l を混合し、Denature は 98°C で 2 分、Annealing は 42°C で 30 秒、Extension は 68°C で 5 分の条件で 20 サイクル行った。その反応液に制限酵素 *Dpn* I を 1  $\mu$ l 加え、37°C で 3 時間インキュベートした。反応液 2  $\mu$ l を用いて、大腸菌 DH5 $\alpha$  への形質転換を行った。寒天培地で培養させた大腸菌のコロニーを 5 ml LB 培地で 37 °C、16 時間培養しプラスミドを精製し、塩基配列を決定した。

### 1-iii CPDm、CPD1 のコンストラクト作製

HBc150 をコードしている PT7-SC ベクターを鋳型とし、プライマーは Primer1 と Primer17 を用いて HBc150-GGSEEEGGS の遺伝子配列 (HBc150\_L3 fragment) を PCR で増幅した。PCR 溶液をアガロースゲルによる電気泳動後、目的とする PCR 産物 HBc150\_L3 fragment のゲルを切り出し、精製した。HBc150\_L3 fragment は、pET-28a(+) vector の *Nco* I-*Bam*H I 制限酵素切断部位へ挿入し、HBc150\_L3 plasmids を作製した。作製されたプラスミドを用いて上記と同様の方法で大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した後、プラスミドを精製した。

CPDm の配列を作製するために、Primer3 と Primer18 を用いて(GGS)<sub>6</sub>-HBc150 の遺伝子配列を PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動により精製した。精製された DNA 断片を HBc150\_L3 plasmids の *Bam*H I-*Xho* I 制限酵素切断部位へ挿入し、CPDm plasmids を作製した。作製されたプラスミドを用いて上記と同様の方法で大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した後、プラスミドを精製し、塩基配列を決定した (表 3-1: CPDm アミノ酸配列)。

CPDm plasmids を鋳型として、Primer3 と Primer19 を用いて(GGS)<sub>6</sub>-HBc150-GGSKL の遺伝子配列 (L6\_HBc150 fragment) を PCR で増幅させ、アガロースゲル電気泳動により精製した。精製された L6\_HBc150 fragment を HBc150\_L3 plasmids の *Bam*H I-*Hind* III 制限酵素切断部位へ挿入し、CPDmKL plasmids を作製した。作製されたプラスミドを用いて上記と同様の方法で大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した後、プラスミドを精製した。

精製された GFP\_R4 fragment を CPDmKL plasmids の *Hind* III-*Xho* I 制限酵素切断部位へ挿入し、CPD1 遺伝子配列のコンストラクトを作製した。作製されたプラスミドを用いて上記と同様の方法で大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した後、プラスミドを精製し、塩基配列を決定した (表 3-2: CPD1 アミノ酸配列)。

表 1 プライマー配列

Primer	Sequence (5' → 3')
Primer1	GGCGGCCATGGACATTGATCCTT
Primer2	GCGGGATCCACCTTCCTCTTCAGAGCCACCAACAACAGTAG
Primer3	CGCCGGATCCGGTGGTAGCGGTGGCAGCGGTGGTAGCGGCGGCA GCGGCGGCAGCGGTGGCAGCATGGATATCGATCCTTATAAAGAAT TC
Primer4	GGCGAAGCTTAGAGCCACCAACAACAGTAG
Primer5	GGTAAAGCTTATGGTGAGCAAGGGC
Primer6	GCGACTCGAGTTAGCGGCGGCGGCGGATCCCGGCG
Primer7	TAATACGACTCACTATAGGG
Primer8	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Primer9	TCCTGAGCATGCGTCACCTCACC
Primer10	GGTGAGGTGACGCATGCTCAGGA
Primer11	AGCCATTCTCGCGTGGGGGGAAT
Primer12	ATTCCCCCACGCGAGAATGGCT
Primer13	TCATATATCTGCGCTTACTTTTG
Primer14	CAAAAGTAAGCGCAGATATATGA
Primer15	CTACTGTTGTTTGCGGTGGCTCT
Primer16	AGAGCCACCGCAAACAACAGTAG
Primer17	GCGGGATCCACCTTCCTCTTCAGAGCCACCGCAAACAACAGTAG
Primer18	GCGACTCGAGTTAGCAAACAACAGT
Primer19	GGCGAAGCTTGCTGCCACCGCAAACAACAGTAG

表 2 HBc149、CPDm のアミノ酸配列

---

1. HBc149

1 MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SFFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHASP  
51 HHTALRQAIL AWGELMTLAT WVGNNLEDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL  
101 LWFHISALTF GRETVLEYL V SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVV

---

2. CPD1\_HBc149

1 MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SFFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP  
51 HHTALRQAIL CWGELMTLAT WVGNNLEDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL  
101 LWFHISCLTF GRETVLEYL V SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVG  
151 GSEEEGGSGG SGGSGGSGGS GSGGSMIDID PYKEFGATVE LLSFLPSDFD  
201 PSVRDLLDTA SALYREALE S PEHCSPHHTA LRQAILCWGE LMTLATWVGN  
251 NLEDPASRDL VVNYVNTNMG LKIRQLLWFH ISCLTFGRET VLEYLVSFGV  
301 WIRTPPAYRP PNAPILSTLP ETTVVGGSKL MVSKGEELFT GVPILVELD  
351 GDVNGHKFSV SGEGEGDATY GKLTCLKFICT TGKLPVPWPT LVTTLTYGVQ  
401 CFSRYPDHMK QHDFFKSAMP EGYVQERTIF FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL  
451 VNRIELKGID FKEDGNILGH KLEYNYN SHN VYIMADKQKN GIKVNFKIRH  
501 NIEDGSVQLA DHYQQNTPIG DGPVLLPDNH YLSTQSALSK DPNEKRDH MV  
551 LLEFVTAAGI RRRR

---

表 3 CPDm、CPD1 のアミノ酸配列

---

1. CPDm

1 MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SFFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHASP  
 51 HHTALRQAIL AWGELMTLAT WVGNNLEDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL  
 101 LWFHISALTF GRETVLEYL V SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVC  
 151 GGSEEEGGSG GSGGSGGSGG SGGSGGSMDI DPYKEFGATV ELLSFLPSDF  
 201 FPSVRDLLDT ASALYREALE SPEHASPHHT ALRQAILAWG ELMTLATWVG  
 251 NNLEDPASRD LVVNYVNTNM GLKIRQLLWF HISALTFGRE TVLEYLVSFG  
 301 VWIRTPPAYR PPNAPILSTL PETTVVC

---

2. CPD1

1 MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SFFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHASP  
 51 HHTALRQAIL AWGELMTLAT WVGNNLEDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL  
 101 LWFHISALTF GRETVLEYL V SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVC  
 151 GGSEEEGGSG GSGGSGGSGG SGGSGGSMDI DPYKEFGATV ELLSFLPSDF  
 201 FPSVRDLLDT ASALYREALE SPEHASPHHT ALRQAILAWG ELMTLATWVG  
 251 NNLEDPASRD LVVNYVNTNM GLKIRQLLWF HISALTFGRE TVLEYLVSFG  
 301 VWIRTPPAYR PPNAPILSTL PETTVVCGGS KLMVSKGEEL FTGVVPILVE  
 351 LDGDVNGHKF SVSGE GEGDA TYGKLT LKFI CTTGKLPVPW PTLVTTLTYG  
 401 VQCFSRYPDH MKQHDFFKSA MPEGYVQERT IFFKDDGNYK TRAEVKFEGD  
 451 TLVNRIELKG IDFKEDGNIL GHKLEYNYS HNVYIMADKQ KNGIKVNFKI  
 501 RHNIEDGSVQ LADHYQQNTP IGDGPVLLPD NHYLSTQSAL SKDPNEKRDH  
 551 MVLLEFVTAA GIRRRR

---

## 2 発現と精製

### 2-i HBc149、CPDm の発現と精製

HBc149 をコードしている PT7-SC ベクター、作製した CPDm plasmids を用いて、それぞれ発現用大腸菌 Rosetta™2 (DE3) (Merck Millipore) を形質転換した。シングルコロニーを各 3 ml LB 培地に移し、37 °C、8 時間、250 rpm で振盪培養した。その培養液を 1L LB 培地に移し、OD<sub>600</sub> が 0.6–0.8 になるまで同条件で培養した。終濃度 1 mM になるように IPTG を添加し、25°C で 3 時間培養することにより、HBc149、CPDm をそれぞれ大量発現させた。発現誘導された大腸菌を、4 °C で 15 分、4000 xg で遠心分離した。沈殿した大腸菌を、60 ml の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA、200 µg/ml PMSF、1 mg/ml リゾチーム) で懸濁後、氷上で超音波破碎し、20000 xg で遠心分離した。上清に硫酸アンモニウムを最終濃度 30 % になるように氷上でゆっくりと加え 30 分間攪拌し、20000 xg で遠心分離した。沈殿を 20 ml の Tris-Triton buffer (0.1 % Triton X-100、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH 7.5) で溶解し、サイズ排除クロマトグラフィー (Sephacryl S-4B、GE Healthcare) により VLPs を分離・精製した。SDS-PAGE により目的蛋白質が含まれる分画を確認した後、回収した。サンプル溶液に硫酸アンモニウムを最終濃度 25 % になるように氷上でゆっくりと加え 30 分間攪拌し、20000 xg で遠心分離した。沈殿は、3 ml の Buffer A (300 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH 7.5) で懸濁し、1 mg/ml の懸濁液を 5-30 % のスクロースグラデーションの層へ 0.4 ml 乗せ、超遠心分離 (141000 xg、6 時間、Hitachi P28S2 rotor) により沈降させ、VLPs と会合していない蛋白質とを分離した。Gradient Master Station (Biocomp Instruments) を用い、サンプルチューブの上端から下端まで 19 の分画で回収した。超遠心後の各分画の OD<sub>280</sub> を Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) により測定し、SDS-PAGE により分子量から発現した蛋白質を確認した。



VLPs 溶液の濃度を BSA と Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いた Bradford 法で測定した。CPD1 を Buffer B (150 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl pH 7.5) で透析し、遠心式限外ろ過膜 Vivaspin (Sartorius stedim) を用いてサンプル溶液を 10 mg/ml に濃縮した。

## 2-ii CPD1 の発現と精製

作製したプラスミドを用いて、発現用大腸菌 Arctic Express (DE3) RIL (Agilent Technologies) を形質転換させた。シングルコロニーをカナマイシンとゲンタマイシンを含む 5 ml の LB 培地で、37 °C、250 rpm で一晩振盪培養した。この培地の 5 ml を 1 L の LB 培地へ移し、3 時間、30 °C で培養した。各融合蛋白質の発現は、IPTG を終濃度 0.1 mM になるように加え、24 時間、11°C で誘導した。発現誘導された大腸菌を回収し、CPDm と同様の方法で精製し、超遠心後の各分画の蛍光強度を Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) により測定 (励起波長 488 nm、蛍光波長 509 nm) 後、10 mg/ml に濃縮した。

## 3 電子顕微鏡観察

VLPs の形成を確認するために、精製された CPD1 と HBc149 をカーボンコーティングされた銅製メッシュグリッドに添加し、2%の酢酸ウラニルでネガティブ染色した。グリッドを 80 kV の条件で日立 H7600 透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した。

#### 4 結晶化とデータ収集

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行った。24 穴のプレートに、1 ウェルに対して 500  $\mu\text{l}$  の結晶化溶液を入れ、2  $\mu\text{l}$  の蛋白質溶液と 2  $\mu\text{l}$  の結晶化溶液をシリコンコーティングしたカバーガラス上で混合した後、カバーガラスを逆さにし、ウェル上端にシリコングリースを塗布し密封した。HBc149 の HBV キャプシド結晶化条件に基づき、蛋白質濃度 2–10 mg/ml、0.5–4 % PEG 20000、0.4–2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1 M MES (pH 6.0–7.5)、温度 292 K で結晶化スクリーニングした。

HBc149、CPDm から得られた結晶を、極低温測定に備え、クライオプロテクタントを含む結晶化溶液 (22 v/v% 2,3-butanediol、2 % PEG 20000、0.1 M MES pH 6.5) にソーキングし、溶解するかを確認した。

CPD1 サンプルから得られた結晶はリザーバー溶液で 3 回洗浄したのち、IX71 蛍光顕微鏡 (Olympus、Excitation: BP 460–495 nm、Emission: BA 510–550 nm、Dichromatic mirror: DM505) で観察した。

CPD1 の単結晶をクライオループ (Hampton Research) ですくいとり、22 v/v% 2,3-butanediol を含んだ結晶化溶液 (22 v/v% 2,3-butanediol、2 % PEG 20000、0.1 M MES pH 6.5) にソーキングした後、100 K の窒素ガスで瞬間的に凍らせた。R-AXIS VII システム (Rigaku) により結晶の X 線回折を確認した後、Photon Factory BL-17A でデータ収集を行った。その回折データは *iMOSFLM* (Battye *et al.*, 2011)、*CCP4i* (Winn *et al.*, 2011) により処理した。空間群は、*POINTLESS* (Evans, 2006) を用いて決定した。*TRUNCATE* (French *et al.*, 1978) により平均の X 線強度データを構造因子に変換し、自己回転関数 (SRF) は *MOLREP* (Vagin *et al.*, 1997) により求めた。

