

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 22日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤 C

研究期間：H21～H23

課題番号：21590322

研究課題名（和文） バンド3 タンパク質の膜内領域の構造解析

研究課題名（英文） Structural Study on Human Red Cell Band 3 Protein, AE1.

研究代表者 濱崎 直孝
(Naotaka Hamasaki)

研究者番号：00091265

研究成果の概要（和文）：バンド3 タンパク質が媒介する陰イオン透過の分子機序解明を目的として、電子線構造解析・X線構造解析によるバンド3 タンパク質の膜内貫通ペプチド領域の相互位置決定を目的として研究計画を申請した。本研究期間に目的以上の成果を上げることができた。その成果を下記に箇条書きに列挙する。

1. 赤血球膜の外側から共有結合してバンド3を固定化するイオン輸送阻害剤（H₂DIDS）を付加してバンド3の安定化を試み、良質なバンド3の二次元結晶を得ることができ、極低温（-269℃）で結晶を観察することができる電子顕微鏡を用いることにより、これまで実現できなかった7.5Åという分解能で立体構造を解析することができ、膜内貫通ペプチド領域の相互位置を決定した（発表論文：Yamaguchi, T. et al. J. Struc. Biol. 169, 406-412 (2010); Yamaguchi, T. et al. J. Mol. Biol. 397, 179-189 (2010)）。
2. 1.と同様な処理をしたバンド3 タンパク質の三次元結晶の作製に成功し、高分解能での解析ができ、現在、論文投稿準備中である。
3. 上記二つの成果から、申請目的“バンド3 タンパク質の膜内貫通ペプチド領域の相互位置決定”は完全に達成できた。これからは、さらに詳細な構造解析に励み、“バンド3 タンパク質が媒介する陰イオン透過の分子機序解明”を目指す。

研究成果の概要（英文）：The membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 (AE1) works as a Cl⁻/HCO₃⁻ antiporter. This exchange is a key step for CO₂/O₂ circulation in the blood. In spite of their importance, structural information about AE1 and the AE (Anion Exchanger) family is still very limited. We used the electron microscopy and the X-ray diffraction methods to solve the three-dimensional structure of the AE1 membrane domain, fixed in an outward-open conformation by cross-linking. A dimer of AE1 membrane domains packed in two-dimensional array showed a projection map similar to that of the prokaryotic homolog of ClC chloride channel, a Cl⁻/H⁺ antiporter. In a three-dimensional map, there are V-shaped densities near the center of the dimer, and slightly narrower V-shaped clusters at a greater distance from the center of the dimer. These appear to be inserted into membrane from opposite sides. The structural motifs, two homologous pairs of helices in internal repeats of ClC transporter (helices B+C and J+K), are well fitted to those AE1 densities after simple domain movement. We could get good enough results with a high

resolution for examining the structure and function relationship of the anion exchange in red blood cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学
 科研費の分科・細目： 基礎医学・医化学一般
 キーワード： 生体分子医学、バンド3タンパク質、膜貫通領域

- 研究開始当初の背景
赤血球膜バンド3タンパク質が媒介する陰イオン透過の分子機序解明がなされておらず、その解明の解明が待たれている状況である。
 - 研究の目的
赤血球膜バンド3タンパク質が媒介する陰イオン透過の分子機序解明が目的である。この最終目的へ向けて本研究期間では、電子線構造解析ならびにX線構造解析を用いて、バンド3タンパク質の膜内貫通ペプチド領域の相互位置決定を行う。
 - 研究の方法
バンド3タンパク質を単結晶化し、それを電子線構造解析ならびにX線構造解析似て構造解析する。
 - 研究成果
電子線構造解析ならびにX線構造解析とともに、高解像での構造解析ができ、期待以上の成果を得ることができた。
 - 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) バンド3タンパク質に関連する論文のみリストアップ。
〔雑誌論文〕 (計 5件)
- Yamaguchi T., Fujii T., Abe Y., Hirai T., Kang D., Namba K., Hamasaki N., and Mitsuoka K.: Helical image reconstruction of outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals. *J. Struct. Biol.* 169 (3):406-412, 2010.

- Yamaguchi T., Ikeda Y., Abe Y., Kuma H., Kang D., Hamasaki N., and Hirai T.: Structure of the Membrane Domain of Human Erythrocyte Anion Exchanger 1 Revealed by Electron Crystallography. *J. Mol. Biol.* 397, 179-189 (2010)
- Takazaki, S, Abe, Y, Yamaguchi T, Yagi M, Ueda T, Kagn D, and Hamasaki N. Mutation of His 834 in human anion exchange 1 affects substrate binding. *Biochem. Biophys. Acta*, 1798, 903-908 (2010)
- Hirai T, Hamasaki N., Yamaguchi T, and Ikeda Y. Topology models of anion exchanger 1 that incorporate the anti-parallel V-shaped motifs found in the EM structure. *Biochem. Cell Biol.* 89, 1-9 (2011)
- Takazaki, S, Abe, Y, Yamaguchi T, Yagi M, Ueda T, Kagn D, and Hamasaki N. Arg901 in the AE1 C-terminal tail is involved in conformational change but not in substrate binding. *Biochem. Biophys. Acta*, 1818, 658-665 (2012)

〔学会発表〕 (計 1件)

Hirai T, Hamasaki N., Yamaguchi T, and Ikeda Y. Topology models of anion exchanger 1 that incorporate the anti-parallel V-shaped motifs found in the EM structure. in CSBMCB 53rd Annual Meeting on Membrane Protein in Health and Disease.

〔図書〕 (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：抗ヒトバンド3モノクローナル抗体
発明者：小林拓也、小林貴美、荒川孝俊、日野智也、村田武士、野村紀通、岩田想、浜窪隆雄、岩成宏子、望月康弘、濱崎直孝
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：

番号：特願 2011-246364

出願年月日：2011 年 11 月 10 日

国内外の別：国内のみ

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

理研プレス発表（H22. 1. 22）

日刊工業新聞（H22. 1. 25 科学技術・大学 28 面）

科学新聞（H22. 2. 5）

6. 研究組織

(1) 研究代表者：濱崎直孝 (Naotaka Hamasaki)

研究者番号：00091265

(2) 研究分担者：隈博幸 (Hiroyuki Kuma)

研究者番号：40435136

(3) 連携研究者：平井照久 (Teruhisa Hirai)

研究者番号：10450412

岩田想 (So Iwata)

研究者番号：60452330

小林拓也 (Takuya Kobayashi)

研究者番号：20311730