

解説

光化学系IIの例から見る膜タンパク質複合体の結晶化と構造解析

岡山大学・大学院自然科学研究科

沈 建仁*・川上 恵典

1. はじめに

生体内で膜タンパク質及びその複合体は多くの重要な機能を担っている。しかし、水溶性タンパク質に比べ、立体構造が解析された膜タンパク質の数はまだ少ない。現在タンパク質立体構造データベース (PDB) に登録されているタンパク質の構造数は5万個を超え、配列相同性が30%以下の「独立」のタンパク質構造数は約8500個になっているが、そのうち膜タンパク質として帰属されるものは800未満で、「独立」の膜タンパク質の構造数は180程度のみである。即ち、構造解析が行われた膜タンパク質の数はPDB登録数の中の約2%であり、これは、配列が決定された各種生物の全ゲノムにおいて膜タンパク質が全タンパク質の25~30%を占めていることから考えると、極めて小さい割合であると言わざるを得ない。

タンパク質の立体構造解析の主な手法はX線結晶構造解析法であり、この方法によって解析された立体構造はPDBに登録されているものの86%を占めている。膜タンパク質のX線結晶構造解析は1984-1985年にMichel, Deisenhoferらによって紅色光合成細菌の反応中心の立体構造解明が最初の例である¹⁻³⁾。膜タンパク質の構造解析に際して、界面活性剤を用いて高純度・安定で、活性を保ったままの膜タンパク質を調製すること、及びそれを結晶化することが重要なステップであり、構造解析のボトルネックであるとも言われている(水溶性タンパク質についても同じことが言える)。膜タンパク質複合体の場合、バクテリアや昆虫を用いた発現ができないため、複合体の解体なしに適切な界面活性剤を選んで精製すること、及び得られた標品の結晶化条件を見つけることがさらに重要な課題になる。

本稿では好熱性シアノバクテリアの光化学系II複合体(以下PSIIとする)の精製・結晶化を例に挙げ、可溶性・精製の各段階に応じた界面活性剤の選択と、精製標品から良質な結晶を得るための重要な因子である

活性状態・純度・均一性の評価方法、タンパク質の安定性に応じた結晶化方法の最適化による結晶の分解能の向上について紹介し、さらにPSII変異体の構造解析の一例を紹介する。なお、タイトルでは「膜タンパク質複合体」という言葉を用いたが、以下特に記述がない限り膜タンパク質とその複合体は同じように扱うことにする。

2. 光化学系II複合体

シアノバクテリア由来のPSIIは17個の膜貫通サブユニットと3つの膜表在性サブユニットにより構成され、分子量約350 kDaの単量体が2個結合した二量体として存在している。3つの膜表在性タンパク質は親水性なので、PSIIは膜タンパク質と親水性タンパク質を含む複合体であることになる。これまで好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 及び *T. vulcanus* から、3.8-3.0 Å分解能のPSII構造が報告されている^{4,7)}(図1)。分解能が不十分であること、及び回折実験におけるX線損傷の問題から、現在のPSII構造では、水分解・酸素発生反応の機構を十分詳細に解明することができず、結晶分解能の向上とX線損傷を抑制した構造解析が試みられている。以下我々が行ってきた *T. vulcanus* 由来PSIIの結晶化を中心に紹介する。

3. PSIIの精製

結晶化に適した膜タンパク質を得るには、対象となるタンパク質を、活性のある、安定な状態で生体膜から取り出すことのできる界面活性剤を選択しなければならない。膜タンパク質複合体の場合、複合体本来の組成を解離させずに精製することが重要である。精製には一般に非イオン性界面活性剤を用いるが、結晶化を目的とした場合、できるだけ結晶化に用いる界面活性剤と同じものを使用することが望ましい(やむをえない場合は精製と結晶化に異なった界面活性剤を用いることもある)。これまでに膜タンパク質の結晶化に

