

哺乳類フルクトース輸送体 GLUT5 の構造と分子機構

京都大学大学院医学研究科 野村紀通, 岩田 想

Norimichi NOMURA and So IWATA: Structure and Molecular Mechanism of the Mammalian Fructose Transporter GLUT5

Excessive consumption of fructose in the Western diet is associated with an increased incidence of metabolic disorders such as obesity and non-alcoholic steatohepatitis. A growing interest is focused on the fructose transporter GLUT5. In this review, we describe crystal structures of the mammalian GLUT5 with its empty binding site exposed to either the extracellular side or intracellular side. By comparing structures in these two different conformational states, we show that the transport is achieved by a combination of global “rocker-switch”-like movement of transmembrane bundles and local asymmetric “gated-pore”-like rearrangement. This structural information is now open for designing novel therapeutic drugs.

1. はじめに

清涼飲料水, 菓子類などに多く含まれるフルクトースの過剰摂取は, 肥満・メタボリックシンドローム・脂肪肝など多くの生活習慣病につながる隠れた危険因子である。高フルクトース・コーンシロップ (別名: 果糖ブドウ糖液糖, 異性化糖) を大量に消費する米国ではこのことがすでに大きな問題になっており, フルクトースの過剰摂取に注意を促す臨床研究が相次いで報告されている。¹⁾⁻³⁾

生体内にフルクトースが取り込まれる際の「関門」になっているのが GLUT5 という膜輸送体である。GLUT5 は腸管上皮細胞の頂端膜に局在し, 摂取した食物から

フルクトースを選択的に吸収する働きをもっている (図1)。⁴⁾ また, GLUT5 は乳がん細胞で過剰発現しており, がん細胞の増殖に関与することも明らかになっている。⁵⁾ GLUT5 の基質輸送に伴う立体構造の動作原理, 基質分子の選択的認識機構を解明することにより, 細胞内に流入するフルクトース量を調節し, 生活習慣病やがんを予防・改善する医薬品の分子設計に役立つ基盤情報が得られるものと期待される。

本稿では, GLUT5 が細胞外側に向けて開いた状態 (以下で「外開き」という) と細胞内側に向けて開いた状態 (以下で「内開き」という) の2つの異なるコンフォメーションを可視化した筆者らの研究⁶⁾を紹介し, 基質輸送に伴う GLUT5 の構造動態と分子機構を解説する。

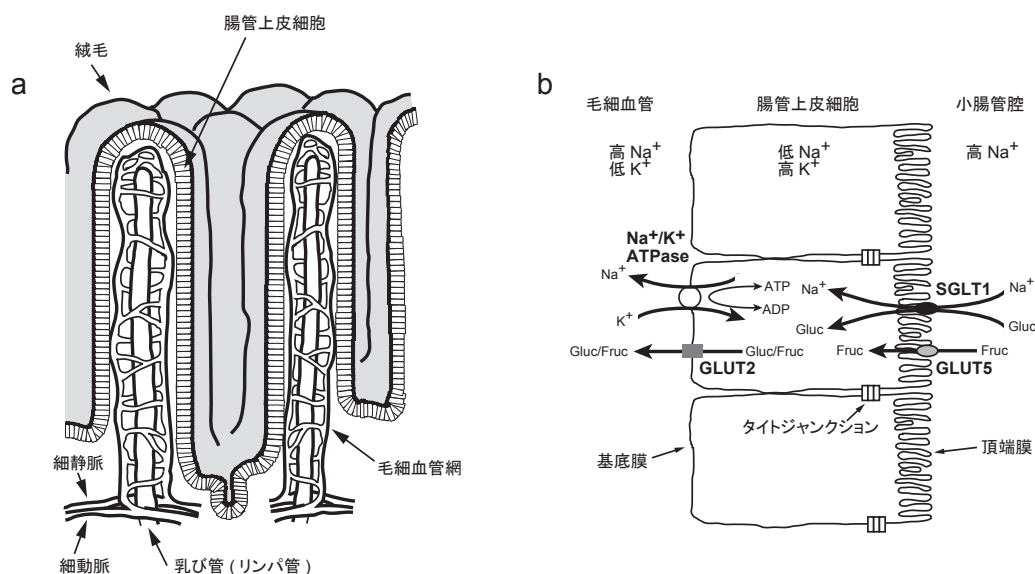


図1 小腸上皮における単糖の吸収。(Transepithelial hexose absorption in the intestine.) (a) 小腸の絨毛構造, (b) 腸管上皮細胞における単糖の膜輸送。Glu: グルコース, Fru: フルクトース。文献30) より改変して転載。

