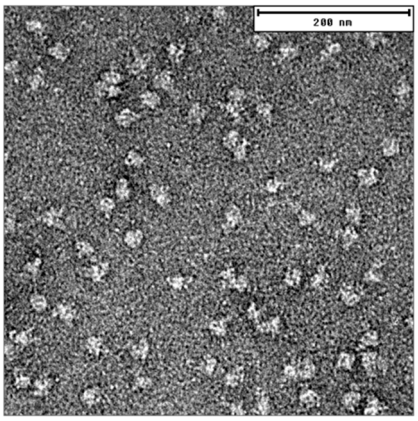
149　金属過不足疾患に関わる亜鉛輸送体の構造と機能の解明	田中　良樹

【目的】生命活動の維持のために、輸送体タンパク質によって細胞内部の分子濃度は一定の範囲に維持されている。輸送体の「選択性」と「輸送制御」が適切に機能することで、生体恒常性が保たれる。この輸送体のメカニズムの完全な理解のためには原子分解能レベルの構造情報が必要である。しかし、高分解能で構造解析されている大半の輸送体が原核生物由来のものであり、輸送体膜タンパク質の構造研究は発展途上にある。このため構造情報からのヒトの疾患に対する創薬への応用までの道程は長い状況にある。本研究では構造未知の真核生物由来の亜鉛輸送体タンパク質などの三次元構造に焦点をあてた研究を行う。

【方法】亜鉛などの金属イオンの輸送を担う輸送体膜タンパク質の立体構造決定を第一の目標とし、それに加えて構造情報に基づく解析を行うことにより、構造と機能の間の相関を解明し、既知の疾患などの原因を明らかにすることを目標に研究を行った。構造決定のためには純度の高いタンパク質試料が大量に必要となる。そのために必要となる試料は真核生物のタンパク質発現系の一つであるメタノール資化酵母を形質転換して調製した。研究代表者はこれまでにこの系を利用して植物の多剤排出輸送体の構造を決定し報告した [1]。複数の生物種から解析対象タンパク質の遺伝子をデータベースから検索し、DNA 合成により遺伝子を入手した。発現用ベクターに遺伝子を導入し、酵母発現系を構築した。発現条件の検討、精製条件の検討を繰り返し、精製試料を得る系を確立した。精製試料を用いて、結晶化や電子顕微鏡撮影を行った。結晶が得られた物に関して、大型放射光施設 SPring-8 BL32XU などのマイクロフォーカス X 線を用いて回折実験を行い、立体構造決定を試みた。同時にクライオ電子顕微鏡による構造決定も予定していたが、クライオ電子顕微鏡での構造解析を行うには輸送体の分子量が小さいという問題点があったため、抗体を結合させ、複合体で測定を行うことで分子量の小ささを解決する方法を試みた。解析対象に特異的結合する抗体を、マウスを用いて作製する方法と、特定のペプチドに結合する抗体を利用する方法の二つを進めた。

【結果】植物の亜鉛を含む 2 価金属イオン輸送体について、取り込み型と排出型のそれぞれについて大量発現系・精製系を確立した。特異的結合抗体を作製し、安定な複合体を形成することを確認した。共結晶化を行った結果、タンパク質結晶を得ることに成功したが、回折実験では高分解能データは得られていない。並行して、クライオ電子顕微鏡での構造解析の前段階としてネガティブ染色電子顕微鏡撮影を行った。ネガティブ染色での撮影像から、輸送体タンパク質と抗体複合体粒子を確認している (図)。クライオ電子顕微鏡像による高分解能の立体構造解析を可能とするためには、より均一で安定した複合体が必要と考えられたため、測定試料の調製方法の改良が必要であると結論付けた。

