

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790034
 研究課題名（和文） 電子線単粒子解析によるスルフォニル尿素剤受容体の制御機構解明
 研究課題名（英文） The structural analysis of the sulfonylurea receptor by single particle analysis.
 研究代表者 木村 泰久 (KIMURA YASUHISA)
 京都大学 大学院農学研究科 助教
 研究者番号：10415143

研究成果の概要：本研究ではヒト培養細胞を用いた哺乳類由来の膜タンパク質複合体につき、発現精製に必要な基盤技術を開発した。またこれらの技術を用いてスルフォニル尿素剤受容体を発現精製し、単粒子解析により基準となる構造の決定を行った。また、タンパク質工学的手法によりヒト MDR1 のリンカードメインが持つ機能を明らかにした。さらにヒト ABCA1 のシステイン結合が機能に必須であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：スルフォニル尿素剤受容体、単粒子解析

1. 研究開始当初の背景

スルフォニル尿素剤受容体は細胞膜上に存在する 8 量体構造を持つチャネルタンパク質複合体であり、総分子量は約 800kDa に達する強大な膜タンパク質複合体である。スルフォニル尿素剤受容体は現在使用されている経口の糖尿病治療薬スルフォニル尿素剤の作用点となっており、糖尿病の新規薬剤開発対象として重要である。新規薬剤の開発においては詳細な生化学的、構造生物学的解析が必須であり、これを可能にするためのタンパク質工学的な基盤技術の構築が希求されていた。また、立体構造に関しては低分解の報告が一例あるのみであり、チャネル開閉、薬剤

による活性制御などの詳細なメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的はスルフォニル尿素剤受容体の大量発現精製にかかわる基盤技術の開発及び電子線単粒子解析により全体構造を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではヒトの培養細胞を用いたスルフォニル尿素剤受容体の大量発現精製技術の

開発を行った。また得られた知見を HDL 形成など重要な生理機能を持つタンパク質に応用し解析を行った。

4. 研究成果

本研究で開発した技術、および得られた知見は以下の通りである。

1. ヒト培養細胞を用いた哺乳類由来の膜タンパク質および膜タンパク質複合体の大量発現精製技術
2. スルフォニル尿素剤受容体の初期構造の決定
3. ヒト ABCA1 のシステイン結合の HDL 形成における役割の解明
4. ヒト MDR1 のリンカー領域の機能解明

以下詳細について記述する。

項目 1 として行った「ヒト培養細胞を用いた哺乳類由来の膜タンパク質および膜タンパク質複合体の大量発現精製技術の開発」ではまずヒトの培養細胞を用いた哺乳類由来のスルフォニル尿素剤受容体の発現系の構築を行った。バイオリクターによる発現システムの確立、大量培養時における一過性発現手法の構築により、発現にかかる費用を従来の 10 分の 1 に抑えるとともに、細胞毒性があるタンパク質などに対しても対応が可能な発現系を構築することができた(図 1)。

続いて行った精製手法の構築では蛍光ゲルろ過法によって精製条件の決定を行った。本手法は蛍光によるタンパク質の特異的な検出とゲルろ過を組み合わせたものであり、未精製の段階で目的タンパク質の安定性や複合体の形成状況を判断することが可能で