2. GLUT5の機能と病態生理的意義

ヒト・哺乳類細胞では、2つのタイプの内在性膜タンパク質が細胞膜を介した単糖の輸送機能を担っている。促進拡散型の糖輸送体GLUT (facilitative glucose transporter; SLC2A, MFS [major facilitator superfamily]) による受動輸送と、ナトリウムイオン共役型の糖輸送体SGLT (sodium-glucose cotransporter; SLC5A, SSF [sodium:solute symporter family]) による能動輸送である。GLUTには14種、SGLTには6種のサブタイプが存在し、それぞれの基質特異性や組織局在性は異なり、生理学的役割も異なる。^{7), 8)} 一部の糖輸送体はヒト疾患の創薬ターゲットとして阻害剤の開発が進められている。たとえば、SGLT2は近位尿細管において尿糖を再吸収する機能を担っているが、その阻害剤は尿糖の排泄を促しインスリン非依存的に血糖値を低下させる効果があるため、新しい作用機序の2型糖尿病薬として注目されている。⁹⁾

GLUT5はフルクトースに特異的な促進拡散型輸送体であり、グルコースやガラクトースなどの単糖は輸送しない。膜内外での基質の濃度差ポテンシャルに従って基質を透過・拡散させ、輸送に補因子を必要としない単輸送体 (uniporter) である。GLUT5はSGLT1とともに小腸の絨毛上皮から単糖を吸収する機能を担っている。食物中の糖質は唾液や膵液中の α -アミラーゼにより二糖類にまで分解された後、小腸に到達すると小腸粘膜に存在するマルターゼ、スクラーゼ、 α -デキストラナーゼにより単糖類に分解され、絨毛上皮から体内に吸収される。砂糖 (スクロース) や甘味料由来のフルクトースはGLUT5により、グルコースはSGLT1によりそれぞれ腸管上皮細胞内に取り込まれ、門脈を経由して肝臓に入り代謝される (図1)。GLUT5により過剰に取り込まれたフルクトースは肝臓でトリグリセリドに変換・蓄積され、肥満や非アルコール性脂肪肝などの原因となる。¹⁰⁾⁻¹²⁾ これまでにGLUT5と糖尿病発症の直接的な因果関係は明らかになっていない。2型糖尿病患者では骨格筋と小腸においてGLUT5の発現レベルが顕著に亢進することが知られているが^{13), 14)} その病態生理学的意義は不明である。

3. GLUT5の結晶化戦略

ヒト疾患の治療薬標的となっている膜タンパク質の構造解析に向けて、2000年代半ば頃からターゲット膜タンパク質の大量発現技術、脂質キュービック相法などの結晶化技術、マイクロフォーカスビームを用いたX線回折データ測定技術などの開発に大きな進展があった。¹⁵⁾ これにより膜タンパク質構造研究はいわゆる「第三世代」を迎え、「解ける構造を解く」から「解きたい構造をオンデマンドで解く」という研究スタイルに変貌を遂げた。ヒトGタンパク質共役受容体 (GPCR) の結晶構造解

析の成果が次々に報告されたのもこの時期である。¹⁶⁾ このような流れの中で、筆者らは2007年からGLUTの構造研究プロジェクトを開始した。GLUT5を解析ターゲットに選んだ理由は、さまざまなヒト・哺乳類GLUTサブタイプの中でラットGLUT5とウシGLUT5は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の発現系を用いて比較的大量に安定な精製標品が調製できるという利点があり、GLUT構造研究のモデルとして適していると考えたためである。

