

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2011

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

研究成果の概要（和文）：

輸送体膜蛋白質は、金属イオン、糖、代謝産物、薬剤などの細胞内への取込みおよび細胞外への排出を厳密に制御し、細胞内の環境を適切に保っている。本研究では、マグネシウム輸送体、鉄輸送体および重金属輸送体などの金属イオン輸送体、光感受性陽イオンチャネル、蛋白質膜透過輸送体、ペプチド輸送体、多剤排出輸送体に関して、(1) X線結晶構造解析による構造的基盤の解明、(2) 分子動力学(MD)シミュレーションによる動的側面の解明、(3) *in vivo/vitro*における機能解析による実験的な検証の3つの手法を協奏的に駆使し、(A) その機能本体である輸送の機構、(B) 輸送基質の選択機構、(C) 輸送の制御機構の3点に着目し、膜輸送体が生命活動を維持するメカニズムを解明した。特に、様々な種類の基質に特異的な膜輸送体の作動機構を比較・統合することにより、膜輸送の本質的なメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Membrane transporters maintain the intracellular circumstances by strictly regulating the import and export of metal ions, sugars, metabolites and drugs etc. To elucidate (A) how the transporters drive their transport, (B) how the transporters exclusively select their specific substrates and (C) how the transporters regulate their transporting activities at an atomic resolution, we performed (1) structure determination by X-ray crystallography, (2) dynamic property analysis by MD simulation and (3) *in vivo* and *in vitro* complementary experiments, focusing on ion transporters of magnesium, iron and heavy metals, light-gated cation channels, protein transporters, peptide transporter and multidrug transporters. Especially, we uncovered the essential molecular mechanism of membrane transport by comparing and integrating the functional mechanisms of transporters specific for various kinds of target solutes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	40,700,000	12,210,000	52,910,000
2009年度	27,800,000	8,340,000	36,140,000
2010年度	29,500,000	8,850,000	38,350,000
2011年度	40,800,000	12,240,000	53,040,000
年度			
総計	138,800,000	41,640,000	180,440,000

研究分野：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，チャネル，トランスポーター，電気生理学解析、遺伝学解析

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は細胞の内外の境界を決め細胞質を外部環境と異なる状態で維持し、細胞の生存にとって不可欠な役割を果たす。物質を生体内外に輸送することでこの異なる環境を作り出しているのが、膜に埋め込まれた輸送体蛋白質である。しかしながら、輸送体を含む膜蛋白質は試料調製などの問題から立体構造決定は困難であり、これらの理解は世界的にも限られた状況にある。その一方で、我々は既にMg²⁺輸送体MgtE全長の構造決定を行うなど、先駆的な成果を挙げてきた。本研究は、現在我々のグループで発展しつつある膜蛋白質の構造生物学という先駆的な研究を格段に推進し、この生命現象の根幹をなす輸送体について、輸送の駆動機構、基質の識別機構、輸送の制御機構を中心に総合的に理解することを目的とした。具体的には、1. X線結晶構造解析による構造的基盤の解明、2. 分子動力学(MD)シミュレーションによる動的側面の解明、3. *in vivo/vitro*における機能解析による実験的な検証、3つの手法を協奏的に駆使し問題解決を図ることを目指した。

2. 研究の目的

金属イオン輸送体

金属イオン輸送体は無機物であるイオンを正確に識別して膜内外に輸送し、細胞内外の環境を維持・変化させる役割を持つ。そしてその輸送能は、輸送基質自体の濃度や他の様々な要因により制御されている。近年、これらの構造的な研究が盛んであり、特にNa⁺、K⁺、Ca²⁺輸送体に関しては詳細な構造解析が進んでいる。しかし、他の生理的機能が重要なイオンについては、未だ不明な点が多く残されている。本研究では、それらの中からMg²⁺輸送体MgtE、Zn²⁺輸送体CDF、Fe²⁺輸送体FeoBに焦点を当て研究を推進する。

物理刺激による輸送制御

輸送制御の機構には、既に挙げた濃度により制御を受ける化学センサーの他に、物理的刺激(光、電位差、温度等)により制御を受けるケースが知られている。この物理センサーの機構は、前者とは全く異なった制御の構造的基盤を有すると推測される。本研究で取り上げる高等真核細胞の温感チャネルTRPV1は、N端およびC端の700残基および100残基程度の細胞質ドメインと中央の6回膜貫通ドメインから構成され、43°C以上の温度変化で、Ca²⁺あるいはNa⁺の流入を起し、神経細胞を脱分極・興奮させるが、その物理センサーの分子機構は未解明である。また、神経生物学の分野で最近脚光を浴びている、可視光を感受してカチオンの流入を引き起こすチャネルロドプシンの構造機能研究を推進する。

