

尿管結石の形成を防ぐシュウ酸輸送体分子の X 線結晶構造解析

島村 達郎
Shimamura Tatsuro

1. はじめに

男性の約 15%，女性の約 7%が発症すると言われる尿管結石は、激痛を伴うことで知られている。この激痛は、尿中に含まれるシュウ酸、リン酸、尿酸、カルシウム、マグネシウム等が石のように固まり、尿管を塞ぐことで生じる。結石で最も多いのがシュウ酸カルシウムを主成分とするものである。このようなシュウ酸の多くは、ほうれん草やお茶等の食品に含まれているものである。食品中のシュウ酸は胃から腸へ送られるが、腸で吸収されたシュウ酸が最終的に尿中に排出され結石の原因となる。そのため、腸で吸収されるシュウ酸の量を減らすことは、結石リスクの軽減に有効である。

腸内細菌の 1 種であるシュウ酸分解菌 (*Oxalobacter formigenes*) は、腸内のシュウ酸を唯一の炭素源として吸収し、ギ酸に分解することでエネルギーを取得している (図 1)。このため腸内のシュウ酸分解

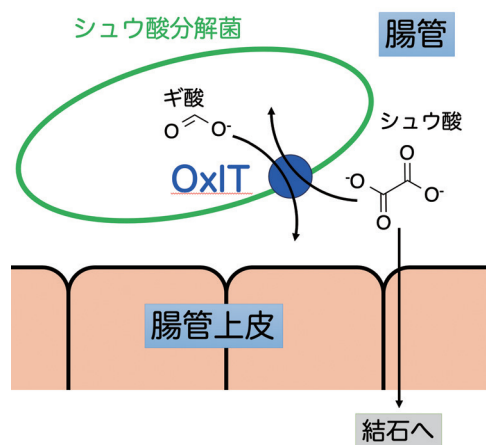


図 1 腸管でのシュウ酸分解菌と OxIT の働き

菌の存在は、結石リスクの軽減に寄与する。実際に、病気や手術等の影響で、腸内のシュウ酸分解菌が少ない人は、結石リスクが高いことが知られている。シュウ酸分解菌による菌体内へのシュウ酸の取込みと菌体外へのギ酸の排出は、細胞膜に存在するシュウ酸輸送体 OxIT により担われている (図 1)。腸内に存在する様々な物質からどのようにして最小のジカルボン酸であるシュウ酸を見分けて取り込むのか等、OxIT の詳しい輸送機構について興味を持たれるが、それらの解明に必須な OxIT の立体構造情報に関しては、低い分解能の構造が発表されているだけであった^{1,2)}。

2. 研究手法

輸送体は、分子の中心付近にある基質結合部位を細胞内外に交互に開閉して輸送を行うという交互アクセス機構により基質を輸送することが知られている (図 2)。これまでの輸送体の研究では、交互アクセス機構における複数の代表的な中間体の立体構造を解明することで輸送機構の詳細が解明されてきた³⁻⁵⁾。そこで筆者らは、X 線結晶構造解析の手法

