

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370035

研究課題名 (和文) バンド3の三次元結晶構造解析と陰イオン透過分子機序の解明

研究課題名 (英文) Crystal structure of human Band3 (anion exchanger)

研究代表者 小林 拓也 (KOBAYASHI TAKUYA)  
京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20311730

研究成果の概要 (和文)：2000 年以降、濱崎らはヒト赤血球よりバンド 3 の膜貫通ドメインを単一に精製する方法を確立し、2005 年から小林らとバンド 3 の結晶構造解析に向けて共同研究がスタートした。2008～2010 年の基盤研究 (B) (代表者 小林) では、バンド 3 に対する構造認識抗体を作製し、アニオン輸送の阻害剤を噛ませて外向き型に固定化したバンド 3 / 抗体 (Fab) 複合体を結晶化した。その結果、マイクロフォーカスビームやピクセル検出器を用いた低振動角測定 / ラインスキャンをはじめとしたビームラインの特長を生かして 3.4Å を超える分解能でデータを収集することに成功した。現在、分解能 3.4Å の電子密度図に対しモデル構築と精密化を進めている。

研究成果の概要 (英文)：Anion exchanger (AE) gene family consists of four members, AE1-4. These AE proteins are present in most cells and regulate intracellular pH and chloride (Cl<sup>-</sup>) by the exchange transport of anions across membranes. Band 3, designated AE1, is the major integral membrane protein of the red blood cells and intercalated cells of the distal and collecting tubules of the kidney. Band 3, consisting of 911 amino acids, has two principal structural domains. Its 40 kDa N-terminal domain in the cytoplasm binds the red blood cell skeleton proteins and has a role in maintaining the shape of erythrocytes. While the membrane domain of human erythrocyte Band3 works as a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> antiporter. This exchange is a key step for CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> circulation in the blood. In spite of their importance, structural information about Band3 is still unknown. We used X-ray crystallography to solve the three-dimensional structure of Band3, fixed in an outward-open conformation by cross-linking, at 3.4 Å resolution. Band3 are formed as a dimer in complex with Fab fragments. There are V-shaped densities near the center of the dimer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：X線結晶解析

## 1. 研究開始当初の背景

1974年 Cabantchik と Rothstein によって、世界で初めて赤血球に発現する陰イオン透過性分子としてバンド3が同定された (J. Membr. Biol. 15, 207-48)。バンド3は赤血球膜タンパク質の25%を占める主要膜タンパク質であり、世界中でこれまで30年以上、多くの研究者によって研究がなされている。赤血球膜タンパク質バンド3は、陰イオン交換トランスポーター(Anion Exchanger)ファミリーの一員であり、Cl<sup>-</sup>とHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>など一価の陰イオンを交換輸送することが知られている (Fig.1.A)。陰イオン交換トランスポーターは赤血球だけでなく、あらゆる細胞の細胞膜に存在しており、赤血球と腎臓尿管上皮細胞に存在する Anion Exchanger 1 (AE1)、普遍的に細胞に存在する Anion Exchanger 2 (AE2)、脳と心臓の細胞膜に存在する Anion Exchanger 3 (AE3)とに分類されている。バンド3 (AE1)は分子量約100 kDaで、大きく二つのドメインから構成されている (Fig.1.B)。バンド3は細胞質に突出したN末ドメイン(40kDa)を介して、アンキリンやスペクトリンなどの細胞骨格タンパク質ネットワークを細胞膜に繋ぎ止め、赤血球の形態を維持している。また、膜貫通部分であるC末ドメイン(55kDa)はCl<sup>-</sup>とHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の交換反応を司り、炭酸脱水素酵素と協調して組織や細胞の必要酸素量を検出するメタボリックセンサーとして機能し赤血球の酸素と二酸化炭素運搬に必須の役割を果たしている (Fig.1.A)。従って、C末ドメインの構造異常は陰イオン透過活性だけでなく細胞膜裏打ちタンパク質ネットワーク全体の破綻にも結びついていると考えられる。実際、バンド3異常で溶血性貧血がおこる原因のかなりの部分が細胞膜貫通ドメインの不安定化と推測されている。我々はバンド3の膜貫通ドメインの立体構造を解明し、バンド3タンパクの陰イオン透過機構の解明を目的としている。

