

令和元年6月18日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07701

研究課題名(和文) 高分子取込みABC輸送体の分子機構の解析と改変による多様な物質輸送系の構築

研究課題名(英文) Construction of transport systems by analysis and modification of molecular mechanism of macromolecule-importing ABC transporter

研究代表者

丸山 如江 (Maruyama, Yukie)

摂南大学・理工学部・助教

研究者番号：90397563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴモナス属細菌A1株のアルギン酸ABC輸送体は、ペリプラズム局在性基質結合タンパク質との相互作用により、高分子アルギン酸を細胞外から細胞内に取り込む。基質取り込みに際して、基質アルギン酸、基質結合タンパク質、およびATPとの複合体形成によりABC輸送体(ヘテロ4量体)の構造を変化させる。本研究では、これらの分子間の相互作用に焦点を当て、アルギン酸ABC輸送体の輸送機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルギン酸輸送における分子間の親和性解析は、ABC輸送体における高分子基質輸送の全容解明を可能とするため、これまで低分子基質を中心に蓄積されてきたABC輸送体研究成果に新たな理解をもたらす。A1株では改変株を用いた海洋バイオマス(アルギン酸)からのバイオエタノール生産や、A1株のアルギン酸取込み・分解系を移植した細菌による物質取込み強化などの応用研究が成功しているため、A1株のアルギン酸取込みの要であるABC輸送体の機能と構造に関する本研究成果により、これらの応用研究がさらに深化することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The alginate ABC transporter in *Sphingomonas* sp. A1 imports high molecular weight alginate into the cell by interaction with the periplasmic substrate-binding protein. During substrate uptake, the structure of ABC transporter (heterotetramer) is changed by complex formation with alginate, substrate-binding protein, and ATP. In this study, we clarified the influence of the interaction between these molecules on the function and structure of alginate ABC transporter.

研究分野：構造生物学

キーワード：ABCトランスポーター アルギン酸 スフィンゴモナス属細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一般的に、細菌が細胞外の高分子物質を取込む場合、分解酵素を分泌し、低分子化した物質を細胞内を取込む。例外として、高分子物質 (DNA) の取込み機構 (自然形質転換) や、バクテリオシン (タンパク質) の取込み機構の存在が知られている。しかし、その分子機構について種々の説が提唱されているものの、統一的な見解は得られていないのが現状である。我々の研究グループは、多糖の一種であるアルギン酸 (10 ~ 1000kDa) を高分子のまま取込むグラム陰性細菌 *Sphingomonas* sp. strain A1 (A1 株) を見出し、ABC 輸送体がアルギン酸の膜通過に機能していることを明らかにしてきた (図 1)。アルギン酸は、細胞表面に形成される体腔と内膜の ABC 輸送体により細胞質内へと取込まれる。ABC 輸送体は、ATP のエネルギーを用いて物質の輸送を行う膜輸送体であり、細胞の内から外へ (排出系) 輸送するものと外から内へ (取込系) 輸送

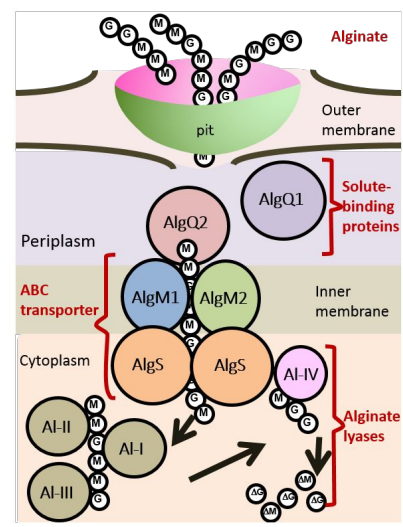


図 1 A1 株のアルギン酸取り込み装置

するものがある。輸送基質は、脂質や糖などの低分子物質から、タンパク質など的高分子物質まで、多岐にわたる。A1 株において、アルギン酸はペリプラズムの結合タンパク質 AlgQ1 もしくは AlgQ2 (単量体、共に約 60kDa) に捕捉され、次いで細胞質膜の ABC 輸送体 AlgM1M2SS (四量体、140kDa) により細胞質内へと運ばれる。取込まれたアルギン酸は、細胞質で分解酵素 (アルギン酸リアーゼ) によって単糖にまで分解される。この特徴的な高分子の内膜輸送の詳細を明らかにするため、これまでに、界面活性剤を用いて精製した組換え型 AlgM1M2SS 四量体をリポソーム小胞に再構成することにより、結合タンパク質と ABC 輸送体の *in vitro* 機能解析系を確立した。また、X 線結晶構造解析により AlgM1M2SS 四量体と AlgM1M2SS・AlgQ2 五量体の全体構造を決定した (Maruyama et al, Structure, 23, 1643-1654, 2015)。