## 【1-3 結果】

### 1 融合蛋白質の発現と超遠心分離による精製

超遠心後に分画された HBc149、CPDm の OD<sub>280</sub> を測定すると、それぞれチューブ下端側（分画 12–17）に高い値が得られた（図 6 左）。SDS-PAGE をすると、CPDm（分子量約 30 kDa）の各分画は HBc149 と同様にスクロース密度が高い分画 12–17 にシングルバンドが検出された（図 6 右）。

大腸菌により発現された CPD1\_HBc149、CPD1 は、スクロースグラディエントを用いた超遠心後の SDS-PAGE により、分画 12–17 にそれぞれ 55 kDa のシングルバンドとして検出された（図 7）。蛍光強度測定では分画 1、2 と 12–17 において蛍光を発していることが示された。（図 8）。シングルバンドである分画 12–17 を回収することでサンプルチューブ 1 本当たり CPD1\_HBc149 は 0.1–0.13mg、CPD1 0.15–0.21 mg 精製された。

### 2 電子顕微鏡による VLPs の観察

分画 12–17 の精製された CPD1 は、TEM により VLPs を形成していることが確認された（図 9）。CPD1 の VLPs は、HBc149 の  $T=4$  正二十面体 HBV キャプシドと比較すると内径は異なるが、外径はほぼ等しく約 350 Å であった。

### 3 結晶化

精製された CPDm は結晶化条件によって、形状が異なる 2 つの結晶が得られた。1 つは、3.5–4.5 % PEG 20000、0.45–0.55 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1 M MES pH 6.5 の条件で結晶化された平板結晶である (図 10a)。もう一方の結晶は、0.5–1.0 % PEG 20000、1.0–1.4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1 M MES pH 6.5 の条件で八面体の微結晶が得られた (図 10b)。クライオプロテクト溶液にソーキングすると、平板結晶は溶解したが、八面体結晶は 1 時間経過後も溶解しなかった。

CPD1 蛋白質濃度 2–4 mg/ml に調製し、HBV キャプシドの結晶化条件と同様の緩衝液と沈殿剤を用いた結晶化溶液 (0.5–1% PEG 20000、1.0–1.4M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1M MES pH 6.5) の結晶ドロップは相分離状態となり、3 ヶ月静置することで回折能のある結晶 (約 0.1 x 0.1 x 0.1 mm) が得られた (図 11a)。リザーバー溶液で洗浄した結晶から、GFP 由来の蛍光が蛍光顕微鏡により確認された (図 11b)。

### 4 CPD1 結晶の X 線結晶学的データ

X 線回折像が得られ (図 12)、最大分解能 2.15 Å、空間群 *F*432 に属し、格子定数は  $a = b = c = 219.7 \text{ \AA}$  であった。その他の X 線結晶学的統計データを表 4 に示した。得られた結晶の空間群 *F*432 とは、単位格子中に 96 の非対称単位が存在し、24 の回転操作と 4 の並進操作から得られる空間群であり、この非対称単位の 24 の回転操作は八面体の対称操作と一致している。さらに 5–10 Å 分解能、100 Å の積分半径を用いて、SRF マップを作製すると、2 回回転軸、3 回回転軸、4 回回転軸のピークが得られた (図 13)。八面体に存在する 4 回回転軸のピークが得られ、二十面体に存在する 5 回回転軸のピークが得られなかったことから、CPD1 は結晶中で八面体を形成していることが明らかにな

った (図 14)。

Matthews 係数 (Matthews, 1968) と溶媒含有率は、それぞれ  $2.01 \text{ \AA}^3\text{Da}$  と 38.8 % であった。Matthews 係数から、非対称単位は 1 分子であると考えられ、結晶内の八面体は 24 分子の CPD1 で構成されていることを示唆している。したがって、空間群  $F432$  の単位格子中に 96 分子の CPD1 が存在し、4 つの八面体が存在していることを示した。

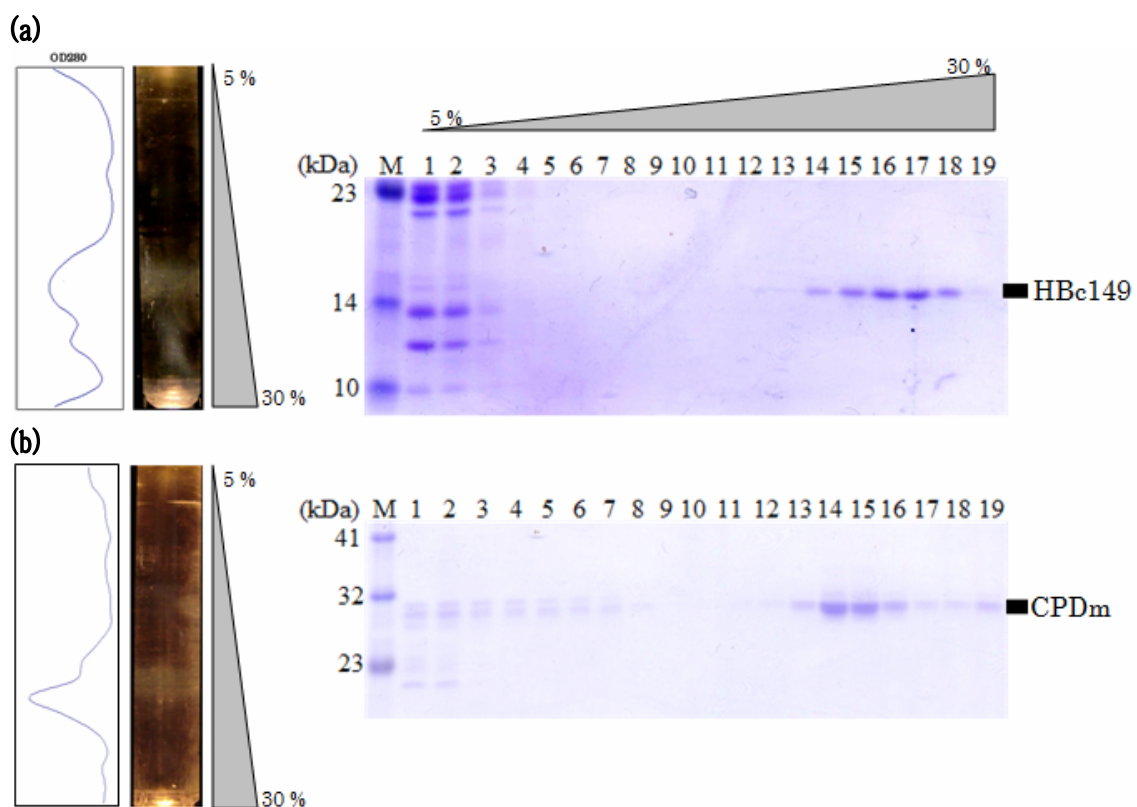


図 6 超遠心後のサンプルチューブ（左図）と、19 に分画したサンプルの SDS-PAGE（右図）

(a) HBe149 (14 kDa)

(b) CPDm (30 kDa)

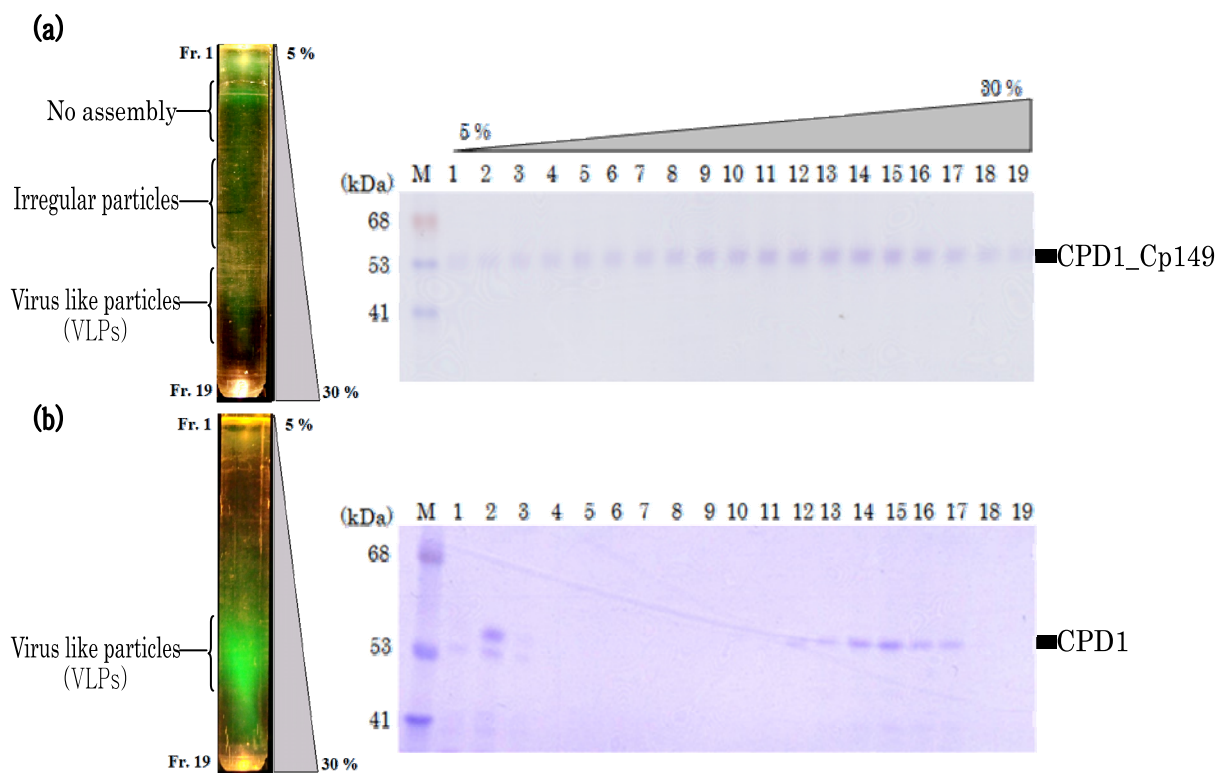


図 7 超遠心後のサンプルチューブ（左図）と、19 に分画したサンプルの SDS-PAGE（右図）

(a) CPD1\_HBc149 (55 kDa)

(b) CPD1 (55 kDa)

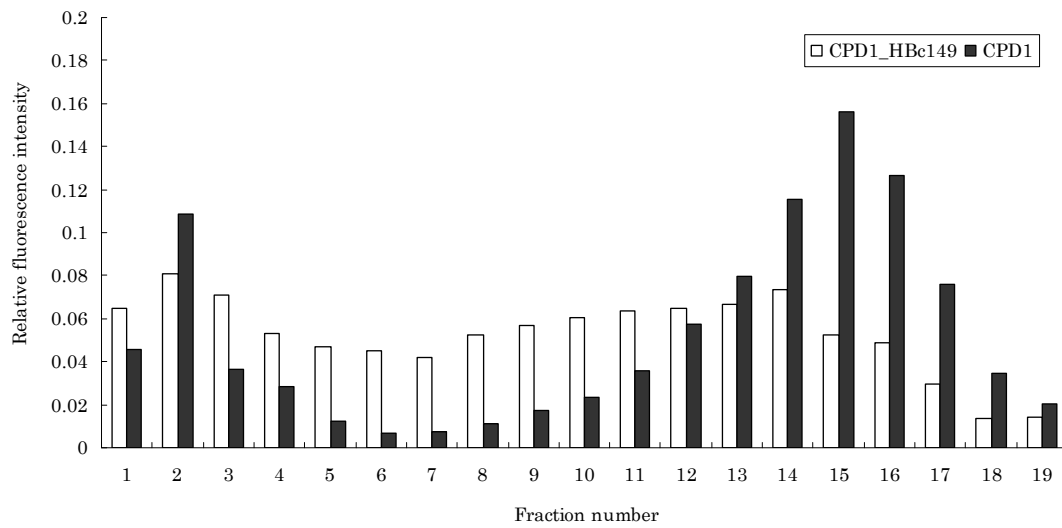


図 8 超遠心後に分画されたサンプルの相対蛍光強度

超遠心前のサンプル蛍光強度を 1 とした、各分画の相対蛍光強度



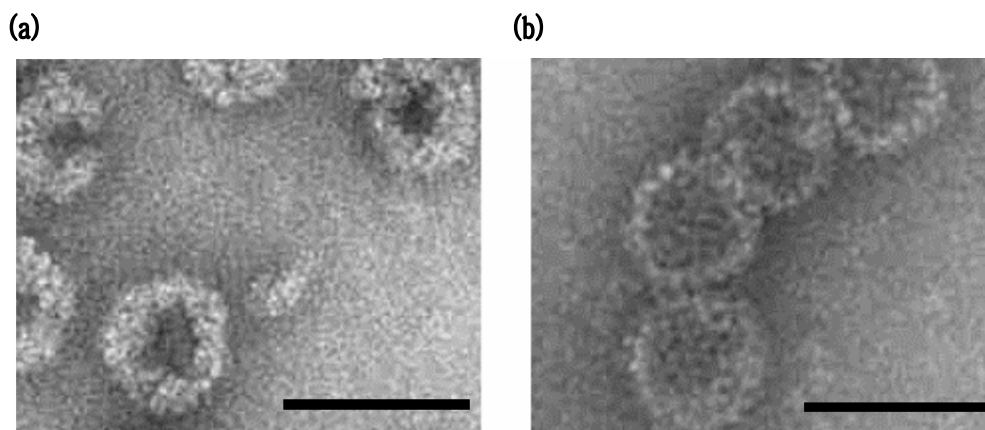


図 9 超遠心後のサンプル分画 12-17 の電子顕微鏡写真 (Scale bar = 0.05 mm)