抗体複合体ネガティブ染色電子顕微鏡像



149. 金属過不足疾患に関わる亜鉛輸送体の構造と機能の解明

田中　良樹

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域 構造生命科学研究室

Key words：膜タンパク質，輸送体，結晶構造解析

緒　言

生命活動の維持のために、輸送体タンパク質によって細胞内部の分子濃度は一定の範囲に維持されている。輸送体の「選択性」と「輸送制御」が適切に機能することで、生体恒常性が保たれる。この輸送体のメカニズムの完全な理解のためには原子分解能レベルの構造情報が必要である。一般的に輸送体膜タンパク質の構造解析は困難ではあるが、研究代表者はマグネシウムチャネル MgtE や多剤排出輸送体 MATE などの結晶構造解析を達成し、輸送制御機構について新たな知見を加えた［2，3］。しかし、高分解能で構造解析されている大半の輸送体が原核生物由来のものであり、輸送体膜タンパク質の構造研究は発展途上にある。このため構造情報からのヒトの疾患に対する創薬への応用までの道程は長い状況にある。本研究では構造未知の真核生物由来の輸送体タンパク質の三次元構造に焦点をあてた研究を行う。高等真核生物には 20 種類を超える金属イオンの輸送体が存在する。多数の輸送体が協調し、組織特異的に機能して亜鉛恒常性を維持する。SLC（Solute Carrier）輸送体分類において、SLC30 や SLC39 が亜鉛特異的な輸送体とされており、恒常性維持に関与している（図 1）［4］。広く生物種に保存され、高等真核生物から単細胞真核生物、植物にも存在する。細胞質側に His-rich region を有し、細胞質側の亜鉛濃度センサーとして機能している可能性がある。しかし、立体構造が決定されていないため、詳しいことはわかっていない。また、様々な疾患の原因遺伝子が亜鉛輸送体にある変異であることが明らかにされてきており、創薬の面でもその輸送機構の解明が期待されている。また、植物の金属耐性にも関わり、機能の解明が植物のストレス耐性向上にも繋がる可能性がある。亜鉛イオンの恒常性の維持の為の制御機構の詳細な理解のため、本研究では真核生物由来の金属イオン輸送体を対象にして X 線結晶構造解析などを行うことで、その輸送制御機構を明らかにすることを目的とする。さらに、構造情報に基づく遺伝学的・生化学的解析を進め、ヒトにおける亜鉛輸送体が原因となっている各種疾患について、構造面からの原因解明を目指す。本研究提案においては、植物由来の亜鉛を中心とした 2 価金属イオンを輸送する輸送体膜タンパク質の構造解析を主たるテーマとしたが、同時期に進めていた植物由来のアルカロイド輸送体の結晶構造解析に成功したため、その結果についても報告する（論文リバイス中）。

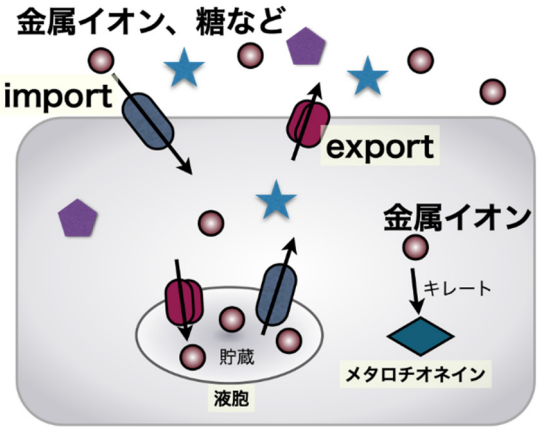


図 1. 細胞における膜タンパク質輸送体による物質輸送

方　法

1. 大量発現系・精製系の構築

構造決定のためには純度の高いタンパク質試料が大量に必要となる。そのために必要となる試料は真核生物のタンパク質発現系の一つであるメタノール資化酵母を形質転換して調製した。大量精製時には 2 L 培養したメタノール資化酵母を破砕したのち超遠心分離により膜画分を回収。これを n-Dodecyl-β-D-maltoside に溶かし、膜タンパク質を可溶化し、各種精製用カラムを使って精製した。

2. 抗体複合体形成

抗体複合体を形成するにあたって、特異的結合抗体を準備する必要があったため、二通りの方法をとった。一つは、解析対象の膜タンパク質を脂質リポソームに再構成し、立体構造を安定化させた状態でマウスに注射し、マウスに抗体を作らせ、回収する方法。もう一つは既に完成しているペプチドー特異的認識抗体の組み合わせを利用し、輸送体のループ部分に認識ペプチド配列を組み込んで抗体を結合させる方法である。マウスから得られた抗体はパパイン処理を施すことで構造が安定な断片 Fab の状態で使用した。ゲル濾過によって結合安定性を評価し、良好なものを構造解析に使用することにした。ペプチド認識抗体に関しても同様にゲル濾過を使用して結合安定性を評価し、ペプチド挿入部位の検討を行った。

