

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570201

研究課題名(和文)膜中におけるバンド3タンパク質の構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of band 3 in the membrane

研究代表者

平井 照久(Hirai, Teruhisa)

沖縄科学技術大学院大学・その他の研究科・研究員

研究者番号：10450412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：バンド3の二次元結晶の改良を試みた。外向きに固定したバンド3では従来ベシクル状の結晶は得られていた。より分解能の向上を望めるシート状結晶を頻度よく得るために、精製条件から再検討した。特に精製標品に見られるグリコフォリンA(GPA)やアクアポリン-1等のマイナーなコンタミの除去を行った。内向きに固定したバンド3の精製も行い安定性を評価した。これらの結晶化とは異なるアプローチも行った。バンド3とGPAとの複合体に結合することが知られているモノクローナル抗体を精製に利用した。このモノクローナル抗体はWright抗体と呼ばれ、バンド3、GPAおよびWright抗体の三者複合体を精製することができた。

研究成果の概要(英文)：We tried to improve the quality of two-dimensional crystal of band 3. We had already got vesicle-like crystals of outward-open band 3 but we tried to get sheet-like crystals to achieve higher resolution. For this purpose, we checked the quality of the sample carefully. We tried to eliminate minor contamination bands that probably corresponded to glycophorin A (GPA) and aquaporin-1. We also checked the stability of purified inward-open band 3 to seek for the other conformation. Besides crystallization efforts of band 3, we tried to purify the band 3 complex. We used Wright monoclonal antibody, which is known to bind to the band 3 and GPA complex, and we were able to get the purified band 3/GPA/Wright monoclonal antibody triple complex.

研究分野：電子線結晶学

キーワード：赤血球 バンド3 AE1 二次元結晶 電子線結晶学

1. 研究開始当初の背景

バンド3はヒト赤血球膜内在性タンパク質のおよそ50%を占める分子量約10万の膜タンパク質である。細胞質ドメインと膜貫通ドメインから成り、細胞質ドメインは赤血球の裏打ちタンパク質が結合するための足場を提供する。膜貫通ドメインは膜を介した重炭酸イオン(HCO_3^-)と塩素イオン(Cl^-)の交換輸送を行い、ガス交換において重要である(Hamasaki N *et al*, *Vox Sang*, 2000)。1970年代以降多くの研究がなされ、可溶化した場合には二量体を形成すること (Casey JR & Reithmeier RA, *J. Biol. Chem.*, 1991)、速度論的研究から陰イオンを1対1で交換輸送すること (Passow H, *Rev. Physiol. Pharmacol.*, 1986)、阻害剤を用いた研究から陰イオン透過には外向き型と内向き型の2つの構造変化が伴うことが示されている (Izuhara K *et al*, *Biochemistry*, 1989)。バンド3の構造を明らかにするために長年多くのグループが結晶構造解析を試みてきたが、Wang らの電子線結晶構造解析による20Å分解能の報告 (Wang DN *et al*, *EMBO. J.*, 1994) を最後にしばらく進展がなかった。我々も二次元結晶化法を試み、阻害剤の1つである H_2DIDS を架橋剤として用いることにより外向きに固定された安定な試料が得られ、まず細長い螺旋対称結晶の作成に成功し20Å程度の構造を得 (Yamaguchi T, *et al*, *J. Struct. Biol.*, 2010)、次に二次元結晶として解析できるチューブ状結晶から低分解能 (7.5Å) の立体構造を得た (Yamaguchi T *et al*, *J. Mol. Biol.*, 2010)。我々が得た三次元構造から以下のことが議論された。

- ① 2量体を基本単位として二次元結晶を形成している。
- ② 膜面に対し凹凸の大きい構造をしている。
- ③ 分子内に特徴的な反平行 V 字モチーフが存在する。
- ④ V 字モチーフはClC型塩素イオン輸送体の

ものと類似している。

ちなみにバンド3の変異は東南アジア型楕円赤血球症 (SAO) や遠位尿細管性アシドーシス (dRTA) などの遺伝病を引き起こす。バンド3はマラリアへの感染のし易さにも影響し、遺伝病のSAOは一方でマラリアに対する耐性を有することも分かって来た (Wrong O. *et al*, *Kidney Int.*, 2002, Kittanakom S *et al*, *Biochem. J.*, 2008)。

2. 研究の目的

二次元結晶化法は、精製した膜タンパク質を脂質二重膜中に再構成して結晶化するため、膜タンパク質本来の環境に近い条件下で結晶化できる。また極低温電子顕微鏡法を用いることにより電子線照射による試料損傷を最小限に抑えることができ、水チャネルタンパク質 Aquaporin-0 のように、高分解能での構造解析も可能である (Gonen T, *et al*, *Nature*, 2005; 1.9Å 分解能)。バンド3の既知の構造 (7.5Å) では未だいくつかのヘリックスがはっきり見えていないため、引き続きデータ数を増やし中程度の分解能 (6Å 程度) を達成する。V 字モチーフについてはClC型塩素イオン輸送体との類似性を議論したが (Yamaguchi T *et al*, *J. Mol. Biol.*, 2010) その関係も明確にしたい。外向きについてはさらにシート状の二次元結晶の改良を行い、最終的には残基位置が特定できる高分解能 (3.5Å 程度) での構造解析を目指す。また内向きの構造を解析するために H_2DIDS とは異なる阻害剤である DEPC (Izuhara K *et al*, *Biochemistry*, 1989) を使用して二次元結晶化を行う。本研究により以下を明らかにする。