* 連絡先 E-mail: shen@cc.okayama-u.ac.jp

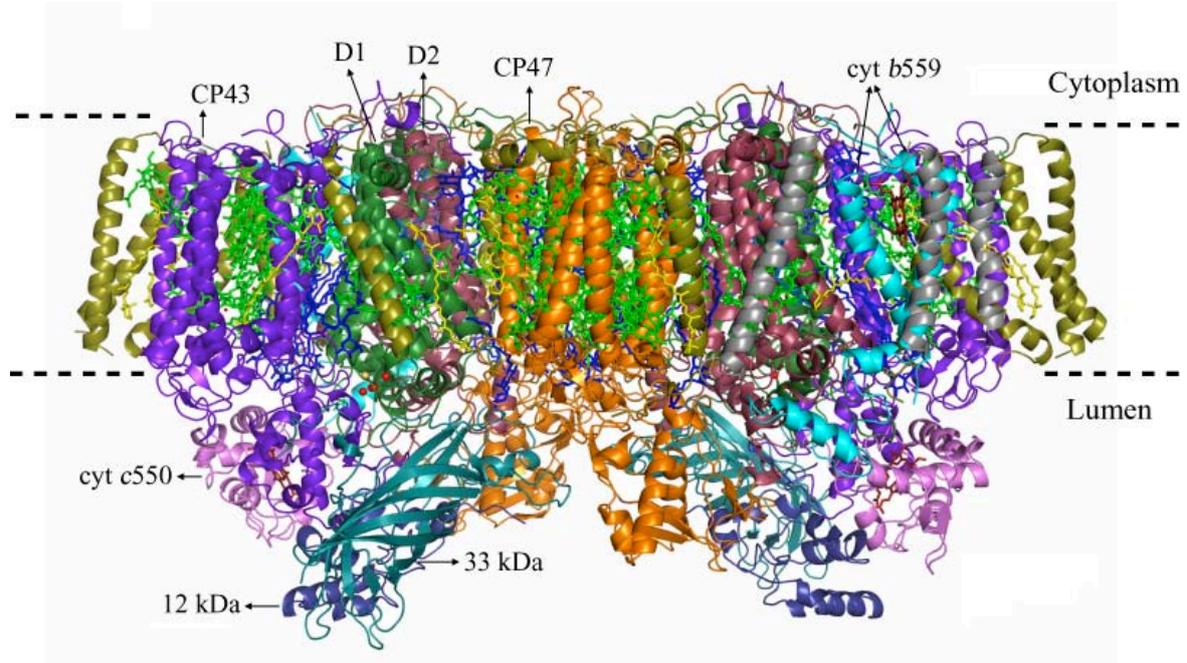


図1 光化学系II (PSII)の3.0 Å分解能の結晶構造⁷⁾。
破線はそれぞれサイトプラズム側とルーメン側のチラコイド膜表面を示す。

成功した界面活性剤として、C₁₂E₉ (polyoxyethylene(9)dodecyl ether), β-OG (n-octyl-β-D-glucoside), β-DDM (n-dodecyl-β-D-maltoside), α-DDM, UDM (n-undecyl-β-D-maltoside), NG (n-nonyl-β-D-glucoside), OM (n-octyl-β-D-maltoside), MEGA10 (decanoyl-N-methylglucamide), LDAO (Lauryldimethylamine-N-oxide)などが挙げられ⁸⁾、その内αヘリックスタイプの膜タンパク質の結晶化において成功例が最も多いのはβ-DDMで、その次はβ-OGである⁸⁾。一般に糖とアルキル基をベースにした界面活性剤において、アルキル鎖が長いほど形成されるミセルが大きく、それによって作られる結晶は水の含量が高く、結晶の質が低くなる傾向がある。しかし、アルキル鎖が短い界面活性剤ほど可溶化力が強い傾向があり、膜タンパク質が不安定、あるいは複合体が解体されやすい傾向がある。

従って、実際の精製と結晶化においては、常用の界面活性剤から、対象となる膜タンパク質(複合体)の活性と安定性を最大限に保てるものを選択しなければならない。

PSIIの精製において、我々はLDAOとβ-DDMの2つの界面活性剤を用いた。チラコイド膜にはPSII以外に多くのタンパク質複合体が存在しており、特に光化学系I複合体(PSI)の除去がβ-DDMのみを用いた可溶化では困難であるため、まずLDAOによりPSIIをチラコイド膜から選択的に可溶化し、得られた粗PSII標品をβ-DDMによって再可溶化した後、TOYOPEARL DEAE650MまたはQ Sepharose HPを用いた陰イオン交

換クロマトグラフィーによって結晶化に適した高純度なPSII標品を精製した⁹⁾。

4. 精製標品の評価

結晶化スクリーニング実験を始める前、及び結晶化において、精製した標品が結晶化に適しているかどうかを常に分析し、評価することは、精製が容易でない膜タンパク質にとって特に重要である。精製膜タンパク質が結晶化に適しているかどうかを判定するためには、標品の活性、純度、均一性、安定性を分析し、評価する必要がある。以下PSIIを例にそれらの分析手法、評価基準について述べる。