### 2. 研究の目的

ABC 輸送体は、低分子から高分子までの多様な物質を基質とすることが知られているが、特に低分子輸送体を中心に研究が進んでおり、図 2 のような輸送サイクルが提唱されている。輸送基質の結合・解離または ATP の結合・加水分解、および ADP の解離に伴って、ABC 輸送体の複雑なコンフォメーション変化が起こる。これまでに決定した立体構造は、

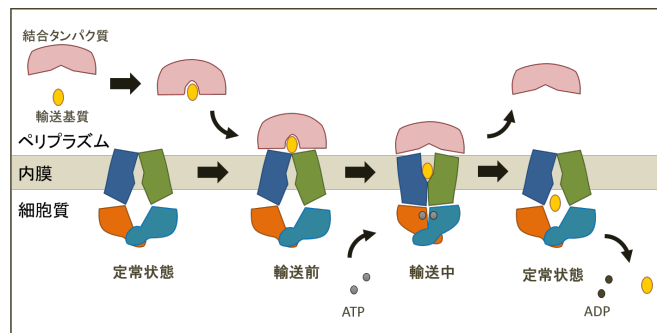


図 2 ABC 輸送体による基質輸送サイクル

図 2 に示す輸送サイクルにおける定常状態と輸送前の構造を示している。しかしながら、細胞質の内外に通じる二箇所のゲートを交互に開閉することによって低分子基質の輸送を行う本モデルでは、内膜貫通分子の内部空洞より大きな高分子物質の輸送機構を説明できないため、本輸送体特有の基質輸送機構を有していると考えられる。本研究では A1 株のアルギン酸輸送系にみられる、高分子輸送をはじめとした特徴的な輸送機構を解明することを試みた。

### 3. 研究の方法

アルギン酸 ABC 輸送体は、組換え大腸菌を用いて大量に発現し、超音波による細胞破碎後、超遠心分離とカラムクロマトグラフィー (Ni-NTA および Superdex S-200) を用いて精製した。精製の最適化に際しては、精製の最終段階であるゲル濾過クロマトグラフィーの展開溶液に加える界面活性剤を変更することにより検討した。ATPase 活性は、プロテオリポソームに再構築した AlgM1M2SS、あるいは界面活性剤に溶解した AlgM1M2SS を用いて、遊離したリン酸を定量することにより測定した。基質 (2 mM ATP) \ ABC 輸送体 (0  $\mu$ M または 0.1  $\mu$ M AlgM1M2SS) \ 10 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) \ 基質結合タンパク質 (1.3  $\mu$ M AlgQ2) およびアルギン酸オリゴ糖を含む条件下で、37 °C で反応を行った。輸送活性は、蛍光標識したオリゴ糖を基質として、MgATP を封じ込めたプロテオリポソームを用いて測定した。20  $\mu$ M 蛍光標識化オリゴ糖、MgATP を封じ込めたプロテオリポソーム (0.1  $\mu$ M AlgM1M2SS、0 mM または 5 mM MgATP) \ 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) からなる反応液に、37 °C で基質結合タンパク質 (0  $\mu$ M または 1  $\mu$ M AlgQ2)

を加えて反応を行った。反応液の超遠心分離（150,000 g、4 分、30 分）により得られた沈殿を超純水に懸濁した後、蛍光強度を測定することによりプロテオリポソーム内に蓄積した蛍光標識オリゴ糖の濃度を求め、輸送活性を算出した。X 線回折データは、放射光施設 SPring-8 の BL38B1 ビームラインにて湿度調整法（HAG 法）を用いて測定した。得られた回折データは、HKL2000 で処理した後、プログラム Molrep を用いて分子置換法にて位相を決定した。構造精密化には Refmac5 と winCoot を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 精製法の最適化と結晶化

