

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：82626
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790064
 研究課題名（和文） ミトコンドリア内膜トランスポーターの立体構造解析と輸送メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Structure determination and elucidation of transport mechanism of mitochondrial inner membrane transporter
 研究代表者
 竹内 恒（TAKEUCHI KOH）
 独立行政法人産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・主任研究員
 研究者番号：20581284

研究成果の概要（和文）：本研究では MTP の立体構造を解析し、その輸送メカニズムを解明することで、MTP がかかわる疾患の理解、治療に貢献することを目的とし、ヒトの疾患との関連が明らかな 13 種の MTP の大腸菌発現系を確立し、発現および精製条件の検討を行った。その結果、UCP1, ORC1, CAC, ODC (36K) と GC1(38K) で良好な発現が観察された。その他の MTP については発現量がわずかであり構造解析には適さないと判断した。しかしながら発現した MTP はすべて不溶画分に移行しており、可溶化条件の検討が必要となった。様々な界面活性剤をもちいた可溶化を検討したが、一部が可溶性分に移行するのみで十分な効率での可溶化に成功しなかった。最近、海外のグループがマウス UCP2 の大腸菌を用いた発現および構造解析に成功した。これを鑑みると異種由来の MTP をより広く解析候補とするなどの工夫が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：To contribute the understanding and cure of the human diseases associated with mitochondrial membrane transporters (MTPs), we developed prokaryotic expression systems for 13 types of MTPs for structure determination and elucidation of their transport mechanism. The 13 MTPs were known to be responsible for specific human diseases. Within those constructs, UCP1, ORC1, CAC, ODC (36K) and GC1(38K) showed good expression that would be enough for further structural analysis. Others showed only limited expression and were judged not suitable for further analysis. All expressed MTPs were in insoluble fraction. Various types of detergents were tried to extract the MTPs, however, only limited amount of protein was extracted as soluble form. Recently mouse UCP2 was successfully expressed in heterogus expression system and structurally analyzed. Thus, we need to include MTPs from other species as candidates for expression and following structural analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景
(1) 真核生物の細胞小器官であるミト

コンドリアは、酸化的リン酸化や脂肪酸のβ酸化によるエネルギー生産の場であると

もに、ヘム、アミノ酸など様々な代謝物の生合成にかかわっている。ミトコンドリアトランスポーター (MTP) は、SLC25 遺伝子にコードされている膜蛋白質群で、ADP など酸化リン酸化に必須な分子や、アミノ酸生合成などに関わる様々な低分子代謝原料をミトコンドリアに供給するとともに、これらの代謝産物を細胞質に共輸送する働きを担っている。また H⁺チャネルとして働き、体温の維持を担う uncoupling protein(UCP)も MTP の一種である。ヒト遺伝子中には約 50 種の MTP が知られており、そのうち少なくとも 13 種が病態関連遺伝子として同定されている (Biochim. Biophys. Acta, 1777, (2008), 564 など)。国内外で MTP に変異を持つ患者に注目した症例研究や分子生物学的解析が行われており、その MTP 研究の重要性は広く認められるところであるが、その機能発現を理解するために必要な構造生物学的知見は十分でなかった。

(2) MTP の立体構造を原子レベルで解析した唯一の報告は、2003 年に Nature 誌に掲載された牛由来の ADP/ATP 共輸送 MTP と阻害剤との複合体を結晶構造解析した例である (Nature, 426, (2003), 39)。この唯一の報告は、MTP の全体像を明らかにした点で高く評価されるべきであるが、阻害剤との複合体構造であることから MTP の基質輸送機構の完全な理解には至っていない。また、天然に高発現している ADP/ATP 共輸送 MTP をそのまま用いており、必ずしも発現量が多くない他の MTP への同様な解析手法の適用は不可能である。

2. 研究の目的

本研究ではこのように重要な生体機能を担い、またその変異が重篤な疾患を引き起こす MTP に着目し、立体構造に基づいて MTP の輸送メカニズムを解明することを目的とする。具体的には病態関連 MTP について、立体構造解析に堪えられるだけの発現量を確保することを目標とし、大腸菌等を用いた異種発現系を構築する。この際、将来的に NMR 法を適用することを視野に安定同位体標識が可能な発現系を前提とする。十分量の発現が見られた MTP については精製を検討し、基質結合および非結合状態の立体構造を明らかにすることで、その基質認識機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) MTP の発現、精製

ヒトの疾患との関連が明らかな 13 種の MTP (CIC, PiC, AAC1, UCP1, 2, & 3, AGC2, ORC1DNC, CAC, ODC, GC1, SLC25A38) について大腸菌発現系を構築する。発現する MTP は