バンド3の三次元結晶構造の解析に関する国内・国外の研究動向については、1995年に Sekler らが *Saccharomyces* を用いてヒトバンド3の大量発現・精製に成功した (J. Biol. Chem. 270, 21028-34)。2000年には、Zhang らが親水性のN末端ドメインを *E. coli* で発現、精製、結晶化し、2.6Åの分解能で結晶構造を解明した (Blood 96, 2925-33)。さらに、2002年には Lemieux らがヒト赤血球から精製した

バンド3のC末ドメインを結晶化し、14Åの分解能を持った結晶を作製した (J. Struct. Biol. 37, 322-32)。しかし、これまでにヒトおよびその他の種のバンド3ホモログでC末の膜貫通ドメインの結晶構造は解明されていない。このような状況の中、濱崎と康らは、1980年代から生化学および分子生物学的手法を用いてバンド3の陰イオン透過分子機序の解明を試みてきた。その結果、陰イオンの取り込み活性に重要なアミノ酸をいくつか同定することに成功した (Okubo K, J. Biol. Chem. 269, 1918-26, 1994, Kanki T, J. Biol. Chem. 278, 5564-73, 2003, Abe Y, J. Biochem. 36, 97-106, 2004, Takazaki, J. Biochem. 139, 903-12, 2006, Jin XR, Biochemistry 42, 12927-32, 2003)。

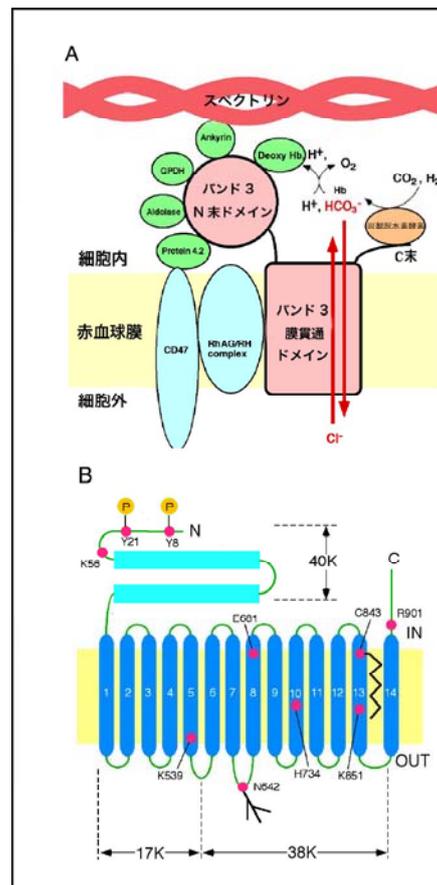


Fig. 1A 赤血球膜タンパク質バンド3の模式図, B バンド3タンパク質の予測される二次構造.

しかし、生化学的に重要なアミノ酸の同定だけでは詳細な陰イオン透過分子機序の解明には至らず、さらに構造生物学的アプローチを試みることとなった。2000年以降、濱崎、

康らはヒト赤血球よりバンド3の膜貫通ドメインを単一に精製する方法を確立し、2005年から岩田 想教授（現 京都大学 医学研究科）指導の下、研究代表者である小林とバンド3の結晶構造解析に向けて共同研究がスタートした。バンド3は糖鎖修飾された膜タンパク質で、糖鎖が残存すると結晶化しない。小林らはさらに精製方法を改良することでより完全に糖鎖を切断する方法を確立し、5-6Å程度の分解能のある三次元結晶の作製に成功した（Fig.2）。

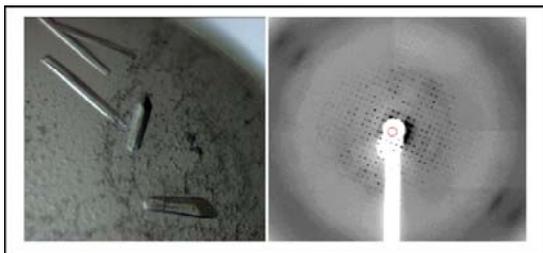


Fig.2 バンド3の結晶と回折データ。

## 2. 研究の目的

赤血球膜タンパク質バンド3は大きく二つのドメインからなる。N末の親水性ドメインとC末の膜貫通ドメインである。即ちバンド3は、N末ドメインにより細胞骨格タンパク質群と結合し、C末ドメインにより細胞膜に安定にアンカーする陰イオン交換トランスポーターである。本研究はバンド3の三次元結晶構造を明らかとし、構造を基盤としたバンド3の陰イオン透過分子機序の解明を目指している。