活性を保持した ABC 輸送体の精製方法を検討した。種々の界面活性剤を用いて組換え大腸菌の膜画分から組換え輸送体を精製し、ATPase 活性を指標に各種界面活性剤をスクリーニングすることにより、界面活性剤 Cymal-6 と CHAPSO を組み合わせることにより、酵素活性が検出される条件を見出した(図 3)。本条件を見出したことにより、本輸送体の結晶化条件の検討や活性スクリーニングを容易にすることが期待できる。この界面活性剤に溶解した輸送体に、基質結合タンパク質とアルギン酸オリゴ糖、ATP アナログを添加した結晶化条件を探索したところ、定常状態の結晶化条件では結晶が得られず、代わりに、PEG6000 と塩化アンモニウムを沈殿剤とした時に、 $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$  の単結晶が得られた。本結晶は回折データの取得には至らなかったが、これまでの不活性条件における結晶とは明らかに異なる結晶が得られたことから、スクリーニングを継続することで今後に期待が持てる。

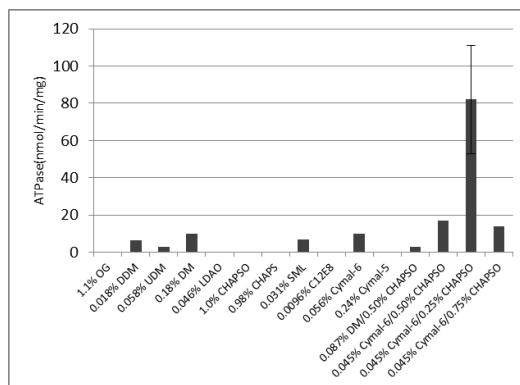


図 3 アルギン酸 ABC 輸送体の ATPase 活性における各種界面活性剤の影響

##### (2) ABC 輸送体の構造制御

輸送中間状態の AlgS にジスルフィド結合を導入することにより、アルギン酸 ABC 輸送体の構造変化を制御し、輸送中間体構造の結晶構造を解明することを目指した。変異 AlgS (S163C) を含むアルギン酸 ABC 輸送体は、野生型と同様に四量体構造をとり、かつ、還元剤存在下で ATP 加水分解活性を示したが、酸化剤存在下では AlgS の部分分解が認められた。AlgS に導入した部位特異的変異が輸送体の構造変化に意図しない影響を与えたと考えられる。

##### (3) アルギン酸と ATP

共免疫沈降法を用いて、基質輸送サイクルにおける分子間の相互作用を調べたところ、アルギン酸 ABC 輸送体が基質結合タンパク質と結合する為には、ATP と輸送基質が必要であることが示された。一方、AlgQ2 および異なる重合度 (PD) を有するアルギン酸オリゴ糖基質を用いた ATPase および輸送活性において、長いアルギン酸オリゴ糖 (PD ≥ 5) は、アルギン酸 ABC 輸送体の ATPase 活性を刺激するものの、輸送基質として不活性であった。すなわち、ATP 加水分解が基質輸送とは無関係に刺激され得ることを示した。AlgQ2 と長いアルギン酸オリゴ糖 (PD=6-8) の存在下で結晶化し、 $3.6\text{\AA}$  分解能で結晶構造を決定した。決定した構造は、非輸送リガンドを結合する AlgQ2 と、inward-facing 構造の AlgM1M2SS からなっていた(図 4)。これらの結果より、ペリプラズムで基質結合タンパク質が基質を捕捉し ABC 輸送体と接触すること、および細胞質ドメインに ATP が結合することが、ABC 輸送体の構造変化および基質輸送を引き起こすと考えられた。