4. 1. 活性

X線構造解析の目的は活性を保った状態のタンパク質の立体構造を解明することであるので、結晶化に用いるタンパク質が十分な活性を保っているかどうかを常に分析し、モニターすることが必要である。活性が低いことは、タンパク質の純度が低い、あるいは構造が一部変性、あるいはnative構造と異なっている、と言ったことの現われでもあるので、このような標品は良質な結晶を与えることが困難であると考えた方がよい。細胞内の最適状態での活性を知ることは通常難しいが、複数回の精製を通して目的タンパク質の最大活性を把握し、そのような、あるいはそれに近い活性を持つものを結晶化に用いることを心がけるべきである。PSIIの場合、総合的な活性として飽和光による酸

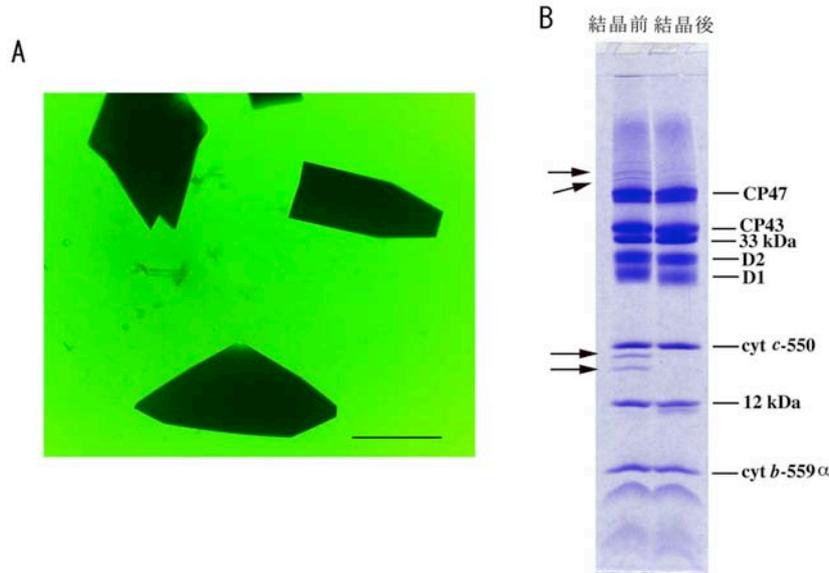


図2 (A) シアノバクテリア *T. vulcanus* 由来PSII二量体の結晶。バーは0.5 mmを示す。(B) 結晶前と結晶化後のPSII二量体のタンパク質組成。結晶化後のPSIIは数個の結晶を溶解して分析したもの。矢印で示したバンドは、結晶化前の溶液試料に存在するが、結晶化された試料になくなった狭雑物である。

素発生の活性を測定し、これまでの経験から *T. vulcanus* から3000 $\mu\text{moles O}_2/\text{mgchl/ml}$ 以上の活性を持つ標品を結晶化に用いている。それよりも活性の低いものは最高分解能の結晶を与えていない。

4. 2. 純度

結晶化には標品の純度が高いほどよいが、複合体の場合、精製度を上げるにつれ、結合が弱いサブユニットの部分的解離が起こるという複合体特有の問題がある。オリゴマーを形成するタンパク質についても、精製条件を強くすることによってオリゴマー構造が破壊されるなど類似の問題があり、精製手順をどこで止めて結晶化に入るかを適宜判断する必要がある。標品の純度は通常 SDS-PAGE、Blue native PAGE (BN-PAGE)、clear native PAGE (CN-PAGE)¹⁰⁾、ゲルろ過などを用いて評価する。サブユニットの解離が活性を低下させる場合は活性測定も1つの手段となる。我々が結晶化に用いたPSIIの純度を図2Bに示した。図から明らかなように、結晶化に用いたPSIIには他のタンパク質のバンドがいくつか残っており(矢印)、必ずしも純度の十分高いものではなかった。カラムクロマトグラフィーのステップを追加してこれらコンタミのバンドを除去しようとする場合、PSII表在性タンパク質の一部が脱落するなどintactなPSIIが得られなくなる問題があった。これ以上精製できないと判断したので、この標品を用いて結晶化を行ったが、ある程度良質な結晶が得られ(図2A)、結晶中にはコンタミのバンドがなくなっていた(図2B、レーン2)⁹⁾。これは、ある程度

