

英国 Imperial College London および Diamond light source への

海外派遣報告書

-膜蛋白質の X 線結晶構造解析研究への取り組み-

工学部・応用化学科 助教 海野 英昭

(派遣期間：平成22年 8月13日～平成22年11月11日)

膜蛋白質の X 線構造解析研究を進めるため、英国 Imperial College London および Diamond light source にて研究滞在し、マウスおよびヒト由来グルコーストランスポーターの X 線結晶構造解析研究を実施した。その研究においては、結晶構造解析に適した膜蛋白質結晶を得るために膜蛋白質と抗体との複合体化を行い、複合体の結晶化検討を行った。

1. 滞在研究機関の紹介

今回私が滞在した研究機関は英国にある Imperial College London で、非常に研究レベルの高い理系大学として知られている大学である。滞在先の研究グループは、英国ロンドンにある Imperial College London, Biochemistry Building 内に膜蛋白質結晶学研究室 (Membrane Protein Crystallography)、および英国 Oxfordshire 州 Didcot にある放射光実験施設 Diamond Light Source 内に膜蛋白質研究室 (Membrane Protein Laboratory) の2研究室を有し、膜蛋白質の X 線結晶構造解析研究にターゲットを絞り精力的に研究が進められている。また、その研究の為に必要な技術開発として、膜タンパク質の発現・精製から結晶化、データ収集までの最適化手法の開発も広く手がけており、それにより得られた技術を用いて構造解析された当研究室の研究成果は、Nature, Science といったトップジャーナルに数多く報告されている。今回私は上記2カ所 (Diamond Light Source の膜蛋白質研究室および Imperial College London の膜蛋白質結晶学研究室) の研究室にて研究を行った。

2. 研究内容と成果

私はマウス由来およびヒト由来の膜タンパク質である、グルコーストランスポーターの X 線結晶構造解析をテーマとして研究を行った。グルコーストランスポーターは生体内において細胞膜を貫通する形で存在する膜タンパク質であり、細胞内外のグルコースを膜の反対側に輸送する働きを有している。ヒトではこれまでに7種類のグルコーストランスポーターの存在が報告されており、それぞれのトランスポーターは臓器特異的に発現し、機

能している事がわかっている。これらのトランスポーターを含め、真核生物由来のトランスポーターの結晶構造解析の報告例は無く、真核生物由来のトランスポーターがどのような構造を有し、どのようなメカニズムによって糖もしくは基質の輸送を行っているのかは未だ不明である。本研究では、ヒトおよびマウス由来のグルコーストランスポーター(GluT)の X線結晶構造解析を行う事で立体構造を解明し、その糖輸送のメカニズムを明らかにする事を目的とし研究を行った。

本研究のターゲットタンパク質としている膜タンパク質は、その特徴的な構造及び性質から結晶構造解析が最も難しいタンパク質の一つであり、生物学的に極めて重要なタンパク質である一方で報告例は非常に少ないのが現状である。グルコーストランスポーターの結晶構造解析を行うには、酵母による組み替え型タンパク質の発現、膜タンパク質の精製、タンパク質の抗体との複合体化、結晶化、の各段階でタンパク質を安定かつ均一な状態を維持し実験を進める必要があり、それを維持する事の難しさが膜タンパク質構造解析を難しくさせている要因である。当研究室では、その各段階を安定かつ均一な状態で維持しているかをモニタリングし、最適な条件を見出す手法として、GFP 融合タンパク質を用いた発現、精製システムが確立されており、本研究においてもそのシステムを用いて精製および結晶化の最適化を行った。特に本研究滞在では、抗体との複合体化による安定性向上の最適化に重点を置き、グルコーストランスポーター(GluT)に特異的に結合する抗体を複数準備し、それらと GluT との複合体化およびその安定性向上の変化を CPM assay により確認し、その結果最も安定性を高める抗体を見いだした。その抗体を含め、複数種類との抗体フラグメント(FAB および Fv)とグルコーストランスポーター (GluT1 GluT5, GluT7) との複合体化、および結晶化を行った。これにより得られた安定性向上に関するデータおよび各種結晶は、今後の結晶構造決定に向けて有用な知見となった。



Imperial College London



膜蛋白質結晶学研究室のメンバー

I studied structural analysis of Glucose transporter (GluT) from mouse and human. Glucose transporter are membrane proteins in which it transport sugar from inside or outside of membrane to the other side. Crystal structures of the transporters are not reported until now, and its mechanism as transporter are not revealed yet. In this study, I started structural analysis of mouse and human GluTs for revealing the structure and transport mechanism of the substrate.

The membrane proteins including GluTs are known as difficult target to express, purify and crystallize for structural study by reason of its biochemical property and structural feature. One way to improve the success in obtaining pure membrane proteins for biochemical and structural analysis is to use GFP-based fusion technology. As the C-terminal GFP folds and becomes fluorescent only if the upstream membrane protein integrates into the membrane, the resultant fluorescence is a fast and accurate measure of membrane-integrated expression. Fluorescence is easy to measure directly in liquid culture, standard SDS-gels and detergent-solubilized membranes. Detergent-solubilized membranes can also be subjected to fluorescence size-exclusion chromatography (FSEC) to measure the ‘monodispersity’ of the sample. Although membrane-integrated expression is no guarantee of function, the GFP-tag, nevertheless, speeds up the empirical process that all membrane proteins are required to go through on the way to obtain stable and homo-geneous material for functional and structural work. I purified the GluT proteins with the method described above, made complexes with antibody, measured CPM assay to check stabilities of the complexes, and made several kind of crystals in complex with antibody fragments. This knowledge is thought to be useful information for further study for structure determination and structural analysis of the GluTs.

3. 今後の展望と感想

本研究結果の知見は膜タンパク質結晶学研究室（MPC）の研究者に引き継ぎ、今後抗体との複合体結晶化およびその最適化へと進める予定である。X線回折データの分解能向上には、タンパク質の均一性および安定性が非常に重要であり、本実験により安定性の優れた複合体が得られた事は研究を進める上で大きな前進であり、将来の構造決定および構造解析につながる事が期待される。

本海外派遣で得られた、膜タンパク質の結晶構造解析に関する膜タンパク質の発現・精製最適化手法、界面活性剤の最適化、および膜タンパク質結晶の回折データ処理の各技術は、現在私が長崎大の研究室で進めている各種膜タンパク質の結晶構造解析プロジェクトを進める上で非常に有用であり、派遣先研究室での経験を生かして今後の研究の飛躍的な進展が期待できる。

本海外派遣では滞在先での研究技術習得に加え、研究室の方々との交流から、他の国の方の考え方、英国での習慣、英国での人々の生活に触れることができ、多くの驚きと共に自身の視野が広がり、充実した滞在生活を送る事が出来ました。本研究滞在の機会を与えて下さいました、長崎大およびインペリアルカレッジの関係者の皆様に深く感謝致します。ありがとうございました。