

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 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770100

研究課題名（和文） 尿素トランスポーターの構造解析

研究課題名（英文） Structural analysis for the urea transporter

研究代表者

山形 敦史（YAMAGATA ATSUSHI）

東京大学・放射光連携研究機構・助教

研究者番号：20463903

研究成果の概要（和文）：

硫酸還元菌由来 (*Desulfovibrio vulgaris*) の尿素トランスポーターの発現と精製に成功した。界面活性剤の検討を行い、デシルマルトシドを用いて、結晶化に成功した。この結晶について低分解能ながら回折データを得た。マウス由来の尿素トランスポーターについて GFP 融合体での発現を行い、FSEC による性状解析を行った結果、構造解析に適した単分散の会合状態であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

We succeeded the expression and purification of the urea transporter from *Desulfovibrio vulgaris*. After the optimization of the detergent, we obtained the crystals using the decyl maltoside. We collected the low resolution diffraction dataset on this crystal. We expressed the mouse urea transporter as the GFP fused form. FSEC analysis revealed that the mouse urea transporter exists as the monodisperse state, suitable for the structural analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

尿素トランスポーター（以下 UT と略）は尿素的選択的輸送を行う膜タンパク質である。ヒトでは、UT-A, UT-B の2種の異なる遺伝子が存在し、さらにそれらのスプライシングアイソフォームによって計7種の UT の存在が知られている。UT-A は主に腎臓での尿素的輸送に関わるのに対し、UT-B は赤血球や直細血管において機能す

ることが知られている。UT-A と UT-B は互いに良く似ているが、UT-A は UT-B が二個タンデムにつながったより複雑な構造である。

一方、バクテリアの中にも UT-B と相溶性の高い尿素トランスポーターが存在する。一部の病原菌では UT を通して尿素的を効果的に取り込み、これをアンモニアへと分解することにより、胃のような酸性の条件

下でも生存することが可能となっている (図 1)。

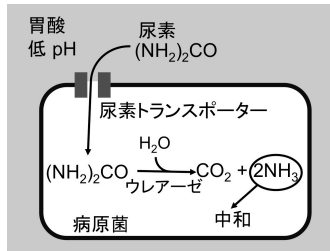


図 1 バクテリア UT によるアンモニア生成機構

このように、極めて重要な機能を持つにも関わらず、研究開始当初、バクテリア由来のものも含めて UT の構造解析例はなく、尿素の選択的輸送メカニズムについての詳細な研究はなされてこなかった。

2. 研究の目的

UT の尿素の選択的輸送メカニズムを原子レベルで詳細に解明するために、立体構造解析とそれに基づいた生化学的解析を目的とした。バクテリアの UT に変異を入れた菌株では酸性条件下での生存が著しく低下することが知られており、バクテリア UT に対する阻害剤は病原菌に対する全く新しい抗生物質となり得ると考えられる。また、マウスでも UT のノックアウトによって、尿中の尿素濃度が正常型と比べて大幅に低くなることが分かっており、UT の有効な阻害剤のデザインが新たなタイプの利尿薬につながることを期待される。以上より、UT の立体構造に基づく詳細な解析が、学術的意義だけでなく、ドラッグデザインのような応用的意義も高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) バクテリア UT の発現検討

バクテリアのゲノムから UT 遺伝子を PCR によって増幅し、T7 プロモーターによる強力な発現が可能な pET ベクターにクローニングした。UT 目的タンパク質の精製が容易になるように、ヒスチジンタグ融合体として発現されるようにクローニングした。次に、得られたベクターを大腸菌に形質転換し、1 リットル程度の培養スケールで発現を検討した。発現させた大腸菌を界面活性剤 (ドデシルマルトシド) を含む緩衝液中で超音波破碎したのち、遠心上清を Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製によってどの生物種の

