

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770095

研究課題名(和文) X線結晶構造解析によるペプチドトランスポーターの基質輸送機構の解明

研究課題名(英文) The transport mechanism of the peptide transporter by the X-ray structural analysis.

研究代表者

小笠原 諭 (OGASAWARA, Satoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30546685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：好冷細菌 *Shewanella oneidensis* 由来 PepTSo の結晶構造解析と平行して、さらに *Streptococcus thermophilus* 由来 PepTSt、植物のシロイヌナズナ由来 PEPT ホモログ 2 種について抗体作製を行った。PepTSo に対するモノクローナル抗体作製で確立した方法を用い、複合体を形成する構造認識抗体を数クローンずつ得た。各ホモログとの共結晶化を検討し、PepTSt-抗体複合体は蒸気拡散法による初期スクリーニングから良好な結晶が得られた。X線回折実験から、この結晶から 3.5Å 前後の回折点が得られた。現在、これらの抗体を用いて機能解析および、構造解析中である。

研究成果の概要(英文)：We were trying to co-crystallize the complex of the PepTSo and antibody. Furthermore we tried to generate antibodies against PEPT homologues, one homologue was from *Streptococcus thermophilus* (PepTSt) and two were from *Arabidopsis thaliana* (PTR1 and PTR2). As we generated antibodies against PepTSo, we were successful to produce some antibodies against three homologues. These antibodies recognized conformational epitope of the PEPT homologues. On initial screening by vapor diffusion method, the complex of the PepTSt and this antibody conformed crystals. The crystals were diffracted at about 3.5 angstrom. We are now proceeding the functional and structural analyses.

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：ペプチドトランスポーター モノクローナル抗体 構造解析 膜蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトペプチドトランスポーター(以下PEPT)は推定12回膜貫通の膜蛋白質である。そのうち小腸吸収上皮細胞の刷子縁膜に発現するオリゴペプチドトランスポーターPEPT1は、ジ/トリペプチドのみならず、ペプチド類似構造を有するβ-ラクタム環を有する抗生物質やACE阻害薬、抗がん薬のベスタチン、ペプチド構造を持たない抗ウイルス薬バラシクロビルや、4-アミノフェニル酢酸、β-アミノレブリン酸などの多様な化合物をも輸送することが明らかにされ、さらにβ-アミノ基をも鎖長の異なるモデル脂肪酸を用いた研究からアミノ基とカルボシキル基とが4CH<sub>2</sub>ユニット分の距離をもつ配置が基質としての最低基本構造であることが示唆されている(Addison et al., *Clin. Sci. Mol. Med.* 1975, Doring et al., *J. Clin. Invest.* 1998, Tsuji et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987, Muranishi et al., *Pharm. Res.* 1989, Doring et al., *J. Biol. Chem.* 1998, Sawada et al., *Br. J. Pharmacol.* 1999, Akarawut et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998)。一方、PEPT2は腎臓で高発現している他、脳・肺・脾臓等多くの臓器に発現が認められるが、小腸では発現していない。従って、PEPT1が薬物の腸管吸収において重要な役割を担っていると考えられる(Ramamoorthy et al., *Biochem. Biophys. Acta.* (1995), Terada et al. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* (1997))。さらにPEPTは腫瘍細胞において、高発現していることから、PEPTに対して高親和性のペプチド系抗がん剤を合成することで、効果的に腫瘍細胞に取り込まれ、薬効を発揮することが期待される。PEPTに対して基質が結合した状態で構造解析を行うことは、効率的な創薬のために非常に重要である。

## 2. 研究の目的

PEPTの構造解析を行うにあたり、哺乳類由来のPEPT1/2はリコンビナントの系では非常に発現量が少ないこと、大量生産が困難であり構造解析には不向きであった。我々はオリゴペプチド輸送活性を持つPEPTのバクテリアホモログ蛋白質を探索し、構造解析を行うこととした。その中で好冷細菌*Shewanella oneidensis*由来ペプチドトランスポーター(以下PepTSo)は12回膜貫通領域を持ち、ジ/トリペプチドを基質とする輸送体であることが、共同研究者のNewsteadらによって明らかとなっている(Newstead et al., *EMBO J.* 2011)。しかし、輸送通路内の基質の存在に関する構造情報が今回の3.6-3.8 Åの分解能からは得ることができず、より高い分解能が求められる。そこで申請者はPEPTSoの立体構造を基質の結合した状態で、2 Å前後の分解能で構造解析することを目的とする。得られたPepTSoの構造情報と、β-ラクタム環を有する抗生物質を中心としたPepTSoの輸送活性測定の結果を元に、ヒトPEPT1/2と比較し、ペプチドトランスポーターの基質輸送機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