3. 結晶化

結晶化手法は膜タンパク質の結晶化に適した方法である脂質キュービック（LCP）法を適用し、結晶化ロボットを使用してスクリーニングと結晶化条件の改良を行った。

4. 電子顕微鏡撮影サンプルの調製

電子顕微鏡を使った測定では膜タンパク質を水溶液中に可溶化させておくために通常使われる界面活性剤が使えないため、精製後に溶液中から界面活性剤を除く必要がある。界面活性剤なしで膜タンパク質を水溶液中で安定化させるために、脂質ナノディスク Membrane scaffold proteins（MSPs）に膜タンパク質を埋め込む手法を利用した。脂質と MSP に疎水性の高い膜タンパク質が囲まれることで、単粒子のまま界面活性剤なしの水溶液中に存在できる（図 2、3）。本研究対象は植物由来の膜タンパク質であるため、脂質も植物由来のものを使用した。

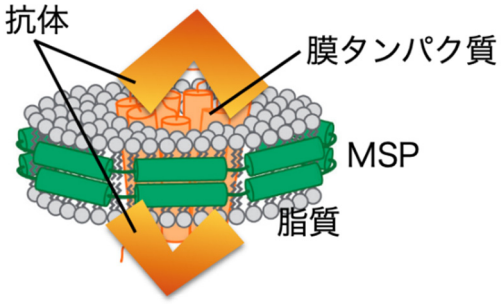


図 2. 膜タンパク質-抗体複合体の脂質ナノディスク再構成時のイメージ
解析対象としている膜タンパク質は 50 kDa 程度の分子量であるが、抗体と結合させた状態でナノディスクに埋め込むことで、合計 100 kDa 程度の分子量になり、クライオ電子顕微鏡での原子分解能での構造解析が期待できる大きさとなる。

5. X 線回折実験

LCP 法で得られた結晶は主に大型放射光施設 SPring-8 BL32XU で測定を行った。BL32XU のマイクロフォーカス X 線と自動測定システムを組み合わせることで微小結晶が得られた時点で、X 線回折データを収集した。回折データの処理には解析ソフトウェア XDS を使用した。

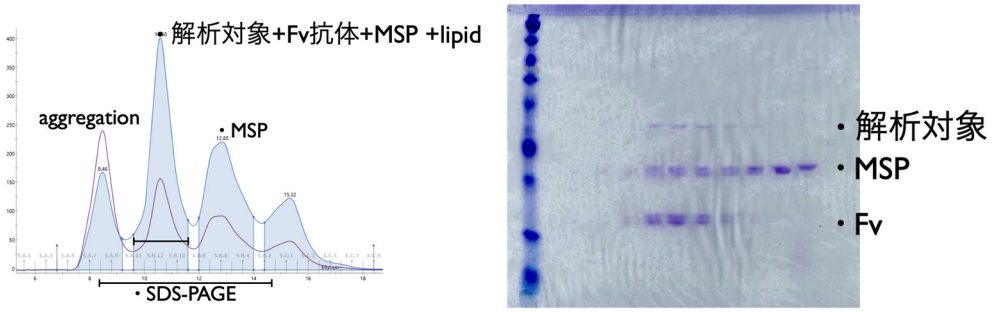


図 3. ナノディスク作製時のゲル濾過結果
ナノディスク再構成後、余分な MSP と脂質を取り除くため、ゲル濾過精製を行った。
クロマトグラフィーと溶出された画分を SDS-PAGE した結果を示す。

結果および考察

1. 亜鉛輸送体の結晶構造解析

サンプルの大量発現および精製方法の確立を行った。得られたタンパク質を使った結晶化スクリーニングにより予備的な結晶が得られた。得られた結晶を用いて大型放射光施設での回折実験を行った。複数の条件の結晶で回折像を取得したが、いずれも異方性が高く、構造決定には至らなかった。

結晶のリファインメントのため、抗体（Fab または Fc）との複合体結晶化を行うこととした。発現ベクターに抗体認識配列を付加、融合タンパク質として大量発現させ、精製後にペプチド配列認識抗体を結合させる方法と、解析サンプル特異的な抗体を、マウスを用いて作製する方法を使用した。抗体複合体状態での結晶化を行ったところ、針状の結晶を得ることに成功した。放射光施設での回折実験を行った結果、予備的な低分解能データを得たものの、構造決定には至らなかった。これまでに複数の抗体が得られており、いまだ全ての組み合わせについて結晶化スクリーニングを実施できていないため、さらなる結晶化を進行中である。並行してクライオ電子顕微鏡での構造決定のための準備を進めた。クライオ電子顕微鏡で構造決定するためにはある程度の分子量の大きさが必要であることと、界面活性剤を溶液から取り除く必要があったため、結晶化にも用いた抗体を結合させ、さらにナノディスクに再構成を試みた。ゲル濾過クロマトグラフィーとネイティブ PAGE の結果から、亜鉛輸送体膜タンパク質＋抗体＋ナノディスクを含む画分を回収できたと判断した。これをネガティブ染色電子顕微鏡で観察したところ、ナノディスク粒子が単分散状態で存在しているのが確認できた。しかし、抗体まで含めた完全な状態のナノディスクの比率が十分ではないということもネガティブ染色電子顕微鏡像でわかった。より複合体比率を高めたナノディスク再構成条件の検討が必要である。

