

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06986

研究課題名(和文)プロトン駆動力変換機構に関わる細菌ExbB-ExbD-TonBの構造研究

研究課題名(英文)Structural study of ExbB-ExbD-TonB that is responsible for energy transduction of proton motive force in bacteria

研究代表者

眞木 さおり (Maki-Yonekura, Saori)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・研究員

研究者番号：20513386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌の外膜と内膜のエネルギーの伝達を担う内膜プロトンチャネルExbB-ExbD複合体のX線結晶構造解析から、ExbBの6量体のリング状構造を決定した。また、クライオ電子顕微鏡の単粒子解析によりExbB-ExbD複合体は、2つの状態をとることがわかった。1つはExbBの6量体にExbDの3量体を取り囲まれた状態、もう1つはExbBの5量体とExbDの単量体からなる状態であり、5量体の構造はイオン透過活性が低下する低いpHで多く形成され、逆に6量体の構造は、高いpHで多くなることが明らかになった。本研究から、ダイナミックな形態変化によるイオンチャネルの活性制御という新しい現象が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Gram-negative bacteria import essential nutrients such as iron and vitamin B12 through outer membrane receptors. This process utilizes proton motive force harvested by the Ton system made up of three inner membrane proteins, ExbB, ExbD and TonB. ExbB and ExbD form the proton channel that energizes uptake through TonB.

We report the structures of hexameric complexes of ExbB and ExbD revealed by X-ray crystallography and single particle cryo-EM. Image analysis shows that hexameric and pentameric complexes coexist, with the proportion of hexamer increasing with pH. Channel current measurement and 2D crystallography support the existence and transition of the two oligomeric states in membranes. The hexameric complex consists of six ExbB subunits and three ExbD transmembrane helices enclosed within the central channel. We propose models for activation/inactivation associated with hexamer and pentamer formation and utilization of proton motive force.

研究分野：生物物理

キーワード：X線結晶構造解析 クライオ電子顕微鏡 イオンチャネル プロトン駆動力

1. 研究開始当初の背景

原核生物から高等動物に至るまで、細胞膜で仕切られた細胞の内と外の水素イオン濃度の差は、生命活動の根源的なエネルギーの源となる。細胞膜に埋まっている膜タンパク質を通してイオンが流れると、これを駆動力として種々の反応が進行する。大腸菌の ExbB と ExbD と呼ばれる膜タンパク質は、複合体を形成して、水素イオン (プロトン) を透過するイオンチャネルとなり、細菌が化学物質や栄養素を輸送する際に駆動力を与える役割を担っている。このプロトンの流れが力学的エネルギーに変換される機構は、不明な点が多い。また、ExbB と ExbD が関わる輸送系は、ウイルスの細胞内への侵入に利用されることも知られている。

2. 研究の目的

大腸菌をはじめ多くのグラム陰性菌は、外膜に存在するレセプターを介して鉄や栄養素を外から取込む。外膜レセプターに取込まれた基質をペリプラズム領域に輸送するには、細胞質内外に生じるプロトン駆動力 (proton motive force; pmf) が利用されるが、空間的に離れた外膜と内膜のエネルギーの伝達を担うのが内膜プロトンチャネル ExbB-ExbD-TonB 複合体である。プロトンの流れがどのように力学的エネルギーへ変換されるのかを明らかにするために、X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析法を用いて ExbB-ExbD-TonB 複合体の構造解析を行い、pmf 供給機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) X線結晶構造解析

大腸菌の ExbB-ExbD-TonB 複合体の大量発現系の構築、精製、結晶化を行う。良質の結晶が得られたら、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL32XU および BL41XU において X線回折実験を進める。結晶性を改善するため、結晶化条件の最適化や凍結条件の検討を進める。同時に重原子同型置換とセレノメチオニン置換による異常散乱を利用して、位相情報を取得するための結晶作製も進める。

(2) クライオ電子顕微鏡による単粒子解析

ExbB-ExbD-TonB 複合体の結晶化が難しい場合は、結晶化の必要がないクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を進める。精製した複合体を薄い氷に急速凍結し、電子線直接検出型の高速読み出しカメラ K2 summit (GATAN 社) を備えた加速電圧 300 kV の透過型電子顕微鏡 Titan Krios (FEI 社) などを使用して動画撮影によるデータ収集を行う。得られた画像は、ソフトウェア

