

IIII 宇宙における高品質タンパク質結晶化技術の伝承と可能性 IIIII  
(解説)

## 宇宙における高品質タンパク質結晶化技術の伝承と可能性

吉田 尚史・朴 三用

### Structure Basis for a Subunit Interaction of Influenza Virus RNA Polymerase for Drug Design

Hisashi YOSHIDA and Sam-Yong PARK

#### Abstract

Influenza A virus is a major human and animal pathogen with the potential to cause catastrophic loss of life. Influenza virus reproduces rapidly, mutates frequently, and occasionally crosses species barriers. The recent emergence of swine-origin influenza H1N1 and avian influenza related to highly pathogenic forms of the human virus has highlighted the urgent need for new effective treatments. Here, we describe two crystal structures of complexes made by fragments of PA and PB1, and PB1 and PB2. These novel interfaces are surprisingly small, yet they play a crucial role in regulating the 250 kDa. polymerase complex, and are completely conserved among swine, avian and human influenza viruses. Given their importance to viral replication and strict conservation, the PA/PB1 and PB1/PB2 interfaces appear to be promising targets for novel anti-influenza drugs of use against all strains of influenza A virus. It is hoped that the structures presented here will assist the search for such compounds.

**Keyword(s):** Influenza virus, RNA polymerase, X-ray crystallographic

Received 1 August 2016, Accepted 11 January 2017, Published 31 January 2017

#### 1. はじめに

近年、タンパク質立体構造を基にした薬剤開発が盛んにおこなわれており、それに向けては高分解能でのタンパク質立体構造解析の需要が高まっている。これまでに、高品質な結晶を作製し高分解能データを取得するために、様々な方法が提案されてきた。その中で、微小重力環境を利用した宇宙での結晶作製は、最も強力な方法の1つであると考えられている。微小重力環境では、密度差対流が抑制されるため、結晶への不純物の取り込みが減少し、ゆっくりと結晶成長が起こるため、良質な結晶生成が期待できる。実際に、今までに実施されてきた宇宙環境でのタンパク質結晶化実験では、回折分解能の向上や結晶学的統計値の改善、さらには結晶のクラスター化の抑制など様々な好影響が確認されている。しかし、地上での結晶化方法をそのまま宇宙環境での結晶化へと適用することができないため、宇宙実験に向けた結晶化技術が必要となる。さらに、宇宙

実験の機会は限られており、確実に良好な結晶を作製するためには、良好なタンパク質試料と最適化された結晶化条件の確立が必須である。これまでに我々の研究グループは、インフルエンザウイルスの新規薬剤開発を目指し、インフルエンザ RNA ポリメラーゼの結晶構造解析をおこなってきた。インフルエンザ RNA ポリメラーゼは、ウイルス増殖の中心的な役割を担っており、創薬ターゲットとして注目されてきた。今回、我々が進めてきた、宇宙環境下でのインフルエンザ RNA ポリメラーゼの結晶化を例として、宇宙実験に向けたタンパク質の結晶化技術を紹介するとともに、今後の展望について議論したい。

#### 2. 宇宙環境下での結晶化

タンパク質や核酸などの生体高分子立体構造を明らかにすることは、生体内で起こる様々な生命現象を理解する上で非常に重要である。近年、数多くのタンパク質さらに

は複合体の立体構造が決定されており、タンパク質のもつ機能や相互作用に関する情報、生体反応メカニズムの解明が進んでいる。また、タンパク質の立体構造に基づいた医薬品の分子設計 (SBDD; Structure-Based Drug Design) も盛んにおこなわれており、タンパク質の立体構造情報の需要は高まっている。このような生体反応の解明や新規医薬品の開発に向けては、ターゲットとするタンパク質の構造を原子分解能レベルで解析することが必須であり、その方法として X 線結晶構造解析法があげられる。X 線結晶構造解析は近年の技術開発によりめざましい発展をとげており、分解能 1 Å 付近での構造決定も珍しいものではなくなっている。一方で、X 線結晶構造解析のデータはそのタンパク質結晶の質に依存するため、高分解能データの収集には高品質結晶の作製が必要不可欠である。