2. 植物の金属耐性に関わるとされる多剤排出輸送体 MATE の結晶構造解析

Nicotiana tabacum 由来 MATE の構造解析を行った。multidrug and toxic compound extrusion（MATE）transporter はほぼ全ての原核生物と真核生物に広く保存されたトランスポーターファミリーの一つであり、細菌の薬剤排出に関わる輸送体として最初に同定された。植物においても保存されている。植物 MATE は特に MATE ファミリー遺伝子を多く有しており、様々な物質輸送に利用している。以前の研究成果として、*Camelina sativa* 由来の MATE 構造［1］を報告しており、それに続く植物由来 MATE として *Nicotiana tabacum* 由来 MATE の構造決定をした。

発現、精製、結晶化に関しては亜鉛輸送体と同様の手法をとって行い、3.6 Å 分解能で構造決定に成功した。今回決定した結晶構造では、非対称単位中にコンフォメーションの異なる 2 分子が含まれていた（図 4）。MATE 全体構造は既知の構造同様に、6 回膜貫通ヘリックス束が二回繰り返した 12 回の膜貫通ヘリックスから構成されていた（図 5）。N 末端、C 末端ともに脂質膜と平行な向きの細胞質ヘリックスが存在する。N 末端のデリーションは構造を不安定化する傾向が認められたため、末端のヘリックスには構造を安定化させる働きがあるのかもしれない。

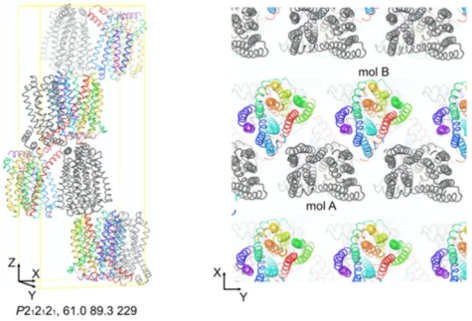


図 4. Nicotiana tabacum 由来 MATE の結晶パッキングの様子
非対称単位中に 2 分子の MATE が含まれている。一方をグレー、もう一方をヘリックスごとの色分けで表示している。LCP 法結晶でよく見られる脂質膜中に横並びになったタンパク質が層状に並び、結晶化している。タンパク質同士が大きく接触する状態にはなく、パッキングがタンパク質構造に与える影響は小さいと考えられる。

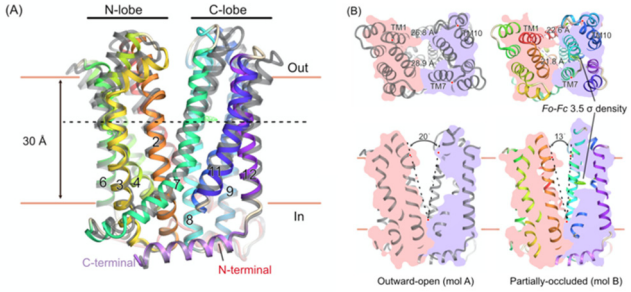


図 5. Nicotiana tabacum 由来 MATE の全体構造
A) 全体構造の重ね合わせ。ほぼ同一の outward-open 型をとっている。
B) 断面図。共に outward-open であるが、開き度合いに違いがあり、mol B が少し狭く、また内部に水分子とは考えにくい大きさの電子密度が観測された。