一般に膜タンパク質のX線結晶構造解析が困難である最大の要因は、回折データ収集に必要な良質の結晶が得られる確率がきわめて低い点である。疎水性表面 (膜貫通部分) が大きく、分子間接触に寄与できる親水性表面が小さいため結晶格子が形成されにくい (図2)。また、膜輸送体は細胞内外への物質輸送という機能発現に伴い大規模にコンフォメーションが変化する。膜輸送体分子には複数の過渡的中間状態のコンフォメーション (基質輸送過程で生じる外開き-内開きのコンフォメーション間での動的平衡) が生じているため、分子の「かたち」の不均一性が結晶化を妨げる要因になる。さらに高親和性の阻害剤などのリガンド化合物を結合させれば構造揺らぎを抑えてエネルギー的に準安定な状態に制御することも可能であろうが、膜輸送体にはそうした高親和性のリガンド化合物が天然に存在しない、あるいは既知ではない場合が多い。またGPCRの結晶構造解析では、構造的に揺らぎが大きい細胞内第三ループ (ICL3) をT4リゾチームやアポシトクロム *b562RIL* (BRIL) で置換した融合タンパク質を作製して親水性ドメインを拡張し結晶性を向上させるという戦略が多用されるが、¹⁷⁾ これはGPCRの構造フォールドが束一的であるという特質

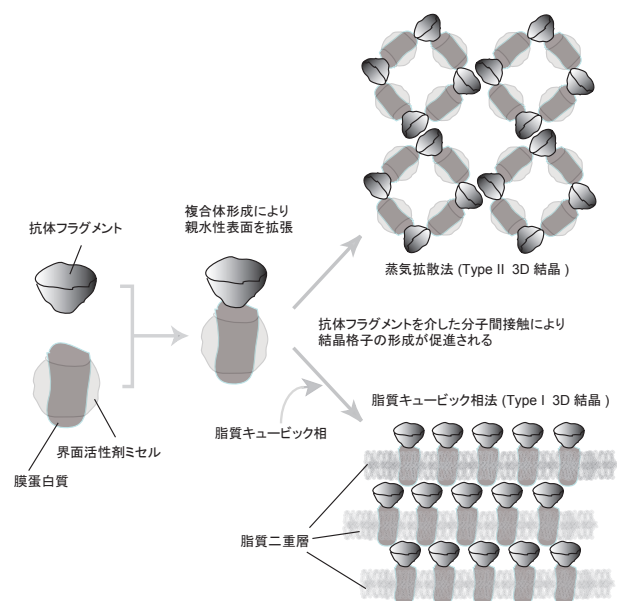


図2 抗体フラグメントを用いた膜タンパク質の結晶化。 (Antibody fragment-assisted crystallization of membrane proteins). 文献30) より改変して転載。

があるため適切な融合タンパク質を比較的簡単に設計できるのであって、同様の融合タンパク質戦略を膜輸送体に適用しようとすれば個々のターゲットについて膨大な試行錯誤を必要とするため、事実上困難である。

膜タンパク質に抗体フラグメントを結合させると①膜外親水性表面が拡張され、あたかも分子同士を接着する「糊しろ」のような役割をして分子間接触が改善する、②結合した抗体が膜タンパク質をある特定のコンフォメーションに固定化するために結晶化が促進される、などの効果が現れる場合が多い(図2)。筆者らはこの利点に着眼し、膜タンパク質の「結晶化シャペロン」として利用可能な抗体フラグメントをファージディスプレイ系により高効率で作製する独自技術を確立した^{18), 19)}。取得した抗体フラグメントは未変性状態のラット GLUT5 の立体構造を認識し、ラット GLUT5 に結合することによってその熱安定性を顕著に向上させる性質をもっていた (GLUT5-抗体フラグメント複合体の T_m 値は、GLUT5 単体の T_m 値に比べて 12℃ 高い)。得られた抗体フラグメントを用いて、ラット GLUT5-抗体フラグメント複合体を作製し、蒸気拡散法により結晶化した。この複合体結晶は脱水和を施すことによって分解能が大幅に改善した。