UT が構造解析に十分なだけの発現があるかを検討した。

(2) バクテリア UT の精製と結晶化

十分な発現が認められる UT について、10 リットル程度の培養スケールでの培養を行った。回収した大腸菌を、超音波破碎もしくは高圧破碎したのち、超遠心によって膜画分を回収し、界面活性剤による可溶化を行った後、Ni アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。さらに、精製産物をゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、溶液中での会合状態の解析を行った。精製サンプルを用いてシッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行った。得られた結晶の回折データを大型シンクロトロン放射光施設 Photon Factory、SPring-8 にて測定を行った。

(3) FSEC 解析

FSEC (Fluorescence detection Size Exclusion Chromatography) 解析は、蛍光タンパク質タグ付きの膜タンパク質を蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィーによって迅速に性状解析する手法である。FSEC 解析の概要を図 2 に示す。

本研究では、高等真核生物種の UT の発現と性状解析のために、昆虫細胞発現系による FSEC の系の確立から始めた。まず、Invitrogen 社製の Bac-to-Bac システムの pFastBac ベクターを基に、HRV3C プロテアーゼ認識サイトとヒスチジンタグ付き GFP 遺伝子を含むベクターを作製した。次に、このベクターに UT 遺伝子をクローニングし、C 末 GFP 融合体として発現させるコンストラクトを作製した。作製したコンストラクトから Bac-to-Bac システムを利用して Bacmid を調整し、これを Sf9 昆虫細胞に感染させてタンパク質発現を行った。この昆虫細胞を 1% ドデシルマルトシドを含む緩衝液によって可溶化した後、超遠心によって上清画分を分

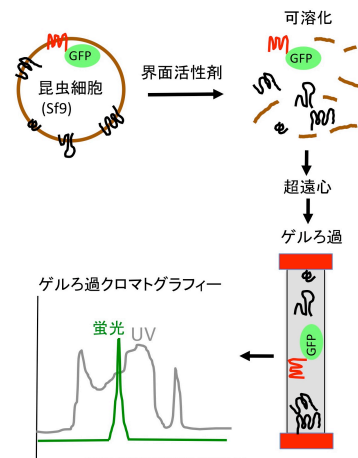


図 2 FSEC の概要

離した。この上清画分を、島津社製の蛍光検出器 (RF-10AXL) 付き液体クロマトグラフィーシステムを用いて GFP の蛍光 (励起/蛍光波長=480/512 nm) の検出を行った。

4. 研究成果

(1) バクテリア UT の結晶化

まず構造解析に十分な質と量のバクテリア UT を得るために組換え体での発現・精製を行った。硫酸還元菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) と黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の UT について発現を検討したところ、硫酸還元菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) 由来の UT (以下 dvUT と略) が良く発現することが分かった。そこで、dvUT を 10 リットル程度の培養スケールで発現させ、細胞破碎後に膜画分を分離、界面活性剤による可溶化を経て、Ni アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。この精製 UT はゲルろ過クロマトグラフィーでは単一のシャープなピークを示した (図 3A)。さらに、各種界面活性剤に対する安定性をゲルろ過クロマトグラフィーを用いて検討したところ、マルトースを親水部とする界面活性剤存在下では安定であることが分かった。特にデシルマルトシド存在下において dvUT のピークがシャープであることから結晶化が期待された。実際にデシルマルトシドを用いて精製した dvUT を用いて結晶化したところ、ポリエチレングリコールを沈殿剤とする条件で、図 3B のような結晶を得ることが出来た。Photon Factory、SPring-8 にて回折データ測定を行ったところ、分解能 6 Å 程度の回折を得ることが出来た。

