

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380049

研究課題名(和文) 基質結合タンパク質と巨大分子特異的ABCインポーターとの複合体の構造と機能

研究課題名(英文) Structure and function of complex of substrate-binding protein and macromolecule-specific ABC transporter

研究代表者

村田 幸作 (Murata, Kousaku)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：90142299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円、(間接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陰性細菌において、多糖の輸送に関わるABCトランスポーターの構造機能相関を解析した。その結果、基質を結合した結合タンパク質がinward facing構造のABCトランスポーターに接触し、その後、ATPの結合に伴い、結合タンパク質がドメインを開くと共にABCトランスポーターもoutward facing構造に変化し、基質がABCトランスポーターに受け渡され、次いで、ATPの加水分解により基質が細胞質に輸送されることを示した。また、本ABCトランスポーターは、マルトース輸送ABCトランスポーターと類似しているが、トンネル構造など巨大分子を輸送する特徴的な構造を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The structure and function relationship of macromolecule(alginate)-specific ABC transporter (importer:AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS) of *Sphingomonas* sp, A1 was analyzed. The substrate-binding proteins (AlgQ) bind/release alginate by opening/closing the N-domain and C-domain. The subsite 1 in the AlgQ specifically binds mannuronate. Through the contact with alginate-bound AlgQ, the permeases (AlgM1 and AlgM2) constituting importer open, receive alginate from AlgQ, and then alginate is introduced into cytosol by using ATP-hydrolyzing energy, which is generated by the action of AlgS (ATPase). This ATP transporter was different from the ABC transporters responsible for the transport of low-molecular weight substrates in that the substrate-binding protein (AlgQ) forms the tunnel that allows the passage of alginate, a long chain acid polysaccharide.

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：微生物機能

キーワード：ABCトランスポーター 酸性多糖輸送 *Sphingomonas*属細菌 X線結晶構造 輸送体分子進化

1. 研究開始当初の背景

殆ど全ての生物細胞の膜インターフェイスに局在する ABC トランスポーターは、ATP 加水分解エネルギーを用いて物質の膜内外への輸送(取り込みと排出)を行う重要な分子装置(インポーターとイクスポーター)である。癌細胞の多剤耐性化(薬剤排出)にも関係している。そのため、ABC トランスポーターの高次構造と機能との相関を明らかにする研究が主に細菌を対象に進展している。

グラム陰性細菌のペリプラズム局在性基質結合タンパク質は、細胞外膜から細胞内膜に基質を輸送する機能を有し、ABC インポーターと接触して基質を受け渡した後、ABC インポーターから遊離する。つまり、基質結合タンパク質と ABC インポーターは、離合集散可能な過渡的複合体を形成し、その相互作用を通して輸送活性や ATP 加水分解活性を制御する。

この制御に関わる基質結合タンパク質と ABC インポーターの構造要因が明らかにされつつあるが、その多くは低分子物質の輸送に関わる ABC トランスポーターであり、本研究が対象とする多糖の様な高分子物質の取り込みに関わる ABC インポーターの構造機能相関解析は進展していない。

これまでに、著者らは、グラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株(以下、A1 株)由来高分子多糖アルギン酸の取り込み系の実体を明らかにし、細胞外のアルギン酸がペリプラズム局在性アルギン酸結合タンパク質(AlgQ1 或いは AlgQ)と ABC インポーター(AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS)の作用により直接細胞質に取り込まれることを明らかにした。これは、微生物学史上最初の高分子物質取り込み ABC インポーターシステム(基質結合タンパク質依存的 ABC トランスポーター)である。

そこで、本研究では、多糖(アルギン酸)取り込みに関わる分子機構の解明を目的とし

て、アルギン酸特異的 ABC トランスポーターの *in vitro* 測定系と立体構造(X 線結晶構造)の決定を進めた。

2. 研究の目的

A1 株における巨大分子特異的基質結合タンパク質と ABC トランスポーター(インポーター)との相互作用の特性を明らかにするため、その全高次空間構造と構成タンパク質の分子間相互作用を解析する。

3. 研究の方法

基質結合タンパク質(AlgQ1 或いは AlgQ2)と ABC インポーター(AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS)の相互作用に関わる構造要因(具体的には、両者の結合に関わる分子構造とその結合による構造変化)、並びに ATP 加水分解のシグナル伝達機構を、表面プラズモン共鳴解析、X 線結晶構造解析、電子顕微鏡解析、及び部位特異的変異解析などにより明らかにする。

