

無細胞タンパク質結晶化による天然変性タンパク質の迅速微量構造決定

(北大環境科学¹・京府大生命²・科学大生命³・ASMat⁴) 小島 摩利子・安部 聡・古田 忠臣・○上野 隆史^{3,4}

Rapid Structure Determination of Intrinsically Disordered Proteins Using Cell-free Protein Crystallization (¹ Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University, ²Department of Biomolecular Chemistry, Kyoto Prefectural University, ³*School of Life Science and Technology*, ⁴*ASMat, Institute of Science Tokyo*) Mariko Kojima,¹ Satoshi Abe,² Tadaomi Furuta,³ ○Takafumi Ueno^{3,4}

Protein folding is regulated by interactions with ions, small molecules, and other proteins, allowing functional adaptation to environmental changes. Intrinsically disordered proteins (IDPs) flexibly alter their structures through interactions with other proteins, enabling diverse functions. While their structural regulation is crucial for drug discovery and medicine, IDPs are challenging to analyze due to their flexibility, and the mechanism of their structural stabilization remains unclear. This study utilized cell-free protein crystallization (CFPC) technology to establish a structural analysis screening method for IDPs and investigate the intermolecular interactions. CFPC, based on the wheat germ system with a 100 μ L volume, achieved to obtain high-resolution crystal within 24 hours. We have successfully applied CFPC to determine the structure of the IDP targets using polyhedra crystal (PhC) as the fusion tag systems.

Keywords : *Intrinsically disordered protein; Protein microcrystal; Cell-free protein crystallization*

タンパク質のフォールディングはイオンや低分子、タンパク質との相互作用により制御され、外部環境に応答して異なる機能を発現する。天然変性タンパク質 (Intrinsically disordered protein; IDP) は、他のタンパク質との相互作用により柔軟に構造変化させることで多様な機能を発現するタンパク質であり、その構造制御は創薬医学の分野で注目されている。しかし IDP はその柔軟性ゆえに構造解析が困難であり、IDP が他のタンパク質表面で構造を固定する仕組みは未解明のままである。本研究では、著者らが開発した無細胞タンパク質結晶化技術(Cell-free protein crystallization; CFPC)を用いて、¹ IDP の構造解析スクリーニング法を確立し、IDP の構造決定に必要な分子間相互作用を解析した。² CFPC では 100 μ L スケールのコムギ胚芽無細胞タンパク質合成反応を用い、24 時間以内に高分解能の結晶を取得できる。² これまでも細胞内タンパク質結晶である多角体(polyhedra crystal; PhC)を鋳型とした標的タンパク質の構造決定に成功しており、³ PhCを融合タグとした様々なタンパク質標的への応用が期待できる。

1) S. Abe, et al., *Sci. Rep.*, 12, 16031 (2022).

2) M. Kojima, et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 121, e2322452121 (2024).

3) M. Kojima, et al., *Biomater. Sci.*, 11, 1350-1357 (2023).