

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位(専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	田中潤子		審査員主査： Chief Examiner	上野隆史

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

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、その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構築されている。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、バイオ固体材料の開発が進められている。しかしながら、固体材料を構築する上で、細胞内でタンパク質が結晶化して機能を発現するに至るプロセスに着目した例はほとんどない。細胞内タンパク質結晶の機能化と、このプロセスの関連性を分子構造の観点から明確にすることが、固体材料の開発には重要であると考えた。本博士論文では、「固体材料としての機能化につながる分子構造の特性理解」を目的とし、先行研究より固体材料として利用されている 3 種類の構造未知タンパク質 Crystalline inclusion protein A, B (CipA, CipB) と Cry1Aa を標的とした。この課題へのアプローチとして、結晶化プロセスに着目した結晶化や構造解析手法の応用を考案した。

本博士論文の第 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困難であった。高品質な結晶合成には、細胞内における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)」を用いた。具体的には、双晶を抑制する添加剤を合成液に導入することによる結晶化と構造解析を行なった。その結果、1,4-ジオキサンを添加することにより CipA のツイーン率が減少し、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層状の結晶格子を形成することが明らかになった。以上より、細胞内における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の確立により達成した。ツイーン率が減少した CipA は、1,4-ジオキサンにより結晶格子が制御されることが示唆された。

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 は低品質な結晶であるため、分解能が低く構造解析が困難であった。そこで、大腸菌内で合成した結晶の溶解後、再結晶化することにより、溶液と結晶状態における CipB の構造決定を試みた。X 線結晶構造解析により、CipB 結晶は 4 量体が 6 つ集積することで形成される 24 量体ケージ構造をビルディングブロックとして構成されることが明らかになった。さらに、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) 単粒子解析により、溶液状態において 24 量体ケージは非対称で歪んだ構造として存在することがわかった。溶液と結晶状態における 24 量体ケージ構造の比較により、CipB 結晶は構造のひずみや分子間相互作用領域の柔軟性を伴う 24 量体ケージから構成されることを明らかにした。

第 4 章では、C 末端領域にシステインリッチなドメインを有する Cry1Aa の結晶構造解析を試みた。*Bacillus thuringiensis* (Bt 菌) で合成した Cry1Aa 結晶を細胞から精製し、X 線結晶構造解析を行うことにより、結晶内のジスルフィド形成を明らかにした。結晶内におけるタンパク質集合体を安定化させる有用な共有結合の一つであるジスルフィド結合は、Cry1Aa の C 末端ドメインを介して分子間で形成されることがわかった。さらに、結晶内において三次元架橋化ネットワークを形成するため、結晶の安定化にも寄与することが示唆された。本成果は、安定化した結晶の設計指針を提示するだけでなく、Cry toxin 結晶の生物学的機能の解明に繋がると期待される。

本研究では、新規結晶化手法の確立や構造解析手法の応用により、CipA, CipB, Cry1Aa の構造解析に成功し、機能化が期待されるそれぞれの構造特性を明らかにした。本成果は、細胞内タンパク質結晶の機能化をさらに発展させていくために、分子構造の観点から設計指針を提示するものである。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 (理学) Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名： Student's Name	田中潤子		審査員主査： Chief Examiner
			上野隆史

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Protein crystals, formed by a highly ordered protein assembly have been used as solid materials. Protein crystals with various functions have been constructed by rational molecular design based on crystal structure. Recently, "In-cell protein crystals" spontaneously formed in living cells, have attracted attention as solid materials with various biological functions. However, due to their low crystal quality, there are limitations to determining their crystal structure. In this thesis, I focused on Crystalline inclusion proteins A, B (CipA, CipB), and Cry1Aa with unknown structures. These crystals have been reported to have potential as solid materials. I developed a crystallization method and analyzed these proteins to elucidate the structure.

In Chapter 2, I determined the crystal structure of CipA, which could not be structurally analyzed due to the high twin fraction. I used the "Cell-free protein crystallization (CFPC)", the twinning fraction was decreased by adding 1,4-dioxane to the reaction solution. The problem of difficulty in controlling crystallization in cells was solved by this method.

In Chapter 3, I attempted to elucidate the structure of CipB. I found that CipB was composed of a 24-mer cage by analyzing proteins eluted from CipB crystals purified from *E. coli*. The solubilized CipB cages were re-crystallized and used for X-ray structure analysis. I reported the details of the CipB cage structures analyzed by X-ray and cryo-EM.

In Chapter 4, I determined the full-length structure of Cry1Aa, which has a cysteine-rich C-terminal domain. Cry1Aa crystals, which crystallize in *Bacillus thuringiensis (Bt)*, were purified from cells, and structurally analyzed to reveal disulfide formation.

In this thesis, the challenges of structure determination were overcome by the development of crystallization and structure analysis methods. These findings will lead to an understanding of *in vivo* crystallization as well as provide molecular design guidelines.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).