N 末端に His タグを付加し、精製条件を容易にする。将来的な安定同位体標識を視野に発現時には最小培地を用いる。大腸菌において発現することが困難な MTP が存在することも予想されるが、このような場合には酵母を用いた蛋白質発現系 (J Biomol NMR. (2008), 42, 159) や無細胞発現系 (J Biomol NMR. (2010), 46, 33) を試みる。発現した MTP の活性は精製後にリガンド結合活性をリポソームに再構成することで検証する。NMR 測定は MTP を界面活性剤に可溶化した状態または脂質 2 重膜ナノ粒子に再構成した状態で行なうが、これらの測定条件において基質結合活性が保たれていることを確認する。

(2) MTP の立体構造解析

NMR 解析では、対象分子の性質に依存した非特異的多量体化などにより、シグナルの広幅化が起こり、十分な解析ができないことがある。したがって、生物学的に重要かつ解析可能性を有する対象を迅速に選定する必要がある。そこで、基質結合活性が確認された MTP の NMR スペクトルを測定し、観測核の緩和速度を指標として解析対象を絞り込む。立体構造解析としては NMR シグナルの配列特異的帰属を基質結合状態および非結合状態で確立する。このことにより、MTP 分子内におけるリガンド結合サイトが同定される。基質結合状態については、2 種類の基質のうち 1 種類のみを加えた状態、両方を加えた状態のあわせて 3 状態を解析し、個々の基質結合が異なる位置に結合するのか、また結合に伴い MTP にどのような立体構造変化が生じるかを検討する。さらに基質が結合した状態での MTP の立体構造を決定することで、MTP が基質をどのように特異的に認識しているかを明らかにする。立体構造決定を行なう際には基質を過剰量加えることで、結合・非結合状態間の遷移が起こらないように立体構造を固定する。またこれらの MTP について阻害剤が明らかになっている場合は、阻害剤との複合体構造の解析も行なう。阻害剤は MTP を特定の構造に強く固定すると考えられ、立体構造解析が容易になる可能性がある。MTP は単量体で 30kDa と分子量が大きいため立体構造解析にはメチル選択標識など高分子量解析に特化した手法を用いる。

4. 研究成果

(1) 疾患関連 MTP の発現系構築

ヒト遺伝子中には約 50 種の MTP が知られているが、そのうち特定の疾患に関連することが明らかとなっている 13 種の遺伝子を HGPD より入手し、ゲートウェイ法により pDEST17 に組み込むことにより大腸菌発現系を構築した。構築した系で発現されるタンパク質は N 末端に His-tag が付加された状態と

なる。13 種遺伝子のコードするタンパク質は以下のとおりである。CIC, PiC, AAC1, UCP1, 2, & 3, AGC2, ORC1, DNC, CAC, ODC, GC1, SLC25A38

(2) 疾患関連 MTP の発現

構築した大腸菌発現系を用いて疾患関連 MTP の発現を行った。発現には将来的に安定同位体標識が必要であることから M9 最小培地を用いた。発現誘導は 0.6 mM の IPTG で行い、誘導時間は 3 hr, over night, 24hr を試みた。発現温度は 25°C とした。なお誘導後 3hr で良好な発現が見られたことから、以後の検討には同条件を用いた。誘導後の菌体を回収し、超音波破碎後、14000g/20min の遠心を施し、膜画分を含む沈殿画分を得た。その結果、図 1 に示すように、UCP1, ORC1, CAC, ODC (36K) と GC1 (38K) で良好な発現が観察された。その他の MTP については発現量がわずかであり構造解析には適さないと判断した。良好な発現を示した 5 種に関しては、低速遠心で膜画分と不溶性画分の分離を試みた。その結果、発現した MTP はすべて不溶画分に移行しており、可溶性条件の検討が必要であることが判明した。なお菌体破碎時に超音波破碎を避け、Bugbuster 等の界面活性剤を用いても結果は同じであった。

(3) 疾患関連 MTP の可溶性化

沈殿画分からの MTP 抽出を行うため、octyl-glucoside (OG)、dodecyl-maltoside (DDM)、Triton X100, Sarkosyl など可溶性の異なる界面活性剤をもちいた可溶性化を検討した。発現が良好であった 5 種の MTP の沈殿画分 100ml 培養分に対して、臨界ミセル濃度の 10 倍の界面活性剤溶液を 4 ml 加え 4°C で 2hr、スターラーによる可溶性化を行ったが、一部が可溶性分に移行するのみで、十分な効率での可溶性化に成功しなかった。また上記界面活性剤による連続抽出、低速遠心による不溶性画分の先行除去など抽出法の工夫も行ったが、芳しい結果は得られなかった。2011 年、海外のグループがマウス由来 UCP2 の大腸菌を用いた発現および構造解析に成功した。筆者らは界面活性剤 (OG) に DMPC, Cardiolipin, phytanoyl lipid を混合した混合ミセルでの MTP 抽出に成功している。また報告されたのがマウス由来 UCP2 であり、我々の系ではヒト UCP2 の発現が見られていないことから異種由来の MTP をより広く解析候補とするなどの工夫が必要と考えられる。

