

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06968

研究課題名(和文) コンフォメーション固定化抗体を用いた哺乳類の胆汁酸輸送体の結晶構造解析

研究課題名(英文) Crystallographic study of the mammalian bile acid transporter NTCP in complex with its conformation-specific antibodies

研究代表者

野村 紀通(Nomura, Norimichi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10314246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：NTCPは細胞膜の内外でのナトリウムイオン濃度勾配を利用して胆汁酸の腸肝循環を駆動する膜タンパク質であり、高脂血症治療薬の標的として重要である。本研究ではNTCPの結晶構造を解明し、構造に基づく医薬品の分子設計に欠かせない立体構造情報を得ることをめざした。  
熱安定性と分子サイズの単分散性が良好なNTCP変異体、ならびにNTCPに対する立体構造認識抗体を作製し、結晶化に適したNTCP精製標品の調製条件を確立することに成功した。現在、このNTCP変異体と立体構造認識抗体の複合体の結晶化条件を探索中である。

研究成果の概要(英文)：High cholesterol levels greatly increase the risk of cardiovascular disease. By its conversion into bile acids, about 50% of cholesterol is eliminated from the body. However bile acids released from the bile duct are constantly recycled, being reabsorbed in the intestine via sodium dependent bile acid transporters. ASBT and NTCP, both of which are SLC10 (Sodium bile acid co-transporter family) members, have received attention as a new target of therapeutic drugs. In this study, our efforts have been devoted to crystallization of the mammalian NTCP in complex with its conformation-specific antibody fragments.

A number of NTCP mutants that show high thermostability and monodispersity on size-exclusion chromatography (SEC) have been isolated. In addition, a total of six clones of antibodies that specifically recognize conformational epitope on the NTCP have been developed. Crystallization screening of the NTCP mutant-Fab complex is currently underway.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜タンパク質 抗体 X線結晶構造解析 創薬ターゲット 高脂血症 胆汁酸 トランスポーター コレステロール

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の二位と三位を占める心疾患および脳血管疾患の発症・増悪の主要な原因は、血中のコレステロール濃度の過剰な上昇（高脂血症）である。現在、臨床で主に用いられている高脂血症薬はコレステロールの合成を阻害するものであるが、患者によっては肝障害の副作用が起こることが知られており、異なる薬理機序をもつ治療薬の開発が望まれている。

コレステロールは肝臓で胆汁酸に変換された後に腸から排泄されるが、その大部分は小腸上皮から再吸収され、血液を通して肝臓に戻され再利用されている（腸肝循環；図1）。

ヒト・哺乳類のナトリウム依存性胆汁酸輸送体 NTCP (SLC10A1) および ASBT (SLC10A2) は、肝細胞および小腸上皮細胞に発現し胆汁酸の再吸収を担う膜蛋白質であるが、その機能を阻害剤により抑えることにより、肝臓における胆汁酸の合成が促進され、血中コレステロール濃度が低下することが知られている。このため胆汁酸輸送体は高脂血症治療薬の新たな分子標的として有望視されている。

胆汁酸輸送体 ASBT の細菌ホモログの結晶構造は、本申請の連携研究者である岩田らによってすでに解かれているが、臨床での著効を示す阻害剤の分子設計・開発のためには細菌ホモログではなく、ヒト・哺乳類の胆汁酸輸送体の実構造データが必要である。しかしながら、研究開始時点において 3.5 Å以上の分解能で X 線結晶構造が解明されたヒト・哺乳類の膜輸送体はわずかに四例（ヒト・促進拡散グルコース輸送体 GLUT1、ウシ・ミトコンドリア ADP/ATP キャリア、ウシ・尿素輸送体およびヒト・ミトコンドリア ABC 輸送体）のみであり、膜輸送体の構造解析の難度は依然としてきわめて高い。国内・国外のいずれの研究グループも創薬標的として狙いを付けたヒト・哺乳類の膜輸送体の X 線結晶構造をオンデマンドで決定しうる技術水準には到達できておらず、精密立体構造に基づく膜輸送体標的創薬は未開拓のまま残されている。

