

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650023

研究課題名(和文) ヒト由来膜輸送体の結晶構造解析への挑戦

研究課題名(英文) Structure determination of human membrane transporters

研究代表者

島村 達郎 (Shimamura, Tatsuro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90391979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膜輸送体は、多くの病気に関係している。そのためヒト由来の膜輸送体は重要な創薬ターゲットであり、その立体構造情報は機能解明ばかりが効率的な創薬にも役立つ。しかし、不安定な哺乳類由来の膜輸送体は結晶化・構造解析が困難であった。我々は、膜タンパク質の構造解析分野で最新の手法である立体構造認識抗体を用いた結晶化方法とLipidic cubic phase法を用いた結晶化方法を哺乳類由来の膜輸送体の構造解析に応用した。その結果、いくつかのものでも結晶化に成功し、ヒト由来膜輸送体の迅速な構造決定の実現性が高まった。

研究成果の概要(英文)：Membrane transporters are drug targets because they are important causes of diseases. Therefore, the structural information of human membrane transporters is very useful for the rational design of new drugs. However, it is difficult to determine the crystal structure of membrane transporters because of their instabilities. We tried to crystallize mammalian transporters using the recently developed methods for the membrane protein crystallization and succeeded to crystallize some of the membrane transporters.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜輸送体 結晶構造解析 創薬

1. 研究開始当初の背景

生体膜を隔てて物質の輸送を行っている膜輸送体は、糖尿病や鬱病など多くの病気に関わっているほか、薬物動態にも関係している。そのためヒト由来の膜輸送体は重要な創薬ターゲットとなっている。このようなことから膜輸送体の立体構造情報は、膜輸送体の機能解明に必須であるばかりか、**Structure-Based Drug Design** による効率的な創薬にも役立ち、ヒト由来の膜輸送体の立体構造情報の需要は高い。一方で膜輸送体は、柔軟性が高く不安定なため構造解析が難しく、これまでに構造決定された膜輸送体の殆どは膜輸送体のなかでも比較的安定な細菌由来のもので、不安定なヒト由来の膜輸送体の構造解析成功例は未だに報告されていなかった。

一方で、膜タンパク質の構造解析分野では、膜タンパク質を安定化させる様々な技術が開発されてきた。このような技術としては第一に、立体構造認識抗体の利用が挙げられる。立体構造認識抗体とは、抗原タンパク質の一次配列ではなく、三次元構造を認識して結合する抗体のことである。立体構造認識抗体が結合することにより、抗原タンパク質のゆらぎが抑制されて安定化するとともに、抗原タンパク質が膜タンパク質の場合には、抗体の結合により親水性領域が大きくなり、結晶化しやすくなるという利点もある。我々は、マウスに免疫して作製した立体構造認識抗体を用いて、アデノシン A2a 受容体の結晶化・構造解析に成功している (*Nature*, **482**; 237-40 (2012).)。第二には、**Lipidic cubic phase (LCP)** 法による膜タンパク質の結晶化技術である。LCP 法はモノオレインなどの脂質と水を混合させることで人工的な脂質二重膜を形成させ、そこに精製した膜タンパク質を再構成させて結晶化する手法である。LCP 中の膜タンパク質は、通常の結晶化時のような界面活性剤ミセル中に存在する場合と比べ、より自然な状態にちかいたため安定に存在できることが知られている。実際に、膜タンパク質の中でも特に不安定で構造解析が難しかった G タンパク質共役型受容体は LCP 法の応用により結晶化・構造解析が可能となり、我々も LCP 法を用いてヒスタミン H1 受容体の結晶化・構造

解析に成功した (*Nature* **475**:65-70 (2011).)。さらに我々は、細菌由来の膜輸送体の構造解析にも成功しており (*Science* **322**, 709-713 (2008)., *Science* **328**, 470-473 (2010).)、これらの経験や技術を融合させることで、ヒト由来の膜輸送体の構造解析に挑戦できる環境が整っていた。

2. 研究の目的

本研究では、我々の経験や技術を活かし、不安定性が原因で構造解析が遅れていたヒトをはじめとする哺乳類の膜輸送体の構造解析に挑戦する。そして、これらの膜輸送体の立体構造を単体および阻害剤との複合体で決定し、膜輸送体の基質認識機構の解明や、膜輸送体をターゲットとする医薬品の効率的な開発に役立つ情報を取得することが目的であった。

3. 研究の方法

結晶化のためには大量のサンプルが必要である。哺乳類の膜輸送体を大量発現は、培養の容易な大腸菌で行うのは難しい。そこで我々の膜タンパク質の大量発現技術 (*Methods*, **55**:281-286 (2011)) により、酵母を用いて膜輸送体の大量発現系を構築した。それでもうまくいかない場合には、昆虫細胞による大量発現も試みた。発現させる膜輸送体には His-tag などのタグを付け、アフィニティー精製により精製を行った。結晶化は界面活性剤ミセル中の膜輸送体に対して行う従来の方法に加え、LCP 法も用いた。また、精製後の膜輸送体をマウスに免疫し、構造認識抗体の作製も試みた。構造認識抗体は、Fab 断片もしくは Fv 断片にしたものを膜輸送体に結合させ、結晶化に用いた。Fv 断片は、一本鎖 Fv フェージディスプレイ法により高効率で作製した。選抜された Fv 断片は *Brevibacillus* 発現系により培養上清中に大量に分泌生産させた後、精製した。抗体断片と膜輸送体との複合体のゲル濾過分析で単分散ピークであることを確認後、結晶化スクリーニングをおこなった。結晶のチェックやデータ収集は大型放射光施設 SPring8 で行った。