一方、ウサギ GLUT1 では C 末端側の細胞内親水性領域の約 40 残基の欠失により内開き状態のコンフォメーションに固定化されるという報告がある。²⁰⁾ この知見に基づいてウシ GLUT5 の C 末端欠失変異体を作製して、コンフォメーション間での平衡を内開き状態側にシフトさせることにより、GLUT5 単体を蒸気拡散法で結晶化することにも成功した。

4. GLUT5 の立体構造と分子機構

4.1 全体構造

ラット GLUT5-抗体フラグメント複合体結晶から得られた立体構造は、外開き状態のコンフォメーションであり、細胞外からのフルクトース分子の流入・結合を待ち受けている輸送直前の瞬間の構造と考えられた(図3a)。一方、C 末端欠失変異のウシ GLUT5 単体の結晶から得られた立体構造は内開き状態のコンフォメーションであり、GLUT5 が細胞内にフルクトース分子を放出して輸送を終えた瞬間の構造と考えられた(図3b)。

GLUT5 の全体構造は、N 末端側の 6 本の膜貫通ヘリックス束 (TM1 ~ 6) および C 末端側の 6 本の膜貫通ヘリックス束 (TM7 ~ 12) が V 字型あるいは逆 V 字型のように配置して、基質分子の透過経路となるキャビティを形成していた(図3c, d)。その二組の膜貫通ヘリックス束を連結している細胞内ドメインには 4 本のヘリックス (ICH1 ~ ICH4) があり、さらに C 末端の細胞内ドメインにも 1 本のヘリックスがあった。ウシ GLUT5 の結晶構造解析に用いた変異体タンパク質は、この ICH5 へ

リックスに相当する領域を欠失させたものであるため、ICH5 ヘリックスは GLUT5 のコンフォメーション変化において重要な役割を担っていることが示唆された。

4.2 基質結合部位

基質や基質アナログの GLUT5 への結合状態を可視化する目的で、臭化化合物などを用いて種々の条件で共結晶化やソーキングを試みたが、リガンドの電子密度は確認できなかった。親和性の弱い相互作用で占有率が保証されなかったことが原因と考えられる。そこでキャビティの最深部に露出するアミノ酸残基を系統的に置換し、得られた変異体におけるフルクトースの結合を測定することによって基質結合部位を生化学的に同定した。この基質結合部位にある Gln166 を Glu に置換することにより、GLUT5 の基質特異性はフルクトース高親和性からグルコース高親和性に変換された。これらの結果は、キャビティの最深部周辺のアミノ酸残基が輸送基質の認識に重要であることを示唆している。

4.3 基質輸送に伴う構造動態

外開き状態と内開き状態の GLUT5 立体構造を重ね合わせて比較すると、①二組の膜貫通ヘリックス束が基質結合部位の周りに 15° の角度だけ回転して輸送経路のキャビティを外開き状態から内開き状態に変換され

