

令和 元 年 10 月 27 日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成31年度

受付番号 201960067

氏名 下條 明介

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ドルトムント （国名： ドイツ連邦共和国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

ゴケグモ由来膜孔形成神経毒素ラトロトキシンのクライオ電子顕微鏡構造解析

3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 元 年 9 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

マックスプランク分子生理学研究所 構造生化学部門5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(M4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

**研究遂行経過****標的タンパク質の発現および精製**

本研究はまず標的タンパク質の選定を行った。すでに同定された 7 種類ラトロトキシンのうち、4 種類 ( $\alpha$ -LTX、 $\alpha$ -LCT、 $\alpha$ -LIT、 $\delta$ -LIT) の配列が公表されているが、 $\alpha$ -LTX は人体への毒性作用が危惧されるため、残り 3 種類のラトロトキシンのみ発現することにした。

標的タンパク質をコードした DNA 断片を購入し、活性型 (C 末端ドメインを欠損させたもの) を自ら PCR 法で調製したのち、各種発現ベクターおよび発現大腸菌株の検討を行なった (表 1)。しかし全ての組み合わせにおいて、標的タンパク質が発現しないまたは可溶化しない結果になり、使用可能なサンプルを調製することができなかった。

そこで私は Sf9 昆虫細胞発現系を試みた。発現宿主細胞への毒性を配慮して、 $\alpha$ -LCT のみをターゲットにした。MultiBac Baculovirus System を用いて、 $\alpha$ -LCT の DNA 断片を pACEBac1 発現ベクターに挿入し、全長および活性型  $\alpha$ -LCT を含む発現プラスミドを作製できた。このプラスミドを元にバクミドを調製し、それをウィルスにトランスフェクションさせウィルスストックを作製して、宿主昆虫細胞に感染させた。しかし標的タンパク質の大量発現に成功したものの、依然として可溶化せず、次のステップに進めることができなかった。

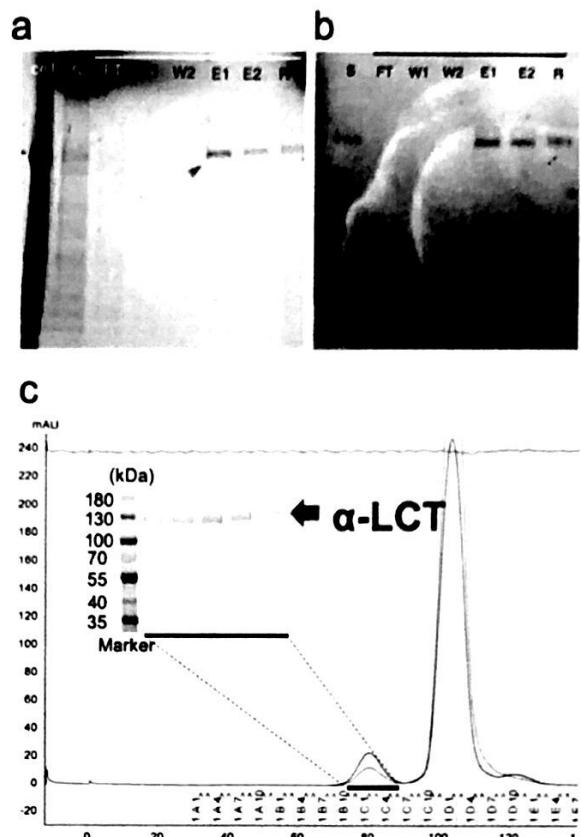
プラスミド	目的	結果
pET28a	His タグによる精製	発現しない
pGex4T1	GST タグによる精製およびフォールディングの補助作用	可溶化しない
pET32	Thioredoxin タグによりジスルフィド結合のミスマッチを防ぐ	発現しない

表 1. 大腸菌発現系を用いてラトロトキシンを発現した際に使用したプラスミドとその実験結果

最後に私は標的タンパク質の N 末端に細胞外分泌シグナルペプチドを融合する方法を試みたところ、活性型  $\alpha$ -LCT のみ、昆虫細胞の培養液から可溶化されたタンパク質を検出できた（図 1, a, b）。Strep II アフィニティタグおよびゲル濾過の二段階精製によって、高純度の活性型  $\alpha$ -LCT を得ることに成功した（図 1, c）。1 リットル培養液から約 1 mg のタンパク質を回収でき、4°C では数日間、-80°C では一ヶ月以上安定して保存することができた。

