

Protein encapsulation in the hollow space of hemocyanin crystals containing a covalently conjugated ligand

Biochem. Biophys. Res. Commun., in press (2019)

Tsubasa Hashimoto, Yuxin Ye, Mihoko Ui, Tomohisa Ogawa, Takashi Matsui, and Yoshikazu Tanaka

Summary

多孔質結晶の内部空間にゲスト分子を包摂する技術は、ゲスト分子の構造決定や分離、外部環境からの保護、触媒作用など、様々な応用の可能性を秘めているため、大きく注目されている。特に、蛋白質やDNAなどの生体高分子から形成される結晶は、低分子から形成されるものに比べ、非常に大きな内部空隙を有しているため、より大きなゲスト分子を包摂可能であるなど、ホスト分子として大きな可能性を秘めている。更に、蛋白質結晶を構成する多数のアミノ酸は、様々な機能を持つ側鎖を有しており、これはゲスト分子を包摂する際に有用である。例えば、遊離したチオール基を持つシステイン残基は、マレイミド基のような官能基と特異的な共有結合を形成するため、ゲスト分子の部位特異的包摂に利用できる。

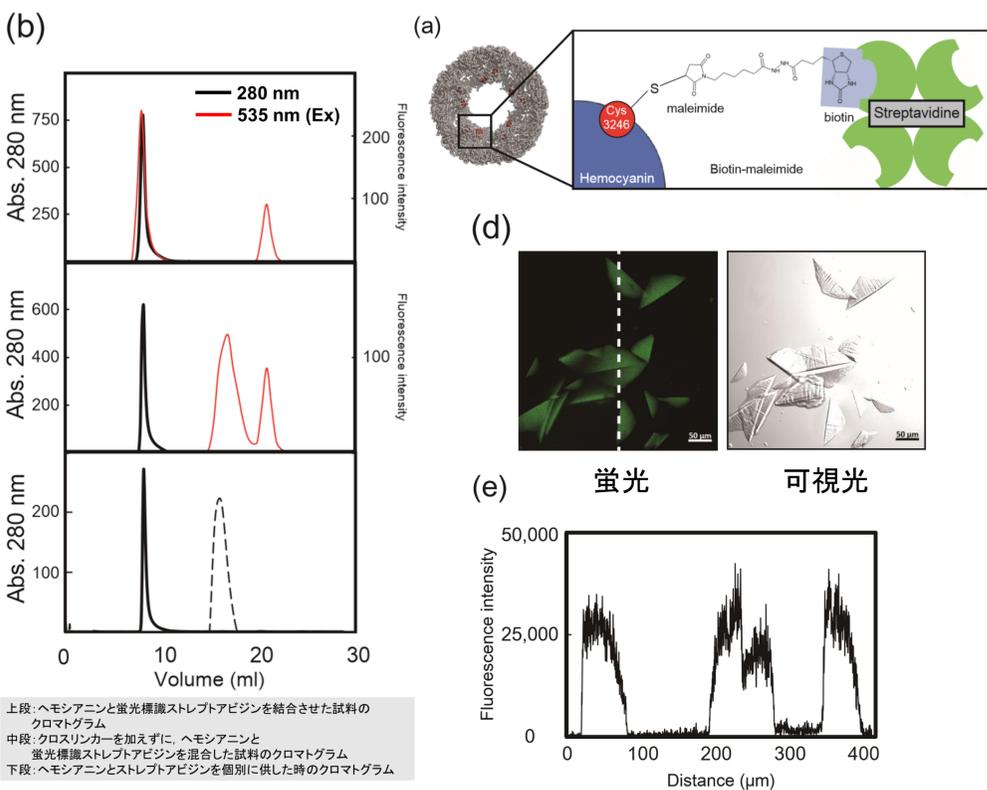
スルメイカ血リンパ由来の酸素運搬蛋白質ヘモシアニンは、約4 MDaの巨大な円筒状の蛋白質会合体であり、約110 Åの内部空隙を持つ。更に、結晶中ではストロー状に積み重なるため、ヘモシアニン結晶には、蛋白質をはじめとした様々な生体高分子化合物をゲスト分子として包摂できるホスト結晶としての応用性が期待される。先行研究では、ヘモシアニン結晶中にゲスト蛋白質を包摂する2つの手法を開発し、様々なゲスト蛋白質を結晶中に包摂することに成功した。しかし、上述した包摂手法は、ホスト-ゲスト間の非特異的な相互作用に依存しており、結晶中でゲスト蛋白質の結合部位や配向を制御することができないという課題が存在する。