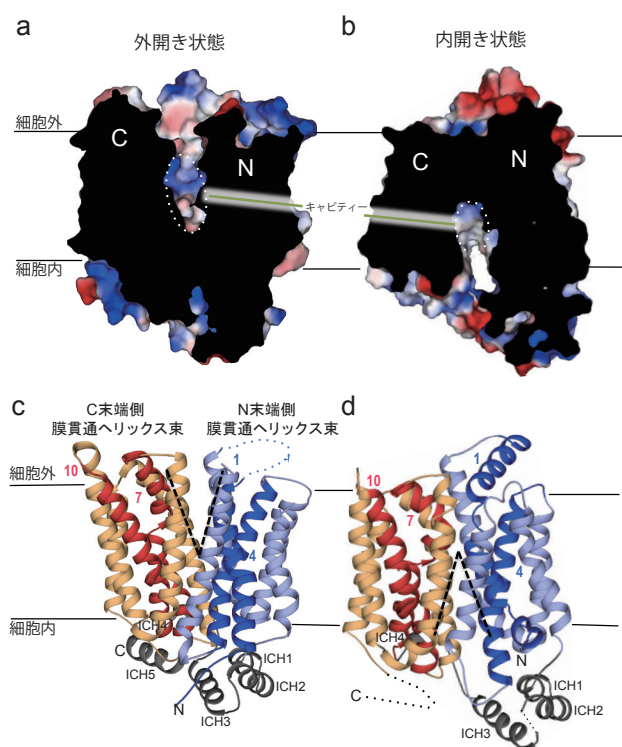


図3 GLUT5 の全体構造。(Overall structure of GLUT5.) (a) 外開き状態と (b) 内開き状態の GLUT5 の基質輸送経路のキャビティ (表面電荷図を細胞膜に垂直な面で切断した断面). (c) 外開き状態と (d) 内開き状態の GLUT5 の全体構造 (リボン図). 黒色破線は V 字型のキャビティを示す. 文献 6), 30) より改変して転載.

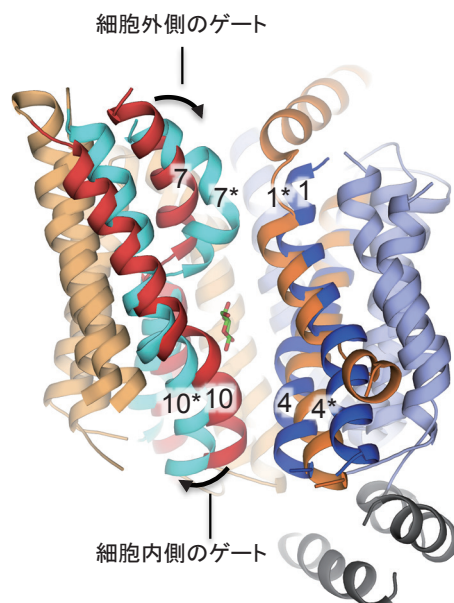


図4 外開き状態と内開き状態の立体構造の重ね合わせ比較。(Superimposition of the open outward- and inward-facing structures.) 1, 7, 4, 10は外開き状態での各ヘリックスの位置. 1*, 7*, 4*, 10*は内開き状態での各ヘリックスの位置. 中央のフルクトース分子は変異実験から予想される基質結合部位の位置を表す. 文献6), 30) より改変して転載.

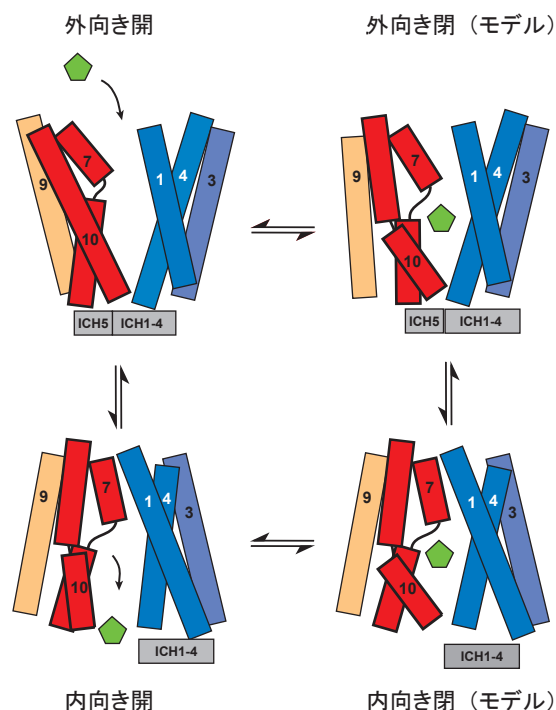


図6 GLUT5の交互アクセス輸送機構。(Alternating-access transport mechanism in GLUT5.) 五角形はフルクトース分子を表す. 文献6), 30) より改変して転載.