4. 研究成果

全部で6種類のヒトもしくはラット由来の膜輸送体(膜輸送体1~6)を対象として研究を行った。膜輸送体の結晶化を成功させるには、サンプルの単分散性が重要となる。そこでまず、膜輸送体1~6について界面活性剤で可溶化後のサンプルについて蛍光ゲル濾過を行い単分散性の検討を行った。その結果、膜輸送体1に関しては、単分散性が悪かった(図1)。

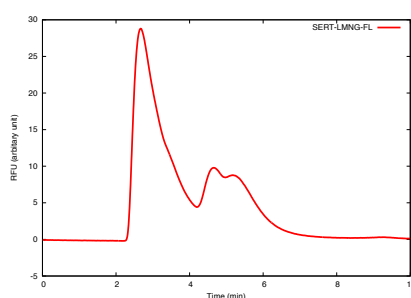


図1. 膜輸送体1の単分散性

単分散性はN末端、C末端を削ると改善する場合があるが、膜輸送体1については、単分散性の改善は成功しなかった。膜輸送体2~6については、単分散性は問題なかった(図2)。

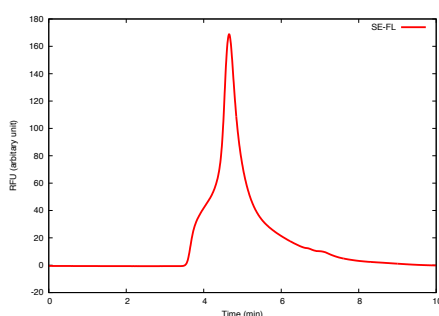


図2 膜輸送体2の単分散性

そこで膜輸送体2~6について酵母で発現させて精製をおこなったところ、膜輸送体5と6が純度良く大量に精製できた。そこで膜輸送体5と6について抗体作製を試みた。膜輸送体5と6に対する立体構造認識抗体は、半年程度で作製できた。そこでこれらの抗体のFab断片、Fv断片を用意し、膜輸送体単体もしくは抗体との複合体を従来の結晶化法とLCP法で結晶化した。その結果、膜輸送体5についてはFab断片との複合体について従来の結晶化法、LCP法で結晶化に成功した。これらはいずれも微結晶であった。膜輸送体6についてはLCP法では結晶はできなかったが、従来の結晶化法で結晶化に成功した(図3)。そこで膜輸送体5と6の結晶をSPRING-8でチェックしたところ膜輸送体5は分解能が8Å程度であった。膜輸送体6は、最高で3.3Å程度

の分解能であった。今後は膜輸送体6についてデータを収集し、構造を決定する予定である。



図3. 膜輸送体6の結晶

以上のことから、我々の技術を融合させることでヒトを初めとする哺乳類由来の膜輸送体の構造解析が不可能では無くなった。今後はさらにいろいろな技術を駆使し、創薬ターゲット膜輸送体の構造解析研究に応用してゆきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

① Tono K, Nango E, Sugahara M, Song C, Park J, Tanaka T, Tanaka R, Joti Y, Kameshima T, Ono S, Hatsui T, Mizohata E, Suzuki M, Shimamura T, Tanaka Y, Iwata S, Yabashi M. Diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA (DAPHNIS): application to serial protein crystallography using an X-ray free-electron laser. *J Synchrotron Radiat.* 2015 May 1;22(Pt 3):532-7. 査読有
doi: 10.1107/S1600577515004464.

② Suharni, Nomura Y, Arakawa T, Hino T, Abe H, Nakada-Nakura Y, Sato Y, Iwanari H, Shiroishi M, Asada H, Shimamura T, Murata T, Kobayashi T, Hamakubo T, Iwata S, Nomura N. Proteoliposome-based selection of a recombinant antibody fragment against the human M2 muscarinic acetylcholine receptor. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2014 Dec;33(6):378-85. 査読有
doi: 10.1089/mab.2014.0041.

③ Sugahara M, Mizohata E, Nango E, Suzuki M, Tanaka T, Masuda T, Tanaka R, Shimamura T, Tanaka Y, Suno C, Ihara K, Pan D, Kakinouchi K, Sugiyama S, Murata M, Inoue T, Tono K, Song C, Park J, Kameshima T, Hatsui T, Joti Y, Yabashi M, Iwata S. Grease matrix as a versatile carrier of proteins for serial crystallography. *Nat Methods.* 2015 Jan;12(1):61-3. 査読有
doi: 10.1038/nmeth.3172.

④ Koike-Takeshita A, Arakawa T, Taguchi

H, Shimamura T. Crystal structure of asymmetric football-shaped GroEL:GroES2-ATP14 complex determined at 3.8Å reveals rearrangement between two GroEL rings. *J Mol Biol.* 2014 Oct 23;426(21):3634-41. 査読有 doi: 10.1016/j.jmb.2014.08.017.

⑤ Shimamura T. X-ray structure of histamine H1 receptor. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2014 Jul;144(1):43-4. 査読無

[学会発表] (計2件)

- ① 島村達郎 ヒスタミンH1受容体の構造解析と in silico screening. 第87回日本内分泌学会学術総会 (2014.4.25) 博多
- ② 島村達郎 Crystal structure of Histamine H₁ receptor and drug design. The 11th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. (2013.8.2) 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

田中 良樹 (TANAKA Yoshiki)
京都大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：10632333

小笠原 諭 (OGASAWARA Satoshi)
京都大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：30546685

荒川 孝俊 (ARAKAWA Takatoshi)
京都大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：30523766