有機物の輸送機構

輸送体蛋白質の基質として、イオンの他に有機化合物(アミノ酸、核酸、糖、他)が重要である。いうまでもなく、これら有機化合物は以上で取り上げたイオンとは化学的性質が大きく異なる。ゆえに、これらの輸送体による輸送・識別機構は異なった構造的基盤に成り立つと考えられ、輸送体の網羅的・総合的理解には、これらの解析が必須である。特に、糖・アミノ酸などの有機物に関しては、細胞内外に類似物質が多種存在するため、特異性の高い認識が行われているケースが多い。また逆に、多剤排出因子を代表とする、幅広い物質を認識し輸送するケースも多く知られており、これらの基質識別機構は極めて興味深い問題である。本研究では、有機物の中から特に、ジペプチドおよび薬剤の輸送体POT、薬剤の輸送体MATEに焦点を当て研究を推進する。

蛋白質の膜透過輸送

脂質二重膜は水1分子も通さない障壁であるが、細胞質のリボソームで作られた新生蛋白質のうち、30%は分泌蛋白質あるいは膜蛋白質として、膜を透過し、あるいは膜に埋め込まれる。本研究では、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る。

3. 研究の方法

まず、様々な生物種由来の膜輸送体の大腸菌および昆虫細胞Sf9を宿主した大量発現系を作成し、構造解析に適した系を探索する。標的蛋白質をGFPとの融合蛋白質として発現させ、GFPの蛍光を指標として、発現量、界面活性剤による膜画分からの可溶化量を検討する。さらに、GFPの蛍光を指標としたゲル濾過クロマトグラフィーによって、可溶化後の膜蛋白質の単分散性の評価を行う。結晶化に成功したものに関しては、沈殿剤、pH、添加物、界面活性剤などを振ることで、結晶化条件の精密化を進める。一方で、膜蛋白質の多くは疎水性アミノ酸の割合が高く、大半が膜に埋もれた疎水性ヘリックスで構成されていると推測される。結晶化に際し、結晶の分子間パッキングに貢献しうるのは膜から出た親水性領域のみであり、これが高分解能結晶を得ることが困難な原因の一つとなっている。そこで、本研究では膜輸送体に対して特異的に結合する抗体断片(Fab)を作製し、Fabとの共結晶を作成することで、強固なパッキングを持った高分解能結晶を得ることを目指す。さらには、膜輸送体を脂質中に再構成し、Lipidic Cubic Phase (LCP) 法により結晶化を行う。構造解析に適した結晶が

得られた場合、放射光施設 (SPring-8, PF) の高輝度ビーム (SPring-8, BL32XU) を用いて、回折データの収集を行う。さらに膜輸送体のセレンメチオニン置換体結晶や水銀置換体結晶を作成して放射光施設にて回折データを測定し、多波長異常分散法による位相決定を行う。X線結晶構造解析によって、静的な立体構造が決定された場合は、動的な構造を明らかにするため、スーパーコンピュータを用いた分子動力学シミュレーションを行う。これにより、膜輸送に必須なアミノ酸残基が特定できるので、変異体を作成し、遺伝学解析、電気生理学解析 (パッチクランプ解析)、蛍光分光法解析を行い、輸送機能の検証を行う。以上の解析により、膜輸送体の根本的な分子メカニズムを解明する。

4. 研究成果

二価金属イオンの輸送機構

Mg²⁺輸送体 MgtE 全長構造を 2.9 Å 分解能で決定した結果 (図 1), 細胞質ドメインが Mg²⁺センサーとして働き, 12 個のマグネシウムイオン Mg²⁺ が結合すると, Mg²⁺ 透過孔を閉じ閉構造をとることで, 細胞内 Mg²⁺ 濃度を一定に保つことを示唆した (EMBO J., 2009). さらに, 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 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008). さらに, マグネシウム要求性大腸菌株を用いた相補性実験と電気生理学解析により, MgtE は Mg²⁺ 特異的なチャネルであり, 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機能的に世界に先駆けて明らかにした (EMBO J., 2009).