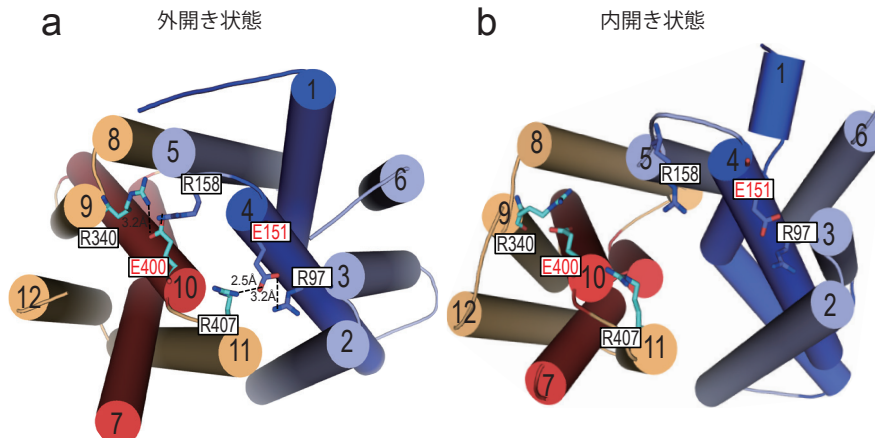


図5 膜貫通ヘリックス束間で形成・切断される塩橋。(Formation and breakage of salt bridges between the transmembrane helix bundles.) (a) 外開き状態, (b) 内開き状態. 細胞質側から見た図. 塩橋の観察を明確にするために細胞内ヘリックス ICH1-5は取り除いて作図した. 文献6) より改変して転載.

ること, それに加えて②TM7およびTM10のヘリックス内部で局所的に構造が変化し, いったん結合したフルクトースを細胞外に逃さず効率的に細胞内に送り込むために2カ所に「ゲート」が形成されること, が明らかになった(図4). また, 外開き状態の構造ではV字型の根元部分(二組の膜貫通ヘリックス束同士が細胞質側で近接している部分)に複数の塩橋が形成されコンフォメーションが安定化されているのに対し, 内開き状態の構造ではこれらの塩橋が切断されていた(図5). この塩橋の

形成に関与しているアミノ酸残基に変異を導入するとフルクトースのGLUT5への結合が弱まることから, この塩橋は外開き状態の構造を安定化させるだけでなく, フルクトースの結合にも重要な役割を担っていることが示唆された. 以上の構造機能相関から明らかになったGLUT5によるフルクトース輸送の分子機構を図6に示した.

4.4 分子機構

一般に膜輸送体が膜の内外へ基質分子を輸送する

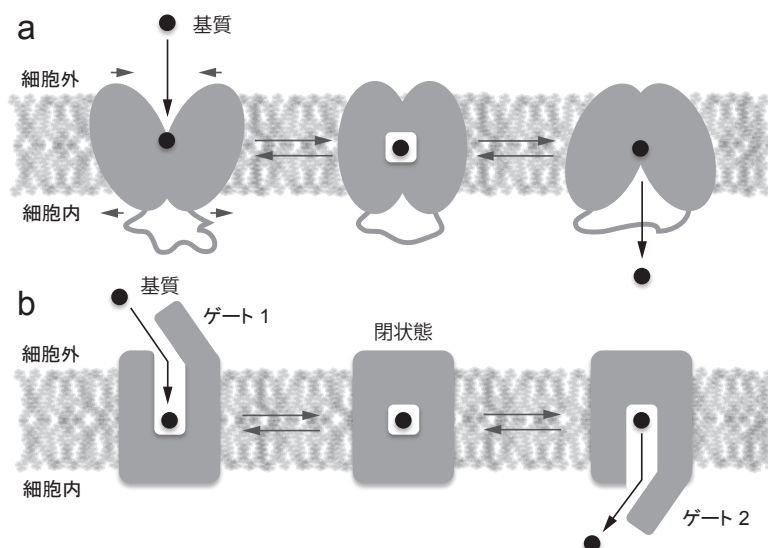


図7 これまでに提案された膜輸送体の動作機序モデル。(Hitherto proposed models for membrane transport.) (a) ロッカースイッチ機構, (b) ゲートポア機構。