不純物を含んだものでも結晶になりうることを示している。不純物の量を正確に見積もることは容易ではないが、おそらく5%程度以内と思われる。言い換えれば、95%程度の純度であれば結晶化に用いることができる。

しかし、不純物は析出される結晶の質に影響を与えることが考えられ、PSII結晶の分解能が低かったのは不純物の存在が一因と思われたので、現在は再結晶化によって不純物を除去し、当初より良質な結晶を得ることに成功している。

4. 3. 均一性

複合体の結晶化にとって、純度よりも均一性が重要な因子であると考えべきである。これは、結晶が均一な粒子から形成されることを考えると当然であろう。同じ組成の複合体であっても、凝集物や変性物の混在により均一な標品ではなくなる。タンパク質の均一性には電気的な均一性と粒子サイズの均一性から分析・評価する必要がある。

電気的な均一性は、タンパク質の表面電荷に左右され、タンパク質の固有の性質の1つであるので簡単に制御できない。通常、イオン交換クロマトグラフィーを用いて単一ピークとして精製した標品は、電気的にも均一であるとみなすことができる。各種タグを利用してアフィニティークロマトグラフィーによって調製した標品は、イオン交換クロマトグラフィーを用いて電荷的に均一なピークかどうかチェックしておいた方がよい。必要であればイオン交換カラムを用いてさらに

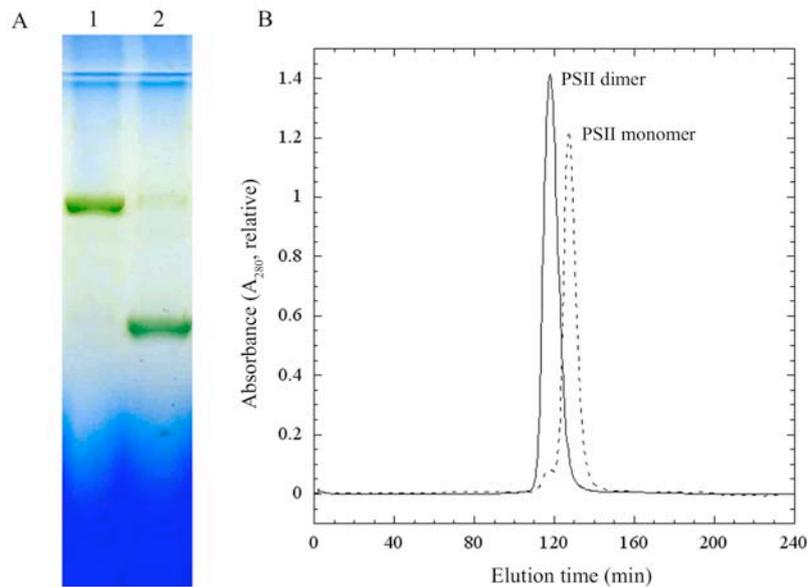


図3 *T. vulcanus*より精製したPSII二量体と単量体のBlue native-PAGE (A)とゲルろ過パターン(B)。

ゲルろ過はSuperdex 200 PC 3.2/30カラムを用い、SMART systemで行った。

精製する。等電点電気泳動を用いて分析してもよいが、等電点電気泳動自身は結晶化標品の精製に適していないので、それによって電氣的に均一でないものが混在していると分かった場合、やはりイオン交換クロマトグラフィーを用いたさらなる精製が必要である。PSIIの場合、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて単量体と二量体を分離し、二量体の単一ピークを分取して結晶化に用いている。

複合体の粒子サイズはサブユニット解離の有無、オリゴマー状態、凝集物・狭雑物の有無などによって影響を受け、結晶化に大きな影響を及ぼす。通常、ゲルろ過、BN-PAGE、CN-PAGEを用いて粒子サイズの均一性を評価する。動的光散乱(Dynamic Light Scattering, DLS)も粒子サイズの分布を評価するのによく用いられ、水溶性タンパク質の場合、monodispersityが高い試料(monodisperseと判断された試料)はほとんど結晶化可能、という報告もある¹¹⁾。膜タンパク質及びその複合体の場合、界面活性剤のミセルが測定妨げになるので、タンパク質とミセル由来のピークを見分けることが必要である。PSIIの場合、BN-PAGEとゲルろ過によって粒子の均一性を評価した(図3)。ゲルろ過において、図3Bに示したような、対称性の高い、狭い単一ピークを示す二量体はよい結晶を与えるが、わずかな広がりを見せるピークを持った標品は良質な結晶を与えない。また、CN-PAGE分析において、高分子量側に凝集物を与えるPSIIはやはり良質な結晶を与えない。