- ① バンド3のヘリックスパッキング
- ② ClC型塩素イオンチャネルとの比較
- ③ 外向きと内向きとの間の構造変化

3. 研究の方法

現在外向きバンド3の構造解析にはベシクル状結晶を使用している。まず電顕像を追加収集して、6Å分解能での構造解析を完了しヘリックスパッキングを確定する。さらにより高分解能が期待できる外向きのシート状結晶の結晶性および出現頻度を向上させ、残基位置を議論できる 3.5Å程度の分解能で構造解析を行う。シート状結晶の最適化のために結晶化時の界面活性剤と脂質を再検索する。平行して内向きの構造解析を進めるために現在使用している H₂DIDS とは別の阻害剤 DEPC (Izuhara K *et al*, *Biochemistry*, 1989) を用いる。界面活性剤や脂質の工夫で結晶を改良できなかった場合は、抗体の利用を検討する。生化学的な実験からはバンド3内にかなりフレキシビリティが高い部分が存在することが予期されており、抗体で対処できる可能性がある。精製したバンド3は連携研究者である長崎国際大学薬学部の濱崎直孝先生のグループから提供を受けた。

4. 研究成果

(1) 外向き型

分解能を向上させるためにシート状結晶の作製に取り組んだ。まずは精製標品の再評価を行った。最終標品の電気泳動を行い銀染色による精製度のチェックを行った。その結果グリコフォリンAやアクアポリン-1等のマイナーなコンタミバンドを検出した。より精製度を向上させるためにイオン交換クロマトグラフィの溶出条件 (NaCl グラジエント勾配、ピークフラクションの取り方等) の最適化に取り組んだ。しかし精製バッチごとによるコンタミバンドの量の変化があったものの、バンドパターンには変化がみられなかった。これは B3MD とマイナーバンドの溶出保持時間がほぼ同じであるとともに、クロマトグラフィの条件以外にもコントロールできていない条件があることが考えられた。そこで以下2つのアプローチについて二次元結晶化と並

行して実験を行った。

① クロマトグラフィ操作の前段階であるグリコフォリンAの選択的可溶化条件と塩析条件の最適化

データを積み上げるにつれて、選択的可溶化条件は最終標品の収率に直接影響がある事がわかってきた。その結果現在のところ、C12E8の濃度を0.04%と塩析の塩濃度を終濃度で0.5 Mとした時に収率がもっとも良くなった。これらの最適化によってグリコフォリンAのコンタミは改善したが、アクアポリン-1のコンタミを改善する事はできなかった。

② その他のクロマトグラフィによる精製度の改善

クロマトフォーカシングによる条件検討を行ったがアクアポリン-1のコンタミは改善されなかった。一方ヒドロキシアパタイトカラムによるクロマトグラフィでは、アプライ量の半分以上がフロースルー画分になってしまったものの、カラムに吸着した画分にはアクアポリン-1のバンドは含まれなかった。

(2) 内向き型

内向き型 B3MD の二次元結晶の作製に取り組んだ。サンプルは長崎国際大学薬学部濱崎グループから提供を受け、DEPC阻害剤によって His834 を修飾し B3MD を内向きに固定化 (内向き型) したものである (Xiu *et al.*, *Biochemistry* 2003, Takazaki *et al.*, *J. Biochem.* 2006)。二次元結晶化は H₂DIDS によって架橋された B3MD (外向き型) の結晶化方法を踏襲すると2週間程度かかる。まずは外向き型の結晶化条件で二次元結晶化を試した。ボタン式透析で結晶化をセットアップし、2週間後に沈殿物を回収し負染色後、電子顕微鏡による観察を行ったがアグリゲーションのみであった。この結果を踏まえ、内向き型の安定性はそれほど高くないと予想された。そこで結晶化時間を短縮するため、カセット式透析によって再度結晶化を行っ

たが結果はボタン式透析と同じであった。以上の結果から内向き型は外向き型に比べて安定性が低いことがわかってきた。そこで内向き型の最適結晶化条件を見いだすためにゲルろ過カラムにて安定性試験を行った。安定性試験の比較対象として外向き型を用いた。内向き型を4、13、23℃の3条件で保存し、途中でサンプリングしながらゲルろ過パターンを取得した。どの温度でも経過日数に依存してダイマー画分のピークが減少した。具体的には4℃と13℃ではほとんど同じ減少パターン（一週間でピークの値の半分）を示したが、23℃では明らかに安定性が悪くなった（2日でピークの値の半分）。一方外向き型の二週間後におけるゲルろ過パターンはほとんど変わらなかった。

3) バンド3複合体

これまでの二次元結晶の改善の試みとは異なるアプローチも行った。バンド3とGPAとの複合体に結合することが知られているモノクローナル抗体であるWright抗体が存在する。結晶化への利用も考慮して、このモノクローナル抗体を利用した精製も試みたところ、バンド3、GPAおよびWright抗体の三者複合体を精製することができた。引き続き、論文に結果をまとめているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

- ①平井照久、山口知宏、臨床血液 7月号、2015 「ヒト赤血球膜タンパク質バンド3の構造 -膜貫通ドメインの二次元結晶構造解析-」

〔学会発表〕（計1件）

- ①平井照久 第76回日本血液学会学術集会 2014年10月 「ヒト赤血球膜タンパク質バンド3の構造」、大阪国際会議場

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 照久 (HIRAI, Teruhisa)
沖縄科学技術大学院大学・スタッフサイエンティスト
研究者番号：10450412

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

濱崎 直孝 (HAMASAKI, Naotaka)
長崎国際大学薬学部・教授
研究者番号：00091265