本研究では、ヘモシアニン内部空間のみに存在するフリーのシステイン残基(Cys3246)に、クロスリンカーを介してゲスト蛋白質を結合させ、それを通常のヘモシアニンと同様の結晶化条件で結晶化することに成功した。すなわち、部位特異的な新たなゲスト蛋白質包摂手法の開発に成功したと言える。この包摂手法を用いて、ビオチン-アビジン間相互作用およびNi-His₆ tag間相互作用を利用したゲスト蛋白質の包摂に成功した。

■ビオチン-アビジン間相互作用を利用したゲスト蛋白質の包摂

ビオチン-マレイミドクロスリンカーを用いて、蛍光標識したストレプトアビジンをヘモシアニン内部に結合させた後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製試料は、通常のヘモシアニンとまったく同じ結晶化条件で結晶化を行った。得られた結晶は共焦点レーザー顕微鏡で観察し、ゲスト包摂の可否を判断した。

その結果、得られた結晶から蛍光標識したストレプトアビジンに由来する蛍光が観察されたため、ビオチン-アビジン間相互作用を利用したゲスト蛋白質の包摂に成功したと言える。

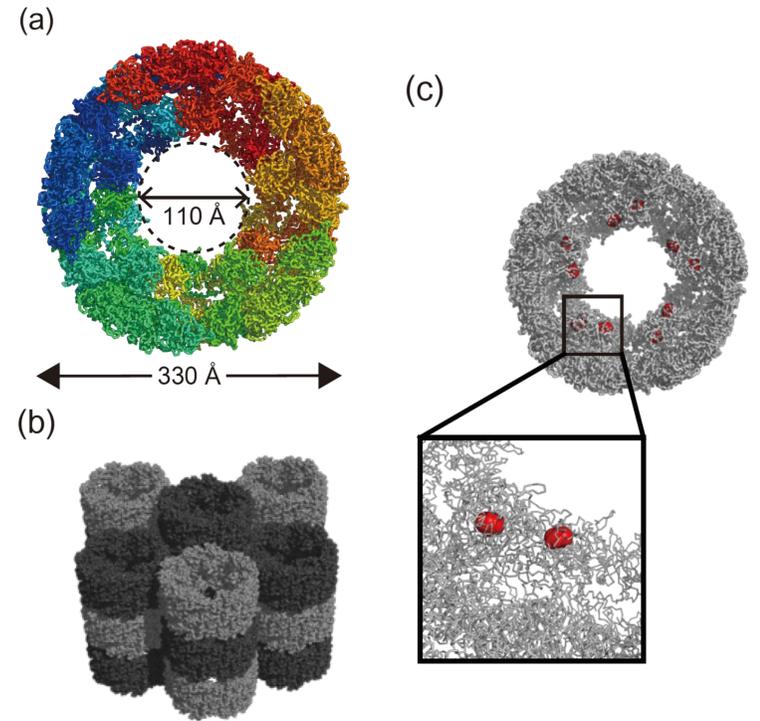


(a) ビオチン-アビジン相互作用を利用したゲスト蛋白質包摂の概念図
(b) ゲル濾過クロマトグラフィーの結果
(c) 蛍光標識ストレプトアビジンを包摂したヘモシアニン結晶
(d) 蛍光標識ストレプトアビジンを包摂したヘモシアニン結晶の蛍光強度

■ GFPを包摂したヘモシアニン結晶のX線回折実験

クロスリンカーを介して、部位特異的にGFPを包摂したヘモシアニン結晶のX線回折実験を放射光施設 Foton factoryにて行った。

その結果、約6 Åの分解能で複数の結晶からデータを得ることに成功した。更に、10個の結晶から得た回折データを統合して得られた結晶学的パラメーターを、ゲスト未包摂のヘモシアニン結晶のパラメーターと比較すると、GFP包摂ヘモシアニン結晶が元のゲスト未包摂のヘモシアニン結晶と同型であることが明らかとなった。