RELION を用いて解析を進める。

4. 研究成果

(1) ExbB の 6 量体のリング構造

ExbB-ExbD-TonB 複合体の大量発現系の構築を試みたが、3つのタンパク質の共発現系を得ることができなかった。そこで ExbB-ExbD 複合体の大量発現系を構築し、良質な結晶を得るための精製法、界面活性剤、結晶化の条件を広範に探査し、100 μm 程度の平板結晶を得ることができた。この結晶から大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU において 2.8 Å 分解能までの X線回折データ収集を行った。一方、ExbB とペリプラズム領域を欠失した ExbD 複合体の構造は、2016年に Celia らによって 5量体であることが報告された。私達は、この 5量体の構造を位相情報として分子置換法による原子モデルの構築を試みたが、うまくいかなかった。そこで、クライオ電子顕微鏡を使った単粒子解析から得られた低分解能 (8 Å 程度) のマップに ExbB 一分子の原子モデルを当てはめ、6量体の原子モデルを作製し、これを X線回折データの初期位相としてモデリング計算を行い、ExbB の 6量体のリング状構造を決定することができた (図 1)。

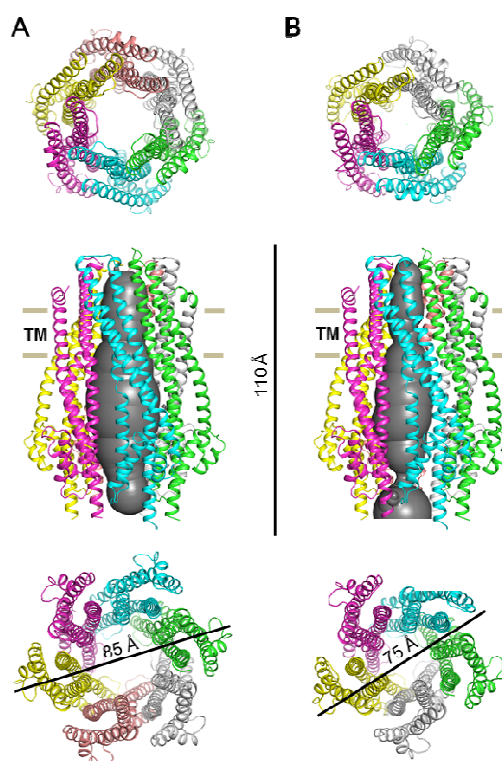


図 1. ExbB の 6 量体と 5 量体の比較。A は、6 量体、B は、5 量体 (Celia et al., 2016)。

この解析結果からは、ExbD に関する構造情報を得ることができなかった。結晶を SDS

電気泳動法で解析したところ、ExbD に相当するバンドがほとんど検出されなかったことから、おそらく ExbD 分子は柔軟性が高く、結晶化の過程で ExbB 複合体から除かれたと考えられる。

(2) ExbB の 6 量体と ExbD3 量体の構造

クライオ電子顕微鏡で画像データを集める場合、界面活性剤やグリセロール、ショ糖等は、タンパク質複合体の画像コントラストを低下させるため、できるだけこれらの使用を避けることが好ましい。ExbB-ExbD 複合体のクライオ電子顕微鏡用試料を調製するにあたり、可溶化、精製には、臨界ミセル濃度が非常に低い Lauryl maltose neopenthy glycol(LMNG, Anatrace 社)を使用した。LMNGの臨界ミセル濃度は、0.001%であり、ExbB-ExbD 複合体の結晶化に最適だった界面活性剤 Pentaethylene Glycol Monodecyl Ether(C10E5 Anatrace 社)の臨界ミセル濃度(0.031%)と比べてもおよそ 1/30 の濃度である。単粒子解析では、結晶化の必要がないので、溶液組成に自由度が高い。本研究では、pH の異なる溶液条件で凍結試料を調製した。0.5 mg/ml に調製した ExbB-ExbD 複合体溶液を液体エタン中で急速凍結し、アモルファスな薄い氷に包埋した試料を、電子線直接検出型のカメラを備えたカルフォルニア大学サンフランシスコ校(UCSF、米国)の電子顕微鏡 Tecnai Polara(FEI 社)で撮影した(図 2)。