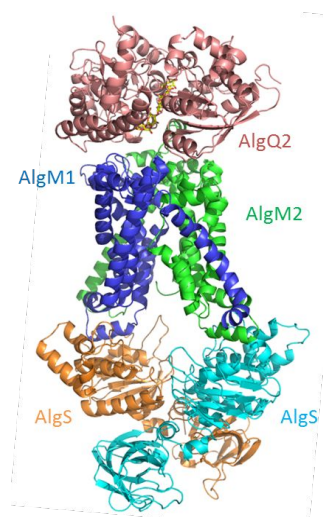


図 4 長鎖アルギン酸オリゴ糖を結合したアルギン酸 ABC 輸送体の結晶構造

##### (4) カルシウムイオン

ペリプラズムにおいて基質を ABC 輸送体に運搬する他の細菌由来基質結合タンパク質において、カルシウムが基質輸送の調節に関与することが間接的に示唆された (Culurgioni et al, Structure 25, 79-93, 2016)。A1 株のアルギン酸取り込みにおけるカルシウムの役割を明らかにする為、基質結合タンパク質 AlgQ2 の立体構造に基づき、カルシウム結合に関与する 2 つのアミノ酸残基をアラニンに置換した二重変異体 (D179A/E180A) を作製した。本変異体は非常に不安定であったが、アルギン酸オリゴ糖と結合することにより安定化し (図 5)、野生型と同様に、ABC 輸送体と相互作用し、その構造変化を引き起こすこと

により ATP 加水分解を促進した。その活性は野生型 AlgQ2 を用いた時と同程度であったが、添加する変異 AlgQ2 の濃度を下げると活性が減少するという違いが見られた。アルギン酸結合型の変異 AlgQ2 の結晶構造では、カルシウムイオン結合部位周辺の構造がフレキシブルになったが、全体構造に変化は見られなかった(図6)。以上より、カルシウムイオンは特にリガンド非結合型の AlgQ2 の構造を安定化させ、その構造安定化を通じて ABC 輸送体の活性に影響を及ぼすと考えられる。

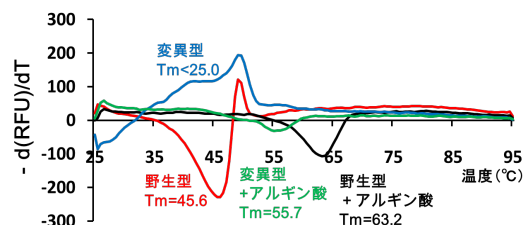


図5 AlgQ2 の熱安定性

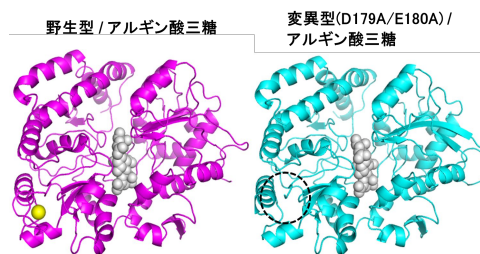


図6 AlgQ2 の結晶構造

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

Maruyama Yukie, Hashimoto Wataru, Murata Kousaku “Structural studies on bacterial system used in the recognition and uptake of the macromolecule alginate.” Biosci. Biotechnol. Biochem., 83, 査読有, 2019, 794-802.

橋本 涉、丸山如江、伊藤隆文、高瀬隆一、村田幸作「ヘテロ多糖の輸送にかかわる細菌由来超分子の構造基盤」化学と生物、査読有、54巻、2018、885-891

Kaneko Ai, Uenishi Kasumi, Maruyama Yukie, Mizuno Nobuhiro, Baba Seiki, Kumasaka Takashi, Mikami Bunzo, Murata Kousaku, Hashimoto Wataru “A solute-binding protein in the closed conformation induces ATP hydrolysis in a bacterial ATP-binding cassette transporter involved in the import of alginate.” J. Biol. Chem., 査読有, 292, 2017, 15681-15690.

[学会発表](計 2件)

Okumura Kenji, Maruyama Yukie, Mikami Bunzo, Murata Kousaku, Hashimoto Wataru “*Sphingomonas* sp. A1 alginate-binding protein: Calcium ion bound to EF hand-like motif stabilizes its structure.” 日本生化学会、2018

Kaneko Ai, Oiki Sayoko, Maruyama Yukie, Mikami Bunzo, Murata Kousaku, Hashimoto Wataru “Interaction mode between solute-binding protein and ABC transporter involved in the import of acidic polysaccharide.” 日本生化学会、2017

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：橋本 涉

ローマ字氏名：Hashimoto Wataru

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：30273519