一般に膜輸送体の結晶構造解析が難しい主な理由として、得られた精製試料中で複数の過渡的中間状態のコンフォメーション（基質輸送過程で生じる外向き一内向きのコンフォメーション間での動的平衡）が生じているため結晶化の成功率が低いことが

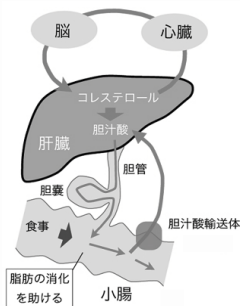


図1. 腸肝循環における胆汁酸輸送体の役割  
小腸上皮細胞における胆汁酸輸送体の機能を阻害すると、肝臓での胆汁酸合成が促進され、血液中のコレステロール濃度を低下させることができる。

挙げられる。また G 蛋白質共役受容体 (GPCR) の結晶構造解析では、構造的に揺らぎが大きい GPCR の細胞内第三ループ (ICL3) を T4 リゾチームやアポシトクロム *b<sub>562</sub>*RIL (BRIL) で置換した融合タンパク質を作製して親水性ドメインを拡張し結晶性を向上させるという戦略が多用されるのに対して、同様の融合タンパク質戦略を膜輸送体に適用するのは個々のターゲットについて膨大な試行錯誤を必要とするため、事実上困難である。さらに GPCR とは異なり、膜輸送体には高親和性の内在性リガンドが天然に存在しない場合が多い。これらのことが安定な膜輸送体精製試料の取得・結晶化をより難度の高いものに行っている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類のナトリウム依存性胆汁酸輸送体 NTCP の結晶構造解析である。上記の背景に基づいて本研究では、野生型と比べてコンフォメーション平衡に顕著な偏りを生じさせた変異型輸送体（コンフォメーション遷移状態アナログ）とコンフォメーション固定化抗体を独自に作製し、胆汁酸輸送体—抗体複合体結晶の構造解析を行う。

### 3. 研究の方法

本研究では以下の(1)、(2)に述べた二つの方法により、結晶化に適した NTCP 精製試料の調製を進めた。熱安定性が改善された NTCP 変異体については、(3)に述べた方法で NTCP 単体の大量精製を行った。さらに(4)で述べた方法により、NTCP-抗体フラグメント複合体の精製を行い、結晶か実験に供した。

#### (1) 熱安定性が高く分子サイズ分布の単分散性の良好な変異体の作製

膜タンパク質精製サンプルの構造の均一性はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) における溶出ピークの単分散性という指標で評価できる。NTCP が様々なコンフォメーションを取ることが熱安定性や単分散性の低下に関与するため、既報の輸送活性低下変異体や、NTCP と同じファミリーに属する ASBT の細菌ホモログの結晶構造から Na<sup>+</sup> 結合に必要と推測される残基を置換した変異体を作製した。単分散性は蛍光サイズ排除クロマトグラフィー (FSEC) や SEC におけるピークの形状から、熱安定性は FSEC-TS や CPM assay で見積り可能な変性温度 (T<sub>m</sub>) で評価した。

#### ① NTCP の FSEC 分析

野生型および変異体 NTCP を発現させた細胞をガラスビーズにより破碎した。破碎液から超遠心で膜画分を回収し、界面活性剤を含む可溶性バッファーを加えて穏やかに攪拌することで可溶化した。可溶性溶液を超遠心し、上清をゲル濾過カラムにアプライした。発現宿主は、Sf9 または出芽酵母を用いた。

## ②NTCPのFSEC-TS分析

NTCP変異体発現させたSf9細胞から、上記①の可溶性溶液を調製し、35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 90°Cで10分間加熱した。サンプルを超遠心後、その上清をFSEC分析に供した。

## (2) 立体構造認識抗体の取得

抗体を結合させることにより親水性領域を拡大できると同時に、膜タンパク質のコンフォメーションを抗体が認識する特定のコンフォメーションに固定できる。以下の手順でNTCPに対する立体構造認識抗体を作製した。