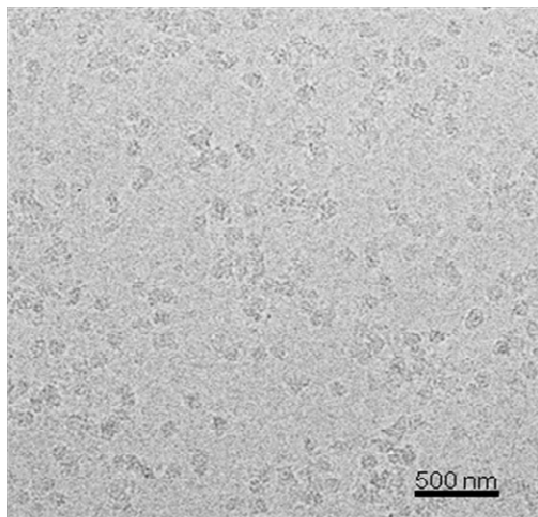


図 2. ExbB-ExbD 複合体のクライオ電子顕微鏡像(pH 8.0)

高速読み出しカメラで動画撮影によるデータ収集を行い、単粒子解析を行った結果、ExbB-ExbD 複合体は、ExbD の 3 量体が ExbB の 6 量体に取り囲まれた状態で存在していることがわかった。ExbD の 3 量体は、水素イオンの通路を形成し、ExbB の 6 量体リング内に非対称に配置していた。ExbB は、隣り合うサブユニットが、生体膜に対して垂

直方向に少しずれた「らせん状」に並ぶことが分かった(図 3)。

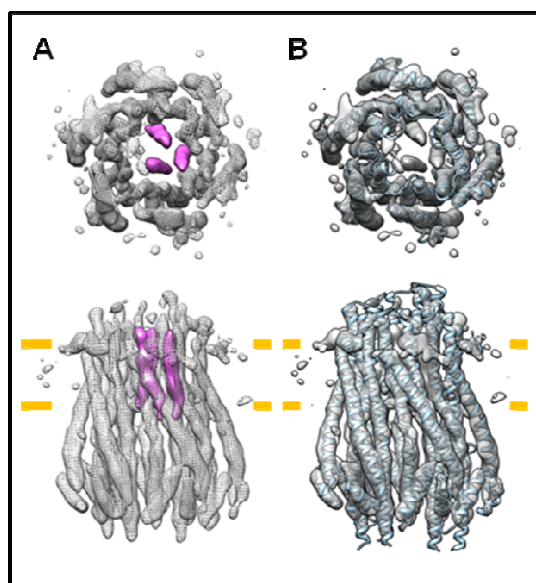


図 3. A は、クライオ電子顕微鏡の単粒子解析で得られた構造。上段は、「細胞膜(黄色の部分)に垂直な方向から」見た図。中央の桃色の三本の α ヘリックスは ExbD に由来し、水素イオン透過とその駆動力の活用に重要な機能を持つ。その周りには、ExbB の各サブユニット(灰色の網目)に相当する。下段は、「細胞膜に水平な方向から」見た図。黄色の線は、細胞膜を示す。B は、X 線結晶構造解析で得られた ExbB の原子モデルを重ねて表示した。

X 線結晶構造解析は、結晶中の分子の構造が同一であることが必要で、結晶中の個々の分子の構造の違いは原理的に可視化できない。一方、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析からは、空間分解能はやや劣るが結晶格子に縛られない ExbB-ExbD 複合体の構造を得ることができた。

(3) ExbB の 5 量体と ExbD 単量体の構造

クライオ電子顕微鏡で得られる画像には、ExbB-ExbD 複合体が取り得る様々な構造状態の分子像が混在していた。これらの画像を分類し、それぞれ 3 次元再構成を行った結果、6 個の ExbB と 3 個の ExbD が構成する複合体の他(「6 量体」と呼ぶ)に、5 個の ExbB と 1 個の ExbD からなる複合体(「5 量体」と呼ぶ)の構造も得られた(図 4)。

(4) pH により変化する 6 量体と 5 量体

クライオ電子顕微鏡による単粒子解析から明らかになった 5 量体の構造は、イオン透過活性が低下する低い pH(pH 5.4)で多く形成され、逆に 6 量体の構造は、イオン透過活性が上昇する高い pH(pH 7-8)で多くなることがわかった(図 5)。

