

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07369

研究課題名(和文)新規xenobiotics ABCトランスポーターの構造機能と生物学的意義の解析

研究課題名(英文)Studies on the structure and function of a xenobiotic ABC transporter

研究代表者

矢嶋 俊介 (YAJIMA, SHUNSUKE)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：90301548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：非天然化合物であるヒドラジド化合物を唯一の炭素源として生育可能な *Microbacterium* sp. HM58-2株がもつ、ヒドラジド分解オペロンが本来作用する化合物の探索、また化合物を取り込む新規ABCトランスポーターの機能解析を目指した。成果として、ヒドラジド分解酵素、オペロン遺伝子の発現制御を行う転写因子IcIRのX線結晶構造解析に成功した。この結果、トランスポーターが取り込む本来の基質と考える化合物の構造に必要な部分構造を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：*Microbacterium* sp. HM58-2 has been recently isolated, which grows with non-natural compounds, hydrazides, as sole carbon source. Subsequently, hydrazidase, which catalyzes the hydrazide compounds as substrates, has also been determined. This research aimed to seek the native substrates of hydrazidase and ABC transporter in the same operon and their functions. As results, we have successfully determined the x-ray crystal structures of hydrazidase and a transcription factor, IcIR, which regulates the gene expressions of the operon. Based on the crystal structures including the hydrazidase complexed with a non-natural substrate, the substructure of potential native compounds for hydrazidase and the transporter were assumed.

研究分野：応用微生物学

キーワード：X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

ヒドラジドは工業的に広く用いられる化合物であり、抗結核薬や抗うつ薬などにも使われている。また種類は少ないもののキノコ由来の agaritine など天然にも存在する一方で、その生体内での代謝メカニズムについて詳細は不明である。

近年、連携研究者の高谷らにより非天然化合物である、ヒドラジド化合物を唯一の炭素源として生育可能な *Microbacterium* sp. 58-2 株が単離された。また、その菌よりヒドラジドを分解する酵素 (hydrazidase) が単離され、これによる化合物分解が炭素の供給源であることがあきらかとなった。また、その後 *M. sp.* 58-2 株のゲノム配列解析をショートリード型のシーケンサーにより試みた。その結果、hydrazidase は ABC トランスポーターを構成するサブユニット遺伝子群を含むオペロン中に存在することがあきらかとなった。

ABC (ATP-binding cassette) タンパク質は、生物に普遍的に存在し、非常に大きなスーパーファミリーを構成している。ABC タンパク質は、ATP の加水分解によるエネルギーを利用して作用し、その機能から、トランスポーター (インポーター、エキスポーター) とその他 (翻訳、DNA 修復) に大別される。特に膜蛋白質であるトランスポーターは多くの種類が知られ、ヒトのがん細胞では薬剤耐性の要因となり、その機能異常により嚢胞性線維症や免疫不全などの病気の原因となる。また、細菌においては、栄養を取り込む、毒を排出するなど、増殖において非常に重要な役割を果たしていることから、基本的な生命現象を担う機能分子として ABC トランスポーターの研究が広く行われてきている。

## 2. 研究の目的

Hydrazidase オペロン中の ABC トランスポーター遺伝子群は、dipeptide/oligopeptide/nickel ABC transporter とアノテーションされた。主に大腸菌、枯草菌で研究され、細菌に広く存在する peptide ABC transporter は、Type I または Type II と呼ばれるサブユニット構成で複合体として働き、オペロン中には転写因子を持たず、取り込んだ peptide を分解する peptidase 遺伝子を伴っている。*M. sp.* 58-2 株にもこのような通常型の peptide transporter は存在するが、今回見いだしたトランスポーターは、膜貫通サブユニットと ATP 結合サブユニットにおいて、それぞれ独立したサブユニットをコードする遺伝子と、両者が融合した遺伝子の 2 種類を有していた。現在までのところ、融合型の機能解析については報告が見られない一方、相同性検索では、土壌単離細菌に同様の構造を有する遺伝子が広く存在しており、大腸菌、枯草菌などにはみられない。

