

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25650019

研究課題名(和文)LCP法とLSP法を併用した膜タンパク質の結晶構造解析

研究課題名(英文)Crystallization of membrane proteins by combined application of LCP and LSP methods

研究代表者

西澤 知宏(Nishizawa, Tomohiro)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80599077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質の結晶構造解析における、結晶化法の技術開発を行った。通常、膜タンパク質の精製、結晶化は界面活性剤により可溶化された不安定な条件で行われることが多かったが、近年モノアシルグリセロールの形成する特殊な連続相を用いて、脂質中で膜タンパク質を結晶化させるLCP法が、高分解能の結晶構造解析に有効であることが示されてきた。本研究ではLCP法と、その発展形であるLSP法を併用することで、比較的幅広いターゲットに対してこの技術を適用することができるようになり、Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体であるCAX、タイトジャンクション形成タンパクであるクローディンなどの構造解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a crystallization method for membrane proteins. Generally, membrane proteins are not stable in detergent micelles, disturbing the crystallization process. Recently Lipidic Cubic Phase (LCP) methods have been applied to obtain membrane protein crystals in lipid-like environment, which advances structural studies of membrane proteins. However its application range is limited to GPCRs and only a small number of other transporters. We found that LCP and its modified method LSP can be applied in combination to facilitate membrane protein crystallization and the application range is not limited. These techniques have lead to the successful crystallization of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (CAX), tight junction forming protein (claudin), and other membrane proteins.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析 膜タンパク質 結晶化

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の立体構造は、創薬のターゲットとしても重要であることから、多くの構造研究のターゲットとなっている。しかしながら、界面活性剤による可溶化などに伴い変性してしまうことが多く、結晶化を行うことが非常に困難であった。近年 GPCR の構造解析で多く用いられるようになった LCP (Lipidic Cubic Phase) 法では、モノアシルグリセロールなどの脂質が形成する特殊な連続層に膜タンパク質を再構成した状態 (*in-meso*) で結晶化を行うため、生体内に近い状態で構造解析を行うことができる。しかしながら、この技術を用いて結晶化を行うためには膜タンパク質のサイズなどの制限があり、その適用可能な膜タンパク質の種類は限られていた。

2. 研究の目的

本研究では、LCP 法とその発展形である LSP (Lipidic Sponge Phase) 法を併用することで、幅広い膜タンパク質に対して、*in-meso* 結晶化の技法を行うための方法論の開発を目的とした。LSP 法は LCP 法と類似の技術であるが、この技法の適用できる膜タンパク質のサイズは、LCP 法に比較して幅広いことが知られている。しかしながら、LSP 法を用いた結晶構造の報告は非常にわずかしか報告されてこなかった。その要因としては、ハイスループットで結晶化条件の検討を行うことが難しかったことが挙げられる。本研究では、LCP 法での結晶化条件をベースにして、LSP 法での結晶化条件の検討を行うことで、効率よく結晶化条件のスクリーニングを行い、幅広いターゲットに対して *in-meso* 結晶化法を適用することを目指すための結晶化技術法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 結晶化ロボットを使用することで、LCP 法の結晶化スクリーニングは 100 条件の結晶化プレートをわずか数分で仕込むことができるようになってきている。そこで、ハイスループットで行うことのできる LCP 結晶化スクリーニングを行い、微結晶の得られた条件をもとにしてバッファー、塩の種類などを選択し、LSP 法に適用することで、結晶化スクリーニングを効率よく行った。特に GPCR 以外の膜タンパク質において、*in-meso* 結晶化を行い、結晶化条件の探索を行った。

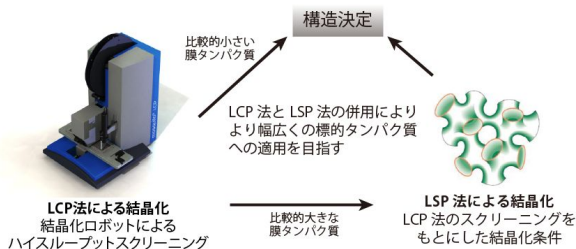


図1 *in-meso* 結晶化の流れ

(2) 複数種の膜タンパク質において *in-meso* 結晶化法のスクリーニングを行い、LCP、あるいは LSP 法による 10-200 $\mu$ m 程度の結晶を得た。このようにして得られた膜タンパク結晶を用いて、SPring-8 マイクロフォーカスビームライン BL32XU において回折実験を行うことで、構造解析のためのデータ収集を行った。