4. 研究成果

(1) ABC トランスポーターの輸送機能

ABC トランスポーターのアルギン酸輸送機能を解析するため、精製した AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS をリン脂質膜に再構成し(図 1)、このリポソーム(プロテオリポソーム)を用いて *in vitro* 輸送活性を測定した。リポソーム内部に 5 mM の MgATP を封じ込め、輸送基質は 2-アミノピリジン(PA)により糖の還元末端を蛍光標識して用いた。ATP、AlgQ2、及びバナジン酸の有無による PA 化不飽和マンヌロン酸 3 糖(Δ MMM)の輸送活性を測定し、AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS による基質の輸送には基質結合タンパク質 AlgQ2 の存在と ATP の加水分解が必要であることを示した。また、輸送には基質の M/G 組成や飽和・不飽和は関係せず、アルギン酸 3 糖

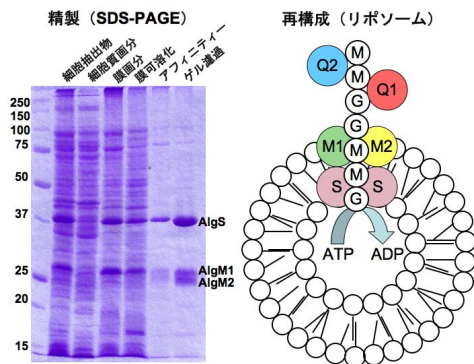


図 1. ABC インポーターの精製と再構成

と 4 糖の輸送活性が確認された。しかし、8 糖以上のアルギン酸オリゴ糖では、輸送活性が低下した。

(2) 基質結合タンパク質の基質認識機構

再構成 ABC トランスポーター AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS の機能が確認されたため、この ABC トランスポーターに接触する基質結合タンパク質 (AlgQ1 または AlgQ2) の構造機能相関を解析した。

アルギン酸結合タンパク質とオリゴ糖との親和性評価には、Differential scanning fluorimetry (DSF) 法を用いた。2 種類の結合タンパク質 (AlgQ1、AlgQ2)、リガンドとして 4 種類のオリゴ糖 MMM、GGG、 Δ MMM、及び Δ GGG を用いた場合、DSF の結果はいずれもほぼ同じ熱変性プロファイルを示したことから、AlgQ1 と MM についてのみ相互作用を解析した。その結果、結合タンパク質は、リガンドの結合に伴い大きく構造変化を起こすこと、つまり、リガンドが結合していない状態では二つのドメインが開いた open 型であるのに対し、リガンドが結合するとドメインが接近し、閉じた構造 closed 型に変化することを明らかにした (図 2)。

(3) 基質結合タンパク質の立体構造解析

アルギン酸結合タンパク質における M と G の相互作用様式を明らかにするため、AlgQ1 と種々のオリゴ糖との複合体の立体

構造を X 線結晶構造解析により決定した。

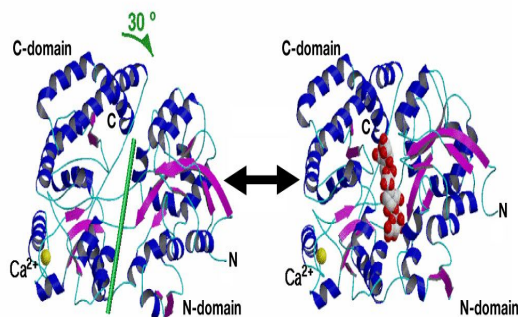


図 2. 基質結合タンパク質の X 線結晶構造

左: アルギン酸非結合, 右: アルギン酸 (赤白) 結合

4 種類のオリゴ糖 MMM、GGG、 Δ MMM、 Δ GGG との複合体は、全て同等の closed 型構造をとっており、オリゴ糖は N-ドメインと C-ドメインの間に位置する深いクレフトの内部に結合していた。詳細は省略するが、結合部位におけるサブサイト 1 では、マンヌロン酸 (M) のみと結合できる構造になっていることを明らかにした。生合成されたアルギン酸、並びに酵素リアーゼで切断されたオリゴアルギン酸は、いずれもその末端糖はマンヌロン酸であるため、このサブサイト 1 の M 特異的結合性は生物学的に妥当であると考えられる。