これまでに、高品質結晶を作製するための様々な方法が提案されており、その中で宇宙での微小重力環境を利用したタンパク質の結晶生成が有効であることが示されている。微小重力環境では、溶液の密度差対流や沈降効果が抑制されるため、成長中の結晶の周辺にタンパク質及び不純物濃度の薄い層ができる。その結果、結晶表面の過飽和度が低下し、不純物の付着が減少するため、結晶周辺に理想的な拡散場が形成され緩やかに結晶が成長する。微小重力環境での結晶化において期待される効果として、分解能の向上や結晶学的統計値の改善、クラスター化の抑制があげられる。回折データセットの質は、結晶中のタンパク質分子の配向の乱れが少ないほど向上するため、微小重力環境下において分子を規則正しく配向させることで、より高品質なデータ収集が期待される<sup>2,3)</sup>。また、単結晶が集まったようなクラスターになりやすい試料は、結晶表面が 2 次核となって別の結晶が成長し始めるが、宇宙実験ではこのような 2 次核形成が抑制され、クラスター化を抑えることができる。構造解析で大きな問題となるツイーン結晶についても、宇宙環境下で結晶化をおこなうことで解消された事例がある<sup>4)</sup>。以上のように、宇宙環境下での結晶化はタンパク質の結晶化に様々な好影響があると考えられ、地上での結晶化実験が抱える問題を解決するための選択肢の 1 つとして大きな可能性を持っている。

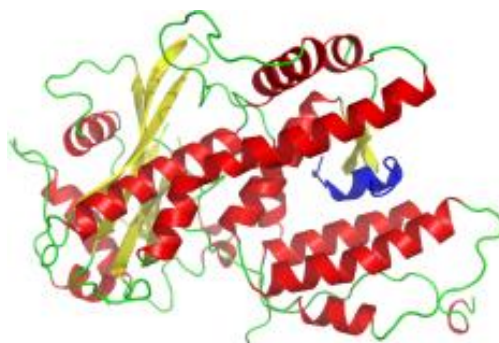
### 3. インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの結晶構造解析

インフルエンザは、ウイルスの感染によって引き起こされる病気である。ヒトが感染すると、高熱や関節痛、倦怠感などの全身症状や、喉の痛みや咳などの呼吸器系の症状を示す。特に深刻なのは乳幼児や高齢者が感染した場合で

あり、インフルエンザ脳症や重度の肺炎などの合併症を起し、死に至ることさえある。近年では、高病原性である鳥インフルエンザウイルスの人への感染により、以前に世界で数千万人単位の死者を出したような世界的大流行が起こることが懸念されており、日本でも抗インフルエンザ薬であるタミフルなどの備蓄に大変な金額が注がれている。しかし、既にタミフル耐性型の鳥インフルエンザウイルスが発見されるなど、ウイルスの変異は頻繁に起こりうるため、このような新型ウイルスに対するワクチンや新薬の開発が世界中で積極的に行われている。

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、ウイルスの複製(増殖)に中心的な役割を担っているため、新規薬剤ターゲットとしてこれまで注目されてきた。また、これまでの薬剤ターゲットとは異なり、RNA ポリメラーゼは変異を起しにくい特徴をもっていることから、鳥インフルエンザなど新型インフルエンザに対する理想的な薬剤ターゲットとされている。我々の研究グループは、インフルエンザウイルスの持つ RNA ポリメラーゼが持つ 3 つのサブユニット (PA, PB1, PB2) のうち、どれか 1 つのサブユニットでも欠けるとその働きを失うことに注目し、サブユニット間結合阻害剤が、新規抗インフルエンザ薬として有望であると考えて研究を進めた。このような阻害剤を設計するためには、その部位の立体構造情報を得ることが近道である事から、インフルエンザの RNA ポリメラーゼの 2 つのサブユニット PA-PB1 結合部位構造を X 線結晶構造解析により解明した<sup>1)</sup>。

PA-PB1 複合体の立体構造は、地上での結晶化実験によって分解能 2.3 Å で解析された (Fig 1)。PA の 3 本の  $\alpha$  ヘリックスで形成されるトンネルに、PB1 の N 末端 14 残基が入り込んでおり、鍵と鍵穴の関係のように結合していた。さらに、その結合部位では、PA と PB1 の疎水性アミノ酸残基が隙間なく相互作用していることから、PA と



**Fig. 1** Crystal structure of PA-PB1 complex. A overall ribbon diagram showing the fold of PA, with helices coloured red, strands yellow and coil green. PB1 residues are coloured dark blue.