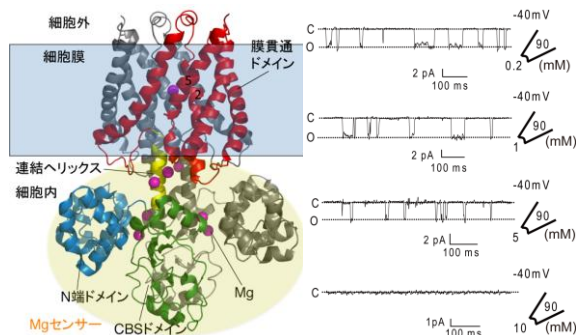


図 1. MgtE の構造と電流の細胞内 Mg²⁺ 依存性

Fe²⁺輸送体 FeoB Fe²⁺センサーとして働く細胞質ドメインの結晶構造を 1.65 Å 分解能で決定し (図 2), 本センサードメインが small GTPase ドメインと GDP dissociation inhibitor (GDI) ドメインから構成されることを初めて発見した。さらに, 遺伝学的相補性解析により, GTPase ドメインと GDI ドメインの相互作用が, GDI 活性と Fe²⁺ 取り込み活性の両方に

必須であることを明らかにした (Structure, 2009).

重金属イオン排出輸送体 CDF CDF の細胞質

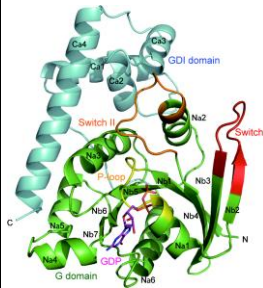


図 2. FeoB のセンサードメインの構造

センサードメインの結晶構造を 2.84 Å 分解能で決定し (図 3), 本センサードメインは 2 量体を形成し, それらの配向がダイナミックに変わることによって重金属を排出することを示唆した (Proteins, 2009).

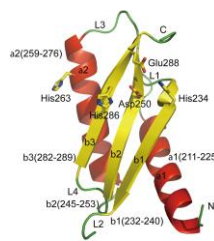


図 3. CDF のセンサードメインの構造

Mg²⁺排出輸送体 ACDP2 ACDP2 は高等真核生物から細菌まで幅広く保存されている Mg²⁺ 排出輸送体である。我々は細菌由来 ACDP の細胞質ドメインの結晶構造を 2.6 Å 分解能で決定した結果, CorC ドメインと CBS ドメイン 2 つから構成され, これらが head-to-tail 型の 2 量体を形成していた (図 4). CBS ドメインは ATP を結合し, その γ リン酸基と Glu 残基で Mg²⁺ をトラップしていた。この結果から, 細胞内 ATP 濃度が高い場合には Mg²⁺ をトラップして排出を制限する制御機構を提唱し, 電気生理学解析により本仮説の実証を目指している。

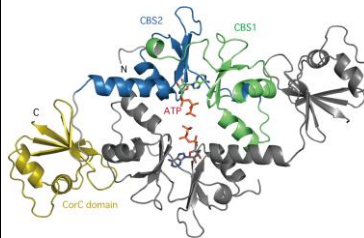


図 4. ACDP2 の構造

物理刺激による輸送制御

TRPV1 温度センサーである, ヒト由来 TRPV1 は, 細胞内 Ca²⁺ 濃度に依存してカルモデュリンが C 末端の TRP ドメインに結合し, 過剰な Ca²⁺ の取り込みが制御される。我々は, TRP ドメインペプチドとカルモデュリンの複合体の結晶構造を 2.0 Å 分解能で決定した結果, 4 量体を形成する TRPV1 の TRP ドメインの 2

つにまたがってカルモデュリンが結合し、 Ca^{2+} の取り込みが抑制されることが示唆された(図5)。また、酵母のTRPチャ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。

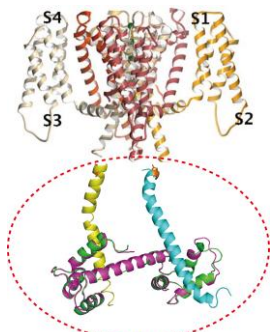


図5. TRPV1のTRPドメインとカルモデュリンの複合体構造

チャネルロドプシン 真核細胞で可視光を感受し陽イオンの取り込みを行うカチオンチャネルで、近年ニューロサイエンス分野で非常に脚光を浴びている。我々は、lipidic cubic phase (LCP)法を用いてチャネルロドプシンの結晶化に成功し、2.3Å分解能のデータ収集に成功した(図6)。さらに、近日中に位相を決定し、結晶構造を決定し、立体構造に基づいて設計した変異体の電気生理学解析により光で駆動されるカチオン輸送機構を解明する。また、近赤外光で活性化される変異体を立体構造情報に基づいて作成すれば、マウスの頭蓋骨に孔をあけて光ファイバーをさし込む必要もなく、非侵襲的に近赤外光レーザーでチャネルロドプシンを発現した特定の神経細胞群を活性化し、行動解析を行うことで、新しいニューロサイエンスの道を切り開くことができる。