4. 4. 安定性

良質な結晶を得るためには、結晶化溶液の過飽和度をできるだけ低く抑え、時間をかけてゆっくり結晶を析出させる方がよい。しかし、精製タンパク質、特に膜タンパク質やその複合体は多くの場合不安定なので、できるだけ短時間で結晶化したいことが多い。一般的に結晶化は4–20°C、数日–数週間かけて行うので、精製タンパク質が結晶化条件で十分安定かどうかをチェックする必要がある。安定性のチェックには、活性測定、SDS-PAGEによる成分の分解の有無、BN-PAGE、ゲルろ過によるオリゴマー状態の変化などが考えられる。PSIIの場合、20°C、1–2週間程度かけて結晶化を行っていたが、酸素発生活性とSDS-PAGEによる分析から、3–5日以上静置すると、表在性タンパク質の1つである12kDaサブユニットが分解し始め、酸素発生活性も低下した(図4)。これは、回収した結晶の分析からも明らかになった(図2B)。Glycerol、ベタイン、プロテアーゼインヒビターの添加により、12kDaの分解を抑制できたが(未発表データ)、酸素発生活性の低下を完全に抑制することはできなかった。Glycerolは溶液の粘性を増やし、結晶核の析出を抑え、結晶をゆっくり成長させることによって結晶の質を高める効果があるが、十分なサイズの結晶が析出するまでの時間を長くし、不安定なタンパク質に対して必ずしも十分な安定化効果を持っておらず、さらにGlycerolの存在によりできた結晶の含水量が高く、結晶の質が悪くなるなどの可能性がある。従って、Glycerolなどの添加剤を使用するかどうかは個々のケースで判断する必要がある。PSIIの場合、結晶化条件を改良し、4°C、5日以内に析出させることによ

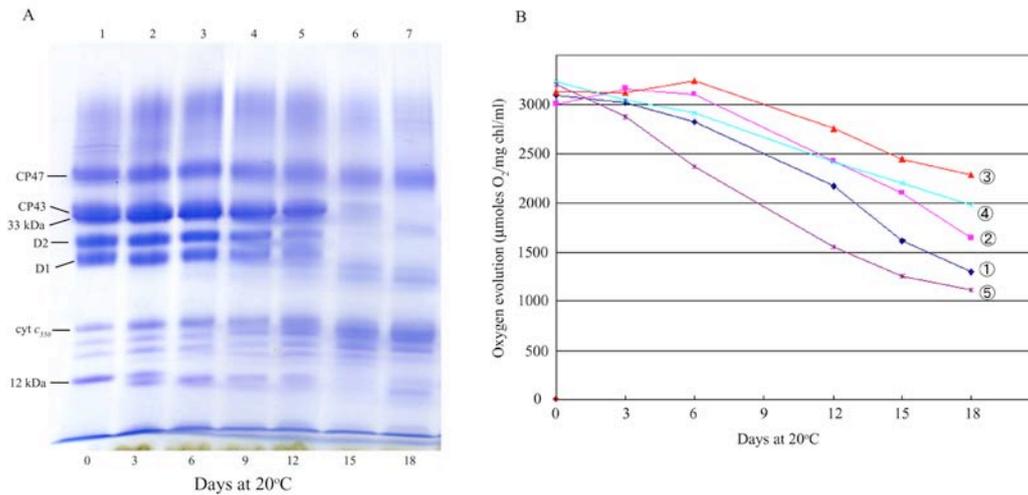


図4 20°C、暗黒におけるPSII二量体の安定性。

(A) コントロール条件 (30 mM Mes pH 6.0, 20 mM NaCl, 3 mM CaCl₂)におけるPSIIサブユニットの分解。(B) 各種条件下における酸素発生活性の変化。①コントロール (30 mM Mes pH 6.0, 20 mM NaCl, 3 mM CaCl₂); ②通常の結晶化条件 (コントロール+15% glycerol+5-6% PEG1,450); ③コントロール+8% glycerol+1.0 M Betaine; ④コントロール+1 mM PMSF; ⑤コントロール+2%ベンズアミジン。