- (a) CPD1 で構成された VLPs
- (b) HBc149 で構成された HBV キャプシド

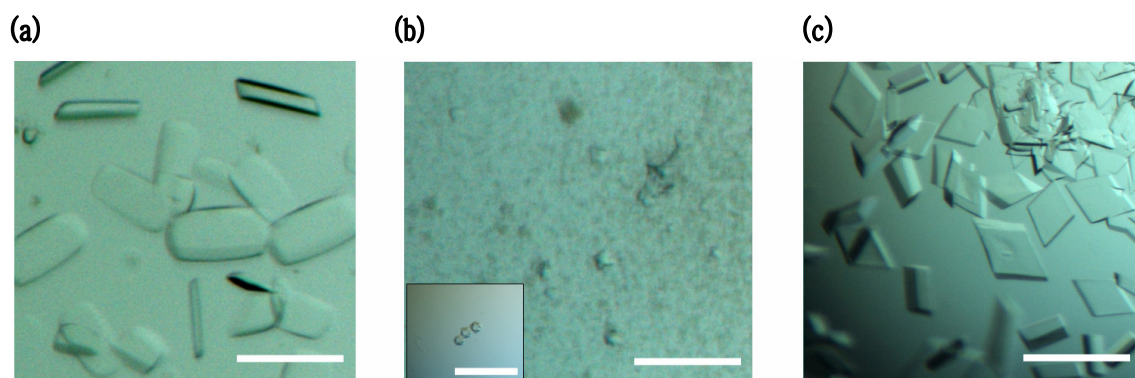


図 10 超遠心後の CPDm と HBc149 の結晶化 (Scale bar = 0.1 mm)

(a) CPDm の平板結晶

結晶化条件: 4.0 % PEG 20000、0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1 M MES pH 6.5

(b) CPDm の八面体結晶

結晶化条件: 1.0% PEG 20000、1.4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1 M MES pH 6.5

左下図: 22 v/v% 2,3-butanediol、2 % PEG 20000、0.1 M MES pH 6.5 にソーキングして 1 時間後の写真

(c) HBc149 の平板結晶

結晶化条件: 4.5% PEG 20000、0.55 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1 M MES pH 6.5

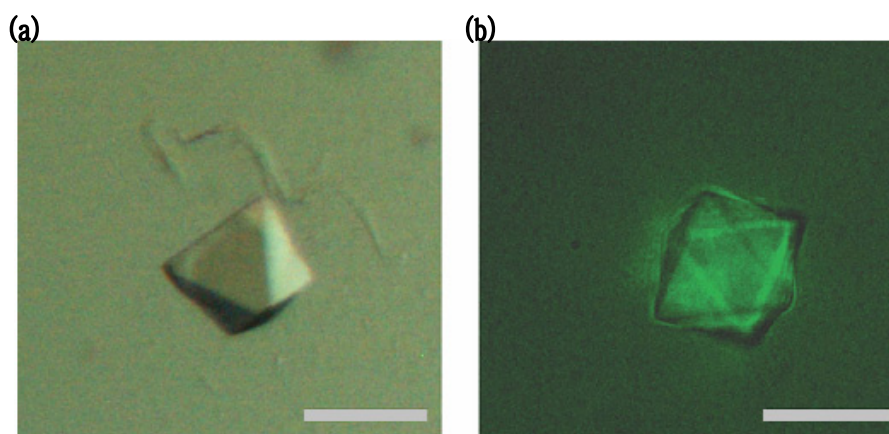


図 11 CPD1 の結晶写真 (Scale bar = 0.1 mm)

結晶化条件: 蛋白質濃度 4 mg/ml、1.0% PEG 20000、1.4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1 M  
MES pH 6.5

(a) 明視野で観察された CPD1 の結晶

(b) CPD1 結晶の明視野／蛍光顕微鏡写真

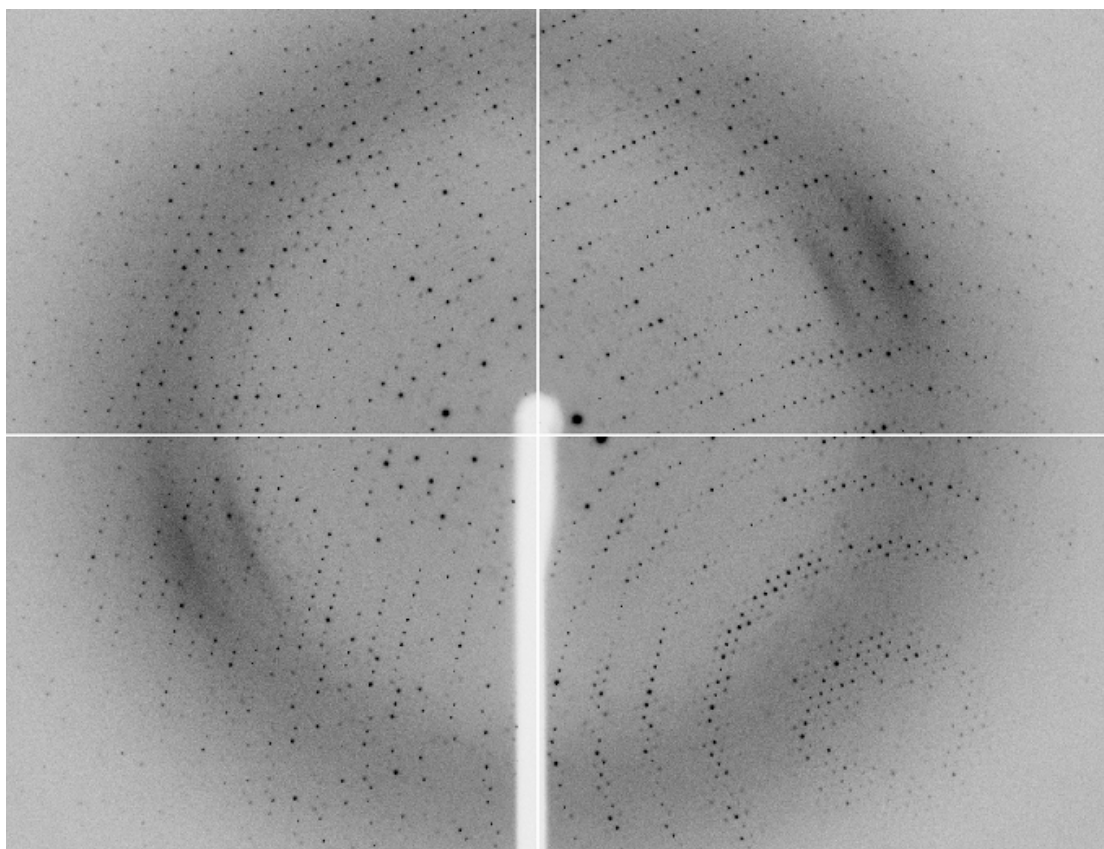


図 12 CPD1 結晶の X 線回折像

測定条件: X-ray source PF BL17A、Wavelength  $0.98 \text{ \AA}$ 、X-ray beam size  $0.05 \times 0.05 \text{ mm}$ 、Detector ADSC Quantum 270、Exposure time 180s、Temperature 100 K、Oscillation angle  $0.3^\circ$

表 4 CPD1 の X 線結晶学的データ

Space group	<i>F</i> 432
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = b = c = 219.7,$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Resolution range (Å)	50.4–2.15 (2.22–2.15)
No. of observed reflections	512833 (36388)
No. of unique reflections	25183 (2138)
Matthews coefficient (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> )	2.01
Solvent content (%)	38.8
Multiplicity	20.4 (17.0)
R <sub>meas</sub> †(%)	8.9 (39.1)
R <sub>p.i.m.</sub> (%)	2.0 (9.2)
Completeness (%)	99.9 (99.9)
R <sub>merge</sub> †(%)	8.5 (37.0)
Mean I / $\sigma(I)$	25.9 (8.0)

†: R<sub>merge</sub> と R<sub>meas</sub> は、Diederichs らの知見を基に決定した (Diederichs & Karplus, 1997)。

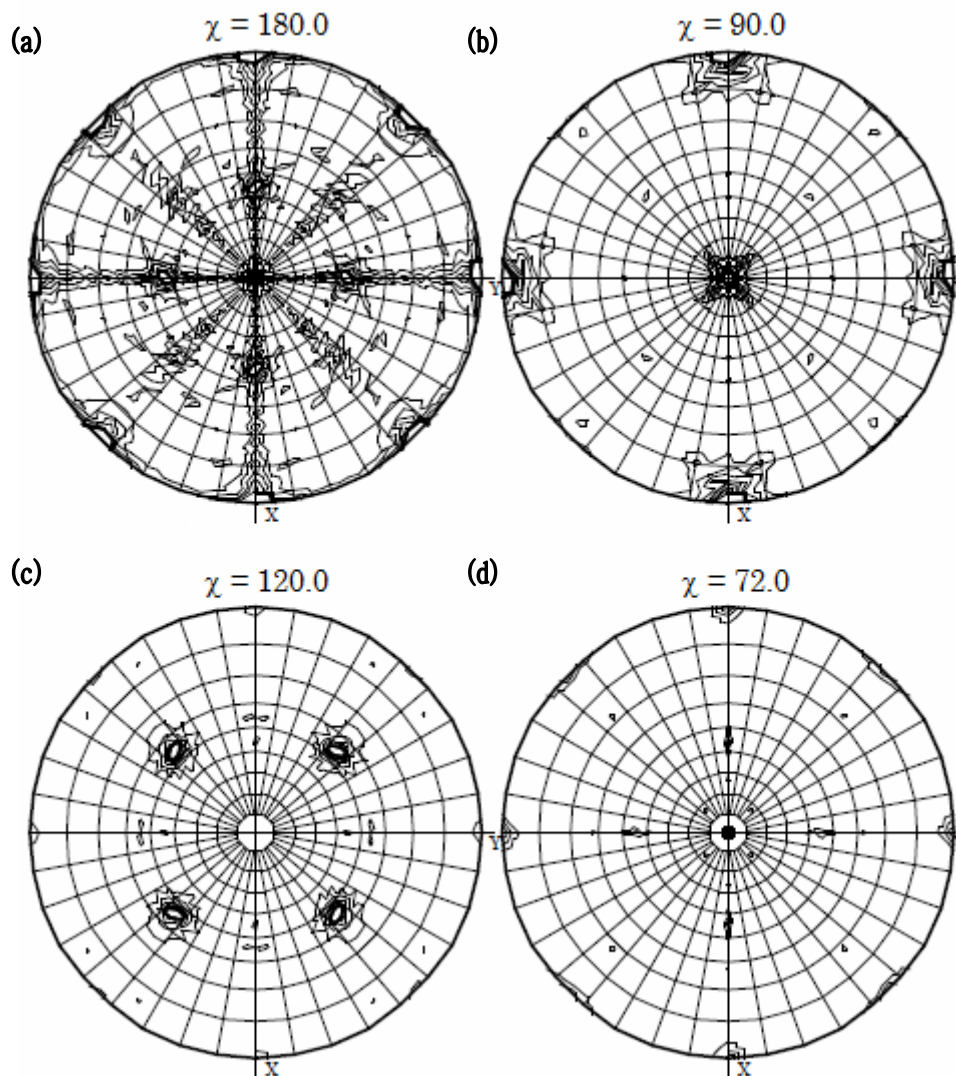


図 13 CPD1 の X 線回折データから得られた SRF マップ

分解能 5–10 Å、積分半径 100 Å で計算した自己回転関数。

八面体に特徴的な 4 回回転軸を示すピークが  $\chi = 90^\circ$  (b) のセクションに確認され、2 回回転軸を示すピークは  $\chi = 180^\circ$  (a)、 $\chi = 90^\circ$  (b) のセクションに、3 回回転軸を示すピークは  $\chi = 120^\circ$  (c) のセクションで確認された。二十面体に特徴的な 5 回軸回転を示すピークは  $\chi = 72^\circ$  (d) のセクションに確認されなかった。