PepTSoの結晶性、および結晶の分解能を向上するため、これまでにPepTSo特異的モノクローナル抗体を作製している。基質の輸送状態の構造を明らかにするためPepTSoがジ/トリペプチドを取り込ませた状態で試料を調製し、Vapor diffusion法、およびLipidic cubic phase法で結晶化の検討を行っている。現在までに両者から共結晶が得られており、さらに条件の最適化中である。

平成24年度はこれらの結晶を2 Å前後の分解能で構造解析することを目標とした。また複数得られているPepTSo特異的モノクローナル抗体について、PepTSoへ複数種類結合が可能か、その場合の結晶性についても検討を行う。

平成25年度は薬剤の取り込みについて検

証するため、海外の共同研究者と協力して、ペプチド類似構造化合物（ラクタム環を有した抗生物質など）の輸送活性を測定するとともに、共結晶化の検討、あるいは得られた構造情報からモデリングを行って、これまでのヒト PEPT1/2 の基質輸送活性に関する知見と比較を行い、基質輸送機構について考察する。

平成 25 年度では、平成 24 年度で計画した「2 Å 前後の分解能で構造解析」が順調に進まなかったため、別の PEPT ホモログについて構造解析に着手し、共同研究者の Newstead 博士が新たに *Streptococcus thermophilus* 由来 PEPT ホモログ PepTSt、植物にシロイヌナズナ由来の PEPT ホモログ 2 種 (PTR1、PTR2) について発現・精製に成功し、一部は構造解析に成功している (Solcan et al., *EMBO J.* 2012, Parker and Newstead., *Nature* 2014)。PepTSo の抗体作製で構築した技術を用い、これらの PEPT ホモログに対する構造認識抗体作製を行う。同様にして抗体との共結晶化を検討し、これらの PEPT ホモログで構造を比較することを試みる。

#### 4 . 研究成果

平成 24 年度では、基質の輸送状態の構造を明らかにするため PepTSo の基質となるジアラニン、トリアラニン、基質とならないテトラアラニンをそれぞれ過剰量添加した状態で、抗体 Fab フラグメントを結合させ、アラニン基質を添加しない状態とゲルろ過クロマトグラフィーによる比較を行った。しかしアラニン基質が低分子のため、溶出位置に変化はなかった。続いて、表面プラズモン共鳴法 (Biacore T100) を用いて、PepTSo とアラニン基質、抗体との結合関係を調べることを試みた。C 末端に PepTSo が付加した PepTSo のコンストラクトを作製して精製を行った。センサーチップに抗 His-tag 抗体を固相化し、精製した PepTSo\_His-tag をキャ

プチャー後、アラニン基質-抗体、または抗体-アラニン基質をインジェクトしたが、やはりアラニン基質が低分子のため、あるいは親和性が低いため検出は困難だった。PepTSo への基質の結合が生化学的に確認できなかったものの、基質の結合により PepTSo の構造や安定性が変化すると、結晶性も変化すると考え、アラニン基質を添加した共結晶化を試みた。蒸気拡散法、LCP 法、いずれもアラニン基質を添加しない場合と全く変わらない条件で結晶が創成された。この条件で得られた結晶を、大きさに応じて大型放射光施設 SPring-8 の BL32XU、BL41XU にて X 線回折実験を行ったが、分解能の改善は見られなかった。