第一にヒト赤血球から精製したバンド3を用いて3Å以上の分解能を持った結晶を得て構造を決定する。膜タンパク質を結晶化するには、界面活性剤のミセル中に膜タンパク質を取り込んだ状態で結晶化する必要がある。この状態では膜タンパク質の疎水的な表面は特定の構造をもたないミセルで覆われているため、結晶格子の形成に寄与できない。従って膜の外に飛び出した親水性部分が大きい膜タンパク質ほど結晶化しやすい傾向がある。そこで、以下の項目について順次検討を行う。

- 1) バンド3の三次元結晶化に適した界面活性剤を探索するために、多種類の界面活性剤について順次精製用界面活性剤と置換し、結晶化スクリーニングに持って行く。
- 2) 抗バンド3モノクローナル抗体のFabフラグメ

ントと精製バンド3を共結晶することで親水性部分を拡大し、結晶化効率の向上を試みる。抗体フラグメントを用いて膜タンパクを結晶化する技術は、1995年、岩田らによって世界で初めて開発された（Nature 376, 660-669）。既に小林らは、共結晶に適したモノクローナル抗体Fabフラグメントを数種類作製し、これらがバンド3と安定な複合体を形成する（Fig.3）。これらの抗体を用いて結晶化条件を最適化する。

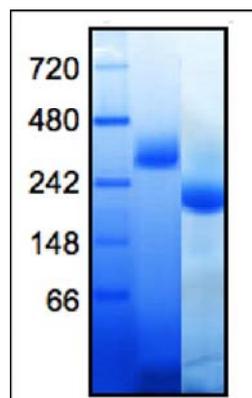


Fig.3 バンド3(右)とバンド3+Fab複合体(左)のNative-PAGE。

第二に酵母発現系 (*Pichia pastoris* と *Saccharomyces cerevisiae*) を用いて、様々なアミノ酸変異ヒトバンド3及びヒトバンド3ホモログの発現、精製、結晶化を試みる。既に、酵母を用いた大量発現系は立ち上がっている。ヒト赤血球から精製したバンド3には不均一性の原因となる糖鎖が修飾されている。精製段階のグリコシダーゼ処理は、必ずしも十分とは言えない。そこで、糖鎖修飾部位をあらかじめ潰した (Asn を Gln に変換) 組み換え型バンド3の結晶化を試みる。本系により、野生型バンド3だけでなく、活性を保持した安定な変異体や様々な種のバンド3ホモログの結晶構造解析も可能となる。

## 3. 研究の方法

### 【高純度・高濃度バンド3調整】

小林らはヒト赤血球よりバンド3を単一に精製する方法を確立している。バンド3は糖鎖修飾された膜タンパク質で、SDS-PAGEではブロードなバンドとして検出される。精製中にグリコシダーゼ処理することにより、殆どの糖鎖を切断することができたが、わずかな糖鎖の切れ残りは結晶化にとって致命的であった。そこで、小林らはさらに精製方法を改良することでより完全に糖鎖

を切断する方法を確立した。これらの精製バンド 3 を用いて三次元結晶化を試みる。

#### 【ヒト赤血球バンド 3 の三次元結晶化】

三次元結晶化は、連携研究者である岩田 想教授(現 京都大学大学院 医学研究科)の指導の下で行う。岩田教授は、これまでに様々な膜タンパクの三次元結晶構造を明らかにしている(Nature 376, 660-69, 1995, Nature Str. Biol. 2, 842-46, 1995, Science 281, 64-71, 1998, Science 301, 610-15, 2003, Science 303, 1831-38, 2004)。小林は、2004 年から岩田研究室で研究を行っている。

赤血球から精製したバンド 3 は界面活性剤を使用して可溶化・精製しているが、精製に適した界面活性剤と三次元結晶化に適した界面活性剤は異なる場合が多い。小林らは、バンド 3 の高次構造に影響を与えることのない界面活性剤を網羅的にスクリーニングする。具体的には、精製バンド 3 に様々な種類の界面活性剤を 2-3 倍の臨界ミセル濃度(CMC)で加え、Native-PAGE によって経時的な変化を検討する。界面活性剤が高次構造に影響を与えない場合、電気泳動したバンド 3 はシャープな 1 本のバンドとして検出される。界面活性剤を幾つか絞り込み、順次精製用界面活性剤と置換し、結晶化スクリーニングに持って行く。

