

表面残基エントロピー減少法による結晶化を目指した蛋白質への変異導入 — β シートモデル蛋白質の結晶化を例として

自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター

真壁 幸樹

(投稿日 2009/11/27、再投稿日 2009/12/11、受理日 2009/12/13)

キーワード: X 線結晶構造解析、蛋白質結晶化

概要

蛋白質の X 線結晶構造解析において、蛋白質結晶の作製は必須のステップである。通常、百から千程度の結晶化条件をスクリーニングし、目的蛋白質が結晶化する条件を探索する。しかしながら、多くの蛋白質が結晶化スクリーニングを行った後でも結晶化せず、結晶構造決定のボトルネックとなっている。これまでに、結晶化しない蛋白質を結晶化させるための試みが数多く提案されてきた。例としては、相同な蛋白質の DNA シャッフリング(1) や対称的に多量体化させ **crystal contact** 数を減少させる方法(2)などがある。それぞれの方法論には一長一短があり、どの方法が最良であるとは言えないが、本プロトコルでは比較的に広く用いられている、表面残基エントロピー減少法 (**Surface Entropy Reduction Method**) について筆者の行った例と合わせて解説する。

イントロダクション

表面残基エントロピー減少法は結晶化が困難な蛋白質試料を結晶化させる試みとして、バージニア大学の Derewenda らによって提案された(3)。現在、この方法は単純かつ強力であるため、広く用いられるようになってきている。これまでに 20 近い蛋白質の結晶化が報告されている(4)。蛋白質表面に存在する大きな親水性の残基は側鎖のコンフォメーションエントロピーが高いため、結晶化の際に比較的に大きなエントロピー障壁を越えなければならない。これらの残基を Ala など小さな残基に変異させることによって、側鎖のコンフォメーションエントロピーを減少し、結晶化パッキングの際のエントロピー損失を減らす。また、Glu や Lys など高いコンフォメーションエントロピーを持つ残基は同時に電荷を持つ残基でもある。このため、これらの残基を電荷的に中性な残基に変異させることは、結晶形成の際の好ましくない電荷相互作用を取り除く効果も期待できる。さらに、蛋白質表面の形状的に考えても、これらの変異によって平らな表面が出来るため、結晶化パッキングの際の分子間接触をより大きくできることが期待される。表面残基エントロピー減少法は、新規蛋白質の結晶化のみではなく、分解能の改善やモデル蛋白質として簡単に結晶化する系の構築を目指す場合などにおいても有用である。

Outer Surface Protein A (OspA) の結晶化変異体の構築(5)

OspA はボレリア菌由来のリグ蛋白質であり、ライム病を媒介するマダニへの感染に関与する。分子量 31kDa、273 残基からなり、N 末端の Cys が脂質修飾されている。OspA の結晶構造は抗体の複合体としてこれまでに 2 つ報告された。この結晶構造から、2 つの

ドメインが単層 β シートによってリンクされたダンベル様構造であることが分かり、この単層 β シートは β シートを研究する上で魅力的なモデルになり得ると我々は考えた。

しかしながら、OspA 単独では結晶化せず、抗体との複合体で結晶化する必要がある。そこで我々は OspA の単層 β シート領域を β シート研究のモデルシステムとして用いるために、OspA の結晶構造を簡便に決定できる方法の確立を目指した。これまでの NMR 測定から N 末端領域はフレキシブルであることが分かっていたため、N 末端 26 残基を欠失させた変異体を構築し、結晶化スクリーニングを行った。しかし、1700 条件を超える結晶化スクリーニングを行ったにもかかわらず、結晶を得ることが出来なかった。OspA は Lys と Glu 残基が全 251 残基中 62 残基 (25%) も含んでおり、これは Derewenda らがモデルケースとして用いた RhoGDI の Lys、Glu 含有率 20% より多い。我々は OspA 結晶化が困難な原因はこの異常に多い高エントロピー残基含有率にあると考えた。そこで、表面残基エントロピー減少法によって結晶化可能な変異体の構築を目指した。単層 β シート領域をモデルシステムとして用いることが目的であるため、表面残基の変異は N 末端もしくは C 末端ドメインに導入した。

