

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	固体材料開発を志向した細胞内タンパク質結晶の構造解明
Title(English)	Structural elucidation of in-cell protein crystals for development of solid-materials
著者(和文)	田中潤子
Author(English)	Junko Tanaka
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12665号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上野 隆史,近藤 徹,野澤 佳世,松浦 友亮,丸山 厚
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12665号, Conferred date:2024/3/26, 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

固体材料開発を志向した細胞内タンパク質結晶の構造解明

Structural elucidation of in-cell protein crystals for development of solid-materials

田中 潤子 指導教員 上野 隆史

タンパク質分子が高秩序に集積することで形成されるタンパク質結晶は、その立体構造を原子レベルで決定するためだけでなく、高い安定性から固体材料としても利用されている。これまで構造情報を基にした合理的な分子設計により、様々な機能を有する結晶が報告されている。一方で、天然では、細胞内で自発的に結晶を形成する「細胞内タンパク質結晶」が、様々な生物学的な機能を有することが知られている。近年、これらの細胞内タンパク質結晶は、(1) *in vitro* 結晶化に比べて迅速、かつ大量に結晶合成ができる、(2) タンパク質など細胞内分子を結晶内に固定化できるため、バイオ固定材料の開発が進められている¹。しかしながら、多くの細胞内タンパク質結晶は、サイズが小さく、構造解析が可能な高い結晶性を有していないため、構造決定が困難である。したがって、構造決定する手法を新しく確立できれば、その構造を基にした分子設計により高機能化を実現する固体材料の創成に繋がる。本博士論文では、これまで構造未知であった細胞内タンパク質結晶の中で Crystalline inclusion protein A, B (CipA, CipB) と CryIAa の構造決定を試みた²。これらの結晶構造は、興味深い構造特性を有しており、構造を基にした分子設計により、様々な機能化材料への応用が期待される。

第2章では、昆虫病原性細菌と大腸菌で結晶を形成する CipA の構造決定を試みた。細胞内で CipA は双晶を形成するため構造決定ができなかった。そこで、細胞内における自発的な結晶化を制御することが必要であると考え、当研究室で開発された「無細胞タンパク質結晶化

(Cell-free protein crystallization, CFPC)」を用いて、双晶を抑制する添加剤を結晶化溶液に導入することによる結晶化と構造解析を行なった。具体的には、1,4-ジオキサンを添加することにより CipA のツイン率が減少し、構造解析に成功した。CipA は4量体をビルディングブロックとした結晶形成をすることを明らかとした。細胞内において結晶化プロセスを制御する方法がなかった問題点を CFPC に添加剤を導入した手法によって、CipA 結晶の格子構造制御に成功した (Fig. 1)³。

第3章では、昆虫病原性細菌内で CipA と同様に結晶を形成する CipB の構造決定を目的とした。大腸菌や CFPC で合成した CipB は低品質結晶であるため、分解能が低く

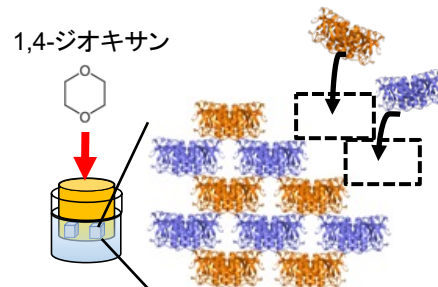


Figure 1. 1,4-ジオキサンを導入した CFPC による CipA 結晶化制御。

構造解析が困難である。そこで、大腸菌内で合成した結晶を溶解後、再結晶化することにより構造決定を試みた。その結果、CipBは結晶内で24量体のケージ構造を保持していることを明らかとした。さらに、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) によって、溶液状態における24量体ケージ構造を解析し、結晶状態との構造比較を行なった。その結果、柔軟性の高い領域が結晶と溶液中では異なることが示唆された (Fig. 2)。

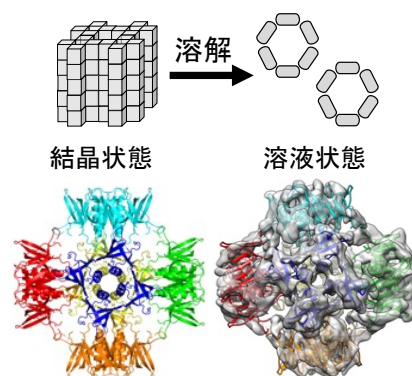


Figure 2. 結晶と溶液状態の構造比較によるCipB ケージ構造特性の解明。

第4章では、システインリッチなC末端ドメインを有するCry1Aaの構造解析を試みた。*Bacillus thuringiensis* (Bt菌)で結晶化するCry1Aaの結晶を細胞から直接精製し、構造解析することにより、結晶内のジスルフィド形成を明らかにした。その結果、Cry1AaはC末端ドメインを使って分子間ジスルフィド形成を三次元架橋化させることによって、結晶を安定化していることがわかった (Fig. 3)。本成果は、Cry toxin 結晶の生物学的機能の解明に繋がると期待される⁴。

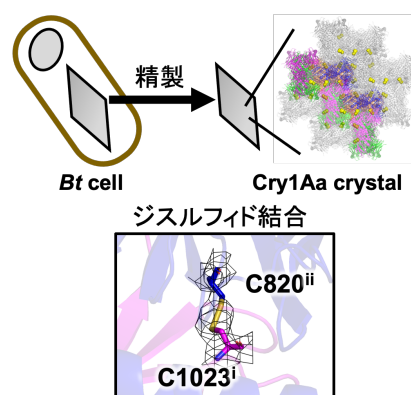


Figure 3. Bt菌精製Cry1Aa結晶内三次元架橋化ネットワークの決定。

本博士論文では、結晶化や解析手法を新たに確立することで、構造未知であったCipA, CipB, Cry1Aaの分子構造の決定に成功した。本成果は、構造生物学分野において有用なツールとなるだけでなく、CipA, CipB, Cry1Aaの構造特性を生かした分子設計により、機能性固体材料開発につながると確信する。

【参考文献】 1) M. Kojima, *et al.*, *Biomater. Sci.*, **2022**, 10, 354-367, 2) Y. Wang, *et al.*, *ACS Synth. Biol.*, **2017**, 6, 826-836, 3) S. Abe, J. Tanaka, *et al.*, *Sci. Rep.* **2022**, 12, 16031, 4) J. Tanaka, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**. 685, 149144