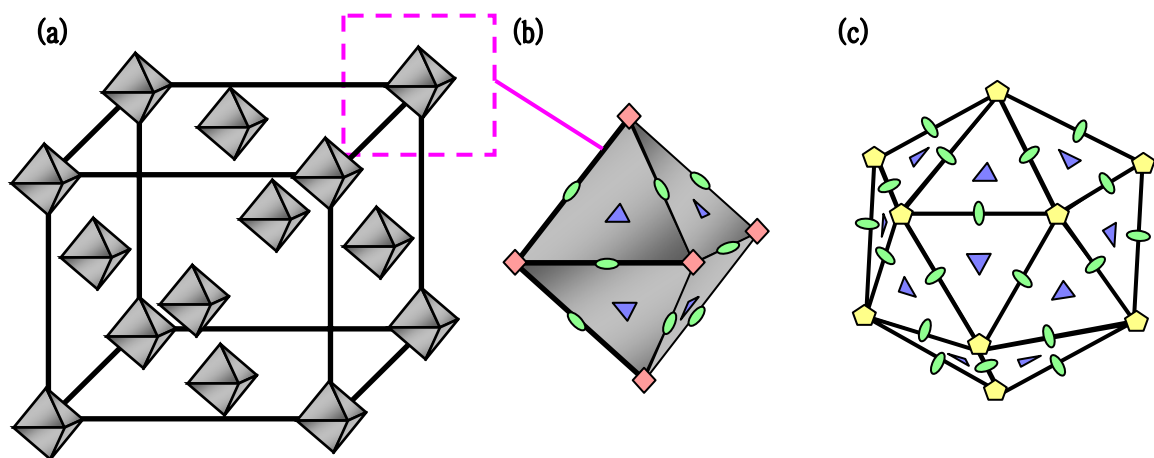


図 14 単位格子内の八面体粒子の模式図、八面体と二十面体の回転軸

(a) 空間群  $F432$  から考えられる単位格子内の八面体粒子の配置

(b) CPD1 の八面体粒子が持つ回転軸（各頂点に 4 回回転軸）

(c) 正二十面体粒子が持つ回転軸（各頂点に 5 回回転軸）

◆: 4 回回転軸、▲: 3 回回転軸、○: 2 回回転軸、◇: 5 回回転軸

## 【1-4 考察】

本研究では、ペプチドリンカーによる VLPs 結晶化への影響を検討し、機能性蛋白質を内包させた VLPs が新規の結晶化プラットフォームとして有用であることを確認するために、HBc149 を基にした融合蛋白質のコンストラクト設計、発現、精製、結晶化を行った。外来蛋白質を融合していない CPDm の超遠心分離による精製においては、Zlotnick らが報告した HBV キャプシドの超遠心分離 (Zlotnick *et al.*, 1999) の知見から、CPDm の超遠心後サンプルチューブ上端側 (分画 1、2) には、会合していない CPDm と大腸菌由来の可溶性蛋白質が存在し、チューブ中央 (分画 4-10) には結晶化に適さない不規則に集合したイレギュラーパーティクル、チューブ下端側 (分画 12-17) には自己集積した VLPs を含むと考えられる。HBV キャプシドを形成する HBc149 と同じ分画に高い OD<sub>280</sub> 値、SDS-PAGE のシングルバンドが得られていることから、CPDm は VLPs を形成し精製されたと考えられる。結晶化においては、2 つの形状の結晶が得られ、ペプチドリンカー存在下でも HBV キャプシドと同様の条件下で結晶化できることが明らかになった。得られた結晶のうち一つは平板結晶であった。この結晶化条件は HBc149 においても平板結晶が得られる条件であり (図 10c)、二十面体 HBV キャプシドの結晶が得られた条件でもある (Wynne *et al.*, 1999)。そのため、CPDm 平板結晶内の蛋白質のコンフォメーションは、HBV キャプシドに近いと考えられ、この平板結晶は CPDm が二十面体を形成した VLPs の結晶である可能性が示唆された。一方で八面体の結晶は、相分離状態となった条件下で結晶化された。平板結晶はクライオプロテクトANT 2,3-butanediol に数分浸すと溶解してしまうのに対して、この八面体結晶は 2,3-butanediol のソーキングに対して比較的安定に存在していた。このことから、外来蛋白質を融合させた CPDm (CPDs) においても同様の八面体結晶が得られた場合には、その結晶はソーキングに対して安定な結晶となる可能性を示唆しており、将来的にソーキング法による蛋白質複合体結晶作製に寄与できるものと期待される。



CPD1 の超遠心分離による精製では、CPD1\_HBc149 に比較して、CPD1 は分画 12–17 から得られた蛋白質が多くなり、高い蛍光強度が観測された。CPDm と同様に Zlotnick らの知見から考えると (Zlotnick *et al.*, 1999)、イレギュラーパーティクルが減少し、より多くの VLPs が形成されていることが示唆された。HBc149 の C 末端付近 (120–143 aa) の相互作用は正二十面体キャプシドの安定化に寄与していることが明らかにされており (Wynne *et al.*, 1999)、HBc150 の 150 番目のアミノ酸であるシステインが分子間でジスルフィド結合することで、相互作用をより安定なものとし、安定化した正二十面体 VLPs が多く形成されたと考えられる。

TEM 観察により、分画 12–17 から HBV キャプシドとは外径は同じだが、内径の異なる CPD1 の VLPs が確認された。この結果から、CPD1 の VLPs が HBV キャプシドと同様に正二十面体のキャプシドを形成し、GFP を VLPs 内側に配置していると考えられる。HBc149 の C 末端に GFP を付加した融合蛋白質は VLPs を形成することはできないが、CPDm を利用したことで機能を保持した状態の GFP を VLPs に内包させ、結晶化に適していると考えられる安定な VLPs の作製に成功した。

精製された CPD1 の結晶化においては、HBV キャプシドと同様の沈殿剤、緩衝液、pH により結晶が得られた。CPDm に融合させた GFP は、結晶を形成する際の蛋白質表面の相互作用への影響は少なく、蛋白質表面のコンフォメーションが HBV キャプシドに近いという可能性が示唆された。また、蛍光顕微鏡により GFP 由来の蛍光が確認されていることから、融合した蛋白質が機能を保持した状態で結晶化されていることが明らかになった。

結晶内で CPD1 が八面体を形成していたが、結晶化前の TEM 観察では八面体粒子を見つけ出すことはできなかった。したがって、CPD1 はクリスタルパッキングの結果として八面体構造に配置されたと考えられる。これまでに、バクテリオファージ MS2 のウイルスコート蛋白質が、結晶化により同様の八面体の構造に配置されることが報告されている (Plevka *et al.*, 2008)。結晶内で八面体を構成する MS2 コートプロテ

インと CPD1 との間にいくつか類似点がある。MS2 キャプシドは、1 種類のサブユニットで構成され、そのサブユニットは二量体を形成する (Golmohammadi *et al.*, 1993)。さらに、二分子の MS2 コートプロテインがペプチドを介して結合された二量体 (CCPD) は、二十面体粒子を形成することが知られている (Peabody *et al.*, 1996)。しかし、CPD1 と同様に TEM 観察では八面体粒子は検出されず、空間群  $F432$ 、格子定数  $a = b = c = 220.44 \text{ \AA}$  で結晶化した (Plevka *et al.*, 2008)。結晶化は、MS2 キャプシドの結晶化条件 (1.5 % PEG 6000、0.2 M sodium phosphate buffer、pH 7.4、Valegard *et al.*, 1986) を基に、相分離状態 (0.32 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.08 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、5 % PEG 8000、pH 7.5) にすることで結晶化されている。Plevka らは、二十面体の CCPD 粒子は相分離の結晶化条件により解体され、そのサブユニット (CCPD) が八面体構造に再配列されたと報告している。

本研究における CPD1 もまた相分離の条件で結晶化した。おそらく CCPD の場合と同様に、相分離状態は CPD1 で構成された二十面体の VLPs を崩壊させ、八面体構造に再配列し、 $F432$  空間群に属する結晶が形成されたと考えられる。得られた結晶は、2,3-butanediol を含んだ結晶化溶液のソーキングに耐える安定性を持ち、そして HBV キャプシドの結晶の分解能が  $3.3 \text{ \AA}$  であるのに対し、CPD1 の結晶は  $2.15 \text{ \AA}$  の高分解能データが得られた。詳細構造が明らかになれば、その構造情報は最適な結晶化プラットフォームをデザインする上で重要となる。

## 第二章

GFP を挿入したペプチドリンカーを介して二量体化した  
B 型肝炎ウイルスコアプロテインの発現、精製、  
結晶化と X 線結晶学的研究

## 【2-1 背景と目的】

ウイルスサブユニットと外来蛋白質から構成される融合蛋白質のVLPsは、様々なアプリケーションのプラットフォームとして利用されている。これまでに、CPD融合蛋白質（CPDs）が自己集積し、VLPsを形成することを報告した。このCPDsは、二分子の変異体コアプロテイン（HBc150）がペプチドリンカーを介して結合したCPDmと外来蛋白質により作製された融合蛋白質である。CPDmのC末端に外来蛋白質を融合させたCPDs（CPD1）もまたVLPsを形成することが明らかにされている。

そのCPD1のVLPsは、電子顕微鏡により観察すると正二十面体のHBVキャプシドと同径の粒子であった。精製したVLPsを結晶化すると、融合した外来蛋白質の機能が維持されている結晶が得られた。しかしX線単結晶解析の結果から、CPD1は結晶化の際にVLPsから八面体の対称性を持つ構造へ再配列することが明らかになった。八面体粒子の構造をもつ結晶を得るためには二つの条件が必要である。一点目は野生型のウイルスキャプシドにおいて二量体化する二分子のサブユニットをペプチドにより結合させること、二点目に二量体化したサブユニットから構成されたVLPsを、野生型ウイルスキャプシドの結晶化条件を基に作製した相分離状態の条件で結晶化することである。これらの条件を満たしたMS2コートプロテイン（CCPD）もまた、同様の八面体に配列した構造をもつ結晶を生成する（Plevka *et al.*, 2008）。これらの八面体に再配列する結晶は、その高い対称性から、結晶内で機能を保持した外来蛋白質を配置させる新規のプラットフォームとなる可能性が示唆された。CPDsをプラットフォームとして利用するためには、選択肢の一つとしてCPDmのC末端以外の位置にも様々な外来蛋白質を融合させる新しいCPDの設計が必要である。その新たに設計されたCPDsは効率的にVLPsを形成し、単結晶がCPD1の結晶と同系であることが理想的である。なぜなら、CPD1を基にした融合蛋白質の設計では効率的に自己集積することができなかつたため、結晶化に必要な蛋白質量を得ることが困難であった。HBc149のC末端側（120–143 aa）はVLPsを形成する

際にコアプロテイン間で相互作用する領域であり (Wynne *et al.*, 1999)、C末端に大きい蛋白質をつなげるとVLPs形成が阻害され、VLPsを形成できないCPD1も存在する。そのため、VLPsに効率的に自己集積できるCPDsのさらなる開発研究が必要とされている。さらに、得られた結晶が同形であることは、CPDsが外来蛋白質を融合させた位置に左右されない結晶化プラットフォームとなることが期待されるためである。

今回、ペプチドリンカー間に外来蛋白質を配置させることで、コアプロテイン間の相互作用に影響の少なく、自己集積の効率を改善させる新規のCPDsを設計した (CPD2、CPD2\_HBc149、図17)。融合させる外来蛋白質にはGFPを利用した。GFPを選んだ理由として、蛍光強度により精製、VLPsの確認が比較的容易となり、さらに既にX線結晶構造解析例が報告されているため(Yang *et al.*, 1996)、本研究での外来蛋白質の構造的変化を確認できるためである。さらにVLPs形成効率を比較するため、HBc149で作製されたCPD2\_HBc149のコンストラクトを作製した。CPD2、CPD2\_HBc149を大腸菌で発現し、CPD2で構成されたVLPsを精製し結晶化を行った。