て、これまで最良の結晶を与えることが分かった。

5. PSIIの結晶化

タンパク質の結晶化方法は様々あり、最もよく使われているのは蒸気拡散法としてのハンギング・ドロップ法またはシッティング・ドロップ法である。他にはバッチ法、二液バッチ法、透析法、界面拡散法などがある。膜タンパク質の場合、蒸気拡散法は沈殿剤とともに試料中の界面活性剤も濃縮されるので、それによって相分離が起こり、結晶化の妨げになることがある。一方、バッチ法や透析法は最終条件をコントロールでき、界面活性剤が濃縮されることはないが、バッチ法では結晶析出の範囲が狭く、透析法はセッティングに時間がかかったり多くの条件を一齐にスクリーニングしにくいと言った問題があり、いずれも初期結晶化条件のスクリーニングには適していない。従って、どの方法を使うかは扱うタンパク質の安定性や結晶析出の再現性などを検討する必要がある。結晶化の際の温度も重要なパラメーターの1つであり、通常4°Cと20°Cを試す。

PSIIの場合、初期の結晶化は20°C、キャピラリーチューブを用いた微量透析法でサンプル溶液として4.0 mg chl/ml, 20 mM Mes (pH 6.0), 10 mM CaCl₂, 20 mM NaCl, 20 mM MgSO₄、外液に20 mM Mes (pH 6.0), 20 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 40 mM MgSO₄, 0.015% β-DDM, 5-7% PEG1450を用いて行った⁹⁾。その結果、1-2週間で1.0 x 0.5 x 0.1-0.2 mmサイズの結晶ができ、3.7 Å分解能の回折データが得られ、それに基づき構造解析が

行われた⁵⁾。しかし、上述したように、20°C、1-2週間では12 kDaサブユニットの分解が起こり、酸素発生活性が部分的に低下したので⁹⁾、これ以上の分解能の向上は見られなかった。そのため、透析法よりも短時間で結晶を析出させることができるハンギング・ドロップ蒸気拡散法を用いて、高純度・高活性の試料から3-4日で結晶を析出させることによって、分解能3.3 Åの回折データを得た。さらに4°Cで結晶化を行い、1日で析出した結晶を回収し、オイルバッチ法を用いた再結晶化と抗凍結剤置換の条件を最適化することによって、最高分解能 2.74 Åの回折スポットを与え(図5)、フルデータセットとして3.0 Å分解能を与える結晶を析出させることに成功した。

6. PSII変異体の結晶構造解析

PSIIは 5 kDa 前後の「低分子量」サブユニットを13個持っており、そのうちの多くの機能は解明されていない。さらに現在報告されている結晶構造において、3つの膜貫通ヘリックスの帰属が決定されていない。変異体の結晶構造解析によって、サブユニットの位置や機能に関する情報を取得することが可能であり、我々はPsbY欠失株からPSII二量体を精製し、野生株とほぼ同様の条件で結晶化し、野生株との差フーリエ図から、PsbYは3.0 Å分解能の構造におけるX1に対応することを同定した(図6)。現在の分解能では、PsbYの欠失によるPSII変異体の構造変化を特定することはできないが、分解能の向上により変異体における構造変化を検出し、PSIIにおけるPsbYの機能を明

