

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (S)

研究期間：2008 ~2012

課題番号：20227003

研究課題名 (和文) 膜輸送体による基質認識・輸送調節機構の構造基盤の解明

研究課題名 (英文) Structural basis for molecular mechanisms of substrate recognition and transport regulation by membrane transporters

研究代表者 濡木 理

(NUREKI OSAMU)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10272460

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析, 電気生理学, 遺伝学, 膜輸送体

1. 研究計画の概要

膜輸送体タンパク質は、物質を生体内外に輸送することで細胞内の環境を一定に保ち、生命を維持している。本研究では、X線結晶構造解析、分子動力学シミュレーション、構造に基づいて設計した変異体の機能解析を組み合わせることで、各種膜輸送体の輸送駆動機構、基質認識機構、輸送制御機構を原子分解能のレベルで明らかにする。

2. 研究の進捗状況

1. **二価金属イオンの輸送機構**

Mg²⁺輸送体 MgtE の全長構造を 2.9 Å 分解能で決定し、分子動力学シミュレーションにより、細胞内の Mg²⁺濃度に依存してセンサードメインの構造が開閉することを計算機内で再現した。さらに、マグネシウム要求性大腸菌株を用いた遺伝学実験と電気生理学解析により、MgtE は Mg²⁺特異的なチャンネルであり、その細胞質ドメインがマグネシウムセンサーとして働くことで、細胞内 Mg²⁺濃度を一定に保つことを世界に先駆けて解明した。Fe²⁺輸送体 FeoB と重金属排出輸送体 CDF に関しては、細胞質ドメインの立体構造を解明し、これらが細胞内金属イオン濃度を検知するセンサーとして働くことを示唆した。また、Mg²⁺排出輸送体 ACDP2 に関しては、細胞質ドメインの構造解析により、細胞内 ATP 濃度に依存して Mg²⁺排出が制御される機構を示唆した。Na⁺と Ca²⁺を対抗輸送する NCX 輸送体に関しては、古細菌ホモログである CaCA の結晶化に初めて成功し、5 Å 分解能のデータを収集している。

2. **物理刺激による輸送制御**

温度センサーである、ヒト由来 TRPV1 の C 末端の TRPドメインとカルモデュリンの複合体の結晶構造を 2.0 Å 分解能で決定し、カルモデュリンが TRPV1 のカチオン輸送をフィードバック輸送する機構を示唆した。また、酵母の TRPチャンネルを酵母内で大量調製し可溶化することに成功し、結晶化を目指している。

3. **有機物の輸送機構**

糖の輸送とリン酸化をカップルしたグルーブ輸送を行う糖輸送体 PTS に関して、3.8 Å 分解能を持つ結晶の作成に成功し、構造解析を進めている。また、H⁺あるいは Na⁺と薬剤を対抗輸送し、様々な薬剤の排出に働く（ヒトでは腎臓や脳関門での異物排出に働く）MATE に関して、結晶化に成功し、2.4 Å 分解能のデータを収集した。現在、位相決定・構造決定を行っている。さらに、H⁺とジペプチド・薬剤を symport し、高等真核生物では小腸でのペプチドの吸収に働いている POT に関して、1.99 Å 分解能での構造解析に成功した。現在、ジペプチドおよび各種薬剤との複合体の構造解析を進めている。さらに、低分子にとどまらず、細胞質中で合成されたタンパク質を、SecA ATPase モーターに駆動されて、変性状態で細胞膜を輸送し、あるいは膜タンパク質を細胞膜に埋め込む Sec 膜透過因子の構造機能解析を精力的に進めた。まず、タンパク質の膜透過チャンネルである SecYE の結晶構造を、特異的抗体との複合体の形で、3.2 Å 分解能で決定した。これまで報告されていた古細菌の SecYEβ が閉構造であったのに対し、我々の構造は、膜貫通ヘリックスが互いに関いて、疎水性の凹みを形成した開構造であった。システインクロスリンク法を用いた生物化学的解析と結晶構造解析・MD シミュレーションにより、SecA が結合すると閉構造から開構造