結晶条件の大規模スクリーニングは自動結晶化ロボット(トパーズ)を使用する。膜タンパク質の構造解析で最も時間のかかるプロセスの一つが得られた結晶の最適化である。結晶化・最適化は岩田らの開発した膜タンパク質専用の条件(MemSys, MemGold)を使用する(Methods and results in crystallization of membrane protein. Ed. S. Iwata, Int. Univ. Line, 2003)。岩田、小林らは、この結晶の最適化を迅速に行うために、ロボットで調製した大量の結晶化プレートを X 線データ測定システム(MX スキャナー)に直接マウントし、スクリーニングを行う。

膜タンパク質を結晶化するには、界面活性剤のミセル中に膜タンパク質を取り込んだ状態で結晶化する必要がある。この状態では膜タンパク質の疎水的な表面は特定の構造をもたないミセルで覆われているため、結晶格子の形成に寄与できない。従って膜の外に飛び出した親水性部分が大きい膜タンパク質ほど結晶化しやすい傾向がある。そこで、小林らは抗バンド 3 モノクローナル抗体の Fab フラグメントと精製バンド 3 を共結晶することで親水性部分を拡大し、結晶化

効率の向上を試みる。既に小林らは、共結晶に適したモノクローナル抗体 Fab フラグメントを数種類作製し、幾つかの抗体で複合体の結晶を試みる。これらの抗体を用いて結晶化条件の最適化とスクリーニングを継続する。

#### 【組み換え型バンド 3 とホモログの大量発現系の構築及び三次元結晶化】

小林らは、2004 年から酵母の培養技術を学び、現在では *Pichia pastoris* と *Saccharomyces cerevisiae* を用いた膜タンパク質の大量発現系を立ち上げている。酵母をタンパク質生産の場として利用する利点には、大腸菌なみの取り扱いやすさと培養の容易さ、増殖速度の早さ、高密度培養があげられる。

*Saccharomyces cerevisiae* は、正常にフォールディングした膜タンパク質のスクリーニングに使用している。具体的には、様々な膜タンパク質の C 末端に GFP を融合させることで、過剰発現、可溶化、精製の任意の段階で、対象の膜タンパク質を直接可視化することを可能とし、時間と手間を短縮ができる。本手法は、Dr. Drew が岩田研究室に導入した最新の技術である(Nature Methods 3, 303-13, 2006, Pro. Natl. Acad. Sci. USA 104, 13936-41, 2007)。*Pichia pastoris* はメタノールで制御される強力なプロモーターを有し簡便に安価な培地での高密度培養(菌体量約 250g/L 培地)が可能である。*Pichia pastoris* は機能的に *Saccharomyces cerevisiae* と非常に類似しており、*Saccharomyces cerevisiae* で得られた知見をそのまま応用することが可能である。

ヒト赤血球から精製したバンド 3 には不均一性の原因となる糖鎖が修飾されている。精製段階のグリコシダーゼ処理は、必ずしも十分とは言えない。そこで、糖鎖修飾部位をあらかじめ潰した(Asn を Gln に変換)組み換え型バンド 3 の大量発現系の構築を試みる。本系により、野生型バンド 3 だけでなく、活性を保持した安定な変異体や様々な種のバンド 3 ホモログの大量発現も可能となる。既に、小林らはバンド 3 ホモログ(*Pombe*, *Saccharomyces*, *Phanerochate chryso sporium*) の大量発現に成功している。特に *Phanerochate chryso sporium* のバンド 3 ホモログについては、1 リッターあたり 15 mg のタンパクを発現させることが可能であり、結晶化スクリーニングにより、いくつかの条件で粗な結晶を得ている。