4. 研究成果

(1) CaCA (Calcium-Cation Antiporter) ファミリーに属する、原核生物由来の  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  交換輸送体の構造解析を行った。30 種の原核生物のゲノムから CaCA ファミリーに属するイオン交換輸送体遺伝子のクローニングを行い、大腸菌を用いて目的の輸送体を発現させた。試した中で最も挙動のよかった古細菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来の  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  交換輸送体 (CAX\_Af) を界面活性剤 DDM により可溶化した状態で精製を行い、精製タンパクを用いて LCP、LSP 法を併用した結晶化を行ったところ、300 $\mu$ m を越える非常に大きな結晶を得ることができた (図 2)。この結晶を用いて、SPring-8 マイクロフォーカスビームライン BL32XU において回折実験を行ったところ、2.3 $\text{\AA}$  の高分解能で構造解析を行うことに成功した (図 3)。

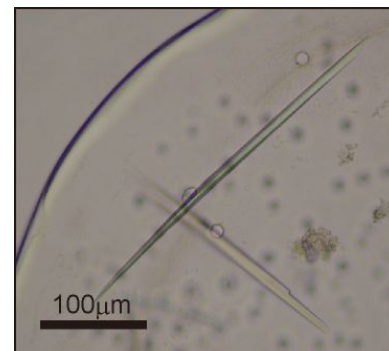


図2 CAX\_Af の結晶

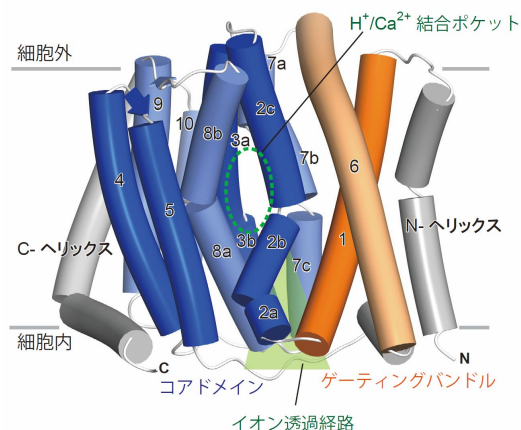


図3 CAX\_Af の全体構造

この CAX\_Af の構造から、CaCA ファミリーに保存されたモチーフである荷電性アミノ酸が、分子の中央に  $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  結合ポケットを形成

し、ゲーティングと呼ばれる二本のヘリックスが滑るような動きをすることで、この結合ポケットが細胞内外へ交互に向くことが明らかになった。さらに、変異体解析や、CaCAファミリーに属する他の輸送体との構造比較から、ゲーティングバンドルの構造変化は、輸送される基質イオンの結合と共役していることが示唆され、CaCAファミリーの持つ対向輸送の分子機構の一端を解明した。ヒトの持つCaCAファミリーの輸送体は心臓などにおけるCa<sup>2+</sup>制御の役割を持っていることから多くの病気との関わりが報告されているおり、CaCAファミリーにおける輸送機構に関する成果は将来的な創薬へとつながることも期待されることから非常に重要であり、Science誌に掲載された。さらに、第86回日本生化学大会のインターナショナルシンポジウムにおいて招待講演として英語での口頭発表を行った。

(2) 多細胞生物の表皮などにおける密着結合(tight junction)を形成するクローディンの構造解析を行った。人間を含む高等生物では、体表面を上皮細胞がシート状に覆うことで、外界との“シールド”を形成している。この上皮細胞のシートは、上皮細胞間における密着結合によって実現されているが、その基本構成要素となるクローディンと呼ばれる膜タンパク質がどのようにしてストランド状の密着結合を形成しているのかは、発見以来の謎であった。マウス由来のクローディン-15を、バキュロウィルスを用いて昆虫細胞で発現させ、界面活性剤による可溶化した状態で精製を行った。精製後のクローディン-15をモノオレイ脂質に再構成し、LCP法を用いて結晶化を行ったところ、柱状の結晶を得ることができた。SPRING-8マイクロフォーカスビームラインBL32XUにおいて回折実験を行ったところ、2.3 Åの高分解能で構造解析に成功した(図4)。

