

# Encapsulation of biomacromolecules by soaking and co-crystallization into porous protein crystals of hemocyanin

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 509, 577-584 (2019)

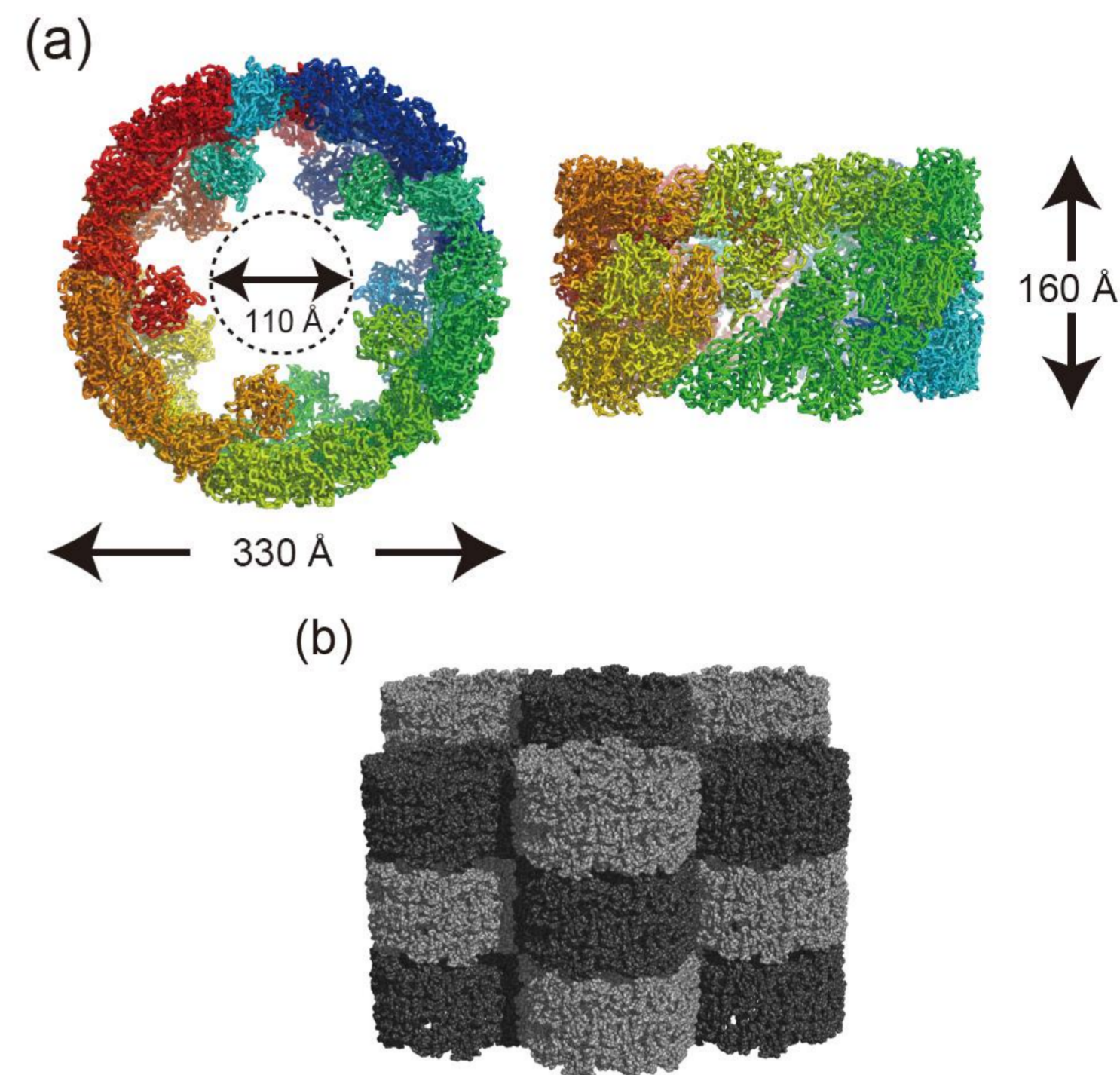
Tsubasa Hashimoto, Yuxin Ye, Asuka Matsuno, Yuki Ohnishi, Akira Kitamura, Masataka Kinjo, Satoshi Abe, Takafumi Ueno, Min Yao, Tomohisa Ogawa, Takashi Matsui, and Yoshikazu Tanaka