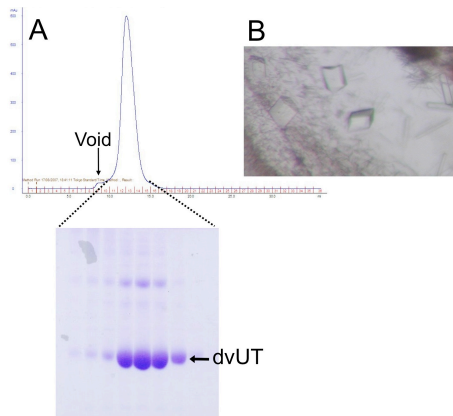


図 3. (A) dvUT のゲルろ過クロマトグラフィーと SDS-PAGE (B) dvUT の結晶

(2) マウス UT の発現と性状解析

高等真核生物由来の UT の構造解析を目指して、マウス UT (mUT) の発現と性状

解析を行った。UT-A、UT-B のうち、よりシンプルな UT-B (以下 mUTB と略) に焦点を絞って研究を行った。

膜タンパク質の構造解析には何よりも性質の良いサンプルを得ることが重要である。近年、FSEC と呼ばれる手法を用いて、迅速に膜タンパク質の性状解析を行うことが可能となった。FSEC では、蛍光タンパク質 GFP を付加させた形で目的タンパク質を発現させた後、界面活性剤による可溶性上清を蛍光検出を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって性状解析を行う。この手法では、少量で精製を行うことなく性状解析を行うことができるので、発現が困難な真核生物種の膜タンパク質には特に有用な手法である。また、高等真核生物の膜タンパク質は、大腸菌を用いての発現が難しく、酵母や昆虫細胞といった真核生物の発現系を用いる必要がある。そこで本研究では昆虫細胞発現系を用いた FSEC 解析を行うことにした。

まず、cDNA ライブラリから mUT-B 遺伝子を PCR によって増幅させ、C 末端 GFP 融合体として発現させることのできるように作製したベクターにクローニングした。C 末 GFP 融合 mUT-B (mUTB-GFP) を昆虫細胞 (Sf9) 内で発現させたのち、FSEC 解析を行った。その結果、mUTB はシャープな単分散のピークを示した (図 4)。さらに、界面活性剤で可溶化した mUTB-GFP を Ni アフィニティークラムによって精製した。精製の各フラクションを SDS-PAGE

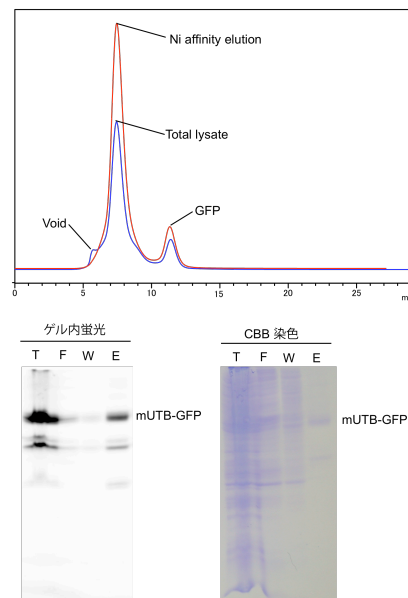


図 4. mUTB-GFP の FSEC と SDS-PAGE による解析。SDS-PAGE の各レーン T; 遠心上清、F; フロースルー、W; 洗浄、E; 溶出をそれぞれ示す。

によって分離し、GFP 蛍光を特異的に検出するゲル内蛍光と、タンパク質を染色する CBB 染色の二種の検出方法によって検出したところ、mUTB-GFP が確かに精製されたことが分かった (図 4)。また、この精製サンプルを FSEC による解析を行ったところ、同じく単分散のピークを示し (図 4)、精製によってこの性質が失われないことが明らかとなった。以上より、mUT-B が構造解析に適したサンプルであることが示された。

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 1 件)

佐藤裕介、藤田宏明、吉川梓、山下雅美、山形敦史、Kaiser S、岩井一宏、深井周也
Proc. Natl. Acad. Sci. 査読有、2011、108 巻、20520-20525

DOI: 10.1073/pnas.1109088108

[図書] (計 1 件)

山形敦史
日本結晶学会誌、査読有、2011、53 巻、264-268

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/SRROLifeSciDivJp2/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 敦史 (YAMAGATA ATSUSHI)

東京大学・放射光連携研究機構・助教

研究者番号：20463903