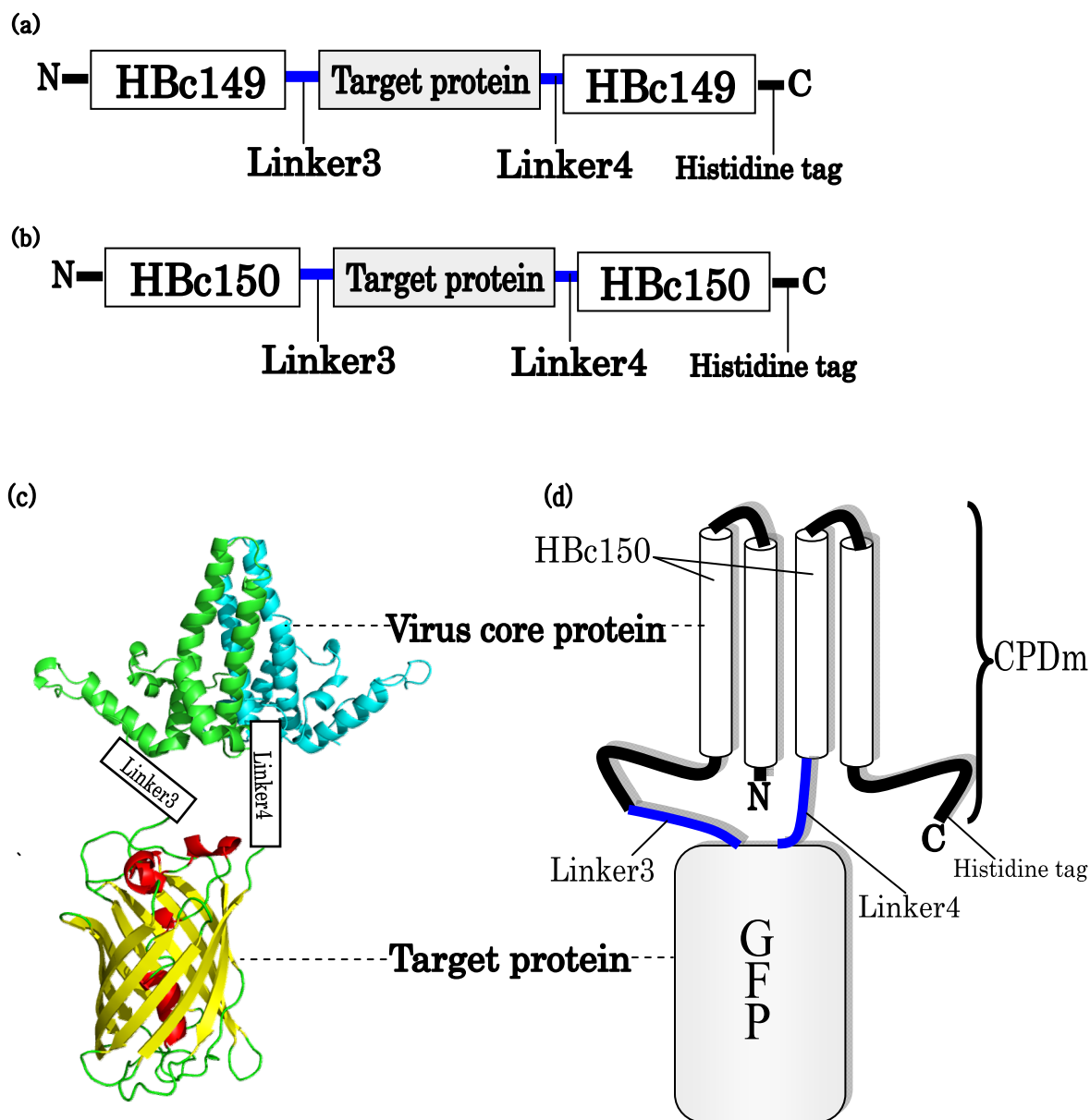


図 17 本研究で作製した融合蛋白質の遺伝子ブロック図とその模式図

(a) CPD2\_HBc149

(b) CPD2

Linker3 のペプチド配列: (GGS)<sub>3</sub>KL

Linker4 のペプチド配列: (GGS)<sub>3</sub>

Histidine tag: H<sub>12</sub>

(c) PDB に登録されているコアプロテイン (1QGT) と GFP (1GFL) から作製した CPD2 の模式図

(d) PDB に登録されている構造から考えられる GFP と Linker の配置を表す CPD2 の概略図

## 【2-2 実験方法】

### 1 プラスミドのコンストラクト作製

#### 1-i CPD2 のコンストラクト作製

HBc150 をコードしている PT7-SC ベクターを鋳型とし、PCR を行った。表 1、表 5 に記したプライマーの Primer1 と Primer20 を用いて HBc150-(GGS)<sub>3</sub>KL 遺伝子配列 (HBc150\_L3-2 fragment) を PCR で増幅した。PCR 溶液をアガロースゲルによる電気泳動後、目的とする PCR 産物 HBc150\_L3-2 fragment のゲルを切り出し、精製した。pET-28a(+) vector (Merck Millipore) に *Nco*I、*Hind* III の制限酵素 (Takara Bio) を加え 37 °C、3 時間インキュベートし、アガロースゲル電気泳動後、ゲルを切り出し、精製を行った。HBc150\_L3 fragment-2 は、pET-28a(+) vector (Merck Millipore) の *Nco*I-*Hind* III 制限酵素切断部位へ挿入し、HBc150\_L3 plasmids-2 を作製した。作製されたプラスミドを用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した。大腸菌からプラスミドを精製し、制限酵素 *Hind* III、*Bam*H I (Takara Bio) で切断し、アガロースゲル電気泳動し、ゲルを切り出すことで精製した。

pEGFP-C1 vector (Clontech Laboratories、GenBank accession no. U55763) を鋳型とし、C 末端を欠損させた 229 アミノ酸残基の GFP の遺伝子配列にペプチドリンカー配列を付加した GFP-(GGS)<sub>3</sub> の遺伝子配列 (GFP\_L3 fragment) を、Primer5 と Primer21 を用いて PCR で増幅させ、アガロースゲル電気泳動により精製した。精製された GFP\_L3 fragment を HBc150\_L3-2 plasmids の *Hind* III-*Bam*H I 制限酵素切断部位へ挿入し、HBc150\_L3\_GFP\_L3 plasmids を作製した。作製されたプラスミドを用いて、上記と同様の方法で大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した後、プラスミドを精製し、制限酵素 *Bam*H I、*Xho*I (Takara Bio) で切断した。

HBc150 をコードしている PT7-SC ベクターを鋳型とし、Primer22 と Primer23 を用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動により精製した。精製した HBc150 DNA 断片を HBc150\_L3\_GFP\_L3 plasmids の *BamH I-Xho I* 制限酵素切断部位へ挿入し、CPD2 遺伝子配列のコンストラクトを作製した。作製されたプラスミドを用いて、上記と同様の方法で大腸菌 DH5 $\alpha$  (Takara Bio) を形質転換した後、プラスミドを精製し、塩基配列を確認した (表 6-1: CPD2 アミノ酸配列)。

#### (1)-ii CPD2\_HBc149 のコンストラクト作製

HBc149 をコードしている PT7-SC ベクターを鋳型とし、プライマーは Primer1 と Primer24 を用いて HBc149-(GGG)<sub>3</sub>KL の遺伝子配列、Primer22 と Primer25 を用いて HBc149 の DNA 断片を PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動により精製した。GFP\_L3 fragment は、CPD2 コンストラクト作製に用いた配列と同様の DNA 断片を用いた。これらの DNA 断片を CPD2 と同様の方法で CPD2\_HBc149 のコンストラクトを作製した。(表 6-2: CPD2\_HBc149 アミノ酸配列)。



表 5 プライマー配列

Primer	Sequence (5' → 3')
Primer20	GGCGAAGCTTAGAGCCGCCGCTCCCCCAGAGCCACCGCAAACA ACAGTA
Primer21	CCATGGATCCGCCGCTGCCGCCGCTGCCACCGATCCCGGCG
Primer22	CGCCGGATCCATGGATATCGATCCTTATAAAGAATTC
Primer23	GCGACTCGAGGCAAACAACAGTAGT
Primer24	CCATAAGCTTGCTCCCACCGCTCCCCCAGAGCCACCAACAACAG TAGTC
Primer25	GCGACTCGAGAACAACAGTAGTCTCCGG

表 6 CPD2、CPD2\_HBc149 のアミノ酸配列

---

1. CPD2

1 MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHASP  
51 HHTALRQAIL AWGELMTLAT WVGNNLEDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL  
101 LWFHISALTF GRETVLEYLV SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVC  
151 GSGGSGGSK LMVSKGEELF TGVPILVEL DGDVNGHKFS VSGEGEGDAT  
201 YGKLTCLKFIC TTGKLPVWP TLVTTLTYGV QCFSRYPDHM QHDFFKSAM  
251 PEGYVQERTI FFKDDGNYKT RAEVKFEGDT LVNRIELKGI DFKEDGNILG  
301 HKLEYNYN SH NVYIMADKQK NGIKVNFKIR HNIEDGSVQL ADHYQQNTPI  
351 GDGPVLLPDN HYLSTQSALS KDPNEKRDHM VLLEFVTAAG ITLGMDELYK  
401 GSGGSGGSM DIDPYKEFGA TVELLSFLPS DFFFPSVRDLL DTASALYREA  
451 LESPEHASPH HTALRQAILA WGELMTLATW VGNNLEDPAS RDLVVNYVNT  
501 NMGLKIRQLL WFHISALTFG RETVLEYLVS FGVWIRTPPA YRPPNAPILS  
551 TLPETTVVCL EHHHHHHHHH HHH

---

2. CPD2\_HBc149

1 MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP  
51 HHTALRQAIL CWGELMTLAT WVGNNLEDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL  
101 LWFHISCLTF GRETVLEYLV SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVG  
151 GSGGSGGSKL MVSKEELFT GVPILVELD GDVNGHKFSV SGEDEGDATY  
201 GKLTCLKFICT TGKLPVPWPT LVTTLTYGVQ CFSRYPDHMK QHDFFKSAMP  
251 EGYVQERTIF FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL VNRIELKGID FKEDGNILGH  
301 KLEYNYN SHN VYIMADKQKN GIKVNFKIRH NIEDGSVQLA DHYQQNTPIG  
351 DGPVLLPDNH YLSTQSALSK DPNEKRDHMV LLEFVTAAGI TLGMDELYKG  
401 GSGGSGGSM IDPYKEFGAT VELSFLPSD FFPSVRDLLD TASALYREAL  
451 ESPEHCSPHH TALRQAILCW GELMTLATWV GNNLEDPASR DLVVNYVNTN  
501 MGLKIRQLLW FHISCLTFGR ETVLEYLVSF GVVWIRTPPAY RPPNAPILST  
551 LPETTVVLEH HHHHHHHHHH H

---

## 2 発現と精製

作製したプラスミドを用いて、発現用大腸菌 Arctic Express (DE3) RIL (Agilent Technologies) を形質転換させた。発現・精製方法は、CPD1 と同様の方法で精製し、1 mg/ml に調製したサンプル溶液 0.4 ml を超遠心分離(141000 xg, 6 時間、Hitachi P28S2 rotor) によって沈降させ、VLPs と会合していない融合蛋白質とを分離した。超遠心後の各フラクションの蛍光強度を Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) により測定 (励起波長 488 nm、蛍光波長 509 nm) し、SDS-PAGE により、分子量から発現した融合蛋白質を確認した。精製された CPD2 を Buffer B (150 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl pH 7.5) で透析した後、遠心式限外ろ過膜 Vivaspin (Sartorius stedim) を用いてサンプル溶液を 10 mg/ml に濃縮した。

蛋白質溶液の濃度は、BSA と Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いた Bradford 法で測定した。

## 3 電子顕微鏡と原子間力顕微鏡 (AFM) による粒子観察

CPD2 の電子顕微鏡観察は、CPD1 と同様の方法で染色し観察した。

精製された CPD2 を Buffer B で 10000 倍に希釈し、剥離させた雲母に 10  $\mu$ l 添加した。30 秒静置した後、DW で雲母表面を洗浄した。雲母を E スキャナー上のサンプルステージにのせ、Multi mode AFM (Bruker AXS) により雲母上にある蛋白質の表面構造を観察し、ソフトウェア Nanoscope (Bruker AXS) により蛋白質の粒子径を算出した。

#### 4 結晶化とデータ収集

結晶化は CPD1 と同様に、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行った。HBV キヤプシド結晶化条件に基づき (Wynne *et al.*, 1999)、蛋白質濃度 5 mg/ml、0.5–4 % PEG 20000、0.4–2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1 M MES (pH 6.5–7.0)、温度 292 K で結晶化スクリーニングした。得られた結晶は、母液による蛍光が強いため、リザーバー溶液で 3 回洗浄したのち、IX71 蛍光顕微鏡 (Olympus、Excitation: BP 460–495 nm、Emission: BA 510–550 nm、Dichromatic mirror: DM505) で GFP 由来の蛍光を観察した。これらの洗浄された結晶を Buffer B に溶解し、SDS-PAGE により結晶を構成する蛋白質の分子量を確認することで、CPD2 (54 kDa) で構成されている結晶であることを確認した。

単結晶をクライオループ (Hampton Research) ですくいとり、クライオプロテクトメントを含んだ結晶化溶液 (22 v/v% 2,3-butanediol、2 % PEG 20000、0.1 M MES pH 6.5) に 1 日ソーキングした後、100 K の窒素ガスで瞬間的に凍らせた。予備的な実験として R-AXIS VII システム (Rigaku) により結晶の X 線回折を確認した後、Photon Factory BL-17A でデータ収集を行った。その回折データは *iMOSFLM* (Battye *et al.*, 2011)、*CCP4i* (Winn *et al.*, 2011) により処理した。空間群は、*POINTLESS* (Evans, 2006) を用いて決定した。*TRUNCATE* (French *et al.*, 1978) により平均の X 線強度データを構造因子に変換し、自己回転関数 (SRF) は *MOLREP* (Vagin *et al.*, 1997) により求めた。

## 【2-3 結果】

### 1 融合蛋白質の発現と超遠心分離による精製

超遠心後のフラクションを SDS-PAGE すると、スクロース密度が高い分画 12–17 に CPD2 と考えられる大きさの分子量 (54 kDa) のシングルバンドが得られた (図 16)。さらに、蛍光強度測定から分画 12–17 に GFP 由来の高い蛍光強度が得られた (図 17)。超遠心サンプルチューブ 1 本当たり CPD2 の VLPs の収量は 0.32–0.37 mg であった。