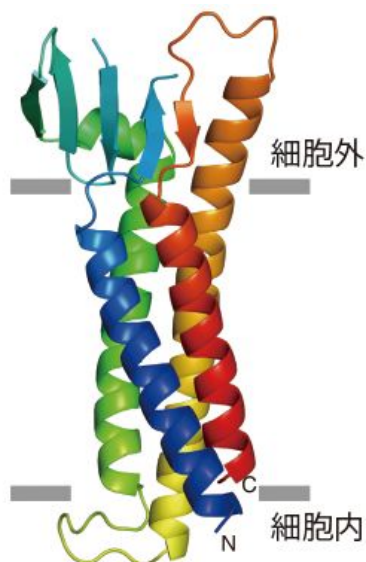


図4 マウス由来クローディン-15の構造

結晶中ではクローディン分子が脂質膜中で相互作用をしており、数珠つなぎに並んでいた(図5)。結晶中で観察された相互作用部位に変異を入れると、細胞中でのストランド形成が起こらなくなることが示されたことから、この相互作用は細胞内でのストランド形成、および密着結合の形成に重要であることが示された。

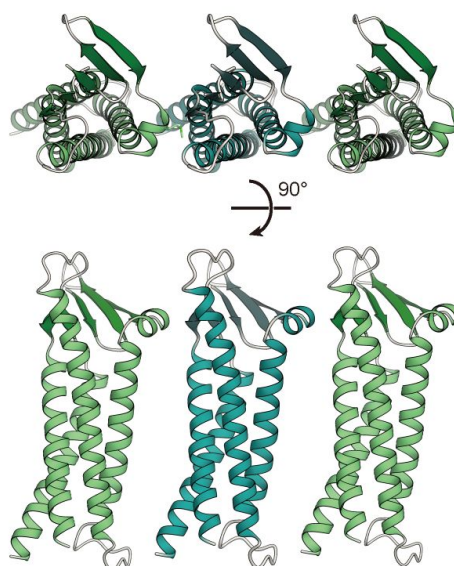


図5 結晶中のクローディンのストランド構造

密着結合は多くの高次生物における外界との壁(シールド)の役割を果たしており、今回の研究成果は、その分子機構の一端を解明し、今後の密着結合における研究のための手がかりとなるため、非常に重要な結果として、Science誌に掲載された。さらに、密着構造による上皮細胞シートは、血液脳関門でも物質交換の重要な役割を果たしているため、今回の成果は、将来的には血液脳関門を越えた薬のデリバリーの開発へとつながることも期待される。

(3) 上記のように、本研究を通して、*in-meso*での結晶化が膜タンパク質の構造解析の分野において非常に重要なツールとして働くことが示された。特にクローディンの研究においては、生体内での相互作用を結晶中で観察できた初めての例であることを強調しておきたい。本研究によって得られた、*in-meso*結晶化のスクリーニングの効率化により、今後さらに多くの膜タンパク質の構造解析へとつながることが期待される。一連の研究成果は、平成25年度日本結晶学会年会および総会において招待講演として呼ばれて発表を行ったことから、その重要性が認識されている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions., Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, Dohmae N, Tsukita S, Nureki O, Fujiyoshi Y., Science, 査読有、344 巻、2013、304-307

Structural basis for the counter-transport mechanism of a  $H^+/Ca^{2+}$  exchanger., Nishizawa T, Kita S, Maturana AD, Furuya N, Hirata K, Kasuya G, Ogasawara S, Dohmae N, Iwamoto T, Ishitani R, Nureki O., Science, 査読有、341 巻、2013、168-172

〔学会発表〕(計 2件)

LCP 結晶化ノウハウ、西澤 知宏、平成 25 年度 日本結晶学会年会および総会(招待講演)、2013 年 10 月 13 日、熊本大学(熊本)

プロトン・カルシウム交換輸送体における構造基盤、西澤 知宏、石谷 隆一郎、古屋 憲孝、喜多 紗斗美、岩本 隆宏、アンドレアス マツラナ、瀧木 理、第 86 回日本生化学大会インターナショナルシンポジウム(招待講演)、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西澤 知宏 (NISHIZAWA, Tomohiro)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：80599077