T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	細胞内タンパク質結晶エンジニアリングによるナノ結晶構造決定
Title(English)	In-cell protein crystal engineering for nanocrystal structure determination
著者(和文)	小島摩利子
Author(English)	Mariko Kojima
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12490号, 授与年月日:2023年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上野 隆史,石井 佳誉,北尾 彰朗,金原 数,田口 英樹
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12490号, Conferred date:2023/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

論文要約

In-cell protein crystal engineering for nanocrystal structure determination

（細胞内タンパク質結晶エンジニアリングによるナノ結晶構造決定）

小島　摩利子
東京工業大学 生命理工学院 上野研究室

本博士論文は, 細胞内タンパク質結晶にタンパク質, ペプチド, 基質小分子などのターゲット分子を均一に固定させる結晶エンジニアリングによるターゲット分子の構造決定を目的とし, 従来法で解析困難なターゲット構造を捕捉する方法論と, 効率的な結晶設計を実現する手法の開発を示す (Fig .1)。本論文は以下の 5 章より構成されている。

Chapter 1 “General introduction”では，タンパク質結晶構造解析に向けた結晶エンジニアリングと, 細胞内タンパク質結晶の構造解析・分子固定法について概説し, 本研究の目的と意義を論じている。これまでの研究から細胞内タンパク質結晶を足場とするターゲット分子の分子固定を活用した構造解析が注目されているものの, ターゲット分子の高分解能構造決定を可能にする構造均一性を持つ高回折品質を合成する普遍的な結晶エンジニアリング法が確立されていないことを指摘し, これを解決するためのアプローチとして, 細胞内タンパク質結晶の一つである多角体の利用可能性について述べている。

Chapter 2 “Engineering of an in-cell protein crystal for fastening a metastable conformation of a target miniprotein”では，細胞内タンパク質結晶の 1 つである多角体のループ領域に 10 残基からなるミニタンパク質 CLN025 を融合した複合結晶の構造解析によって, CLN025 の準安定構造の決定を達成した (Fig. 1a)。さらに分子動力学シミュレーションによって, CLN025 の準安定構造が多角体との間に形成される 2 本の塩橋によって誘起されることを明らかにした。これらの結果を踏まえ, タンパク質結晶内に様々な分子間相互作用を形成する環境を構築する結晶エンジニアリングによって, タンパク質の中間体状態や遷移状態の構造決定が実現できることを見出した。

Chapter 3 “Screening system for structure determination of intrinsically disordered protein using cell-free protein crystallization”では，無細胞タンパク質結晶化法(Cell-free protein crystallization: CFPC)を用いた迅速な結晶エンジニアリングを実現するスクリーニングシステムを構築し, さらにコンピュータによるタンパク質分子設計を組みこむことで, 構造決定を目的とした合理的な結晶設計を実現した。構造決定に向けた設計検討は, (1) 多角体モノマー内の IDP 融合サイト候補のピックアップ, (2) 11 残基 IDP フラグメントの融合サイトの決定, (3) IDP フラグメントの挿入位置の決定の 3 段階のスクリーニングによって行い, 最終的に 11 残基の IDP 由来フラグメントの構造決定に達成している。以上より, 本章で確立されたスクリーニングシステム

が, ターゲット分子の構造決定に有効な結晶設計指針を取得するための網羅的な設計検討を可能にすることを示した。

Chapter 4 “Cell-free protein crystallization for rapid structure determination of multiple substrates”では, Chapter 3 で確立されたスクリーニングシステムを基質の構造決定に適用し, 二糖類を捕捉する足場タンパク質結晶として生体内で結晶化する Galectin-10 (Gal10)に着目して二糖類の構造決定を行った (Fig. 1b)。Gal 10 は無細胞タンパク質合成系によって結晶化され, in-house X 線回折測定での高分解能構造決定を達成した。Gal10 への二糖類の固定は浸漬によって行われ, 最終的に複数の二糖類の構造決定に成功し, さらに分子動力学シミュレーションにより, Gal 10 の基質結合サイトにおける糖類基質の固定に必須なアミノ酸残基の存在を明らかにした。以上を踏まえ, ターゲットに合わせた足場タンパク質結晶結合サイトの設計指針を提案し, 今後はターゲット分子に対する足場結晶の特異性を制御できる可能性を示した。

Chapter 5 “General Conclusion”では, Chapter 1–4 で得られた結晶エンジニアリングに関する知見を総括し, ターゲット分子の構造決定に必要な結晶エンジニアリングの指針と手法を示し, タンパク質結晶足場を用いた構造決定の全自動化を含む将来の展望を論じた。本論文は汎用性の高い結晶エンジニアリングによる分子の構造決定と構造制御が可能であることを示した。本研究成果は, 構造解析を目的とした汎用性の高い結晶エンジニアリング法の基盤となり, これまでに解析されてこなかったターゲット分子の構造解析や機能解明・設計の実現への道を切り拓く。

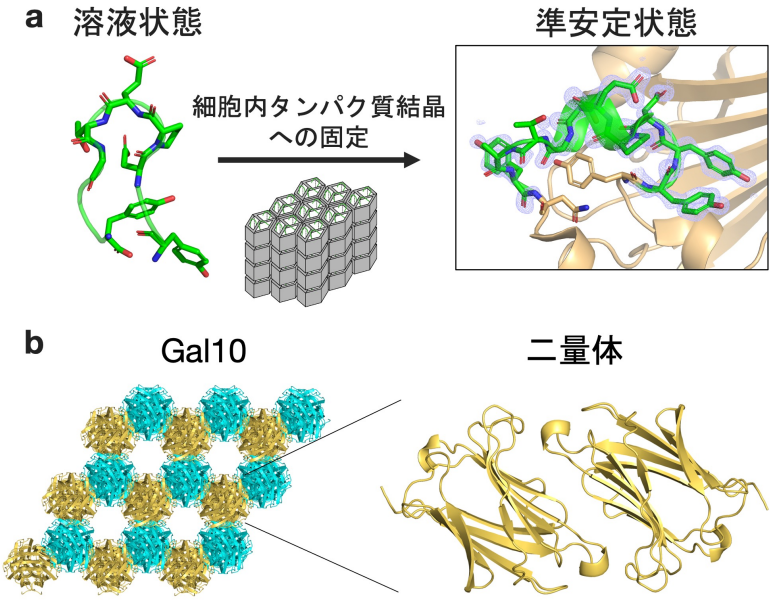

Fig. 1 細胞内タンパク質結晶のエンジニアリングによる構造決定。 a) 多角体を足場とするミニタンパク質の準安定構造決定。 b) Gal10 の結晶構造（PDB ID: 1LCL）。