### 2 電子顕微鏡と原子間力顕微鏡による VLPs の観察

CPD2 の超遠心後サンプルチューブ分画 12–17 を透析した後、TEM で観察すると直径が 350 Å の HBV キャプシド ( $T=4$ ) と同径の VLPs が確認された (図 18)。CPD1 と同様に、HBV キャプシドと比較すると外径はほぼ等しく内径は異なっていた。

AFMの観察像から、複数の粒子が確認され、それらの粒子の直径はTEMの結果と同様に350 Åであった (図19)。

### 3 VLPs の結晶化

蛋白質濃度 5 mg/ml に調製し、硫酸アンモニウムの塩濃度を高くした相状態の結晶化溶液 (2% PEG 20000、1.3–1.6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1 M MES pH 6.5) を使い、温度 292 K にてハンギングドロップ蒸気拡散法により、単結晶が得られた (図 20a)。その八面体結晶は約 4 ヶ月間平衡化することにより約 0.05 mm に成長した。この結晶からは GFP 由来の蛍光が確認され (図 20b)、結晶を溶解したサンプルを SDS-PAGE することで CPD2 の分子量 (54 kDa) のバンドが検出されたことから、GFP が融合された CPD2 の結晶であると確認された (図 20c)。

### 4 X 線結晶学的データ

X 線回折像が得られ (図 21)、最大分解能 2.8 Å、空間群 *F*432 に属しており、この結晶の格子定数は  $a = b = c = 218.6 \text{ \AA}$  であった。その他の X 線結晶学的統計データを表 7 に示した。分子量を 54 kDa とし、Matthews 係数 (Matthews, 1968) と溶媒含有率はそれぞれ  $2.01 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  と 38.8% であり、非対称単位は CPD2 が 1 分子含まれていることが示唆された。SRF マップを作製すると、CPD1 と同様の 2 回回転軸、3 回回転軸、4 回回転軸のピークが得られた (図 22)。

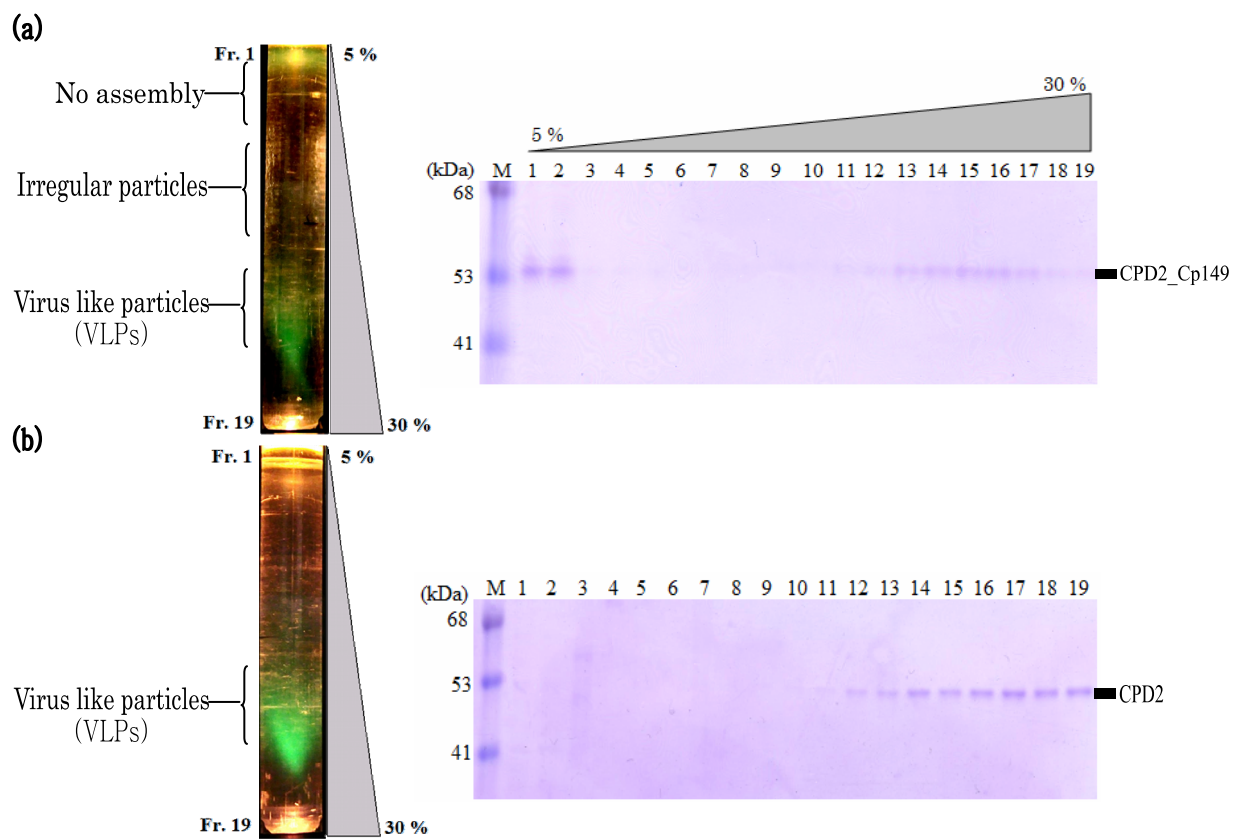


図 16 超遠心後のサンプルチューブ（左図）と、19 に分画したサンプルの SDS-PAGE（右図）

(a) CPD2\_HBc149 (54 kDa)

(b) CPD2 (54 kDa)

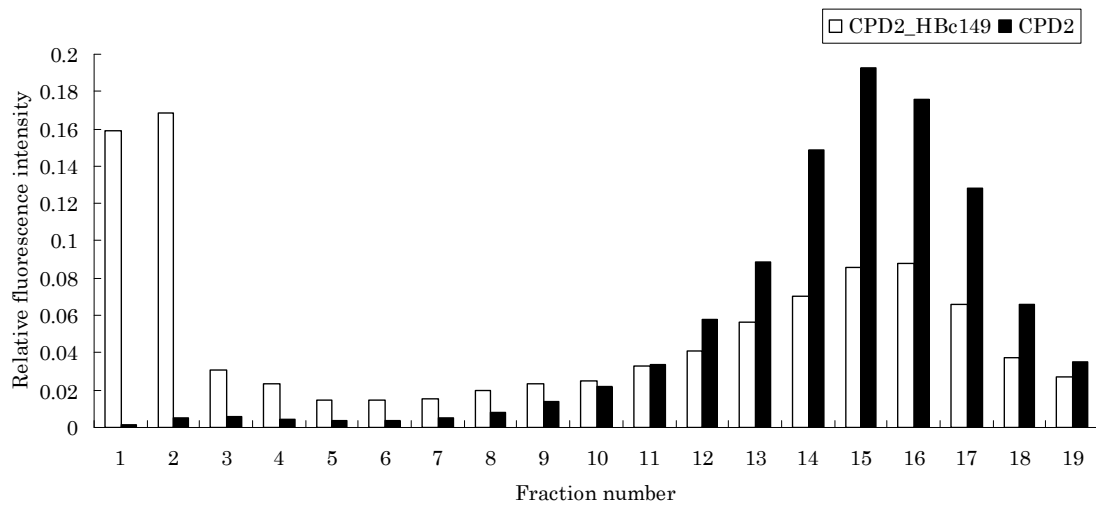


図 17 超遠心後に分画されたサンプルの相対蛍光強度

超遠心前のサンプル蛍光強度を 1 とした、各分画の相対蛍光強度



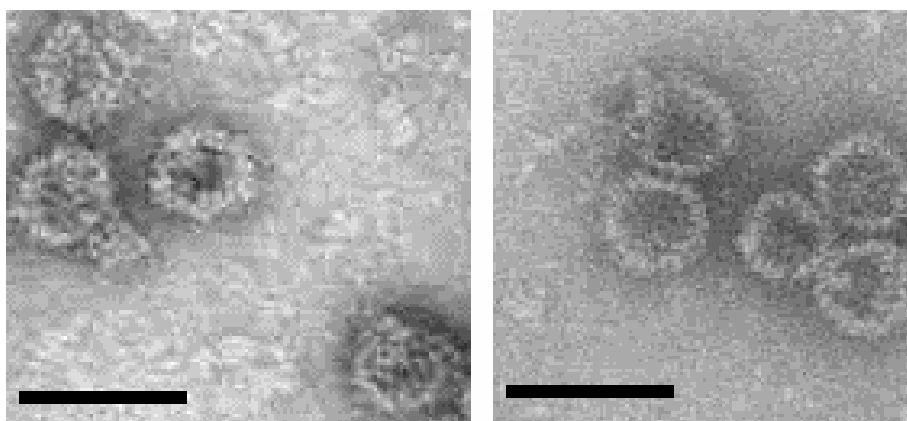


図 18 超遠心後のサンプル分画 12-17 の電子顕微鏡写真 (Scale bar = 0.05 mm)

- (a) CPD2 で構成された VLPs
- (b) HBc149 で構成された HBV キャプシド

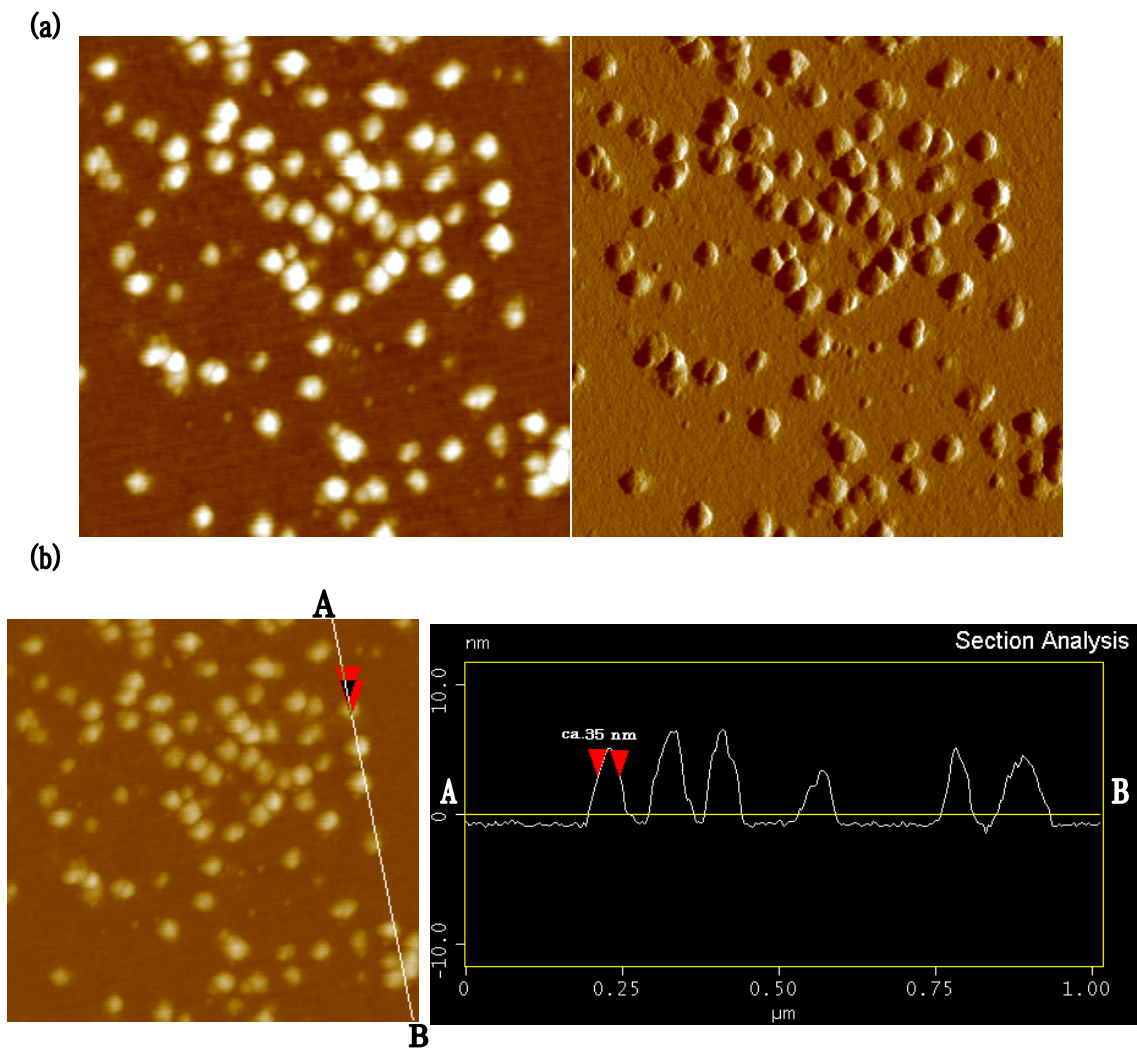


図 19 原子間力顕微鏡 (AFM) による VLPs 観察

- (a) VLPs の AFM 像 (左:トポグラフィ像、右:エラースIGNAL像、scan size 1 mm × 1 mm)
- (b) Section analysis (Nanoscope) を用いた粒子の半値幅測定