図 1.  $\alpha$ -LCT の調製

(a) SDS-PAGE によるタンパク質発現チェック。  
cell: 細胞質、S: 培地、FT: Strep II タグ精製時の素通り画分、W: 洗浄画分、E: 溶出画分、R: 溶出後のレジン。(b) 同ゲルを western blot 法で確認したもの。一次抗体は Anti Strep II を使用。(c) 精製条件を最適化した結果。ゲル濾過カラム精製より単分散したターゲットタンパク質を取得。SDS-PAGE の結果から、高純度のタンパク質が得られたことがわかる。



#### ネガティブ染色法による試料の確認

調製した試料の状態を確認するために、私はネガティブ染色法を用いて 120 kV 電子顕微鏡 FEI Spirit を使い試料を観測した。予想したものと異なり、標的タンパク質は二量体ではなく、単量体として溶液中に存在することが明らかになった。 $\alpha$ -LCT 分子は溶液中で单分散し、性状が良好である（図 2）。そこで 120 kV 電子顕微鏡 JEOL 1400 を用いてテストデータセットを収集し、本試料がクライオ電子顕微鏡による解析に適しているか否かを確認した（表 2）。

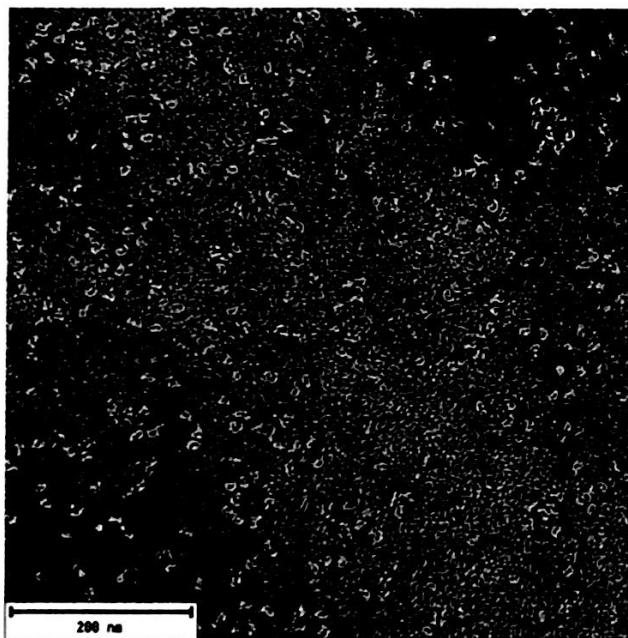


図 2. ネガティブ染色法で観測された  $\alpha$ -LCT 単量体分子

Microscope	JEOL 1400
Magnification	50 kx
Pixel size	2.2 Å
Defocus range	0.8 ~ -1.8 um, 0.2 um of each step
Number of micrographs	120
Number of particles	34521

表 2. テストデータセット収集のパラメータ

引き続き所属研究室が開発した自動粒子ピッキングソフトウェア CryoYOLO を用いて、120 枚の画像から 34521 個の粒子を採取できた。その後、構造解析プログラム ISAC を用いて 2 次元平均クラス分けの結果、ほぼ全ての方向から均一に像が得られており、クライオ電子顕微鏡の解析に適していることがわかった（図 3, a）。3 次元電子密度構築プログラム RVIPER を用いて得られた粒子を再構築したところ、高さ約 150 Å、幅約 100 Å、厚さ約 50 Å の  $\alpha$ -LCT 単量体の初期電子密度像を得ることに成功した（図 3, b）。目的の分子は D 字型で、大きく曲がったバックボーンドメインと球状のセントードメインからなることがわかった。この結果は  $\alpha$ -LCT のアミノ酸配列情報とよく一致し、それぞれ N 末端ドメイン（Ankyrin-like domain）および N 末端ドメインに対応している。