我々は最初に、これまでに報告されていた 2 種類の抗体複合体の結晶構造を詳細に観察した。その結果、2 種類の結晶構造間では結晶パッキングが完全に異なっているにもかかわらず、3 つの残基 (Lys28, Glu196, Lys230) はどちらの結晶構造においても結晶中の分子間接触に関与していた。このことから、この三残基が結晶形成時に分子間接触に関与しやすい "Hot Spot" 残基であると考え、これらの残基をいくつかの組み合わせでアラニンに変異させた変異体を作製した。そのうち 230 位への変異は大腸菌発現において封入体形成が多くなったため、残りの 2 つの部位の Ala 変異体の結晶化スクリーニングを行った。しかし、野生型と同様にこの変異体も結晶の形成が観察されなかった。そこでさらに、OspA 野生型の結晶構造 (抗体との複合体) を観察し溶媒への露出が顕著な 2 残基をアラニンへ変異させた。この計 4 残基をアラニンに変異させた変異体も結晶化スクリーニングによって結晶を得ることが出来なかった。通常は、表面残基エントロピー減少法では 1 つの領域に対してアラニン変異を行い結晶化を目指す、OspA では高エントロピー残基である Lys、Glu が蛋白質表面の全領域に多く分布しているため、1 つの領域に対する変異では不十分であることが考えられる。我々はさらに 9 残基への変異導入を検討した。初めの 4 残基はすでにアラニンに変異しているため、さらなるアラニン変異を導入することは溶解度の著しい減少が危惧された。そのため新たに加える 9 つの変異は極性残基の Ser へ変異させた (図上に変位部位を示す)。この全部で 13 の残基を変異させた変異体は直ちに結晶化した。1536 条件のハイスループット結晶化スクリーニング条件のうち、299 条件で結晶化した (19.5%)。初期スクリーニング結晶化条件から良好な単結晶を得ることに成功し、この結晶から分解能 1.15Å の回折データを得ることが出来た。決定した変異体の結晶構造は野生型の結晶構造と驚くほど同一であった (RMSD : 0.823Å、図下)。変異を導入した 13 残基のうち、8 残基が結晶構造中で分子間接触に関与していた。高分解能の結晶構造から、単層 β シート領域の特徴的な水和構造が明らかとなり、この水和構造によって単層 β シート構造の硬さがもたらされていることが示唆された。

著者たちはこの結晶化変異体を β シート研究のモデル蛋白質として用いて、これまでに多くの OspA 変異体の結晶構造解析に成功してきている。

実験手順

1. 置換する残基

大きなコンフォメーション自由度がある、Lys もしくは Glu。これらの残基は約 90% の割合で蛋白質表面に位置する。これらの残基を低エントロピー残基である、Ala へ置換する。後述するが、Ala への置換によって溶解度が減少するので、溶解度が問題となる場合は、Ser などの他の低エントロピー残基も検討する。

2. どこに変異を導入するか

ループやターン領域の高エントロピー残基を置換する。統計的に Lys・Glu は α ヘリックスもしくはループ/ターン領域に多く存在するが、 α ヘリックス領域の置換は主鎖が埋没しているため、あまり有効でない。相同性のある蛋白質の構造が既知である場合は、ホモロジーモデリングにより推定構造を構築し変異導入部位を決める（側鎖全体が溶媒へ露出している部位への変位が有効であると思われる）。構造が完全に未知の場合は、二次構造予測を用いる。通常は蛋白質配列中に Lys・Glu が 2 つから 3 つ連続するパッチが数カ所存在し、その中の 1 つの部位をさせるが（例えば RhoGDI の Glu154/Glu155 変異）、それでも結晶化に成功しない場合は複数のパッチに同時に変異を導入してみる。

3. 変異導入により懸念される問題点

A. 蛋白質機能に重要な残基への変異導入によって機能が失われる可能性

PSI-BLAST などにより保存性の高い残基を見つけることで、ある程度、機能に重要な残基を推定することが出来る。

B. 変異導入による溶解度の減少

低エントロピー残基としてまず選択肢として Ala を考えるが、Ala は疎水残基であり、この変異によって溶解度の減少が懸念される。溶解度の減少が問題となる場合、Ser など他の親水的な低エントロピー残基を検討する。Derewenda らは他にも Tyr、Thr への置換を提案している(6)。