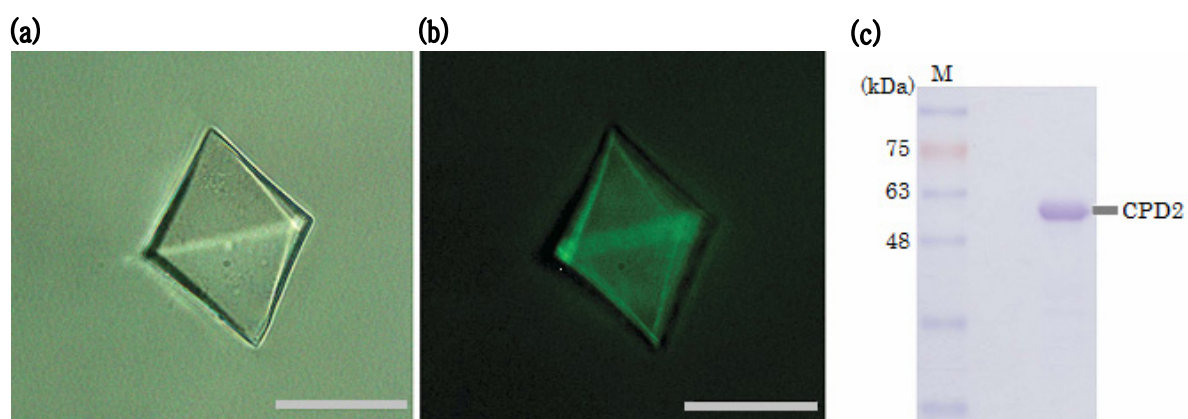


図 20 CPD2 の結晶写真 (Scale bar = 0.05 mm)

結晶化条件: 蛋白質濃度 5 mg/ml、2 % PEG 20000、1.4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1 M  
MES pH 6.5

- (a) 明視野で観察された CPD2 の結晶
- (b) CPD2 結晶の明視野/蛍光顕微鏡写真
- (c) 結晶を溶解した CPD2 (54 kDa) サンプルを SDS-PAGE した泳動図

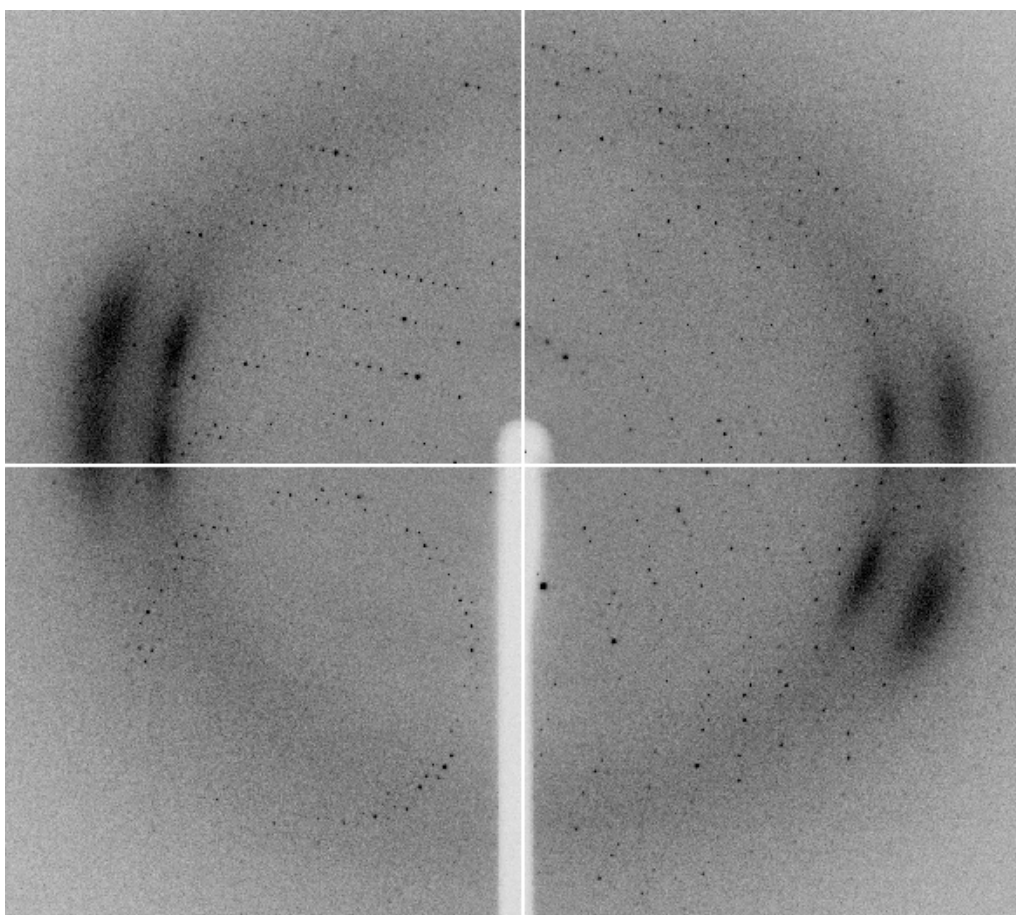


図 21 CPD2 結晶の X 線回折像

測定条件: X-ray source PF BL17A、Wavelength  $0.98 \text{ \AA}$ 、X-ray beam size  $0.05 \times 0.05 \text{ mm}$ 、  
Detector ADSC Quantum 270、Exposure time 180s、Temperature 100 K、Oscillation angle  
 $0.3^\circ$

表 7 CPD2 の X 線結晶学的データ

Space group	<i>F</i> 432
Unit-cell parameters (Å, ° )	$a = b = c = 218.6$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Resolution range (Å)	54.6–2.80 (2.95–2.80)
No. of observed reflections	222456 (31842)
No. of unique reflections	11553(1637)
Matthews coefficient (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> )	2.01
Solvent content (%)	38.98
Multiplicity	19.3 (15.6)
R <sub>meas</sub> †(%)	17.4 (51.5)
R <sub>p.i.m.</sub> (%)	3.9 (11.6)
Completeness (%)	100 (96.6)
R <sub>merge</sub> †(%)	16.7 (49.1)
Mean I / $\sigma(I)$	17.8 (7.2)

†: R<sub>merge</sub> と R<sub>meas</sub> は、Diederichs らの知見を基に決定した (Diederichs & Karplus, 1997)。

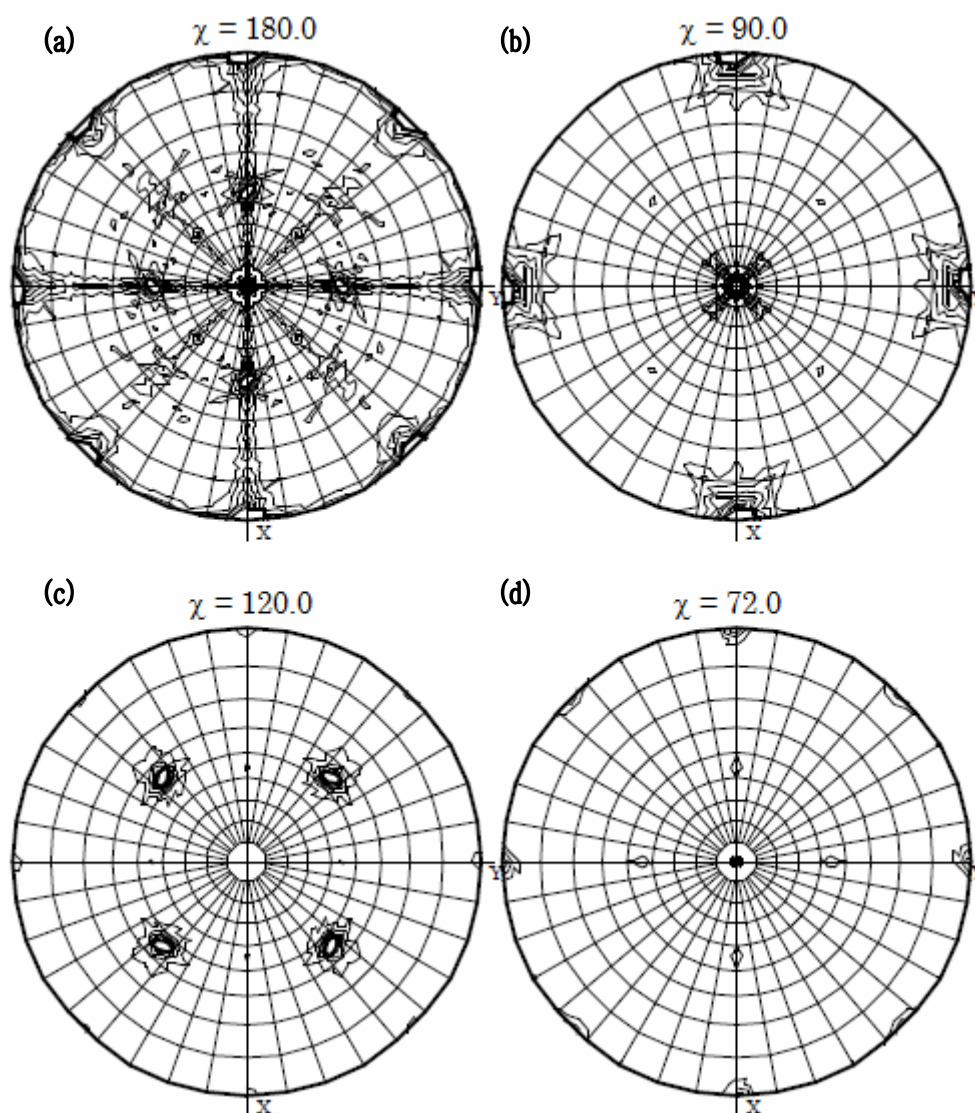


図 22 CPD2 の X 線回折データから得られた SRF マップ

分解能 5–10 Å、積分半径 100 Å で計算した自己回関数。

八面体に特徴的な 4 回回転軸を示すピークが  $\chi = 90^\circ$  (b) のセクションに確認され、2 回回転軸を示すピークは  $\chi = 180^\circ$  (a)、 $\chi = 90^\circ$  (b) のセクションに、3 回回転軸を示すピークは  $\chi = 120^\circ$  (c) のセクションで確認された。二十面体に特徴的な 5 回回転軸を示すピークは  $\chi = 72^\circ$  (d) のセクションに確認されなかった。

## 【2-4 考察】

本研究では、新規の結晶化プラットフォームとしてCPDsを利用するため、VLPsの形成効率を改善すると期待される新たな融合蛋白質を設計した (CPD2)。新たに設計したCPD2が新規の結晶化プラットフォームとして有用であることを確認するために、コンストラクト作製、発現、精製、結晶化を行った。超遠心分離による精製においては、CPD1と同様にこれまでのHBVキャプシドが超遠心分離された知見 (Zlotnick *et al.*, 1999) から考えると、スクロース密度が低い分画1、2はVLPsに自己集積しなかった蛋白質であり、スクロース密度が高い分画12–17に自己集積されたVLPsが存在していると考えられる。CPD1では分画1と2に自己集積しなかった融合蛋白質が検出された (Kikuchi *et al.*, 2013)。一方、対照的にCPD2はCPD1の実験と同一の蛋白質量 (0.4 mg) で超遠心した場合、分画1、2からはバンドを検出するのは困難であり、会合していないCPD2はほとんど存在していなかったと考えられる。さらに、サンプルチューブ1本当当たりのCPD2のVLPsの収量は、CPD1から得られるVLPs (0.15–0.21 mg) より多く回収された。これらの結果は、精製されたCPD2のほとんどがVLPsを形成し、形成効率が改善されていることを示唆している。

TEMとAFMからは、HBVと同径の粒子が確認され、CPD2がVLPsを形成することが明らかになった。

得られたCPD2の結晶の空間群や格子定数は、既報のCPD1 (格子定数 219.7 Å、分解能 2.15 Å) (Kikuchi *et al.*, 2013) や257アミノ酸残基のMS2 CCPD (格子定数 220.44 Å、分解能 3.5 Å、Plevka *et al.*, 2008) と近かった。さらに、CPD1と同条件で作製したSRFマップは八面体に特徴的な4回回転軸のピークが観測され、二十面体に特徴的な5回軸のピークが観測されなかった。これらの結果から考えると、CPD2は、CPD1やMS2 CCPDと同様にクリスタルパッキングにより正二十面体VLPsが解体され、八面体の対称性をもつ結晶に再配列されたと考えられる。

CPD1とCPD2は、外来蛋白質が融合されている位置が異なるにも関わらず、ほぼ同じ条件下で結晶化され、それらの結晶は同形であった。さらに、配列類似性が高いGFPの結晶化条件がProtein data bankに登録されているが、これまでに本研究で使用した結晶化条件に一致するものは登録されていない。これらの結果から、八面体結晶は内包させたGFPに依存せずに、CPDmドメイン間の相互作用により形成されていると考えられる。他の外来蛋白質をCPDmに融合させた場合にも、八面体に再配列したCPDsの結晶を形成する可能性がある。したがって、この八面体粒子は様々な機能性蛋白質を配置させるプラットフォームとして利用できる可能性があることを示唆している。しかしながら、八面体内側の体積は限られているため、配置する蛋白質は制限が生じると考えられる。X線結晶学的データの結果から、結晶内のCPD2の分子パッキングはMS2 CCPDの八面体粒子の結晶構造とほぼ同一であった。そのため、CPD2八面体粒子の内容積はCCPD八面体粒子の内容積と近い値になると考えられる。CCPDの八面体構造モデルを基に考えると、利用可能な内容積はおよそ800 nm<sup>3</sup>である。24分子のCPDsで八面体構造が形成されるので、1分子のCPDmに融合させることが可能な外来蛋白質の許容体積は33 nm<sup>3</sup>であると考えられる。本研究で用いたGFPの体積はおよそ32 nm<sup>3</sup>であり、許容体積内であるため八面体粒子内側に配置されていることが示唆された。

これらのCPDsの三次元構造情報は融合蛋白質の新規設計に重要であり、CPDsで構成されたVLPsのアプリケーションに有用な情報となると考えられる。



## 【引用文献】

### 特許 1

(発明者) 菊地正樹, 岩渕紳一郎, 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.