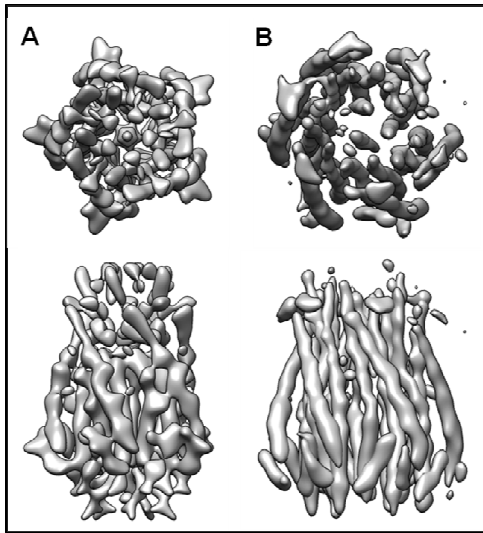


図 4. クライオ電子顕微鏡法で明らかになった 5 量体と 6 量体 A. 5 個の ExbB と中央に 1 個の ExbD からなる複合体。B. 6 個の ExbB と 3 量体の ExbD からなる複合体。

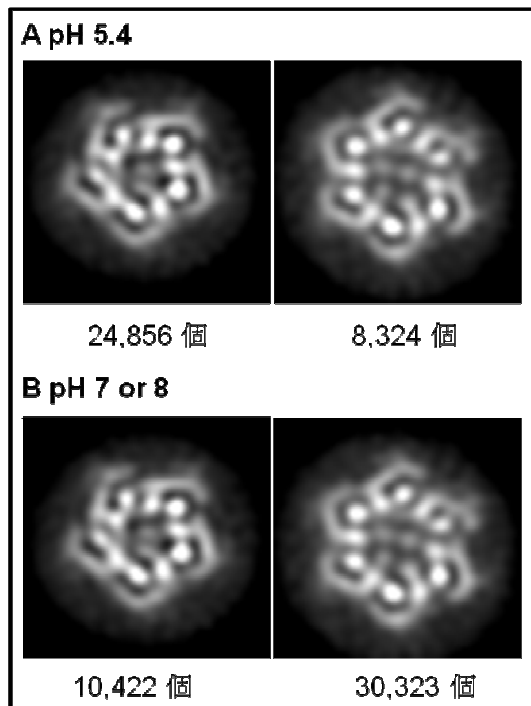


図 5. 異なる pH 溶液中での ExbB-ExbD 複合体の比較。A. 低い pH(5.4)では、5 量体の数が多い。B. 高い pH(7-8)では、6 量体の数が多い。

クライオ電子顕微鏡法では、ExbB-ExbD 複合体を可溶化するために界面活性剤を使用している。この影響を排除するために、脂質膜中でタンパク質が並んだ二次元結晶を作製し、画像解析をしたところ、より生理的な環境に近い状態においても 5 量体と 6 量体の 2 つの構造が含まれることがわかった(図 6)。

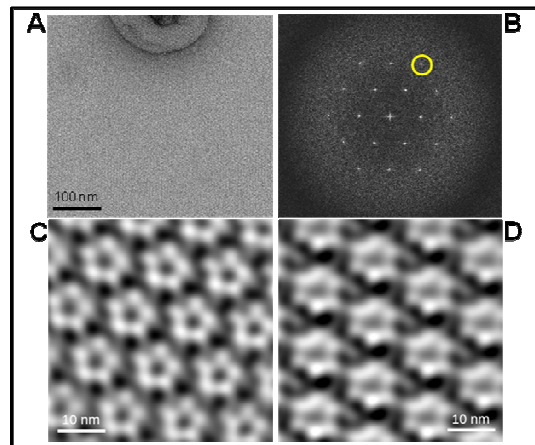


図 6. ExbB-ExbD 複合体の二次元結晶の電子顕微鏡観察 A. 二次元結晶を負染色し、観察。B. A の画像をフーリエ変換した像。C. B のフーリエ変換像のスポット(黄色の丸)を画像解析。ある領域では 5 量体の ExbB-ExbD 複合体が局在していた。D. 別の画像のフーリエ変換像を同じようにスポットの周りを解析すると、6 量体の ExbB-ExbD 複合体が局在していた。二次元結晶中にも 5 量体と 6 量体が混在していることがわかった。

また、水素イオン透過を計測するなど種々の解析を行った結果、この 2 つの構造が相互に変換することが示され、この形態変化が実際に起こっていることが明らかになった。機能発現の抑制のため、膜タンパク質がこのような大きく変化することはこれまで知られていなかったが、これらの実験により、イオンチャネルの活性制御にはダイナミックな構造変化が起こることが示された(図 7)。