#### 4. 研究成果

2000年以降、濱崎らはヒト赤血球よりバンド3の膜貫通ドメインを単一に精製する方法を確立し、2005年から小林らとバンド3の結晶構造解析に向けて共同研究がスタートした。2008～2010年の基盤研究(B)(代表者 小林)では、バンド3に対する構造認識抗体を作製し、アニオン輸送の阻害剤を嚙ませて外向き型に固定化したバンド3/抗体(Fab)複合体を結晶化した。その結果、マイクロフォーカスビームやピクセル検出器を用いた低振動角測定/ラインスキャンをはじめとしたビームラインの特長を生かして3.4Åを超える分解能でデータを収集することに成功した(Fig.4)。さらに、バンド3のシステイン残基を水銀化合物で標識した結晶を準備し、重原子同型置換/異常分散(SIRAS)により、1量体あたり3箇所のサイトを同定したうえで位相計算を行った。その結果、バンド3の4Åの実験位相を計算することができ、それに基づく電子密度図を得た(Fig.5)。現在、分解能3.4Åの電子密度図に対しモデル構築と精密化を進めている。二量体を形成し各々に抗体のFabフラグメントが結合している。Fab分子側面同士のコンタクトで結晶のパッキングが保たれていたことから、外向き型バンド3の構造解析のみならず、内向き型バンド3の構造解析においても、モノクローナル抗体を用いて結晶化しにくい膜タンパク質の結晶の質を高める戦略が可能になった。

この結晶構造を起点として血液のpH及びイオン恒常性、バンド3タンパク質変異で発症する疾患(溶血性球状赤血球貧血や尿管管アシドーシスなど)の機序を理解するための土台が提供されることとなる。

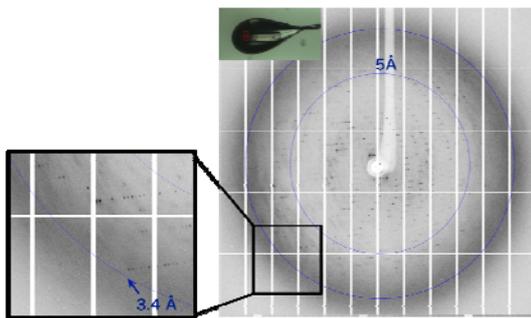


Fig.4 マイクロフォーカスビームラインで撮影されたバンド3/抗体複合体結晶の回折像

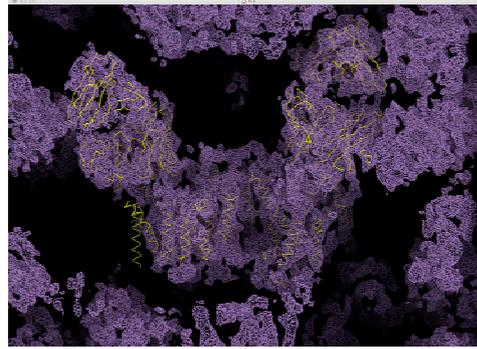


Fig.5 水銀結合サイトの実験位相から計算されたバンド3の電子密度図。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件) \*Corresponding

1. H. Asada, T. Uemura, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, T. Shimamura, H. Tsujimoto, K. Ito, T. Sugawara, T. Nakane, N. Nomura, T. Murata, T. Haga, S. Iwata, and T. Kobavashi\*. Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. *Microbial Cell Factories* in press 2011. 査読有
2. N. Tokuda, K. Igarashi, T. Shimamura, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, K. Ito, T. Sugawara, H. Asada, T. Murata, N. Nomura, S. Iwata, and T. Kobavashi\*. Cloning, expression and purification of the anion exchanger 1 homologue from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Protein Expr. Purif.* in press 2011. 査読有
3. K. Ito, T. Sugawara, A. Koizumi, K. Nakajima, A. Shimizu-Ibuka, M. Shiroishi, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, T. Shimamura, T. Asada, T. Misaka, S. Iwata, T. Kobavashi\*, and K. Abe. Cysteine-to-serine shuffling using a yeast expression system improves protein secretion: case of a nonglycosylated mutant of miracullin, a taste-modifying protein. *Biotech. Lett.* 33, 103-107, 2011. 査読有
4. K. Ito, S. Ito\*, T. Shimamura, S. Weyand, Y. Kawarasaki, T. Misaka, K. Abe, T. Kobavashi, A.D. Cameron, and S. Iwata. Crystal structure of Glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* in press 2011. 査読有
5. K. Ito, S. Ito\*, T. Shimamura, Y. Kawarasaki, T. Kobavashi, and S. Iwata. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a Glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. *Acta Crystallogr. Sect. F*, 66, 1086-1088, 2010. 査読有
6. K. Ito, T. Sugawara, A. Koizumi, K.I. Nakajima, A. Shimizu-Ibuka, M. Shiroishi, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, T. Shimamura, T. Asakura, K. Masuda, M. Ishiguro, T. Misaka, S. Iwata, T. Kobavashi\*, and K. Abe. Bulky high-mannose-type N-glycan blocks the taste-modifying activity of

miraculin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1800, 986-992, 2010. 査読有