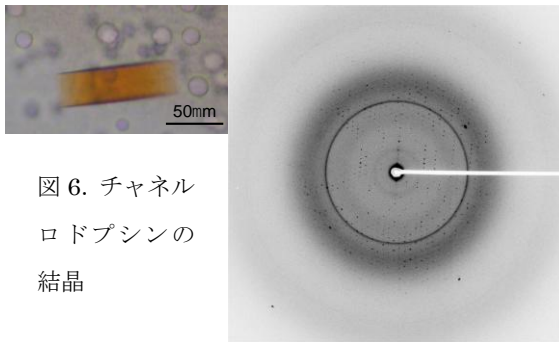


図6. チャネルロドプシンの結晶

有機物の輸送機構

ジペプチド・薬剤輸送体 POT 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、我々は、LCP法を用いて1.99Å分解能での構造決定に至った(図7)。現在、ジペプチド(Ala-Ala, Leu-Leu)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、蛍光分光法およびパッチクランプ法を用いて、POTのそれぞれ薬剤およびプロトンの輸送活性を試験管内で測定する系を確立して

おり、構造に基づいた変異体の機能解析を行う。

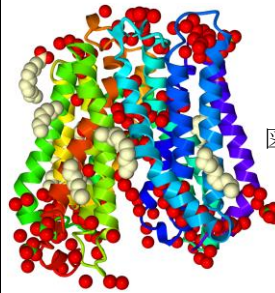


図7. POTの高分解能結晶構造

蛋白質の膜透過輸送

タンパク質の膜透過チャネルである SecYE の結晶構造を、特異的抗体との複合体の形で、3.2Å分解能で決定した(図8)。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かけて、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(図8)。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