分子機構については、従来から交互アクセスモデル (alternating-access model)²¹⁾ という大枠の概念より理解されている。このモデルは、膜輸送体が分子内に基質結合部位をもち、そこから基質分子を細胞外に透過させる経路と細胞内に透過させる経路を交互に開くことにより膜を介した基質分子の輸送を触媒する、というものであり、この概念はおそらくほぼすべての膜輸送体の基質輸送に伴う動作に適用可能であろう。交互アクセスモデルを基盤としてより具体的な膜輸送体分子の動作機序に関しては、これまでにロッカースイッチ機構 (rocker-switch mechanism) (図7a)、ゲートポア機構 (gated-pore mechanism) (図7b)、エレベーター機構 (elevator mechanism) などが提唱されている。²²⁾ ロッカースイッチ機構では、基質分子は膜の中央付近に存在する膜輸送体の基質結合部位に結合し、膜輸送体を構成する2つのドメインがその基質結合部位を中心として剛体回転運動をして交互アクセスが成立する。一方、ゲートポア機構では、基質分子が膜の中央付近に存在する膜輸送体の基質結合部位に結合した後、細胞外側・内側の2カ所のゲートが形成され、それらが開閉することにより基質分子の移動が制御され、交互アクセスが成立する(両方のゲートが閉まっている中間状態も存在する)。

GLUT5の分子機構はロッカースイッチ機構とゲートポア機構の折衷型と言える。小腸管腔内に多量のフルクトースが存在するとき、腸管上皮細胞内との濃度差ポテンシャルエネルギーがGLUT5の駆動力となる。基質結合部位へのフルクトースが結合すると、それに共役して二組の膜貫通ヘリックス束の間に形成されていた塩橋が切断される。同時に、一部のヘリックスで局所的な構造変化が起きて新たにゲートが形成されるとともに、膜貫通ヘリックス束自体が大規模な回転運動をすることに

よって基質分子の透過経路を外開き状態から内開き状態に変化することにより、フルクトースは腸管上皮細胞内に取り込まれる。このGLUT5の動作は、細胞外側・内側の2カ所の局所的なゲートが形成されるだけでほかのドメインは大規模な動作をしないチャネルとも異なり、あるいは単に2つのドメインが剛体回転の動作をするだけで透過経路を開閉するタイプの膜輸送体とも異なる。アミノ酸など親水性の低分子化合物を受動的に輸送するほかの促進拡散型の膜輸送体がGLUT5と同様の動作により基質分子を輸送するのか興味をもたれるところである。

5. おわりに

20年以上にわたり多くの研究グループがヒト・哺乳類GLUTの構造研究に取り組み、ヒトGLUT1の内開き状態の立体構造が2014年に初めて報告された。²³⁾ しかし、その知見だけではGLUTが細胞内に糖分子を透過させる際にどのような構造変化をしているのかという分子機構は未解明であった。同一のGLUTサブタイプで異なるコンフォメーション間の構造動態を解明し、実構造に基づいて分子機構を解明したのは本稿で紹介した哺乳類GLUT5研究が初めての例である。

筆者らの研究とほぼ同時に、ヒトGLUT3の外開き状態の立体構造も解明された。²⁴⁾ さらに、GLUTの細菌ホモログ(ただし単輸送体ではなくH⁺共役型の二次性能動輸送体でありヒト・哺乳類GLUTとは分子機構は異なる)の立体構造も報告されている。²⁵⁾⁻²⁷⁾ これらの構造情報を用いて、膜輸送体の基質特異性や分子機構に多様性を生じさせる構造基盤が今後解明されていくものと思われる。こうした構造研究の成果は、GLUTの輸送活性を阻害・調節する新規化合物の探索・分子設計に重要な指針

を与えるものであり, 生活習慣病の予防・治療薬などの開発につながると期待される。

2016年3月の時点で3.5 Å以上の分解能でX線結晶構造が報告されたヒト・哺乳類の膜輸送体は上記のGLUTの3つのサブタイプに加えてヒトBand3 (SLC4A1),²⁸⁾ ウシUT-B (尿素輸送体; SLC14A1)²⁹⁾ の計5種のみである (ミトコンドリア膜輸送体を除く)。ヒト・哺乳類の膜輸送体の結晶構造解析の難度は依然として高い。本稿で述べた抗体フラグメントを用いた結晶化促進・コンフォメーション安定化技術が種々の膜輸送体構造研究の一助となれば幸いである。