### ①免疫・ハイブリドーマ作製

NTCP 変異体を組み込んだリポソーム溶液を、2週間おきに3回マウスの腹腔へ免疫した。最後の免疫から1週間後にマウスに頸椎脱臼により安楽死処置を行った。脾臓から脾臓細胞を採取し、PEG法によりハイブリドーマを作製した。

### ②一次スクリーニング (リポソームELISA)

NTCP 変異体を組み込んだリポソームを固相化したプレートを用意し、ハイブリドーマの培養上清、2次抗体溶液、TMB 溶液を順に加え、室温でインキュベートして十分に発色させた。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液で反応を停止させて 450 nmの吸光度を読み取り、NTCP変異体を組み込んだリポソームに結合するものを選出した。

### ③二次スクリーニング (リポソームELISA、および変性NTCPを標的としたELISA)

NTCP 変異体を組み込んだリポソーム、変性させた NTCP 変異体、空リポソームそれぞれを固定化させたプレートを用意し、一次スクリーニングと同様に ELISAを行った。NTCP 変異体を組み込んだリポソームには結合するが、変性させたNTCP変異体やからリポソームには結合しないものを選出した。

### ④三次スクリーニング (FSECによるNTCP-抗体複合体形成試験)

NTCP 変異体とハイブリドーマ培養上清、蛍光標識2次抗体溶液を混合し、ゲル濾過カラムにアプライした。NTCP変異体を除いた時と比べ、ピークがシフトするものを選出した。

### ⑤モノクローン化・Fab 精製

ハイブリドーマを限界希釈してモノクロー化し、10日間培養した後、培養上清を回収した。培養上清をProtein Gカラムにアプライしてタンパク質を吸着させ、binding buffer、Elution bufferの順に加えた。クロマトチャートを参考に溶出画分を回収した。回収した画分はPapainで消化し、ゲル濾過カラムにアプライした。クロマトチャートを参考に回収したサンプルをProtein Aカラムへアプライ、未吸着画分とbinding bufferによる洗浄画分を回収し、精製サンプルとした。

## ⑥NTCP変異体-Fab 複合体の熱安定性評価

NTCP変異体にモル比で2倍量のFabを加え、氷上で静置した。これをCPM assayにかけ、熱安定性を評価した。

## (3) NTCP単体の精製

### ①NTCPの発現、膜画分の調製

NTCP変異体Sf9 に発現させた。回収したSf9はHypotonic bufferで懸濁し、ダウンス型ホモジナイザーで細胞を破碎した後、超遠心で沈殿を回収した。回収した沈殿に対して同様の操作を、High osmotic bufferで2回行った。最後に沈殿をHypotonic buffer + 40% Glycerolで懸濁し、液体窒素で凍結して保存した。

### ②可溶性

解凍した膜画分に可溶性バッファーを加え、ダウンス型ホモジナイザーで懸濁した後、攪拌して可溶化した。これを超遠心にかけて上清を回収した。

### ③Ni アフィニティクロマトグラフィー (IMAC)

Ni カラムへサンプルを移して未吸着画分を回収した。その後、Ni wash 1 buffer、Ni 2 buffer、Ni elution 1 bufferを順に加え、それぞれの画分を回収した。

### ④抗FLAG M1 モノクローナル抗体アフィニティクロマトグラフィー

溶出画分に終濃度 2 mM となるようにCaCl<sub>2</sub>溶液を加えた後、抗 FLAG 抗体カラムへ移して未吸着画分を回収した。その後FLAG wash buffer、FLAG elution 1 buffer、Flag elution 2 buffer を順に加え、それぞれの画分を回収した。

### ⑤TEV プロテアーゼによる His タグの除去と PNGase F による糖鎖の除去

2 つの溶出画分を回収し、His6タグ付きのTEVプロテアーゼとPNGase F を加え、一晚4°Cで攪拌した。

### ⑥リバースIMAC

サンプルを回収して終濃度 10 mM となるようにイミダゾール溶液を加えた後、Ni カラムに移して未吸着画分を回収した。そこへFLAG elution buffer、Ni elution 2 buffer を順に加え、それぞれの画分を回収した。