PepTSo の結晶性を改善するため、PepTSo に対する構造認識抗体のうち共結晶の得られる 7 種類のクローンについて、複数の抗体が結合できるかの検討を行った。抗体との共結晶化のメリットは、抗体フラグメントの持つ親和性が、持つ膜蛋白質が持つ高い疎水性を打ち消すことである。一方で、抗体との共結晶化のデメリットは、抗体結合付近は詳細に解析できるが、抗体結合部位から遠い部分はディスオーダーしてしまうことである。もし複数個ある抗体の中で、PepTSo を挟み込むように結合できる抗体の組み合わせで結晶が得られれば、分解能の改善や上記のデメリットが克服できる。通常の PepTSo-抗体 Fab フラグメントのゲルろ過による分子量は約 150kDa であるが、さらに抗体 Fab フラグメントが結合することで高分子量側にシフトすることが予想された。PepTSo に対して 7 種類の抗体 Fab フラグメントの組み合わせ計 42 パターンについて、ゲルろ過クロマトグラフィーによる解析を行った。しかし、前パターンの組み合わせにおいても高分子量側へのシフトは確認できなかった。これは各抗体のエピトープが PepTSo に対して非常に近傍にあることなどが予想された。

PepTSto の結晶性を改善するための二つ目の手段として、結晶の脱水処理の効果を検討した。蒸気拡散法では、結晶に占める水分含量が多いため分解能が向上しない場合がある。そこで結晶創成後、段階的に水分含量の低い沈殿剤へ結晶を移行していく事により結晶中の脱水を行うことができる。そこで蒸気拡散法での PepTSto-抗体 Fab フラグメント結晶化条件の約 30% PEG400 である。この濃度から PEG 濃度を段階的に増加したりザバーへ結晶を移動させ、結晶の分解能を検討した。PEG 濃度が 40%以上となると、結晶が萎縮して崩れてしまった。そこで結晶の形状がほとんど変化しないものを採取し大型放射光施設 SPring-8 の BL32XU、BL41XU にて X 線回折実験を行った。複数個の結晶のうち、1 割程度で分解能が約 3 Å 前後の回折点まで得られた。しかし、顕微鏡観察では目視できない微小な損傷があり、得られたデータセットでは解析できなかった。結晶の脱水処理は有効ではあるものの、その方法については多数の検討の余地があると考えられる。

平成 25 年度では、平成 24 年度で計画した「2 Å 前後の分解能で構造解析」が順調に進まなかったため、別の PEPT ホモログについて構造解析に着手し、共同研究者の Newstead 博士が新たに *Streptococcus thermophilus* 由来 PEPT ホモログ PepTSt、植物にシロイヌナズナ由来の PEPT ホモログ 2 種(PTR1、PTR2)について構造認識抗体作製を行い、共結晶化を検討した。Newstead 博士から提供された各精製 PEPT ホモログを、リン脂質を用いてリポソーム再構成を行い、免疫、スクリーニングに用いた。PepTSto に対する抗体作製で構築したスクリーニング方法(リポソーム ELISA、変性 ELISA、抗体用蛍光ゲルろ過クロマトグラフィー)を用いて構造認識抗体を樹立した。その結果、PepTSt に対しては 3 クローン、PTR1 に対し

ては 11 クローン、PTR2 に対しては 3 クローンの構造認識抗体を樹立した。

PepTSt と PTR1 についてはハイブドーマの培養上清約 100ml からプロテイン G アフィニティゲルを用いた IgG 精製を行い、パパイン消化によって抗体 Fab フラグメントの調製を行った。その後、PepTSt、PTR1 それぞれに抗体 Fab フラグメントを添加し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより複合体形成の確認を行った。PepTSt では 3 クローン、PTR1 では 3 クローンが複合体形成をすることを確認した。これらの複合体画分を分取し、結晶化スクリーニングを行った。