PB1 は主に疎水性相互作用によって結合していることが明らかとなった。これら疎水性アミノ酸残基の変異体を作製し、PA と PB1 の結合を調べたところ、変異体では PA と PB1 が結合できなくなることが明らかとなった。また、同様の変異体を用いて RNA ポリメラーゼの活性を調べると、変異体ではポリメラーゼ活性が劇的に低下することが確認された。すなわち、PA と PB1 の結合に関わるアミノ酸残基は、サブユニット間の結合だけでなく RNA ポリメラーゼの活性にも影響を与えることから、この結合部位に対する新規薬剤は非常に有望な抗インフルエンザ薬となり得ることがわかった。現在までに、立体構造情報を基にした PA-PB1 サブユニット間結合阻害剤の探索を進めてきており、PA-PB1 結合阻害能及びウイルス増殖に対する抑制効果をもつ化合物の開発に成功している。また、阻害剤の開発と同時進行で、宇宙環境下での PA-PB1 複合体の結晶化実験を進めており、PA-PB1 立体構造について高分解能データを収集し、より効果的な阻害剤を設計することを目指している。

#### 4. 宇宙実験に向けたタンパク質結晶化技術

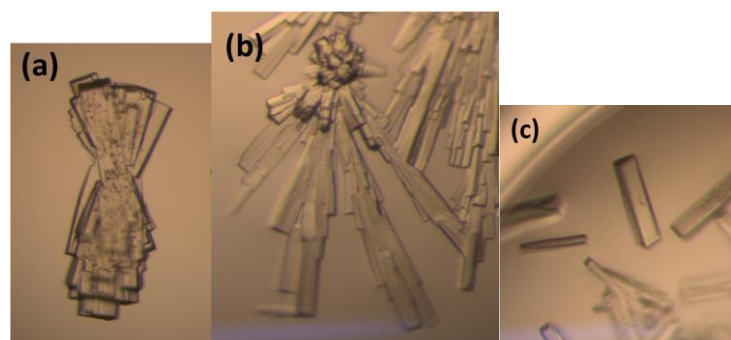
宇宙環境下での結晶化において、地上での結晶化方法をそのまま適用しても結晶が生成しないということが頻繁にみられる。限られた宇宙実験機会で結晶化実験を成功させるためには、宇宙実験向けの結晶化条件検討が必要である。以下に、良好なタンパク質試料の調製方法と宇宙環境下での結晶化方法を紹介する。

##### 4.1 結晶化試料の成分分析

高品質なタンパク質結晶を生成するのに最も重要な技術の 1 つに、タンパク質試料の精製があげられる。精製にあたっては、結晶化試料に含まれる不純物の排除だけでなく、試料の均一度が結晶品質の向上の要となる。以下の方法で、タンパク質試料の品質確認をおこなっている。まず、

SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) で目的以外の成分が夾雑していないことを確認する。次に、Native-PAGE によりゲル中で想定通りの移動をするか、スミアバンドやマルチバンドになっていないことを確認する。必要があれば、2次元電気泳動を行い、タンパク質の電荷が均一であるかを調べる。さらに DLS (粒径分布測定) をおこない、タンパク質分子の粒径が想定の大きさであるか、大粒径成分が多くないかを確認する。タンパク質試料の精製度は、SDS-PAGE で単一と評価できても、Native-PAGE や DLS ではばらつきが出るという試料が散見される。これらは、タンパク質構造のフォールディングの違いや化学修飾や部分的な変性などに起因すると考えられ、タンパク質試料が均一ではないと判断される。以上の分析から問題がみられた試料については、さらなる精製をおこなう必要があり、イオン交換カラムクロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーを適応する。特に、強陽イオン交換カラムや強陰イオン交換カラム (ともに GEヘルスケア社または東ソー社) などの高分離能カラムを用いることで、タンパク質試料の均一性が向上する例が多く見られる。通常、1つの成分としてカラムから溶出される試料について、上記のカラムを用いて、緩やかに塩濃度を上昇させ精製すると異なる成分として溶出されることがある。

実際に、我々の研究対象であるインフルエンザ RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体についても、SuperQ カラム (東ソー社) を用いて精製をおこなうと、3つのピークに分かれて溶出された。これら3つのピークを別々に回収し、それぞれについて結晶化をおこなったところ、これまでの結晶化では再現性が悪く結晶生成確率が低いという問題が解決され、再現性良く結晶が生成できるようになった。また、この他の試料についても、結晶が生成する成分と生成しない成分に分離できた例や、クラスター状の結晶が単結晶の成分とクラスター状の結晶成分に分離できた例 (Fig 2)



**Fig. 2** Crystals from the difference of purity and homogeneity. (a)The poly-crystal obtained from original sample. (b) The poly-crystal obtained from fraction-1 purified by the ion-exchange column and (c)the single crystal obtained from fraction-2.