既知 ABC トランスポーターの Type I と Type

II の分類は、サブユニット構成だけではなく、基質、そしてインポートメカニズムの違いにも基づいている。*M. sp.* 58-2 株由来トランスポーターでは全ての遺伝子が発現していることから、Type I および新規の構成からなる複合体で機能している可能性が考えられた。

すでに Type I として maltose transporter、Type II として vitamin B12 transporter をモデルに、各種結晶構造解析を含む研究が行われてきた。しかし、申請者が見いだした ABC トランスポーターは、新たなタイプとして分類されると考えている。それは、サブユニット構成が新規を含め 3 種類の可能性があることから構造および取り込みメカニズムが共に異なる可能性があると考えられるからである。

また、すでに述べたように *M. sp.* HM58-2 株はヒドラジドを資化する菌として単離されたが、非天然の化合物を代謝できるメカニズム、また本来の基質が何であるのか、を明らかにすることで、関連する非天然化合物の分解をデザインし、菌を生育させる応用が期待される。またこのオペロンが *M. sp.* HM58-2 株のみならず、大腸菌、枯草菌には見られないものの、複数の菌が持っていることがデータベース解析から明らかとなっている。すなわち、このオペロンの生理的な機能を明らかにすることで、あらたな細菌の生存戦略の解明にも繋がる。

そこで、上で述べたように新規の ABC トランスポーターの機能解析を行うとともに、オペロン中の hydrazidase、転写因子である IclR についても解析を行うことで、これらの目的を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) Hydrazidase の X 線結晶構造解析

*M. sp.* HM58-2 株よりクローニングした hydrazidase 遺伝子に Hisx6-tag を付加し、大腸菌による大量発現系を構築した。Ni-カラムによる精製を行い、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。その結果、空間群 C2221 に属する結晶を得ることができた。放射光施設において X 線回折データの収集を行い、既知のアミダーゼ構造をモデルとして分子置換法により、初期構造を得た。その後、モデリングと精密化を繰り返し、最終的な構造を得た。基質認識メカニズムを解明するためには、基質との複合体構造が必要である。そこで、hydrazidase の触媒残基の 1 つである Serine を alanine に置換した変異体を作成、大腸菌による大量発現系を構築、精製を行った。基質として 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (HBH) を用い、共結晶を行った。放射光施設において回折データを収集し、最終的に 1.8 Å 分解能の構造を得た。構造解析を元に、さらに変異を導入し、酵素活性測定を行った。酵素活性は、酵素との反応液を HPLC により分析した。

## (2) IclR 転写因子の X 線結晶構造解析

M. sp. 58-2 株由来の IclR 遺伝子をクローニングし、大腸菌による大量発現系を構築した。結晶化は、カウンターディフュージョン法を用いることで、解析可能な結晶を得ることができた。結晶は空間群 P21212 に属し、2.1 Å 分解能のデータを得た。初期構造は、分子置換法により 1 つのドメインの構造を求め、それに S-SAD 法を組み合わせた MR-SAD 法を用いた。放射光施設 Photon Factory の BL-1A において、波長 2.1 Å で native イオウの異常分散データを測定した。CCP4 の CRANK2 を用いることで、ほぼ自動的にモデル構築が行われた。

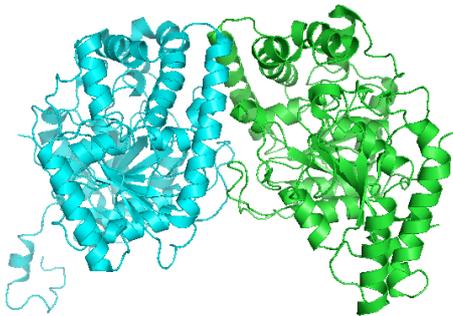
## (3) ABC トランスポーター基質結合サブユニットの結晶化

基質結合サブユニット遺伝子をクローニングし、大腸菌による大量発現系を構築、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Hydrazidase の立体構造解析と基質特異性に関する考察