## Summary

ゲスト分子を結晶中の内部空間に包摂する技術は、ゲスト分子の構造決定、分離、および触媒作用など、様々な応用の可能性を秘めている。これまでは、主に小分子の結晶を用いたゲスト包摂の研究が行われてきたが、最近、蛋白質をはじめとした生体高分子の結晶がホスト結晶として応用されている。生体高分子の結晶は、小分子結晶よりも結晶内部の空間が大きいので、蛋白質などの大きなゲスト分子も包摂できるという、ホストとしての大きな長所がある。

スルメイカの酸素運搬蛋白質ヘモシアニンは、分子量約4 MDaの巨大な円筒状の蛋白質会合体であり、結晶中ではストロー状に積み重なることが、過去の研究で明らかになっている。ヘモシアニンの円筒の内径は約110 Åであり、これはほとんどの蛋白質を包摂するのに十分な大きさである。ゆえに、ヘモシアニン結晶には、蛋白質をはじめとした様々な生体高分子化合物をゲスト分子として包摂できるホスト結晶としての応用性が期待される。

本研究では、最大250 kDaの分子量を持つ蛋白質、および最大200 bpの長さを持つDNAをヘモシアニン結晶中に包摂することに成功した。また、正電荷を持つゲスト分子よりも負電荷を持つゲスト分子の方がヘモシアニン結晶中に包摂されやすいこと、包摂したゲスト分子は結晶中では移動しないことを明らかにした。



(a)ヘモシアニン十量体の全体構造  
(b)結晶中におけるヘモシアニンのストロー状構造

## ヘモシアニン結晶中へのゲスト分子の包摂

ソーキングおよび共結晶化の2つの手法を用いて、様々なゲスト分子をヘモシアニン結晶中に包摂した。包摂後の結晶は、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、包摂の可否を判断した。

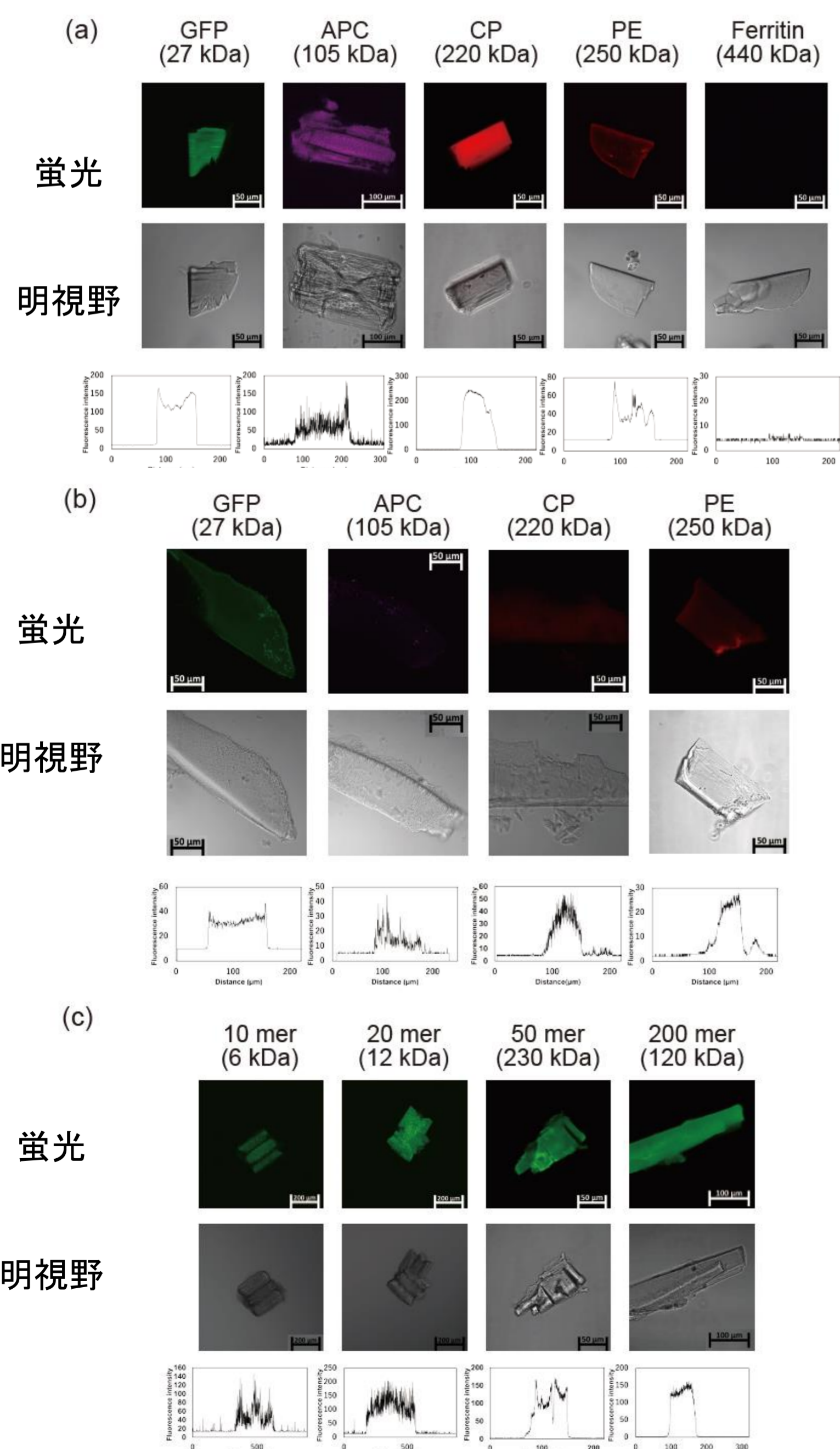
その結果、ソーキングと共結晶化どちらの手法でも4つの蛍光蛋白質(GFP, APC, CP, PE)を包摂することに成功した。一方で、蛍光標識したフェリチンは、その直径がヘモシアニンの内径よりも大きいため、包摂することはできなかった。