(4) ABC トランスポーターの構造機能相関

ABC インポーターと結合タンパク質との複合体の構造解析を進めるため、再構成 ABC トランスポーター (図 1) を用いて結晶を調製し、その立体構造 (X 線結晶構造) を決定した (図 3)。

膜貫通タンパク質である AlgM1 と AlgM2 は、両者共に良く似たトポロジーを示し、ヘリックスが約 6 回膜を貫通する形状を取っている。AlgM2 の H5C のみがペリプラズム領域に突出しており、これが結合タンパク質との相互作用に重要な領域であることが分かった。AlgM1 と AlgM2 の H4a が AlgS のポケットに収まる形で、膜貫通タンパク質と

ATPase が相互作用していることが判明した。

膜貫通タンパク質と結合タンパク質との相互作用について、AlgM1 は AlgQ2 の C 末端ドメインと、AlgM2 は AlgQ2 の N 末端ドメインと接触している。AlgQ2 と AlgM1 との界面に長いトンネル構造が存在し、その先端には AlgQ2 に結合した基質アルギン酸オリゴ糖が見える。つまり、長鎖多糖であるアルギン酸は、このトンネル構造を介して輸送されることが示唆された。



図3. ABCトランスポーター/基質結合タンパク質複合体の立体構造

また、膜貫通タンパク質は、基質結合タンパク質側では閉じ、AlgS 側(ATPase 側)では開いた、全体として inward facing 構造をとっていることが分かった。基質をトラップした結合タンパク質が inward facing 構造のインポーターに接触し、その後、ATP の結合に伴い、結合タンパク質がドメインを開くと共にインポーターも outward facing 構造に変化し、基質がインポーターに受け渡され、次いで、ATP の加水分解により基質が細胞質に輸送されることになる。

今回構造決定した ABC インポーターは、全体構造としてはマルトーストランスポーターと類似しているが、局所的に異なる点が見られた。まず、結合タンパク質の相互作用様式が異なること、また、最大の相違点として、アルギン酸インポーターで認められる基

質結合トンネルはマルトーストランスポーターに存在しないことである。これは、アルギン酸インポーターが長鎖アルギン酸を輸送する分子装置であることを示唆していると考えられる。

今後は、ATP が結合した outward facing 型を示す構造モデルを構築し、高分子アルギン酸がどのように輸送されるかを明らかにしなければならない。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

河井重幸, 村田幸作: 大型海藻(褐藻類)からのエタノール生産. **リサイクルバイオテクノロジーの最前線**(植田充美 監修)シーエムシー出版, 東京, 43-49 (2013).

M.Yanagisawa, S.Kawai & K.Murata: Strategies for the production of high concentration of bioethanol from seaweeds: Production of high concentration of bioethanol from seaweeds.

Bioengineered, **4**(4), 224-235 (2013).

A.Ota, S.Kawai, H.Oda, K.Iohara & K.Murata: Production of ethanol from mannitol by the yeast strain *Saccharomyces paradoxus* NBRC 0259.

J.Biosci.Bioeng., **116**(3):327-332 (2013).

村田幸作: 海藻からエタノールを生産する微生物育種. 「合成生物学の隆起 ~有用物質の新たな生産法構築をめざして~」, 監修: 植田充美, シーエムシー出版, pp.204-214(2012).

竹田浩之, 村田幸作: 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.

バイオサイエンスとインダストリー, **70**(6), 472-473 (2012).

B.Mikami, M.Ban, S.Suzuki, H.-J.Yoon, O.Miyake, M.Yamasaki, K.Ogura,

Y.Maruyama, W.Hashimoto & K.Murata:
Induced-fit motion of a lid loop involved in
catalysis in alginate lyase A1-III.

Acta Cryst., **68**,1207-1216 (2012).

Y.Nishitani, Y.Maruyama, T.Itoh,
B.Mikami, W.Hashimoto & K.Murata.
Recognition of heteropolysaccharide
alginate by periplasmic solute-binding
proteins of a bacterial ABC transporter.

Biochemistry, **51**(17), 3622-3633 (2012).

K.Ohashi, S.Kawai & K.Murata:
Identification and characterization of a
human mitochondrial NAD kinase.

Nat. Commun., **4** December **2012**.
DOI:10.1038/ncomms2262 (2012).