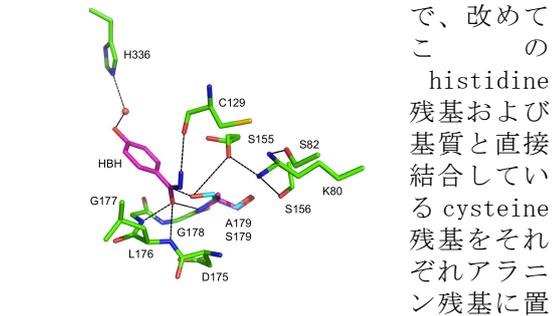
ヒドラジド化合物を唯一の炭素源として生育可能な M. sp. HM58-2 株を単離する際に用いられた化合物を分解する hydrazidase の X 線結晶構造解析を行った。その結果、分解能 1.6 Å で構造を得ることに成功した。全体構造は下図のとおりである。



Hydrazidase は amidase superfamily に分類され、その触媒残基として Ser-Ser-Lys の組合せを持っている。その全体構造は、amidase signature と呼ばれる amidase superfamily に共通する部分は、既知の amidase の立体構造とほぼ同一であったが、アミノ酸配列の比較で、相同性が低い領域では構造に違いが見られた。特に、構造中にポケットのように存在する活性部位にフタをするような領域が、相同性が低い部分であった。

Hydrazidase の基質特異性に関わるメカニズムを解明するために、触媒残基をアラニン残基に置換した変異体を用いて、基質との複合体構造の解析を行った。基質には 4-hydroxybenzoic acid hydrazide を用いた。その結果、1.8 Å 分解能のデータを得ることができ、詳細に基質の結合様式を明らかにで

きた。基質のカルボニル基が活性部位のオキシアニオンホールに固定された結合様式が明らかとなった。さらに、基質の 4-hydroxyl 基が、水分子を介した histidine 残基への結合ネットワークが観察された (下図)。そこで、改めてこの histidine 残基および基質と直接結合している cysteine 残基をそれぞれアラニン残基に置換した変異体を作成し、酵素活性測定をおこなった。その結果、cysteine を alanine に置換した変異体では酵素活性が半減程度であったのに対し、histidine の変異体ではほとんど活性が無く、この histidine 残基が基質認識に重要であることが示唆された。一方で、このことは、基質側の構造にも求められる官能基があることを示唆していると考えられた。Hydrazidase はアシルヒドラジドを分解する活性を有するが、本来の天然の基質の正体は不明である。このことをふまえ、hydrazidase 変異体を用いた基質複合体構造は、基質に求められる部分構造に対する知見を与えたと考えられる。

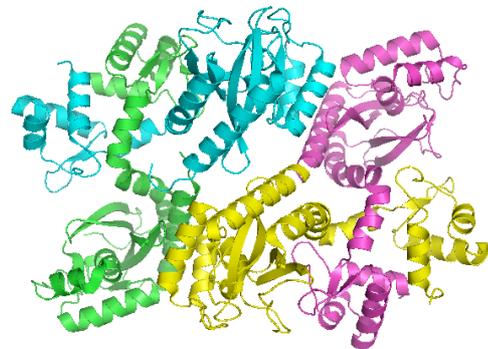


換した変異体を作成し、酵素活性測定をおこなった。その結果、cysteine を alanine に置換した変異体では酵素活性が半減程度であったのに対し、histidine の変異体ではほとんど活性が無く、この histidine 残基が基質認識に重要であることが示唆された。一方で、このことは、基質側の構造にも求められる官能基があることを示唆していると考えられた。Hydrazidase はアシルヒドラジドを分解する活性を有するが、本来の天然の基質の正体は不明である。このことをふまえ、hydrazidase 変異体を用いた基質複合体構造は、基質に求められる部分構造に対する知見を与えたと考えられる。

### (2) IclR 転写因子の X 線結晶構造解析

Hydrazidase オペロン中には IclR 型転写因子と ABC トランスポーターの遺伝子が並んでいる。このことは、IclR 型転写因子が、基質あるいは、その hydrazidase 分解物の結合有無により、オペロン遺伝子発現が制御されることが予想される。そこで、どのような基質が結合し、その転写因子がどのように遺伝子発現制御を行うのかについて知見を得るために、X 線結晶構造解析を行った。