があり、再現性の向上や結晶品質の向上につながる可能性がある。上記の結晶化試料の成分分析を実施し、均一性に問題がないと判断された試料については、蒸気拡散法による結晶化をおこない結晶生成を確認する。必要があれば、結晶化条件の最適化をさらに実施する。

#### 4.2 カウンターディフュージョン (CD) 法による結晶化

宇宙実験での結晶化方法は、従来の蒸気拡散法ではなく、カウンターディフュージョン (CD) 法が用いられる。CD 法は、キャピラリーの中にタンパク質溶液を、外側に結晶化試薬を充填し、それぞれを拡散させておこなう結晶化方法である (Fig 3) <sup>5)</sup>。アガロースゲルを介した 2 液は経時的に拡散し、キャピラリー内で濃度勾配がつけられ、結晶化条件に適した位置で結晶化が起こる。タンパク質溶液と結晶化試薬を直接混合する蒸気拡散法と比べ、CD 法では徐々に溶液拡散が起こるため、結晶生成までの時間が長く結晶核の形成を抑えることができ、より高品質な結晶を生成できる可能性がある。さらに、溶液が乾燥してしまうことがないため、生成された結晶はキャピラリー内で長期間安定である。CD 法のキット (C-Tube Kit) がコンフォーカルサイエンス社から市販されており、簡便に CD 法による結晶化おこなうことができる。宇宙環境下での実験に向けて、必ず地上において CD 法で結晶が得られることを確認しておくべきである。結晶によっては、蒸気拡散法で結晶が得られていた条件をそのまま CD 法に適用しても結晶が得られないことがあり、結晶化条件の検討が必要となる。CD 法で結晶が生成しない場合、マイクロシーディング等で結晶の核形成を促すことも有効である。

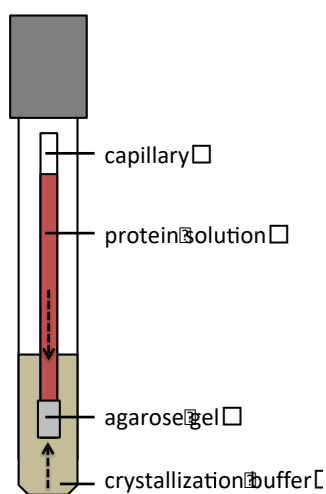


Fig. 3 The schematic diagram of Counter-Diffusion method.

#### 5. 宇宙環境での結晶化実験の結果

我々の研究試料であるインフルエンザ RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体については、上述の試料分析と CD 法による結晶生成を確認した後、宇宙環境下での結晶化実験をおこなった。約 3 カ月間、宇宙環境下で静置された結晶は、地上において取り出し作業が実施された (Fig 4)。その後、シンクロトロン放射光施設 Photon Factory のビームライン BL17A での X 線回折実験をおこない、結晶の品質を評価した。宇宙環境下で生成した結晶では、分解能が 1 Å 台に到達するような劇的な変化はみられなかったものの、地上で生成した結晶と比較してモザイク性 (Mosaicity) の低下や完全性 (Completeness) などの回折パラメーターが改善されており (Table 1)、結晶の品質が向上していることが確認された。さらに、得られたデータを用いて構造解析をおこなったところ、分解能の向上に伴いタンパク質構造の電子密度マップが全体的により明瞭になっていることが確認された (Fig 5)。

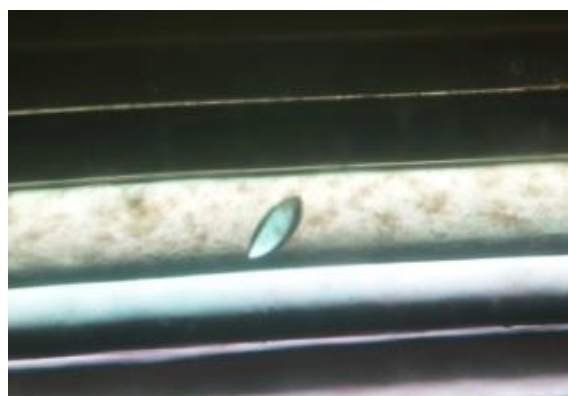


Fig. 4 The crystal of PA-PB1 grown in space environment.