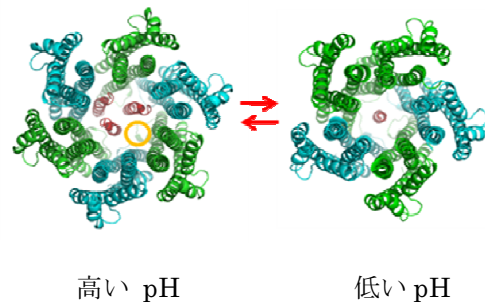


図 7. ExbB-ExbD 複合体の 6 量体と 5 量体の構造変化による活性制御の機構

左の活性化状態(6 量体)では、ExbB と ExbD の間に黄色の丸で示した水素イオンの通り道が形成されるが、右の不活性化状態(5 量体)では、水素イオンが透過するスペースが存在しないことが分かる。

本研究では、X 線結晶構造解析による高分解能 ExbB 複合体(6 量体)の構造解析に成功した。また、結晶格子に縛られない状態の ExbB-ExbD 複合体の構造をクライオ電子顕微鏡を使うことにより、活性化状態、非活性

化状態における二つの異なる構造を解析することもできた。今後は、大腸菌の内膜プロトンチャネルを構成する ExbB-ExbD-TonB 複合体の構造を X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析法を用いて明らかにし、pmf 供給機構の解明を目指す。

参考文献

Celia et al., Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction, Nature vol.538, 2016,60-65
DOI: 10.1038/nature19757

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 5 件)

① K. Yonekura, R. Matsuoka, Y. Yamashita, T. Yamane, M. Ikeguchi, A. Kidera, S. Maki-Yonekura, Ionic scattering factors of atoms that compose biological molecules, IUCrJ 査読有, vol. 5, 2018, 348-353
DOI: 10.1107/S2052252518005237

② S. Maki-Yonekura, R. Matsuoka, Y. Yamashita, H. Shimizu, M. Tanaka, F. Iwabuki, K. Yonekura, Hexameric and pentameric complexes of the ExbBD energizer in the Ton system, eLife 査読有 vol. 7, 2018, 1-24
DOI: 10.7554/eLife.35419

③ 米倉功治、眞木さおり、三次元結晶、単粒子複合解析による膜タンパク質の構造・電荷、プロトン化状態、構造変化・多型を可視化する、実験医学、査読無、36 巻、2018、1333-1338

④ 米倉功治、眞木さおり、タンパク質の電子線三次元結晶構造解析と電荷の精密化、日本結晶学会誌、査読有、59 巻、2017、88-95

⑤ E. Nango, S. Akiyama, S. Maki-Yonekura, Y. Ashikawa, Y. Kusakabe, E. Krayukhina, T. Maruno, S. Uchiyama, N. Nuemket, K. Yonekura, M. Shimizu, N. Atsumi, N. Yasui, T. Hikima, M. Yamamoto, Y. Kobayashi, A.

Yamashita, Taste substance binding elicits conformational change of taste receptor T1r heterodimer extracellular domains, Sci. Rep. 査読有 vol. 6, 2016, 25745-62
DOI: 10.1038/srep25745

[学会発表] (計 4 件)

① 濱口祐、眞木さおり、米倉功治 「Visualization and structure of membrane proteins by cryo-electron microscopy」第 9 回 OCARINA 国際シンポジウム、2018 年 3 月 7 日、大阪市立大学(大阪市)

② 米倉功治、眞木さおり、松岡礼、山下良樹、岩露文恵、田中麻衣子 「Refinement of cryo-EM structure using scattering factors of charged atoms」第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 27 日、つくば国際会議場(つくば市)

③ 眞木さおり、山下良樹、松岡礼、田中麻衣子、岩露文恵、米倉功治 「Oligomeric structure of the ExbB-ExbD complex revealed by X-ray crystallography and cryo-EM」第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 25 日、つくば国際会議場(つくば市)

④ 米倉功治、眞木さおり、山下良樹 「膜蛋白質の電子線三次元結晶構造解析と単粒子解析」第 16 回日本蛋白質化学会年会、2016 年 6 月 7 日、福岡国際会議場(福岡市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞木 さおり (Maki-Yonekura, Saori)
国立研究開発法人理化学研究所
放射光科学総合研究センター・研究員
研究者番号：20513386

(2) 研究分担者

米倉 功治 (Yonekura, Koji)
国立研究開発法人理化学研究所
放射光科学総合研究センター・主任研究員
研究者番号：50346144

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()