その結果、分解能 2.1 Å の分解能でアポ型の立体構造を得ることに成功した (下図)。



非対称単位に 4 分子のサブユニットが存在していた。IclR は 2 量体を基本単位とし、dimer of dimer の 4 量体であった。IclR は 1 分子センサー型転写因子であり、基質結合ドメイ

ンと DNA 結合ドメインがリンカー alpha-helix で繋がった構造をとっている。既知の同ファミリー蛋白質や、他の菌で明らかとなっている IclR とは量体形成に違いが見られた。例えば *Thermotoga maritima* 由来の IclR とは、ドメインごとの構造は一致するものの、ドメインの相対的な配置が大きく異なっていた。このことは、今回我々が得た構造は、DNA に結合した、あるいは結合していない、あるいは活性化の有無における差が反映されているのではないかと考えられた。

### (3) ABC トランスポーター基質結合サブユニットの結晶化

トランスポーターの基質特異性に関する解析を行うため、基質結合サブユニットの結晶化を進めた。基質結合サブユニットを大腸菌にて大量発現系を構築し、精製、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。その結果、結晶を得ることに成功した。

以上の結果から、*Microbacterium* sp. HM58-2 株における hydrazidase オペロンの本来の基質は、4-hydroxyphenyl 基を有するが tyrosine のようにアミノ酸の主鎖構造は基質の対象にならないことが明らかとなった。今後は、天然におけるこのような構造を有する化合物を探索することで本来の基質を明らかにできることが期待される。また、このオペロンでは、ABC トランスポーターにより基質が取り込まれ hydrazidase により分解された化合物が IclR に結合し、さらにオペロンの遺伝子発現を誘導することが考えられた。

## 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 3 件)

- ① Tomonori Akiyama, Misaki Ishii, Atsushi Takuwa, Ken-Ichi Oinuma, Yasuyuki Sasaki, Naoki Takaya, Shunsuke Yajima, Structural basis of the substrate recognition of hydrazidase isolated from *Microbacterium* sp. HM58-2, which catalyzes acylhydrazide compounds as its sole carbon source. *Biochem Biophys Res Commun* 482, 2017, 482, pp. 1007 - 1012. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.148
- ② Tomonori Akiyama, Yusuke Yamada, Naoki Takaya, Shinsaku Ito, Yasuyuki Sasaki, Shunsuke Yajima, Crystal structure of an IclR homologue from *Microbacterium* sp. strain HM58-2. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 73, 2017, pp. 16 - 23. 査読有  
DOI: 10.1107/S2053230X16019208

- ③ Tomonori Akiyama, Taichiro Ishige, Yu Kanesaki, Shinsaku Ito, Ken-Ichi Oinuma, Naoki Takaya, Yasuyuki Sasaki, Shunsuke Yajima, Draft genome sequence of *Microbacterium* sp. strain HM58-2, which hydrolyzes acylhydrazides. *Genome Announc.* 4, 2016, p. e00554-16. 査読有  
DOI: 10.1128/genomeA.00554-16

[学会発表] (計 3 件)

- ① 矢嶋俊介、秋山友了、山田悠介、伊藤晋作、佐々木康幸、高谷直樹、細菌由来センサー型転写因子の結晶構造解析、日本結晶学会年会 2016 年 11 月
- ② 秋山友了、山田悠介、矢嶋俊介、MR-SAD を用いた転写因子の構造解析、2015 年度量子ビームサイエンスフェスタ 2016 年 3 月
- ③ 島村香穂、秋山友了、竹野谷美穂子、伊藤晋作、佐々木康幸、高谷直樹、矢嶋俊介、*Microbacterium hydrocarbonoxydans* 由来 ABC トランスポーター基質結合サブユニットの結晶構造解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢嶋 俊介 (YAJIMA, Shunsuke)  
東京農業大学・生命科学部・教授  
研究者番号：90301548

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

島村 達郎 (SHIMAMURA, Tatsuro)  
京都大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：90391979

高谷 直樹 (TAKAYA, Naoki)  
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：50282322

養王田 正文 (YOHDA, Masafumi)  
東京農工大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：50250105

佐々木 康幸 (SASAKI, Yasuyuki)  
東京農業大学・生命科学部・准教授  
研究者番号：50398814