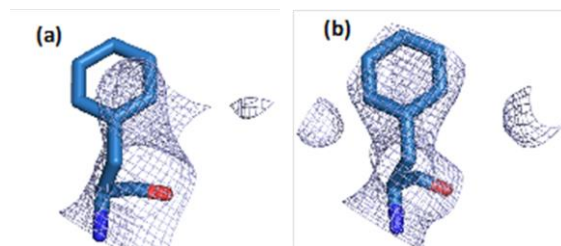


Fig. 5 Electron density maps from the data of ground crystal (a) and space crystal (b).

**Table 1** Statistics of data collection from ground and space crystal.

Data sets	Ground crystal	Space crystal
Space group	$P3_221$	$P3_221$
unit cell(Å) $a, b, c$	101.9, 101.9, 115.0	102.1, 102.1, 114.9
Resolution range (Å)	50.0 - 3.2	50.0 - 2.4
Completeness (Overall / Outer Shell, %)	78.5/70.6	94.8/86.2
$R$ merge (Overall / Outer Shell, %)	5.8/13.2	6.7/31.5
$\langle I \rangle / \sigma \langle I \rangle$ (Overall / Outer Shell)	29.2/8.6	21.9/1.6
Mosaicity	1.30 - 1.83	0.41 - 0.64

## 6. 今後の展望

宇宙環境下での結晶化実験では、分解能の向上や回折データの改善、またはクラスター結晶の抑制など様々な好影響が期待される。一方で、地上での結晶化方法をそのまま宇宙実験に適用することはできず、宇宙実験向けの試料調製や結晶化を検討する必要がある。タンパク質の性質は、各々のタンパク質によって異なるために一律的な対応策はない。例えば、タンパク質の精製や結晶化、さらには結晶の不凍結処理方法などは種々のタンパク質によって様々である。我々の PA-PB1 複合体の結晶化については、DTT などの還元剤の添加が結晶化には必須であった。その他の例としては、グリセロールによってタンパク質が安定化され結晶が生成する試料や、イオン交換カラムで精製すると全く結晶が得られなくなる試料などがあった。タンパク質が安定に存在できる pH や塩濃度などのバッファー条件も結晶化に大きな影響を与える。そのため、成分分析を厳密におこなうことで個々のタンパク質の性質を見極め、それに応じた対策をとることが宇宙実験を実施する上で最も重要な技術といえる。宇宙実験の機会は限られており、フライト期間は数ヶ月間に渡るため、宇宙実験に向けた試料調製に最善を尽くすこと、加えて、これまでに蓄積され

てきた宇宙実験の結果を参考に進めていくことが実験を成功させる近道だといえる。

今後、タンパク質の立体構造に基づいた医薬品の開発がますます盛んにおこなわれることが予想され、高分解能で薬剤とタンパク質の結合様式を明らかにすることは非常に重要である。その際に微小重力環境下での結晶化が、有力な方法の1つとなる可能性がある。また、多数のサブユニットで構成される超分子複合体や膜タンパク質などの取り扱いが難しいとされる試料についても、宇宙環境下での結晶化の有効性を示されることを期待したい。

## 謝辞

本研究を行うにあたりご尽力いただいた、丸和栄養食品株式会社の伊中浩治博士、コンフォーカルサイエンス株式会社の田仲広明博士に謝意を表します。

## 参考文献

- 1) E. Obayashi, et al.: Nature, **454** (2008) 1127.
- 2) H. Tanaka, et al.: J. Synchrotron Rad., **18** (2011) 88.
- 3) K. Inaka, et al.: Crystal Growth Des., **11** (2011) 2107.
- 4) H. Tanaka, et al.: Acta Crystallogr., **F63** (2007) 69.
- 5) H. Tanaka, et al.: J. Synchrotron Rad., **11** (2004) 45.