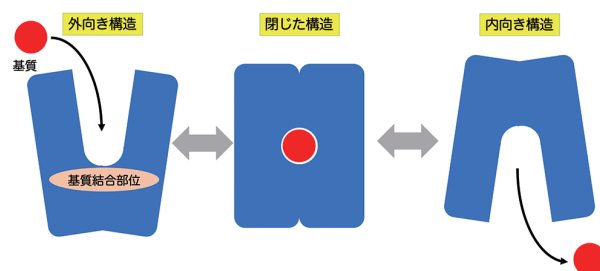


図 2 輸送体の交互アクセス機構

で OxIT の構造決定を試みた。しかし、膜タンパク質である輸送体は結晶化が難しい。その原因として、膜タンパク質は界面活性剤により細胞膜から可溶化して精製する必要があることや、柔軟性が高く不安定であること等が挙げられる。これらを克服するため、筆者らは OxIT をマウスに免疫して取得した構造認識抗体を利用した。このような抗体は、OxIT の立体構造を認識して結合し、OxIT を一定の状態で安定化する。更に、界面活性剤に覆われた OxIT に抗体を結合させることで親水性領域が拡張され、結晶成長に必須である分子間接触が生じやすくなる。なお、界面活性剤に覆われた疎水性領域は結晶成長に利用できない。構造解析の結果から分かったことであるが、筆者らは OxIT の外向き構造と閉じた構造をそれぞれ固定する 2 種類の構造認識抗体の取得に成功した。そして、これらの抗体を OxIT に結合させ、構造解析に適した結晶を取得することに成功した。OxIT の閉じた構造は、蒸気拡散法という従来の結晶化方法で結晶化に成功した。外向き構造は蒸気拡散法では結晶が得られず、キュービックフェーズ法という膜タンパク質に適した結晶化方法を利用することで結晶化に成功した。キュービックフェーズ法は、精製した膜タンパク質を人工脂質二重膜に再構成して結晶化する手法で、膜タンパク質の安定性が向上すると共に、脂質二重膜に埋もれた膜タンパク質の疎水性領域でも分子間接触が可能となる利点がある。一方でキュービックフェーズ法は、結晶が大きくなりやすく、データ測定が難しいという欠点がある。この問題は、大型放射光施設

SPring-8 のビームライン BL32XU を利用することで解決できた。BL32XU は高フラックス・マイクロビームビームラインで、全自動データ収集システム ZOO を活用することにより、10 μm 以下の微小結晶からのデータ収集が可能である⁶⁾。また、X 線回折データの自動処理とマージのためのプログラム KAMO⁷⁾も微小結晶のデータ処理に不可欠であった。

3. 研究結果

筆者らは、OxIT の外向き構造と閉じた構造を、それぞれ 3.3 Å と 3.0 Å の分解能で構造解析に成功した(図 3)⁸⁾。OxIT は 12 本の膜貫通ヘリックス(TM)から成り、前半の 6 本(TM1-6)から成る N 末端ドメインと後半の 6 本(TM7-12)から成る C 末端ドメインの間に基質結合部位が存在した。外向き構造では基質結合部位に向かうシュウ酸の輸送経路が菌体外に開いた構造を取っていた。閉じた構造では、基質結合部位にシュウ酸が結合し、基質結合部位は菌体外からも菌体内からも閉ざされていた。このシュウ酸は、結晶化試薬に含まれていたものである。外向き構造を菌体外側から見ると、基質結合部位付近には塩基性アミノ酸である Lys や Arg が存在して正電荷を帯びており(図 4)、負電荷を持つシュウ酸が結合しやすい状態になっていた。外向き構造は、これらの正電荷の反発により、シュウ酸が結合しないと閉じた構造に構造変化しないと考えられた。シュウ酸が基質結合部位に結合すると、正電荷の反発が解消し、OxIT は輸送を開始して閉じた構造へ