### 特許 2

(発明者) 菊地正樹, 岩渕紳一郎, 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.

Abrescia, N. G., Cockburn, J. J., Grimes, J. M., Sutton, G. C., Diprose, J. M., Butcher, S. J., Fuller, S. D., San Martín, C., Burnett, R. M., Stuart, D. I., Bamford, D. H., & Bamford, J. K. (2004). *Nature*. **432**, 68-74.

Abrescia, N. G., Grimes, J. M., Kivelä, H. M., Assenberg, R., Sutton, G. C., Butcher, S. J., Bamford, J. K., Bamford, D. H. & Stuart, D. I. (2008). *Mol. Cell*. **31**, 749-761.

Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. W. (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 271-281.

Beterams, G., Böttcher, B. & Nassal, M. (2000). *FEBS Lett.* **481**, 169-176.

Birnbaum, F. & Nassal, M. (1990). *J. Virol.* **64**, 3319-3330.

Choi, K.-M., Choi, S.-H., Jeon, H., Kim, I.-S. & Ahn, H. J. (2011). *ACS Nano*. **5**, 8690-8699.

Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.

Crowther, R. A., Kiselev, N. A., Böttcher, B., Berriman, J. A., Borisova, G. P., Ose, V. & Pumpens, P., (1994) *Cell*. **77**, 943-50.

Douglas, T. & Young, M. (2006). *Science*. **312**, 873-5.

- Diederichs, K. & Karplus, P. A. (1997). *Nature Struct. Biol.* **4**, 269–275.
- Evans, P. (2006). *Acta Cryst.* **D62**, 72–82.
- French, S. & Wilson, K. (1978). *Acta Cryst.* **A34**, 517–525.
- Golmohammadi, R., Valegård, K., Fridborg, K. & Liljas, L. (1993). *J. Mol. Biol.* **234**, 620–39.
- Higuchi, R., Krummel, B. & Saiki, R. K. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 7351–7367.
- Koletzki, D., Zankl, A., Gelderblom, H. R., Meisel, H., Dislers, A., Borisova, G., Pumpens, P., Krüger, D. H. & Ulrich, R. (1997). *J. Gen. Virol.* **78**, 2049–2053.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Peabody, D. S. & Lim, F. (1996). *Nucleic Acids Res.* **24**, 2352–2359.
- Plevka, P., Tars, K. & Liljas, L. (2008). *Protein Sci.* **17**, 1731–1739.
- Singh, P., Gonzalez, M. J., & Manchester, M. (2006). *Drug Dev. Res.* **67**, 23–41.
- Skamel, C., Ploss, M., Böttcher, B., Stehle, T., Wallich, R., Simon, M. M. & Nassal, M. (2006). *J. Biol. Chem.* **281**, 17474–17481.
- Tiollais, P., Charnay, P. & Vyas, G. N. (1981). *Science.* **213**, 406–411.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022–1025.
- Valegård, K., Unge, T., Montelius, I., Strandberg, B., & Fiers, W. (1986). *J. Mol. Biol.* **190**, 587–591.
- Vogel, M., Diez, M., Einfeld, J. & Nassal, M. (2005). *FEBS Lett.* **579**, 5211–5216.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, EB, Leslie, A. G, McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A. & Wilson, K. S. (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 235–242.
- Wynne, S. A., Crowther, R. A. & Leslie, A. G. W. (1999). *Mol. Cell.* **3**, 771–780.
- Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N. Jr. (1996). *Nature Biotechnol.* **14**, 1246–1251.

Zlotnick, A., Cheng, N., Stahl, S. J., Conway, J. F., Steven, A. C. & Wingfield, P. T.

(1997). *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **94**, 9556–9561.

Zlotnick, A., Palmer, I., Kaufman, J. D., Stahl, S. J., Steven, A. C., & Wingfield,

P. T. (1999) *Acta Cryst.* **D55**, 717–720.

## 【総括および結論】

以上、著者は本研究において、ヒト B 型肝炎ウイルスキャプシドを利用した新規の蛋白質結晶化プラットフォームの作製を目的として、ウイルスキャプシドを構成するコア蛋白質の融合蛋白質を作製し、これらを用いた研究により以下の知見を得た。

1. コア蛋白質をペプチドリンカーで二量体化した CPDm の C 末端に、機能性の外来蛋白質を融合させた CPD1 は、外来蛋白質の機能を保持した状態で VLPs を形成することが明らかになった。さらに、CPD1 は HBV キャプシドの結晶化条件を基に、外来蛋白質の機能が保持されている状態で結晶化され、X 線結晶学的データから八面体粒子構造に再配列していることが明らかになった。

2. VLPs の形成量（収率）を改善するために、ペプチドリンカー間に外来蛋白質を融合させた CPD2 は、CPD1 と同様に外来蛋白質の機能を保持した状態で VLPs を形成することが明らかになった。さらに、結晶化においても、CPD1 と同様の条件で同形の結晶が得られることが明らかになった。

CPDs が八面体粒子構造に配置する結晶は、安定な結晶の形成制御法として有効であることが示された。これらの CPDs による結晶から得られる構造情報は、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を構築するための有用な情報になると期待される。

## 【今後の展望】

八面体粒子を利用した結晶作製法と、従来の蛋白質結晶化について比較すると表 8 のようになる。八面体粒子を利用した結晶化において、薬剤等の標的蛋白質に特異的に相互作用する低分子化合物との複合体結晶を作製する際には、低分子化合物が八面体粒子表面の CPD ドメインと相互作用する可能性は低く、結晶化への影響が少ないと考えられる。そのため水溶性の低分子化合物の場合には、上述したようにソーキング法による複合体結晶の作製以外にも、従来の方法で共結晶化させることができなかった標的蛋白質と低分子化合物との複合体結晶を作製できる可能性がある。

また、CPDs の八面体結晶は、回折測定可能な大きさに成長するまで少なくとも 2 ヶ月を要したが、直径 10  $\mu\text{m}$  の微結晶は 2 週間で得られていた。この微結晶をシーディングに利用することで結晶化の期間を短くすることも可能となると考えられる。さらに、放射光実験施設の進展により微結晶の回折データ測定が可能になりつつあるため将来的に結晶成長を待たずに短期間での回折データが得られる可能性がある。

本研究で得られた結晶は、共結晶化法やソーキング法による薬剤:蛋白質複合体解析における結晶化プラットフォームとしての可能性が示唆されるものであり、比較的高分解能のデータが得られたことから、スーパーコンピュータを用いた SBDD や FBDD による薬剤の設計・開発等に寄与すると期待される。

そして、標的蛋白質を VLPs に内包させた状態で、既に報告されている条件を基に結晶化されたことは、粒子表面の構造が維持されており、融合させた外来蛋白質の影響が少なかったためと推測される。そのため、生体膜内在性ウイルスである Bacteriophage PM2 (図 23a) や Bacteriophage PRD1 (図 23b) の膜貫通領域を持つキャプシド蛋白質に難結晶性の膜蛋白質を融合させた場合でも、キャプシドの表面構造を維持した状態で膜蛋白質が内包された VLPs が作製される可能性がある。この膜蛋白質を内包した VLPs を利用することによって、難結晶性蛋白質の結晶化法への応用が期待される。

表 8 CPDs を利用した結晶化法と従来の結晶化法との比較

	CPDs による八面体構造を利用した結晶化	従来の結晶化法
結晶化条件の決定	既知のウイルスキャプシドの結晶化条件を基に決定	結晶化条件のスクリーニングを行い、場合により条件を展開し最適化する
結晶化に要する期間	2ヶ月～4ヶ月	数日～数週間
薬剤等の低分子化合物と標的蛋白質の複合体結晶作製	結晶化に標的蛋白質の構造変化による影響が少ない	標的蛋白質の表面構造が変化するため結晶が得られない場合もある

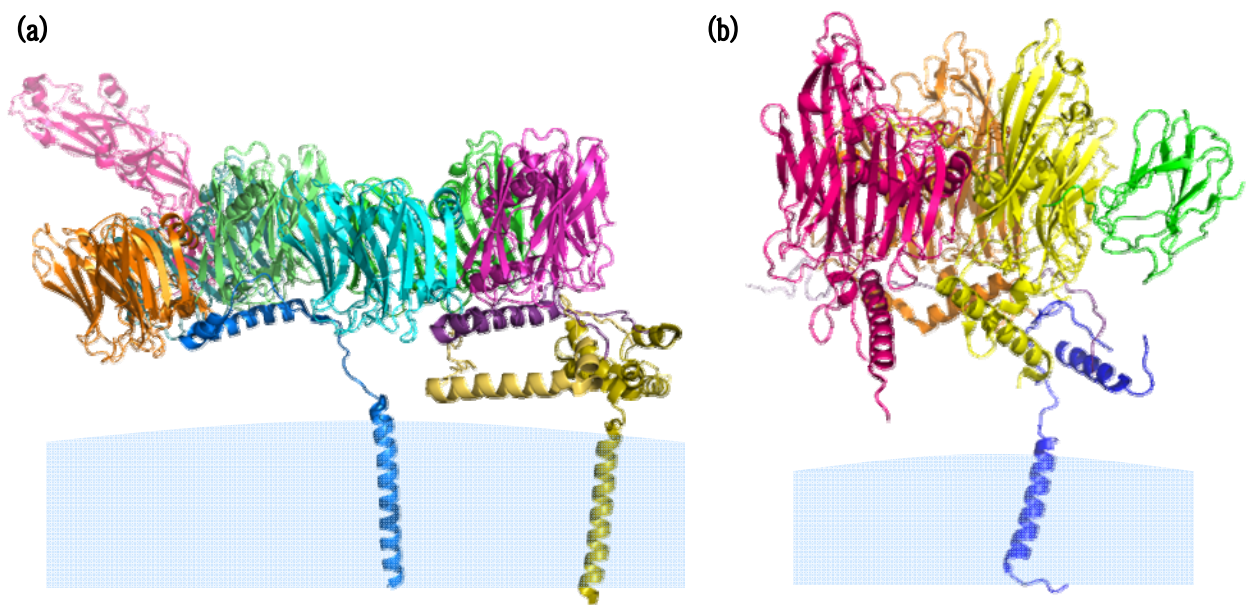


図 23 生体膜内在性ウイルスキャプシド PM2、PRD1 サブユニットの立体構造

- (a) Bacteriophage PM2 (PDB ID 2W0C) のキャプシド蛋白質 P3 (青)、P6 (黄) が脂質膜 (薄青) に存在している模式図
- (b) Bacteriophage PRD1 (PDB ID 1W8X) のキャプシド蛋白質 P16 (青紫) が脂質膜 (薄青) に存在している模式図

## 【謝辞】

本研究において、HBc149 遺伝子を分与して頂いた英国 Medical research council 教授 A. G. W. Leslie 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。

さらに、本論文作製に際して多くの御助言を賜りました本学薬学部 教授 細川正清博士に深く感謝いたします。

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、厚く御礼申し上げます。



## 【主論文目録】

本学位論文の内容の大部分は以下の論文に公表した。

1. Kikuchi M., Iwabuchi S., Kikkou T., Noguchi K., Odaka M., Yohda M., Kawata M., Sato C. and Matsumoto O. “Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic studies of Hepatitis B virus core fusion protein corresponding to octahedral particles.” *Acta Cryst.* F69, 165–169 (2013).
2. Kikuchi M., Iwabuchi S., Kikkou T., Noguchi K., Odaka M., Yohda M., Kawata M., Sato C. and Matsumoto O. “Expression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis of hepatitis B virus core protein dimerized *via* a peptide linker containing an EGFP insertion.” *Acta Cryst.* F69, 942–945 (2013).

## 【審査委員】

本学位論文の審査は千葉科学大学で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉科学大学教授	細川 正清
副査	千葉科学大学副学長	伊永 隆史
副査	千葉科学大学教授	松本 治
副査	千葉科学大学講師	福井 貴史