謝 辞

本研究はスウェーデン・ストックホルム大学のDavid Drew博士をはじめとして多くの方々と共同研究として行ったものである。長期間にわたる共同研究者の皆様のご尽力に心から感謝を申し上げる。

文 献

- 1) M. E. Bocarsly, *et al.*: *Pharmacol. Biochem. Behav.* **97**, 101 (2010).
- 2) K. L. Stanhope, *et al.*: *J. Clin. Invest.* **119**, 1322 (2009).
- 3) V. Douard and R. P. Ferraris: *J. Physiol.* **591**, 401 (2013).
- 4) C. F. Burant, *et al.*: *J. Biol. Chem.* **267**, 14523 (1992).
- 5) A. Godoy, *et al.*: *J. Cell. Physiol.* **207**, 614 (2006).
- 6) N. Nomura, *et al.*: *Nature* **526**, 397 (2015).
- 7) L. Q. Chen, *et al.*: *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 865 (2015).
- 8) M. Mueckler and B. Thorens: *Mol. Aspects. Med.* **34**, 121 (2013).
- 9) V. Vallon: *Annu. Rev. Med.* **66**, 255 (2015).
- 10) M. E. Bizeau and M. J. Pagliassotti: *Metabolism* **54**, 1189 (2005).
- 11) P. J. Havel: *Nutr. Rev.* **63**, 133 (2005).
- 12) J. Montonen, *et al.*: *J. Nutr.* **137**, 1447 (2007).
- 13) J. Dyer, *et al.*: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **282**, G241 (2002).
- 14) C. A. Stuart, *et al.*: *Diabetes Care* **30**, 925 (2007).
- 15) 村田武士, 他:「膜タンパク質」の重要性とその構造が拓く未来, 岩田 想 (編), 膜タンパク質構造研究, 化学同人, p.1 (2013).
- 16) A. J. Venkatakrishnan, *et al.*: *Nature* **494**, 185 (2013).
- 17) E. Chun, *et al.*: *Structure* **20**, 967 (2012).
- 18) 日野智也, 他: 膜蛋白質の立体構造を認識するモノクローナ

ル抗体のスクリーニング方法, 特願2009-110994, 2009年4月30日。

- 19) 野村紀通: 抗体を用いた結晶化, 岩田 想 (編), 膜タンパク質構造研究, 化学同人, p.120 (2013).
- 20) Y. Oka, *et al.*: *Nature* **345**, 550 (1990).
- 21) O. Jardetzky: *Nature* **211**, 969 (1966).
- 22) D. J. Slotboom: *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 79 (2014).
- 23) D. Deng, *et al.*: *Nature* **510**, 121 (2014).
- 24) D. Deng, *et al.*: *Nature* **526**, 391 (2015).
- 25) L. Sun, *et al.*: *Nature* **490**, 361 (2012).
- 26) E. M. Quistgaard, *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 766 (2013).
- 27) C. V. Iancu, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 17862 (2013).
- 28) T. Arakawa, *et al.*: *Science* **350**, 680 (2015).
- 29) E. J. Levin, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 11194 (2012).
- 30) 野村紀通, 岩田 想: GLUT5の立体構造とフルクトース輸送機構, 門脇 孝 (編), 糖尿病学2016, 診断と治療社, 印刷中。

プロフィール



野村紀通 Norimichi NOMURA
京都大学大学院医学研究科
Graduate School of Medicine, Kyoto University
〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町
Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan
e-mail: nnomura@mfour.med.kyoto-u.ac.jp
最終学歴: 京都大学大学院農学研究科博士課程修了
専門分野: 構造生物学, 抗体工学
現在の研究テーマ: 膜輸送体の構造解析, 抗体を用いた膜タンパク質の結晶化



岩田 想 So IWATA
京都大学大学院医学研究科
Graduate School of Medicine, Kyoto University
〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町
Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan
e-mail: s.iwata@mfour.med.kyoto-u.ac.jp
最終学歴: 東京大学大学院農学研究科博士課程修了
専門分野: 膜タンパク質の構造生物学, X線結晶学
現在の研究テーマ: Gタンパク質共役型受容体の構造解析, X線自由電子レーザーによるタンパク質構造解析