Y.Maruyama, T.Itoh, Y.Nishitani, B.
Mikami, W.Hashimoto & K.Murata:
Crystallization and preliminary X-ray
analysis of alginate importer from
Sphingomonas sp. A1.

Acta Cryst., **F68**, 317-320 (2012)

T.Ando, K.Ohashi, A.Ochiai, B.Mikami,
S.Kawai & K.Murata: Structural
determinants of discrimination of NA^+ from
NADH in yeast mitochondrial NADH
kinase Pos5.

J.Biol.Chem., **286**(34):29984-29992 (2011).

H.Takeda, F.Yoneyama, S.Kawai, W.
Hashimoto & K.Murata: Bioethanol
production from marine biomass alginate
by metabolically engineered bacteria.

Energy Environ.Sci., **4**:2575-2581 (2011).

Y.Maruyama, A.Ochiai, B.Mikami, W.
Hashimoto & K.Murata: Crystal structure
of bacterial cell-surface alginate-binding
protein with an M₇₅ peptidase motif.

Biochem.Biophys.Res.Comm., **405**(3),
411-416 (2011).

Y.Maruyama, A.Chuma, B.Mikami, W.
Hashimoto & K.Murata: Heterosubunit

composition and crystal structures of a
novel bacterial M16B metallopeptidase.

J.Mol.Biol., **407**(1), 180-192 (2011).

〔学会発表〕(計 6件)

酸性多糖アルギン酸の取り込みに関わる
ABC トランスポーターの機能解析

○金子あい, 丸山如江, 橋本 渉, 村田幸作(京
大院・農) 第 86 回日本生化学会大会、2013
年 9 月 12 日(パシフィコ横浜・横浜市)

体腔依存多糖取り込み ABC トランスポー
ターの構造機能相関とその応用

○橋本 渉, 丸山如江, 三上文三, 村田幸作(京
大院・農)日本農芸化学会 2013 年度大会(シ
ンポジウム) 2013 年 3 月 27 日(東北大学・
仙台市)

細菌由来アルギン酸 ABC トランスポー
ターの立体構造と基質輸送

○丸山如江, 金子あい, 三上文三, 橋本 渉,
村田幸作(京大院・農)日本農芸化学会 2013
年度大会、2013 年 3 月 25 日(東北大学・仙
台市)

細菌 ABC トランスポーターと連携する基
質結合タンパク質によるヘテロ多糖アルギ
ン酸の認識機構

西谷 悠, 丸山如江, 伊藤貴文, 三上文三, ○
橋本 渉, 村田幸作(京大院・農) 2012 年度
日本農芸化学会関西支部大会、2012 年 9 月
29 日(京都学園大学・亀岡市)

多糖アルギン酸の取り込みに関わる細菌
由来 ABC トランスポーターの X 線結晶構造
解析

○丸山如江, 伊藤貴文, 西谷 悠, 三上文三,
橋本 渉, 村田幸作(京大院・農)日本農芸化
学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日(京大
女子大学・京都市)

多糖アルギン酸を取り込む細菌由来 ABC ト
ランスポーターと基質結合タンパク質の相
互作用に関する構造機能解析

○西谷 悠, 丸山如江, 伊藤貴文, 三上文三,

橋本 涉, 村田幸作 (京大院・農) 2011 年度
日本農芸化学会関西・中部支部合同大会、
2011 年 10 月 2 日(京都大学・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称：アルギン酸からのピルビン酸の生産法
発明者：村田幸作, 河井重幸, 佐藤信行
権利者：国立大学法人京都大学、株式会社マ
ルハニチロ食品
出願番号：特願 2013-034710
出願年月日：平成 25 年 2 月 25 日
国内外の別： 国内

取得状況(計 1 件)

名称：海洋バイオマスからのエタノール生産
発明者：村田幸作, 橋本 涉, 河井重幸, 織田
浩司, 庵原 啓司, 三上文三, 竹田浩
之, 米山史紀, 落合秋人
権利者：国立大学法人京都大学、株式会社 マ
ルハニチロホールディングス
種類：特許第 4845070 号
特許取得日：平成 23 年 10 月 21 日
出願年月日：平成 21 年 8 月 28 日
国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村田幸作 (Murata, Kousaku)
摂南大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：90142299

(2)研究分担者

橋本 涉 (Hashimoto, Wataru)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：30273519

三上文三 (Mikami, Bunzo)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：40135611