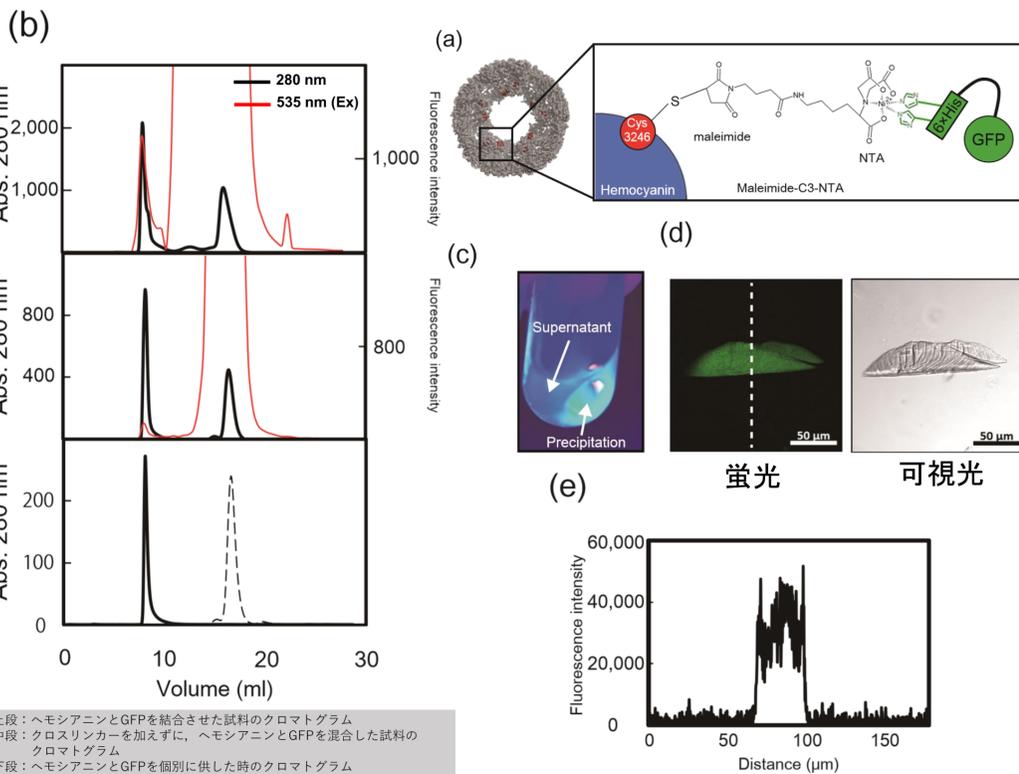


(a) ヘモシアニン+量体の全体構造
(b) 結晶中におけるヘモシアニンのストロー状構造
(c) ヘモシアニン内部空間に存在するCys3246の部位

■ Ni-His₆ tag間相互作用を利用したゲスト蛋白質の包摂

マレイミド-C3-NTA-Niクロスリンカーを用いて、His₆ tagを融合させたGFPをヘモシアニン内部に結合させた後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製試料は、通常のヘモシアニンとまったく同じ結晶化条件で結晶化を行った。得られた結晶は共焦点レーザー顕微鏡で観察し、ゲスト包摂の可否を判断した。

その結果、得られた結晶からGFPに由来する蛍光が観察されたため、Ni-His₆ tag間相互作用を利用したゲスト蛋白質の包摂に成功したと言える。



(a) Ni-His₆ tag間相互作用を利用したゲスト蛋白質包摂の概念図
(b) ゲル濾過クロマトグラフィーの結果
(c) GFPを結合させたヘモシアニンの超遠心精製の結果
(d) GFPを包摂したヘモシアニンの結晶
(e) GFPを包摂したヘモシアニン結晶の蛍光強度

ゲスト包摂・未包摂ヘモシアニンの結晶学的パラメーター

Data collection	This study	Previous
Space group	P2 ₁	P2 ₁
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	172.3, 539.7, 312.9	171.4, 538.7, 310.9
α, β, γ (°)	90.0, 103.7, 90.0	90.0, 104.1, 90.0
Resolution (Å)	50-6.00(6.36-6.00)	13.42-3.00(3.08-3.00)
R _{sym} (%) ^a	68.9(112.2)	11.3(75.1)
I/σ (I) ^a	3.47(2.07)	7.76(1.58)
Completeness (%) ^a	99.8(100.0)	98.9(99.3)
Redundancy ^a	15.1(14.7)	2.56(2.58)

^a Values in parentheses refer to data in the highest-resolution shell.