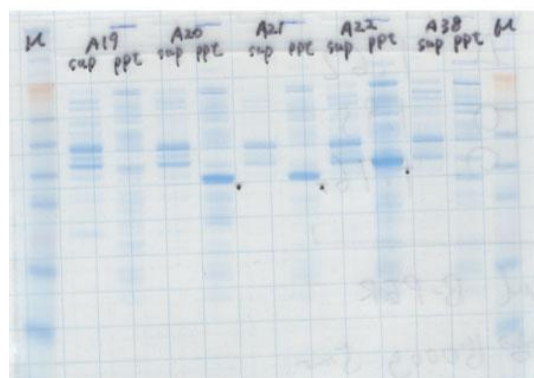
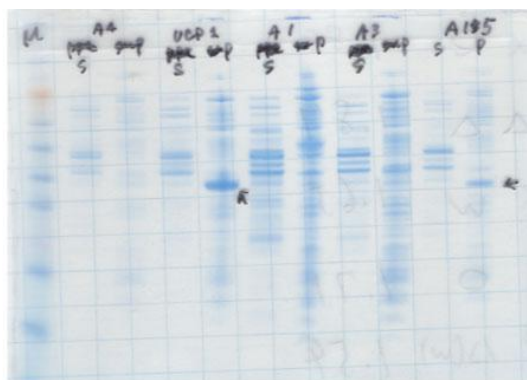


図 1 : 疾患関連 MTP の発現

各種 MTP を発現後、可溶性画分と膜画分を含む沈殿画分に分離を行った。沈殿画分に矢印または点で示すように良好な MTP の発現が確認された。

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 8 件)

① Osawa M, Takeuchi K, Ueda T, Nishida N, Shimada I. Functional dynamics of proteins revealed by solution NMR. *Curr Opin Struct Biol*. 査読有 22, (2012), 660-669, Doi: 10.1016/j.sbi.2012.08.007

② Sugiki T, Takeuchi K, Yamaji T, Takano Y, Tokunaga Y, Kumagai K, Hanada K, Takahashi H, Shimada I. Structural Basis for the Golgi Association by the Pleckstrin Homology Domain of the Ceramide Trafficking Protein (CERT). *J Biol Chem*. 査読有 287, (2012), 33706-33718.

Doi: 10.1074/jbc.M112.367730

③ Gal M, Edmonds KA, Milbradt AG, Takeuchi K, Wagner G. Speeding up direct (15)N detection: hCaN 2D NMR experiment. J Biomol NMR. 査読有, 51, (2011), 497-504. Doi: 10.1007/s10858-011-9580-7

④ Milbradt AG, Kulkarni M, Yi T, Takeuchi K, Sun ZY, Luna RE, Selenko P, Näär AM, Wagner G. Structure of the VP16 transactivator target in the Mediator. Nat Struct Mol Biol. 査読有 18, (2011), 410-418. Doi: 10.1038/nsmb.1999

〔学会発表〕(計7件)

①竹内 恒、嶋田 一夫、多剤耐性転写制御因子の揺らぎによる薬剤認識機構、新学術領域「揺らぎと生体機構」「水和とATP」合同公開シンポジウム「ゆらぎと水-生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」、2012年9月14日、大阪ガーデンパレス(大阪府)

②竹内 恒、NMR approach to study and interfere with blood coagulation responses、難治性疾患統合創薬プロジェクト講演会、2012年1月30日、立命館大学(滋賀県)

③ Koh Takeuchi, Maayan Gal, Hideo Takahashi, Gerhard Wagner, and Ichio Shimada, HNCA-TOCSY-CANH experiments with alternate 13C-12C labeling: a set of 3D experiment with unique supra-sequential information for mainchain resonance assignment、ISNMR2011、2011年11月15日~18日、大塚橋ホール(神奈川県)

④竹内 恒、嶋田 一夫、T細胞レセプターはダイナミックかつ協動的な4次元構造変化により活性化する-NMRおよび光ピンセット法による解析-、第49回日本生物物理学会年会、2011年9月16日~18日、姫路工大(兵庫県)

〔図書〕(計1件)

Takeuchi K, Gal M, Shimada I, and Wagner G 他, Royal Society of Chemistry, Recent Developments in Biomolecular NMR, (2012), 364p, Doi: 10.1039/9781849735391-00025

〔その他〕

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/birc2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 恒 (TAKEUCHI KOH)

独立行政法人産業技術総合研究所・創薬分子
プロファイリング研究センター・主任研究員

研究者番号: 20581284