更に、最大200 bpまでの蛍光標識DNAをソーキングにより包摂することにも成功した。

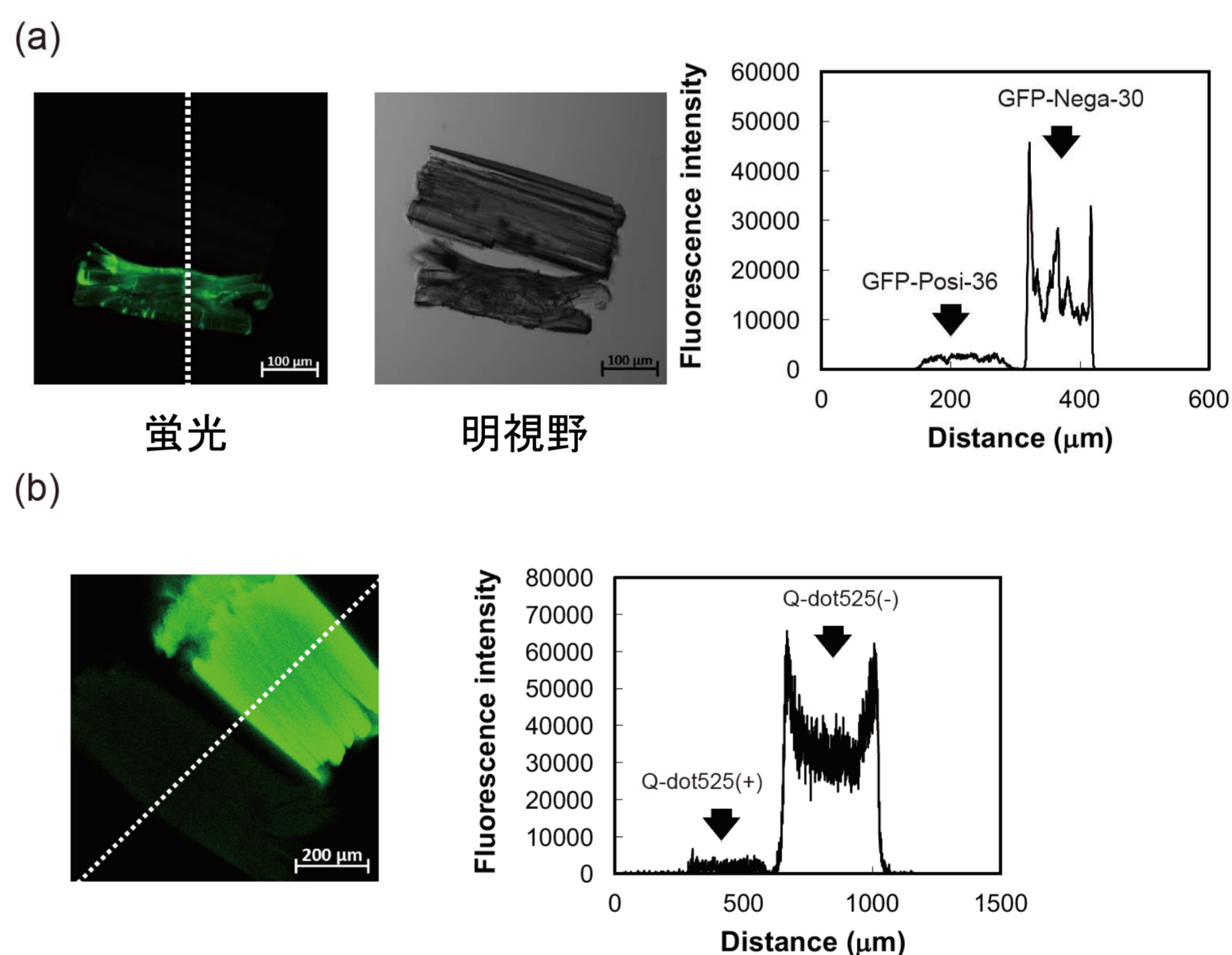
## 電荷の違いによる包摂率の違い

表面電荷の異なる2つのゲスト分子(GFPと量子ドット)を用い、ゲストの電荷が包摂効率に及ぼす影響を評価した。電荷の異なる2つのGFPおよび量子ドットをヘモシアニン結晶中に包摂した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、その蛍光強度から包摂率を評価した。

その結果、いずれのゲストにおいても、負の電荷を持つ分子を包摂したヘモシアニン結晶の方が蛍光強度が高く、負の電荷を持つゲスト分子の方がヘモシアニン結晶中に包摂されやすいことが明らかとなった。



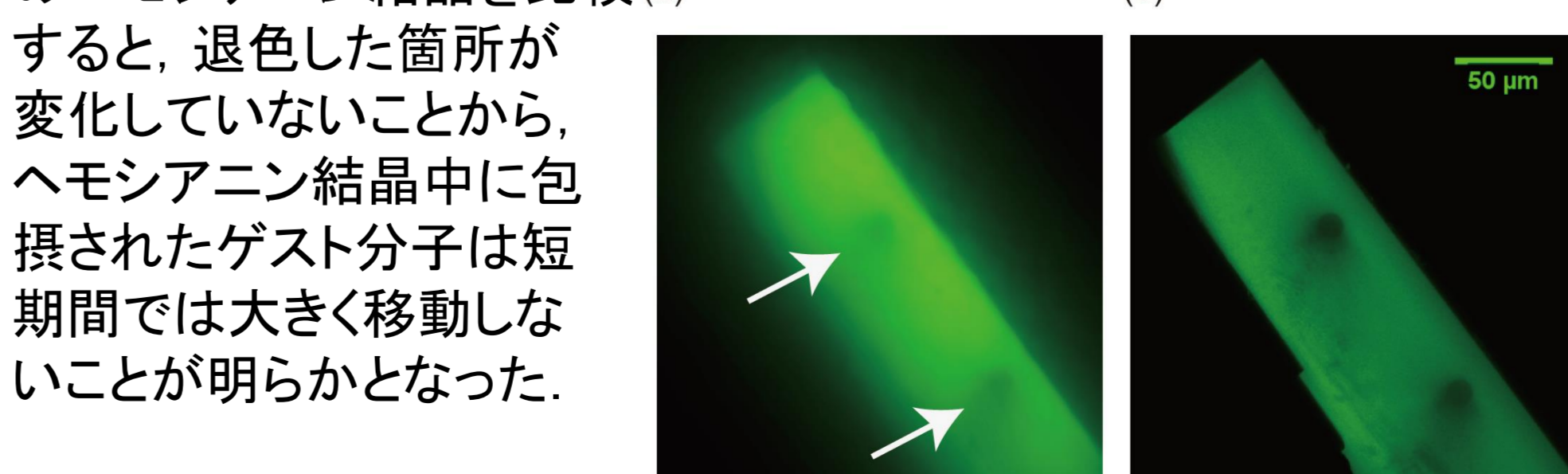
(a)ソーキングにより蛋白質を包摂したヘモシアニン結晶とその蛍光強度  
(b)共結晶化により蛋白質を包摂したヘモシアニン結晶とその蛍光強度  
(c)ソーキングによりDNAを包摂したヘモシアニン結晶とその蛍光強度



(a)正電荷を持つGFP-posi36-および負電荷を持つGFP-nega30-を包摂したヘモシアニン結晶とその蛍光強度  
(b)正負の電荷を持つ量子ドットを包摂したヘモシアニン結晶とその蛍光強度

## 包摂されたゲスト蛋白質の移動性

フォトブリーチング法によりヘモシアニン結晶中に包摂したGFPの移動特性を調べた。GFP包摂直後のヘモシアニン結晶と包摂から一か月後のヘモシアニン結晶を比較 (a) (b)



(a)GFP包摂直後のヘモシアニン結晶  
(b)GFP包摂から一か月後のヘモシアニン結晶