### ⑦SEC

未吸着画分と FLAG elution bufferによる洗浄画分をゲル濾過カラムにアプライした。クロマトチャートを参考に画分を回収し、最終精製サンプルとした。

## (4) NTCP 変異体-Fab 複合体の精製、脂質キュービック相(LCP)法による結晶化

NTCP 変異体にモル比で1.2倍量のFabを加えて氷上で静置し、ゲル濾過カラムにアプラ

いた。クロマトチャートを参考に画分を回収し、濃縮したものを結晶化サンプルとした。結晶化はLCP サンドイッチ法により行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 野生型 NTCP の精製

野生型NTCPのFSECと精製時のSECの結果を図2に示した。FSECでは比較的良好な単分散性を示したが、精製時の濃縮で凝集したことが分かった。野生型NTCPは安定性が低く、結晶化のために安定な変異体を作製する必要性が示唆された。

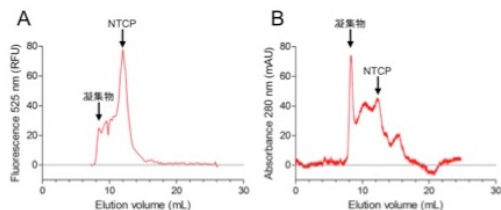


図2. 野生型NTCPの性状分析、および精製  
(A) 野生型NTCPのFSEC。一部に凝集物も見られるが、比較的良好な単分散性を示している。  
(B) 野生型NTCPの精製最終段階のSEC。精製物の大半が凝集している。

##### (2) NTCP 変異体の作製・精製

NTCP 変異体を16種作製し FSEC を行ったところ、10変異体で野生型より良好な単分散性が見られた。これらの変異体について FSEC-TSを行い、各回で熱安定性が高いものを計5種類選出した。これらを精製し、CPM assayに供した。最も熱安定性が高かった点変異体Aを、結晶化に向けた基本コンストラクトとした。この変異体Aは精製時のSECと SDS-PAGEの結果 (図3) から、良好な単分散性と純度を確認できた。培地1 L当たりの収量は約0.4 mgであった。

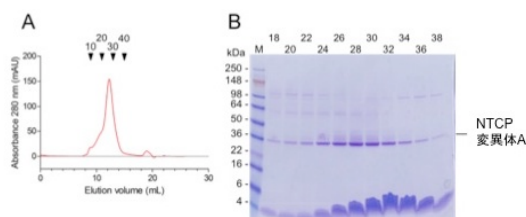


図3. NTCP変異体Aの精製  
(A) NTCP変異体Aの精製最終段階のSEC。  
(B) SECの画分のSDS-PAGE分析。

野生型 NTCP は精製途中で凝集を起こすほど不安定であったが、点変異を導入することで、野生型より熱安定性が高く単分散性も良好な安定化変異体の作製に成功した。変異導入残基は、ASBT細菌ホモログの結晶構造からNa<sup>+</sup> 結合部位を形成すると予測されるアミノ酸残基であった。そのため、NTCP変異体Aは精製サンプル内で取りうる構造が野生型NTCPと比べて制限されており、熱安定性や単分散性が向上したと考えられる。

また、NTCP変異体Aの精製方法も確立した。FLAGタグを用いた精製やPNGase F処理という手順を加えることで、結晶化を行うのに十分な純度の最終精製サンプルが得られるようになった。

##### (3) NTCP 変異体-Fab 複合体の精製・LCP 法による結晶化

NTCP変異体A-Fab 複合体の SECと SDS-PAGEの結果を図4に示す。NTCP変異体Aに対する立体構造認識抗体の取得にも成功した。抗体の利用により、親水性領域を拡大するだけでなく構造のゆらぎをほぼ完全に固定できたと考えられる。NTCP変異体A-Fab複合体を LCP法による結晶化条件のスクリーニングに供したが、現在ひきつづき結晶化条件を見いだすべく研究を続けている。