図1. バイオリクターによる動物細胞の培養手法の開発

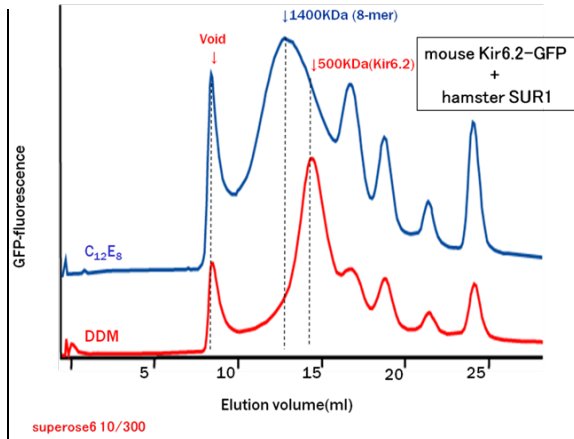


図2. 蛍光ゲルろ過法によるスルフォニル尿素剤受容体の安定化条件探索手法の開発

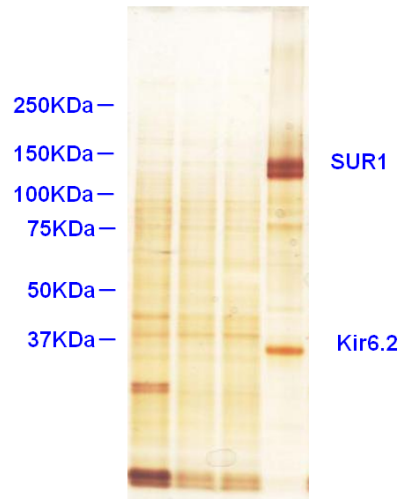


図3. スルフォニル尿素剤受容体の精製。SUR1: 受容体サブユニット。Kir6.2: チャンネル孔サブユニット

ある。これにより 2 週間という短時間で精製条件の決定に成功し、精製にかかる時間を大幅に短縮することができた(図 2)。

上記手法によって精製条件を最適化することで、約 90%の純度で精製標品を得ることができた(図 3)。精製標品の生化学的な解析から、精製したスルフォニル尿素剤受容体は機能的な 8 量体構造を有していることが確認できた。

本研究項目で開発したタンパク質発現手法、安定化条件の探索手法は様々な膜タンパク質やその複合体に対応することが可能であり、広い汎用性を持つ手法である。

(学会発表①,②,③,④)

項目 2「スルフォニル尿素剤受容体の初期

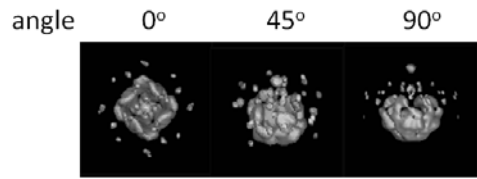


図4. 極低温顕微鏡による単粒子解析実験 現在1万個程度の像から25Å程度の分解能で構造が得られている

構造の決定」では項目 1 によって得られた精製タンパク質を用いて単粒子解析を行った。まず得られた精製標品を 10mg/ml まで濃縮する手法を構築し、得られた標品の極低温顕微鏡による撮影像から、粒子像の構築を開始した。本研究では染色の不要な極低温顕微鏡による観察を行っているため、染色像による変形等が生じないため、本来の機能的な構造が得られることが期待できる。およそ1万個の粒子像を収集し3次元構造の構築を行った。その結果 30Å程度の分解能で立体構造を構築した(図 4)。本研究で用いた粒子像は収束が悪く高分解能が期待できないものであったため、糖鎖付加状態などの翻訳後修飾を統一させることでより高分解能での構造解析が期待できる。

項目 3 の「ヒト ABCA1 のシステイン結合の HDL 形成における役割の解明」では HDL 形成に重要な ABCA1 と ApoA1 の相互作用に着目し研究を行った。本研究ではまず ABCA1A の ApoA1 相互作用部位にシステイン残基が多いことに着目し、研究を開始した。システイン残基によって形成される SS 結合が機能に必要かどうかを検討したところ、ABCA1 は還元剤の添加によって ApoA1 結合能、HDL 形成能を消失したことから、SS 結合が機能に必須であることが明らかとなった。次いでシステイン残基変異体の解析から、ABCA1 の機能には 2 つの SS 結合が必須であることを明らかにした。本研究成果は HDL 形成という重要な生理現象を解明する大きな糸口となるとともに、高脂血症の治療薬開発に向けた重要な知見である。

発表論文②

項目 4「ヒト MDR1 のリンカー領域の機能解明」。MDR1 は癌の多剤耐性の原因遺伝子であり、抗がん剤の重要な開発ターゲットとなっている。MDR1 は輸送基質を認識する膜貫通領域と輸送にエネルギーを供与する ATP 加水分解ドメインを1つずつ持つ機能ユニットがリンカー領域によって2ユニット結合した構造を持つ(図 5)。リンカー領域は真核生物の遺伝子に見られる特徴的な構造部分で