へと構造変化することを突き止めた。さらに、SecAとSecYEのシステインクロスリンクを行い、SecAもSecYEと結合すると開構造となり、ATPase活性が活性化されることを明らかにした。さらに、SecYEと協働するSecDFに関して、3.3Å分解能での結晶構造を解明した。生化学的解析により、SecDFは、SecAが変性したタンパク質をSecYEに押し込んだ後の、タンパク質膜透過後期過程を、プロトンの濃度勾配のエネルギーを用いて促進する機能を持つことを明らかにした。さらに、システインクロスリンクにより、SecDFの第一ペリプラズムドメインが2つの構造をダイナミックに往復することで、タンパク質をSecYEチャンネルから引きずり出すことを明らかにした。さらに、パッチクランプ解析と蛍光分光解析により、SecDFがプロトンを輸送し、これを駆動力としてタンパク質の膜輸送を促進するシャペロンとして働くことを実証し、さらに、プロトン輸送に働くアミノ酸残基を同定することに成功した。

3. 現在までの達成度

当初はカチオン、糖、ジペプチドなど低分子基質の膜輸送体に関して、構造機能解析を推進し、輸送の駆動機構、基質の認識機構、輸送の制御機構を明らかにする目的をたてていたが、当初は膜タンパク質の結晶化や構造解析は容易ではなく、かなりの困難が予想された。我々は、FSECを用いた網羅的な発現解析、生化学的実験およびバイオインフォーマティクスに基づく変異体の作成、融合タンパク質のコンストラクション、抗体との複合体形成、LPC法の導入により、高い確率で膜輸送体の高分解能結晶の作成および構造解析に成功してきた。さらに、分担研究者との緻密な共同研究により、構造解析、計算機シミュレーションで得られた仮説を、遺伝学、電気生理学、分光学的手法により、機能の面からも実証することに成功し、生物学的にも新しい数々の知見を得ることに成功した。また、低分子基質のみならず、タンパク質という高分子の膜輸送に関しても、世界に先駆けて新規構造を2つ発表し、それぞれ新規のメカニズムを実証することに成功し、教科書を塗り替えることができた。これらは、学術誌上でも海外講演でも高い評価を得ている。したがって、これまでの研究成果は、当初の目標を超える進展があり、今後も予定以上の成果が見込まれると自己評価できる。

4. 今後の研究の推進方策

二価金属イオン輸送体に関しては、センサー変異体を用いることで開状態のMgtEの全長構造を解明する。また、予備的な結晶化に成功しているNa⁺/Ca²⁺アンチポーターNCXに関して、特異的抗体の複合体形成により分

解能を向上させる。物理刺激による輸送制御に関しては、温度センサーであるTRPチャンネルの構造機能解析を完成させる。有機物輸送体に関しては、予備的な結晶化および構造解析に成功している、糖輸送体PTS、多剤排出因子MATE、ジペプチド輸送体POTに関して、基質複合体の構造解析ならびに変異体の機能解析を行い、基質認識機構・輸送機構を解明する。Sec膜透過装置に関しては、YidCならびにSecYEG2量体とSecAの複合体、SecYEGと70Sリボソームの複合体の結晶構造解析を推進する。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計13件)

1. "Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export" T. Tsukazaki (8名) A. Maturana, K. Ito and O. Nureki *Nature, in press* (2011).
2. "Mg²⁺-dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg²⁺ homeostasis" M. Hattori (6名) K. Ito, A. Maturana and O. Nureki *EMBO J.* **28**, 3602-3612 (2009).
3. "Structural basis of novel interactions between the small-GTPase and GDI-like domains in prokaryotic FeoB iron transporter." M. Hattori (6名) K. Ito and O. Nureki. *Structure* **17**, 1345-1355 (2009).
4. "Crystal structure of the cytosolic domain of the cation diffusion facilitator family protein." T. Higuchi (3名) O. Nureki. *Proteins* **76**, 768-771 (2009).
5. "Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures" T. Tsukazaki (9名) O. Nureki. *Nature* **455**, 988-91 (2008).
6. "Mg²⁺-sensing mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE probed by molecular dynamics study" R. Ishitani (4名) O. Nureki *Proc. Natl. Acad. USA.* **105**, 15393-15398 (2008).

[学会発表(招待講演)] (計6件)

1. The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association [10/31-11/3, 2010 (Busan, Korea)] "Structural analysis of bacterial Sec translocon machinery" T. Tsukazaki, H. Mori, K. Ito and O. Nureki
2. VIII European Symposium of The Protein Society [6/16, 2009 (Zurich, Switzerland)] "Multiple conformational states of Sec machinery components implicated from bacterial SecYE crystal structure" O. Nureki
3. The Joint 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science [6/22-26, 2008 (Cairns, Australia)] "Gating control: mechanism of magnesium transporter MgtE" O. Nureki
4. Gordon Research Conference -Magnesium in Biochemical Processes & Medicine [2008 (Ventura, CA, USA)] "Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter" O. Nureki

[図書] (計0件)