7. T. Sakurai, T. Misaka, M. Ishiguro, K. Masuda, T. Sugawara, K. Ito, **T. Kobavashi**, S. Matsuo, Y. Ishimaru, T. Asakura, and K. Abe\*. Characterization of the  $\beta$ -D-glucopyranoside binding site of the human bitter taste receptor hTAS2R16. *J. Biol. Chem.* 285, 28373-28378, 2010. 査読有

8. T. Sugawara, K. Ito, M. Shiroishi, N. Tokuda, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, T. Shimamura, T. Misaka, N. Nomura, **T. Murata**, K. Abe, **S. Iwata**, and **T. Kobavashi**\*. Fluorescence-based optimization of human bitter taste receptor expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 704-710, 2009. 査読有

9. T. Yurugi-Kobayashi, H. Asada, M. Shiroishi, T. Shimamura, S. Funamoto, N. Katsuta, K. Ito, T. Sugawara, N. Tokuda, H. Tsujimoto, **T. Murata**, N. Nomura, K. Haga, T. Haga, **S. Iwata**, and **T. Kobavashi**\*. Comparison of functional non-glycosylated GPCRs expression in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 271-276, 2009. 査読有

10. K. Ito, T. Sugawara, M. Shiroishi, N. Tokuda, A. Kurokawa, T. Misaka, H. Makyio, T. Yurugi-Kobayashi, T. Shimamura, N. Nomura, **T. Murata**, K. Abe, **S. Iwata**, and **T. Kobavashi**\*. Advanced method for high-throughput expression of mutated eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 841-845, 2008. 査読有

11. M. Yamamoto, S. Unzai, S. Saijo, K. Ito, K. Mizutani, C. Suno-Ikeda, Y. Yabuki-Miyata, T. Terada, M. Toyama, M. Shirouzu, **T. Kobavashi**, Y. Kakinuma, I. Yamato, S. Yokoyama, **S. Iwata** and **T. Murata**\*. Interaction and stoichiometry of the peripheral stalk subunits NtpE and NtpF and the N-terminal hydrophilic domain of NtpI of *Enterococcus hirae* V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 283, 19422-19431, 2008. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. **小林拓也**、第 84 回日本薬理学会年会、G タンパク共役受容体 (GPCR) の三次元結晶構造解析への試み、横浜、2011 年 3 月 24 日
2. **Takuya Kobayashi**、GPCR workshop、A GFP-based platform for rapid construction and evaluation of highly expressed and stable GPCR variants in *Saccharomyces cerevisiae*、Hawaii、2010 年 12 月 10 日
3. **小林拓也**、第 82 回日本生化学会、G 蛋白質共役受容体 (GPCR) の構造解析に向けて「生産から結晶構造解析までの技術開発」、神戸、2009 年 10 月 22 日
4. **小林拓也**、第 5 回 GPCR 研究会、「Towards Structure Determination of Human Membrane Receptors and Production of Functional

GPCRs in *Pichia pastoris*」、東京、2008 年 5 月 9 日

5. **Takuya Kobayashi**、GPCR シンポジウム、「Towards Structure Determination of Human Membrane Receptors -from Prostanoid receptor studies-」、播磨放射光施設、2008 年 2 月 26 日

[図書] (計 2 件)

1. **小林拓也**、G タンパク質共役受容体 (GPCR) の三次元結晶構造解析への試み、バイオインダストリー (シーエムシー出版)、P23~29、2011 年 3 月
2. K. Ito, T. Misaka, K. Abe, and **T. Kobavashi**. Advanced technologies to determine the 3D structure of taste receptors. The Sense of Taste. Nova Science Publishers, Inc., 2011 年 7 月予定 印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：膜蛋白質の立体構造を認識するモノクローナル抗体のスクリーニング方法

発明者：小林拓也、岩田 想

権利者：科学技術振興機構 JST

種類：PCT 国際出願

番号：PCT/JP2010/57631

出願年月日：2010 年 4 月

国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad\\_school/introduction/1502/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1502/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 拓也 (KOBAYASHI TAKUYA)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20311730

(2)研究分担者

村田 武士 (MURATA TAKESHI)

千葉大学・理学研究科・特任准教授

研究者番号：80415322

(3)連携研究者

岩田 想 (IWATA SO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60452330