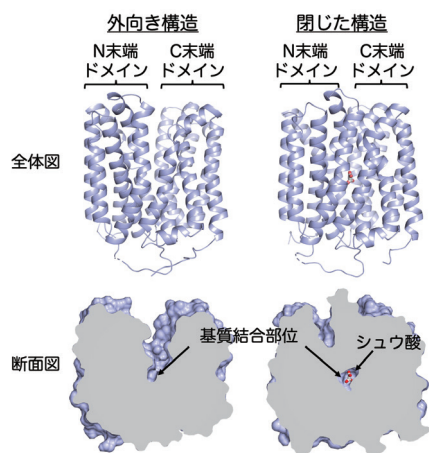


図 3 OxIT の構造
抗体は表示していない

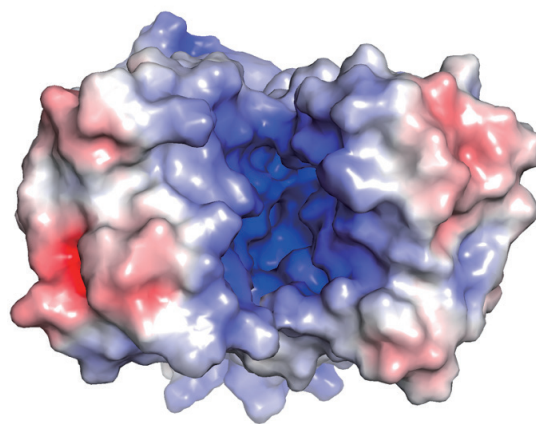


図 4 OxIT の外向き構造の静電ポテンシャル図
正電荷、負電荷をそれぞれ青色、赤色で表示する

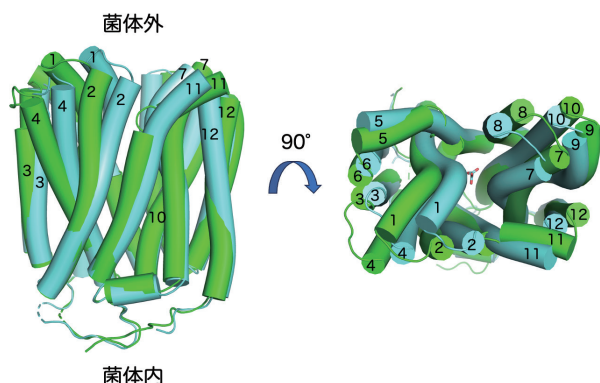


図5 外向き構造（緑）と閉じた構造（水色）を重ねた図
（左）側面から見た図、（右）菌体外側から見た図

の変化が可能となる。その際には、主に TM1, 2, 4, 7, 8, 11 の菌体外側が大きく動き、菌体外へのシュウ酸の経路を塞いでいた（図5）。一方で、菌体内側については、大きな違いは観測されなかった。

閉じた構造では、シュウ酸の2つのカルボキシル基は同一平面上に存在せず、共鳴していない状態で結合していた（図6）。これらのカルボキシル基は、それぞれ TM8 上の Arg272 と TM11 上の Lys355 とイオン結合を形成していた。更に、Arg272 は TM5 上の Ala147 の主鎖のカルボニル基と、Lys355 は TM1 上の Gln34 と TM2 上の Gln63 と水素結合し、ドメイン間の結合も形成していた。シュウ酸はまた、Tyr35, Tyr124, Tyr150, Trp324, Tyr328, Trp352 等の芳香族アミノ酸と水素結合や π - π 結合を形成し、基質結合部位に隙間なく収まっていた。これらのアミノ酸の変異体実験でも、これらの相互作用が OxIT の輸送活性に重要なことが示された。いくつかのジカルボン酸のドッキング計算の結果、炭素数2個のシュウ酸より大きいジカルボン酸は OxIT の基質結合部位に収まらないことが示唆され、OxIT が腸内の様々な栄養素からシュウ酸だけを選んで効率的に輸送する仕組みが明らかになった。

4. 終わりに

筆者らの研究により、OxIT の輸送過程における

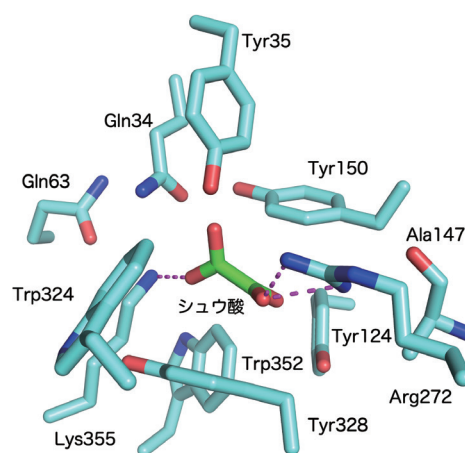


図6 OxIT とシュウ酸の相互作用
イオン結合を点線で表示

外向き構造と閉じた構造の2つの中間体の構造が明らかになった。今後は内向き構造やギ酸が結合した構造を解明し、OxIT の輸送機構を更に詳細に明らかにしたい。尿管結石の軽減法の1つに、シュウ酸分解菌の経口投与が検討されている。本研究で得られた知見は、シュウ酸吸収条件の最適化等、同菌に着目した治療法開発の基盤情報となる可能性が期待される。本研究は、山下敦子教授（岡山大学）、平井照久チームリーダー（理化学研究所）、岡崎圭一准教授（分子科学研究所）らとの共同研究を解説したものです。共同研究者の協力に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Hirai, T., *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 597-600 (2002)
- 2) Hirai, T., *et al.*, *Biophys. J.*, **87**, 3600-3607 (2004)
- 3) Yamashita, A., *et al.*, *Nature.*, **437**, 215-223 (2005)
- 4) Shimamura, T., *et al.*, *Science.*, **328**, 470-473 (2010)
- 5) Nomura, N., *et al.*, *Nature.*, **526**, 397-401 (2015)
- 6) http://www.spring8.or.jp/wkg/BL32XU/instrument/lang/INS-0000001512/instrument_summary_view
- 7) Yamashita, K., *et al.*, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, **74**, 441-449 (2018)
- 8) Jaunet-Lahary T., *et al.*, *Nat Commun.*, **14**, 1730 (2023)

（京都大学大学院医学研究科）