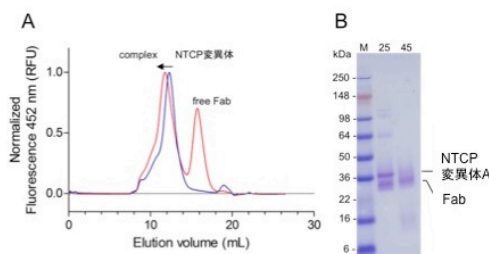


図4. NTCP変異体A-Fab複合体の精製  
(A) NTCP変異体A-Fab複合体の精製最終段階のSECパターン(赤色の線)とNTCP変異体A単体のSECパターン(青色の線)の比較。Fab添加により高分子側へのピークシフトが見られることから、複合体形成が確認された。  
(B) SECの画分のSDS-PAGE分析。画分番号25は複合体の溶出ピーク、画分番号45はFab単体の溶出ピークに相当する。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

① Ono, M., Horita, S., Sato, Y., Nomura, Y., Iwata, S., Nomura, N. "Structural basis for tumor necrosis factor blockade with the therapeutic antibody golimumab" *Protein Science* 27: 1038-1046, 2018 年, 査読あり  
DOI: 10.1002/pro.3407

② Nagarathinam, K., Jaenecke, F., Nakada-Nakura, Y., Hotta, Y., Liu, K., Iwata, S., Stubbs, M.T., Nomura, N., Tanabe, M. "The multidrug-resistance transporter MdfA from Escherichia coli: crystallization and X-ray diffraction analysis" *Acta Crystallographica F* 73: 423-430, 2017 年, 査読あり  
DOI: 10.1107/S2053230X17008500

③ Nomura, N., Iwata, S., Drew, D. "Mechanistic insights from conformational ensembles of the mammalian fructose transporter GLUT5"

SPring-8/SACLA Research Frontiers 2016, pp. 20-21, 2017 年, 査読なし

④ Horita, S., Nomura, Y., Sato, Y., Shimamura, T., Iwata, S., Nomura, N. “High-resolution crystal structure of the therapeutic antibody pembrolizumab bound to the human PD-1” Scientific Reports 6: 35297, 2016 年, 査読あり  
DOI: 10.1038/srep35297

⑤ Nomura, Y., Sato, Y., Suno, R., Horita, S., Iwata, S., Nomura, N. “The intervening removable affinity tag (iRAT) production system facilitates Fv antibody fragment-mediated crystallography” Protein Science 25: 2268-2276, 2016 年, 査読あり  
DOI: 10.1002/pro.3035

⑥ 野村紀通, 岩田想「哺乳類フルクトース輸送体 GLUT5 の構造と分子機構」日本結晶学会誌 58: 133-138, 2016 年, 査読なし

⑦ Nomura, N., Verdon, G., Kang, H.J., Shimamura, T., Nomura, Y., Sonoda, Y., Hussien, S.A., Qureshi, A.A., Coincon, M., Sato, Y., Abe, H., Nakada-Nakura, Y., Hino, T., Arakawa, T., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Murata, T., Kobayashi, T., Hamakubo, T., Kasahara, M., Iwata, S., Drew, D. “Structure and mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5” Nature 526: 397-401, 2015 年, 査読あり  
DOI: 10.1038/nature14909

[図書] (計 2 件)

① Jaenecke F., Nakada-Nakura, Y., Nagarathinam, K., Ogasawara, S., Liu, K., Hotta, Y., Iwata, S., Nomura, N., Tanabe, M. “Generation of conformation-specific antibody fragments for crystallization of the multidrug resistance transporter MdfA” (Methods Molecular Biology, Vol. 1700, Yamaguchi, A. and Nishino, K. (Eds.) “Bacterial Multidrug Exporters”) 97-109, 2018 年  
DOI: 10.1007/978-1-4939-7454-2\_7

② 野村紀通, 岩田想「基礎研究 第 4 章 GLUT5 の立体構造とフルクトース輸送機構」(門脇孝 編『糖尿病学 2016』) 診断と治療社, pp. 28-34, 2016 年

[その他]

ホームページ:

<http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

野村 紀通 (NOMURA, Norimichi)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 10314246

### (2)連携研究者

岩田 想 (IWATA, So)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 60452330

島村 達郎 (SHIMAMURA, Tatsuro)  
京都大学・大学院医学研究科・特定講師  
研究者番号: 90391979