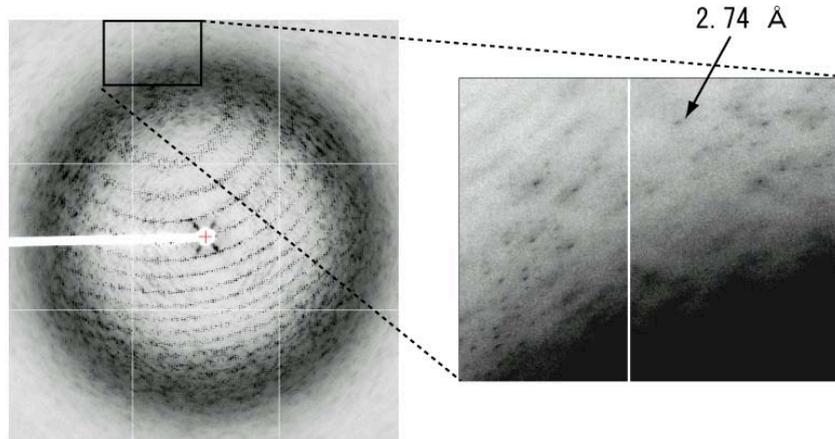


図5 PSII結晶のX線回折像(左)とその一部の拡大図(右) (最高分解能2.74 Åの回折点を矢印で示した)。

らかにすることができると期待している。

7. 終わりに

タンパク質の結晶化のため、スクリーニングキットが複数市販され、微量の試料を扱うことができる結晶化ロボットも利用できるようになり、さらに放射光技術や解析技術の進歩により、構造解析の速度が著しく速くなり、タンパク質の大量構造解析の時代が到来したという感がある。膜タンパク質に関しても、Michelらが光合成細菌反応中心の結晶化に初めて成功した時には、構造解析された膜タンパク質が数年に1個、あるいは1年に1個程度であったが、最近では年に十個を超える数が報告されるに至った。膜タンパク質及びその複合体の結晶化は、いかにタンパク質の立体構造を

保ったまま生体膜から取り出して高純度な標品を精製し、そのタンパク質に見合った結晶化条件・方法を見つけるかにかかっている。そのため、実験材料が大量に入手できることを前提に、可溶化に適した界面活性剤の選択、各精製段階の最適化による高純度、高均一性、高活性標品の精製、そしてタンパク質の安定性を保った条件下での最適結晶化条件・方法の探索が重要な課題になる。

PSIIの結晶構造の現在の分解能は3.0 Åであり、この分解能ではPSIIの全アミノ酸残基の側鎖構造を決定するには不十分である。特に酸素発生反応の中心であるMn₄Caクラスターは、X線照射による損傷を受けるため、十分詳細な構造が解明されていないのが現状である。再現性良く2.7 Å分解能を超える結晶を析出させることが出来れば、複数の結晶を用いて1個の結晶あたりに照射するX線ドーズを著しく低く抑えることで、損傷をより低減したMn₄Caクラスターの構造を解明することができると期待されている。

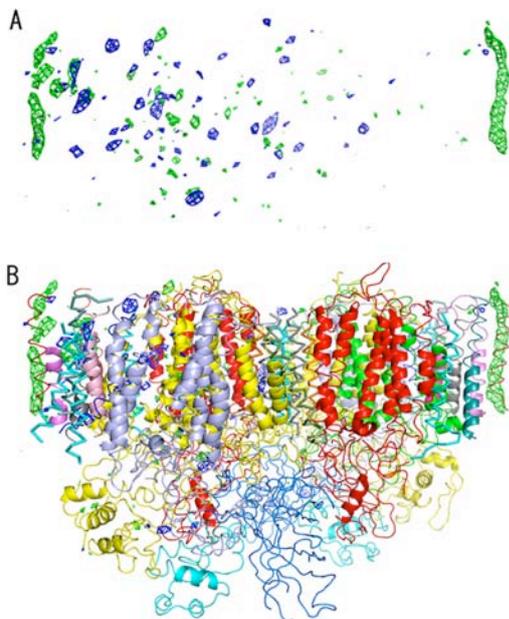


図6 A. 野生株PSIIからPsbY変異株PSIIを差し引いた差フーリエ電子密度図。緑はプラスの電子密度を、青はマイナスの電子密度を表す。B. Aの電子密度を3.7 Å分解能のPSII結晶構造²⁾と重ね合わせたもの。

参考文献

1. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex: electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.* 180, 385-398.
2. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution, *Nature* 318, 618-624.
3. Deisenhofer, J., and Michel, H. (1985) The photosynthetic reaction center from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis* (Nobel Lecture), *EMBO J.* 8, 2149-2170.
4. Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N.,

- Saenger, W., and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 409, 739-743.
5. Kamiya, N., and Shen, J. R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 98-103.
 6. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science* 303, 1831-1838.
 7. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438, 1040-1044.
 8. Iwata, S. (2003) Crystallization informatics of membrane proteins, In Iwata, S. (ed.), *Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins*, pp. 281-297, International University Line, La Jolla, California.
 9. Shen, J.-R., and Kamiya, N. (2000) Crystallization and the crystal properties of the oxygen-evolving photosystem II from *Synechococcus vulcanus*, *Biochemistry* 39, 14739-14744.
 10. Wittig, I., Karas, M., and Schägger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes, *Mol. Cell. Proteomics*, 6, 1215-1225.
 11. Ferré-D' Amaré, A.R., and Burley, S.K. (1997) Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules, *Methods in Enzy.* 276, 157-166.