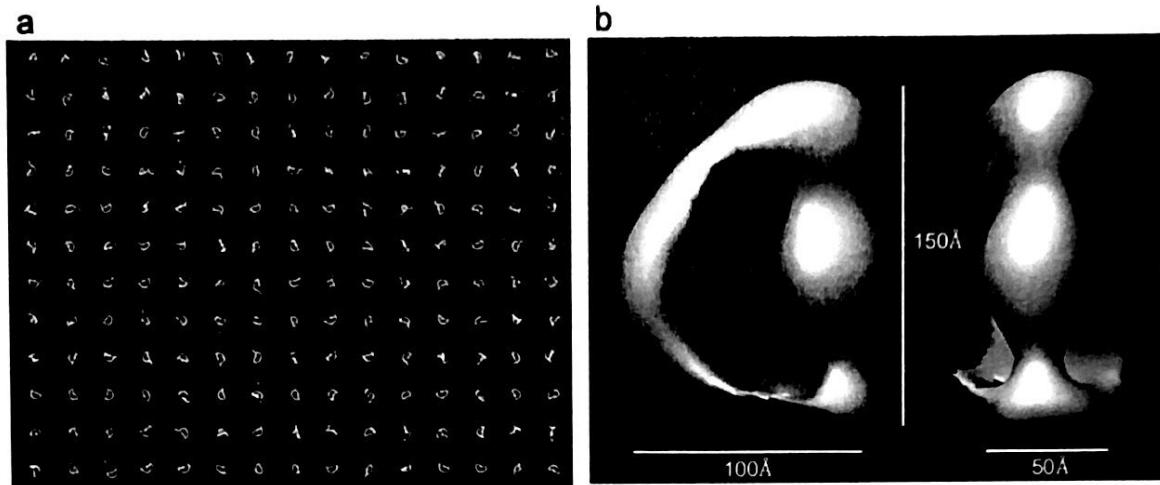


図 3. (a) 2 次元平均クラス分けの結果。粒子が様々な方向に向く、その分布が均一でことがわかる。(b)  $\alpha$ -LCT 単量体分子の 3 次元再構成像。

### 凍結グリット作製の条件検討

得られた試料がクライオ電子顕微鏡解析に適しているため、凍結グリットの作製に取り組んだ。ネガティブ染色法で決定した試料濃度の 10 倍濃くし、FEI 社 Cryoplunge 3 システムを用いてプロッティング時間、プロッティングフォース、温度および湿度など、凍結条件のスクリーニングを行っている。またそれと同時に QUANTIFOIL (Quantifoil Micro Tools 社) および C-Flat (Protochips 社) の各種グリットのスクリーニングも行っており、もっとも氷が均一かつ薄くなる条件を探している。さらに、標的タンパク質の分子量が小さいため(130 kDa)、位相板を用いて現在は FEI 社製 200 kV クライオ電子顕微鏡 Talos Arctica を用いて、図 4 のような鮮明な分子像が得られた。しかし現在、図 4 に示した一様な厚さの氷を持つグリットの作製がボトルネックである。プロッティング時間、グリット種類の 2 つの変量を中心に最適なグリット作製条件を引き続き探索したい。また、溶液中に微量な界面活性剤を加え、安定な氷層の形成をサポートする手法も計画している。

一方で、クライオ電子顕微鏡によるスクリーニング中に使用した位相板が、高周波数におけるシグナルのコントラストの減少をもたらし、高分解能構造が得られない可能性がある。そのため位相版を使わないデータ収集またはデータ処理の方法を確立させる必要があり、所属研究室が現在開発しているノイズ除去ソフトウェアの使用を検討している。

### 膜孔形成の条件検討

$\alpha$ -LCT 単量体試料の調製に成功したため、引き続き四量体膜孔の形成条件の探索に取り組んだ。先行研究によれば、溶液中にミリモル単位の二価カチオン ( $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  など) の存在下で膜孔を形成すると報告されているが、その再現を確認できなかった。次に、生体膜をミックする目