4. SERp サーバ

以上、手動による変異導入部位の検討方法を述べたが、最近この変異導入部位を自動で決定してくれるサーバが公開された (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SER/>) (4)。

SERp サーバでは、まず問い合わせ配列の (1) 二次構造予測 (コイル領域が高スコア)、(2) 連続した 3 残基のエントロピープロファイルを計算 (高エントロピー残基が高スコア)、(3) PSI-BLAST による保存残基の同定 (保存されている残基は低スコア、Ala への変異が見られる部位は高スコア) を行う。これらの計算結果を基に、最適な変異導入クラスター部位を提案してくれる。エントロピー障壁を越えるために、1 つのクラスターパッチ中の変異はすべて同時に変異導入する必要がある。

筆者の行った OspA への表面残基変異がどの程度に予測可能か SERp サーバで計算をしたところ、サーバが提案した 8 つのクラスターのうち、意図的に除外した単層 β シート領域と N-、C-末端以外の 3 クラスターが一致していた (変異した 13 残基のうちの 5 残基) (5)。このことから、このサーバは有効であると思われる。

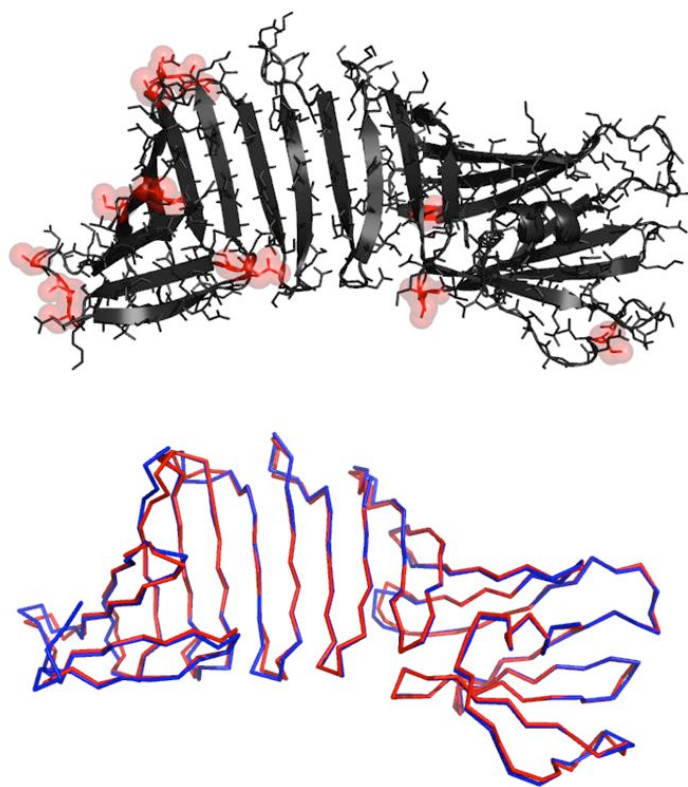
工夫とコツ

変異導入法

一つの表面残基パッチに変異を導入する場合は **QuikChange (Stratagene)** などの単変異導入法を用いると簡便で良いが、複数の部位に同時に変異を導入する必要がある場合、複数の部位に同時に変異プライマーが結合できる **Kunkel 法** を用いると迅速に発現ベクターを構築できる。加えて、変異導入の副産物として、すべてに変異が導入されていないいろいろな組み合わせの変異体を得られるので、それら副産物も結晶化トライアルを行ってみる価値がある。

文献

- 1) Keenan, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 8887-92 (2005)
- 2) Banatao, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 16230-35 (2006)
- 3) Derewenda, ZS., *Structure*, **12**, 529-35 (2004)
- 4) Goldschmidt, L. et al., *Protein Sci*, **8**, 1569-76 (2007)
- 5) Makabe, K. et al., *Protein Sci*, **15**, 1907-14 (2006)
- 6) Cooper, DR. et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, **63**, 636-45, (2007)



図：上、OspA 表面残基変異体の結晶構造。変異を導入した残基を赤で示した。下、OspA 表面残基変異体（赤）と野生型（青）結晶構造の重ね合わせ。