PepTSt では St48-1 と St59-3 の抗体との複合体で共結晶が得られた(図 1)。

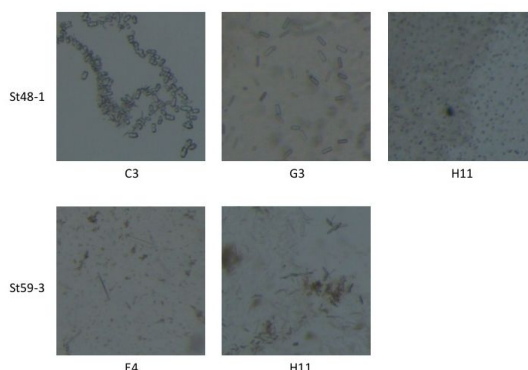


図1:PepTStの共結晶化

PTR1 では PTR44-1 との複合体で共結晶が得られた(図 2)。

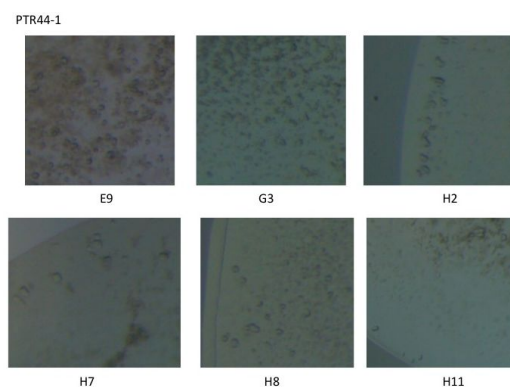


図2:PTR1の共結晶化

PepTSt と St59-3 の複合体の共結晶は初期スクリーニングプレートで結晶が採取できるほどの大きさまで結晶が成長した。そこで大型放射光施設 SPring-8 の BL32XU にて X 線回折実験を行った。その結果、3.5 Å 前後の

回折点が得られた(図3)。

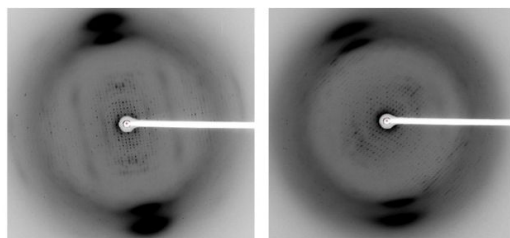


図3:PepTSt-抗体Fabフラグメント(St59-3)共結晶の回折

PepTStで共結晶の得られた St48-1 と St59-3 のクローン、および PTR1 で微結晶の得られた PTR44-1 のクローンはハイブリドーマを Balb/c マウスへ接種し、腹水作製による抗体の大量生産を行った。プロテイン G アフィニティゲルを用いた IgG 精製をして 100mg 以上の抗体 IgG を取得した。一部は Newstead 博士へ送付し、生化学的解析、結晶構造解析を依頼した。

一方、PTR2 で樹立した 3 クローンについては、精製 PTR2 の量が足りなかったため、結晶化スクリーニングは行わずに、腹水作製による抗体の大量生産を行った。こちらについてもプロテイン G アフィニティゲルを用いた IgG 精製をして 100mg 以上の抗体 IgG を取得した。

本課題において、ペプチドトランスポーターの基質輸送機構の解明には至らなかったが、複数の PEPT ホモログに対して、構造解析可能な構造認識抗体を樹立することができた。これは PepTSo に対する構造認識抗体を作製する過程で構築した技術基盤の成果である。この抗体作製技術基盤はペプチドトランスポーターだけでなく、他の膜蛋白質にも応用可能であった。本課題ではないが、この技術基盤を利用して膜酵素の構造解析に成功した(Manolaridis, Ogasawara et al., *Nature*, 2013)。現在、本課題で確立した「構造解析に有用なモノクローナル抗体作製技術」について論文準備中である。今後、PEPT に基質分子を取り込ませた機能性状態を作製し、この抗体作製技術を用いて樹立した構造認識

抗体により共結晶構造解析、ペプチドトランスポーターの基質輸送機構を原子レベルで解明できることが期待される。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小笠原諭、Simon Newstead、小笠原かほり、日野智也、荒川孝俊、寿野千代、村田武士、金子美華、加藤幸成、岩田想；膜タンパク質の結晶化・構造解析を支援するモノクローナル抗体作製技術の開発、第 79 回日本生化学会東北支部例会、2013 年 5 月 11 日、仙台

〔図書〕(計 1 件)

名倉淑子、小笠原諭、田辺幹雄；シーエムシー出版、「タンパク質結晶の最前線」：抗体を用いた膜タンパク質の結晶化、2013、110-119 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小笠原 諭 (OGASAWARA, SATOSHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30546685