非対称単位中の二分子は両方とも同じ outward open であるが、開き具合や TM7 の曲がり度合いに違いがあることが明らかになった（図 6）。MATE ファミリーに共通する大きな内部空洞が *Nicotiana tabacum* 由来 MATE にも存在しており、C-lobe 側に広く、ネガティブチャージを有しているという特徴が確認できた。結晶化は輸送基質の一つと予想されているアルカロイドを加えた状態で共結晶化したものの、明確な電子密度を観測するには至らなかった。しかし、一方の分子中には弱い強度ではあるが、水よりも大きな体積の電子密度の塊が C-lobe cavity に存在していた。その部位はフェニルアラニン側鎖とグルタミン酸側鎖に囲まれた領域であるため、正電荷をもつアルカロイド分子の結合ポケットである可能性が高いと考えられた。今回、同一タンパク質から複数の構造状態を決定し、TM7 の変化部位を特定したことで輸送機構について新たな知見が得られた。TM7 にはグリシン残基（G267、G277）があり、αヘリックスが不安定化されて動きやすくなっていると考えられる。MATE ファミリーの基質排出において、TM1 もしくは TM7 の構造変化が重要と考え、今回明らかにした構造とこれまでの知見を合わせて基質排出に関するモデルを提唱した（図 7）。

この MATE に関する構造解析成果についてまとめ、論文として投稿しており、現在審査中である。

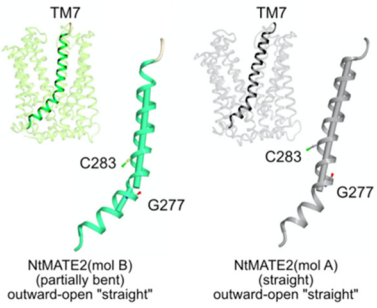


図 6. TM7 拡大図

二分子間の構造変化が最も大きいのが TM7 である。ヘリックス中にグリシン残基が含まれており、この部分でαヘリックスを安定化させる水素結合が切れているため、不安定で動きやすくなっていると考えられる。この構造変化により C-lobe 側のポケットの大きさが変化し、基質結合強度が調節されると考えられる。

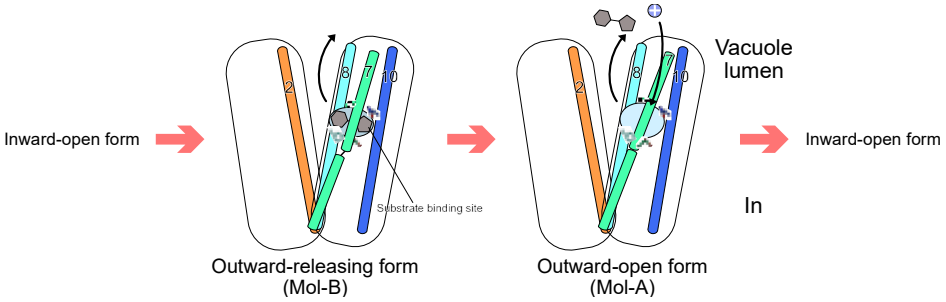


図 7. 基質排出概念図

MATE ファミリーによる基質輸送は inward-open と outward-open 構造の行き来によってなされると考えられているが、内部の結合ポケットから基質が外れる段階に必要な構造変化については明確になっていない。今回決定した構造では、TM7 の曲がり具合によって結合ポケットの大きさが変化すること、やや狭まった mol-B 状態で電子密度が観察され、大きく開いた状態では電子密度が見られないことから、mol-B 状態が基質排出への過渡期の形状と想定した。

共同研究者・謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学大学院先端科学技術研究科バイオサイエンス領域構造生命科学研究室にて行われた。塚崎教授をはじめ、研究室の皆様にはご指導ご鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。

文　献

1) Tanaka Y, Iwaki S, Tsukazaki T. Crystal Structure of a Plant Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family Protein. Structure. 2017 Sep 5;25(9):1455-1460.e2. doi: 10.1016/j.str.2017.07.009. PMID: 28877507.

2) Hattori M, Tanaka Y, Fukai S, Ishitani R, Nureki O. Crystal structure of the MgtE Mg2+ transporter. Nature. 2007 Aug 30;448(7157):1072-5. doi: 10.1038/nature06093. Epub 2007 Aug 15. PMID: 17700703.

3) Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, Ito K, Kuroda T, Higuchi T, Katoh T, Kato HE, Hattori M, Kumazaki K, Tsukazaki T, Ishitani R, Suga H, Nureki O. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. Nature. 2013 Apr 11;496(7444):247-51. doi: 10.1038/nature12014. Epub 2013 Mar 27. Erratum in: Nature. 2020 Feb;578(7794):E19. PMID: 23535598.
4) Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters. Mol Aspects Med. 2013 Apr-Jun;34(2-3):612-9. doi: 10.1016/j.mam.2012.05.011. PMID: 23506894; PMCID: PMC3602797.