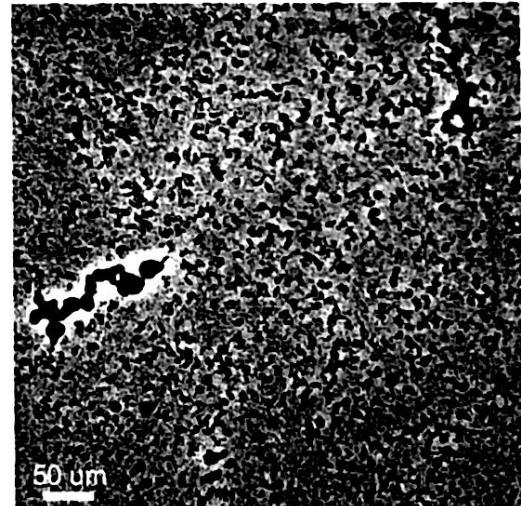


図 4. 200 kV クライオ電子顕微鏡を観察された  $\alpha$ -LCT 単量体分子像。倍率 120 kx、位相板を使用。

的に様々な界面活性剤を  $\alpha$ -LCT 溶液に加えて膜孔形成の誘導を試みたが、同様に膜孔形成が観察されなかった。また、0.1 mg/ml の  $\alpha$ -LCT 試料を 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.0084% DDM を含む溶液に加え、様々な pH、温度、インキュベーション時間をスクリーニングしたが、いずれの条件にも  $\alpha$ -LCT 四量体膜孔は観測されなかった。

上述したように一般的に使われる様々な条件を用いても膜孔が形成されなかつたため、次のストラテジーとしてナノディスクの使用を検討している。ナノディスクはタンパク質のフレームにリン脂質分子を充填させ、局所的に脂質二重膜をミミックする構造体のことである。所属研究室は以前にもナノディスクを用いて膜タンパク質の高分解能解析に成功しており、各サイズのナノディスクを所有しているだけでなく、その使い方のノウハウも蓄積されており、今後これらを有効に活用したい。

### LMWP の発現条件探索

LMWP (Low Molecular Weight Protein) は分子量約 8 kDa の小さなタンパク質であり、その機能はまだ明らかになっていないが、天然由来のラトロトキシンを調製する際に、常に目的のタンパク質とともに精製されることから、ラトロトキシンと強い結合親和性を持ち、LMWP はラトロトキシンの構造安定性に寄与すると考えられている。私は前述したラトロトキシンが多量体化しない問題に触発され、LMWP がラトロトキシンの膜孔形成にも必要であると仮定し、LMWP の調製に取り組んだ。2種類の LMWP をコードする DNA 断片を様々な発現ベクターに挿入し、大腸菌発現系を用いて発現を試みた。ベクター pET28a と pGex4T1 について大腸菌株 BL21(DE3) および Origami B を、またベクター pET40 について大腸菌株 BL21(DE3) pLysS を試みたが、いずれも発現しないまたは可溶化しない結果になった（表 3）。これは LMWP がジスルフィド結合を大量に含み、大腸菌発現系がそれを正しく折りたためられないからだと考えられる。現在はラトロトキシンと同様に昆虫細胞発現系を用いて、目的タンパク質の調製を試みている。

プラスミド	目的	結果
pET28a	His タグによる精製	発現しない
pGex4T2	GST タグによる精製およびフォールディングの補助作用	発現しない
pET40	DsbC タグを融合し、ペリプラズムヘタンパク質を発現することでジスルフィド結合の正確な形成を促進	可溶化しない

表 3. 大腸菌発現系を用いて LMWP を発現した時使用したプラスミドとその実験結果

### 研究成果まとめ

短縮派遣のため 6 ヶ月のみの短い期間であったが、ターゲットタンパク質の発現および精製に成功しただけでなく、ネガティブ染色法による試料の状態を確認するなど、クライオ電子顕微鏡による高分解能構造解析の準備を着実に進め、研究進捗は満足できるものである。今後はラトロトキシン単量体の高分解能構造を決定するとともに、多量体化・膜孔形成の条件を探索し、それらの構造を決定することで、ラトロトキシンの膜孔形成機構を完全解明する。