ある。また複数の ABC タンパク質では翻訳後修飾によって活性調節を行う報告があり、リンカー領域はリン酸化タンパク質など真核生物特有のタンパク質ネットワークによる制御に重要な領域であることが予想される。本研究では MDR1 のリンカー領域に着目し、精製タンパク質による詳細な解析を行った。まずプロテアーゼによる限定加水分解によってリンカーを欠損した MDR1 を作成し、酵素化学的な解析を行った。その結果リンカー領域を欠損させると ATP の加水分解活性が輸送基質存在下、非存在下ともに増加することが明らかとなった。増加割合は輸送基質非存在下の方が大きかったため、リンカー領域はタンパク質の機能を抑えるドメインであり、無駄な ATP 消費を最小限にすることが明らかとなった。

発表論文①

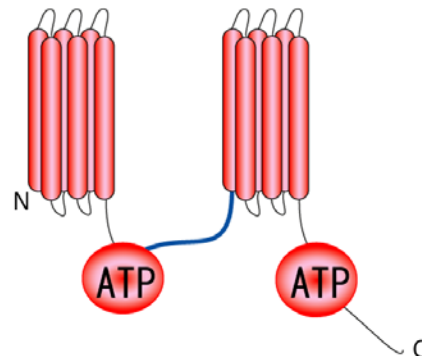


図5. MDR1の2次構造。リンカー領域を青で示した

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 4 件)

① Sato, T., Kodan, A., Kimura, Y., Ueda, K., Nakatsu, T. and Kato, H.

Functional role of the linker region in purified human P-glycoprotein.

FEBS J. in press

査読あり

② Hozoji, M., Kimura, Y., Kioka, N. and Ueda, K.

Formation of two intramolecular disulfide bonds is necessary for apoA-I-dependent cholesterol efflux mediated by ABCA1.

J. Biol. Chem. 284, 11293 - 11300 (2009)
査読あり

③Nagao, K. Zhao, Y., Takahashi, K., **Kimura, Y.**, and Ueda, K.

Sodium taurocholate-dependent lipid efflux by ABCA1-Effects of W590S mutation on lipid translocation and apoA-I dissociation.
J. Lipid Res. 50, 1165-1172 (2009)
査読あり

④**Kimura, Y.**, Morita, S.-y., Matsuo, M., and Ueda, K.

Mechanism of multi-drug recognition by MDR1/ABCB1.
Cancer Sci. 1303-1310 (2007)
査読あり

〔学会発表〕(計 5件)

①**Y. Kimura**, H. Kato, K. Ueda

Large scale production and purification of K_{ATP} channel in mammalian cells
Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences 24th May 2009 Tokyo

②**木村泰久**、平山裕士、浅見成美、木岡紀幸、松尾道憲、加藤博章、植田和光

ヒト培養細胞を用いたヒトABCトランスポーターの大量発現系の構築および精製条件スクリーニング手法の開発
分子生物学会, 2008年12月15日, 神戸

③平山裕士、**木村泰久**、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光

ヒトABCG1の大量培養系の構築・安定化条件の探索
農芸化学会, 2009年3月28日, 福岡

④**木村泰久**、平山裕士、松尾道憲、木岡紀幸、加藤博章、植田和光

ヒト培養細胞を用いたATP感受性カリウムチャネル複合体の大量生産、高純度精製
農芸化学会, 2009年3月28日, 福岡

⑤**木村泰久**、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光
Mechanism of multidrug recognition by MDR1 - cholesterol fill-in model
FEBS-ABC2008, March 1-8, 2008, Innsbruck, Austria

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村泰久(KIMURA YASUHISA)

京都大学 大学院農学研究科 助教

研究者番号: 10415143

(2)研究分担者
無

(3)連携研究者
無