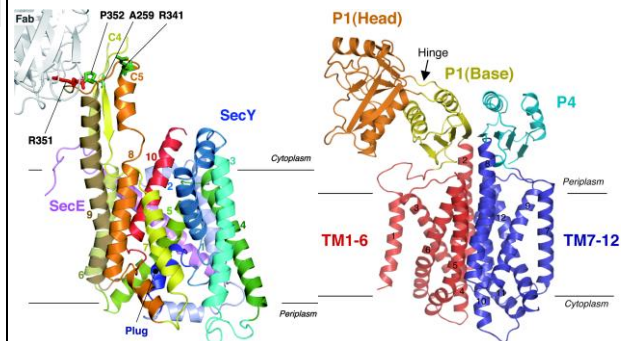


図8. SecYE(左)とSecDF(右)の結晶構造

た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. “Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export” T. Tsukazaki, H. Mori, Y. Echizen, R. Ishitani, S. Fukai, T. Tanaka, A. Perederina, D. G. Vassylyev, T. Kohno, A. D. Maturana, K. Ito and O. Nureki *Nature*, **474**, 235-238 (2011). 査読有
 2. “Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators” H. Nishimasu, S. Okudaira, K. Hama, E. Mihara, N. Dohmae, A. Inoue, R. Ishitani, J. Takagi, J. Aoki and O. Nureki *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 205-212 (2011). 査読有
 3. “Molecular mechanisms underlying the early stage of protein translocation through the Sec translocon” T. Mori, R. Ishitani, T. Tsukazaki, O. Nureki and Y. Sugita *Biochemistry* **49**, 945-950 (2010). 査読有
 4. “Mg²⁺-dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg²⁺ homeostasis” M. Hattori, N. Iwase, N. Furuya, Y. Tanaka, T. Tsukazaki, R. Ishitani, M. E. Maguire, K. Ito, A. Maturana and O. Nureki *EMBO J.* **28**, 3602-3612 (2009). 査読有
 5. “Structural basis for translational fidelity ensured by tRNA lysidine synthetase” K. Nakanishi, L. Bonnefond, S. Kimura, T. Suzuki, R. Ishitani and O. Nureki. *Nature* **461**, 1144-1148 (2009). 査読有
 6. “Structural basis of novel interactions between the small-GTPase and GDI-like domains in prokaryotic FeoB iron transporter.” M. Hattori, Y. Jin, H. Nishimasu, Y. Tanaka, M. Mochizuki, T. Uchiyumi, R. Ishitani, K. Ito and O. Nureki. *Structure* **17**, 1345-1355 (2009). 査読有
 7. “Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the truncated cytosolic domain of the iron transporter FeoB.” Y. Jin, M. Hattori, H. Nishimasu, R. Ishitani and O. Nureki *Acta. Crystallogr. Sect. F* **65**, 784-787 (2009). 査読有
 8. “Tuberous Sclerosis Tumor Suppressor Complex-like Complexes Act as GTPase-activating Proteins for Ral GTPases.” R. Shirakawa, S. Fukai, M. Kawato, T. Higashi, H. Kondo, T. Ikeda, E. Nakayama, K. Okawa, O. Nureki, T. Kimura, T. Kita and H. Horiuchi. *J. Biol. Chem.* **284**, 21580-21588 (2009). 査読有
 9. “Crystal structure of the cytosolic domain of the cation diffusion facilitator family protein.” T. Higuchi, M. Hattori, Y. Tanaka, R. Ishitani and O. Nureki. *Proteins* **76**, 768-771 (2009). 査読有
 10. “Pyrrolysyl-tRNA synthetase-tRNA(Pyl) structure reveals the molecular basis of orthogonality” K. Nozawa, P. O'Donoghue, S. Gundllapalli, Y. Araiso, R. Ishitani, T. Umehara, D. Söll and O. Nureki *Nature* **457**, 1163-1167 (2009). 査読有
 11. “Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures” T. Tsukazaki, H. Mori, S. Fukai, R. Ishitani, T. Mori, N. Dohmae, A. Perederina, Y. Sugita, D. G. Vassylyev, K. Ito and O. Nureki *Nature* **455**, 988-991 (2008). 査読有
 12. “Mg²⁺-sensing mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE probed by molecular dynamics study” R. Ishitani, Y. Sugita, N. Dohmae, N. Furuya, M. Hattori, and O. Nureki *Proc. Natl. Acad. USA.* **105**, 15393-15398 (2008). 査読有
 13. “Regulation of platelet dense granule secretion by the Ral GTPase-Exocyst pathway” M. Kawato, R. Shirakawa, H. Kondo, T. Higashi, T. Ikeda, K. Okawa, S. Fukai, O. Nureki, T. Kita, H. Horiuchi *J. Biol. Chem.*, **283**, 166-174 (2008). 査読有
- [学会発表] (計 6 件) (海外招待講演)
- 2011 The 2011 International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases “Archaeal elongation factor acts an omnipotent carrier GTPase in translational elongation, termination and mRNA surveillance” O.Nureki 9/25-30 (Snowbird, Utah, USA)
 - 2010 The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association “Structural analysis of bacterial Sec translocon machinery” O.Nureki 10/31-11/3 (Busan, Korea)
 - 2010 The 2nd Annual Meeting of Structural Biology of Membrane Proteins “Structural basis for the gating mechanism of cation and polypeptide channels” O.Nureki. 6/8-11(Basel, Switzerland)

- 2009 11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins “Genetic code expansion by non-canonical tRNA synthetases” O. Nureki 8/6 (Vienna, Austria)
- 2009 VIII European Symposium of The Protein Society “Multiple conformational states of Sec machinery components implicated from bacterial SecYE crystal structure” O. Nureki 6/16 (Zurich, Switzerland)
- 2008 The Joint 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science “Gating control; mechanism of magnesium transporter MgtE” O. Nureki 6/22-26 (Cairns, Australia)

〔図書〕 (計 6 件)

- (1) 「タンパク質を膜透過させる分子装置」

塚崎智也, 濡木理

化学工業, 62 471-477 (2011).

- (2) 「ピロリジン翻訳直行性のメカニズム」

野澤佳世, 石谷隆一郎, 濡木理

生化学 82 巻 617-623 (2010)

- (3) 「ピロリジル tRNA 合成における翻訳の直交性の分子構造基盤」

濡木理

蛋白質核酸酵素 54 巻 1660-1669 (2009)

- (4) 「CCA 付加反応のダイナミクス」

濡木理

生化学 80 巻 429-434 (2008)

- (5) 「マグネシウムトランスポーターによる細胞内マグネシウムバランス調節機構」

濡木理, 服部素之, 石谷隆一郎

生化学 80 巻 933-939 (2008)

- (6) 「MgtE トランスポーターによる Mg²⁺ のホメオスタシス機構」

服部素之, 濡木理

蛋白質核酸酵素 53 巻 242-248 (2008)

ホームページ等

<http://www.nurekilab.net/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

マツラナ アンドレス (MATURANA ANDRES)

名古屋大学・農学部・准教授

研究者番号: 10452004

伊藤 耕一 (ITO KOICHI)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号: 10262073

(3) 連携研究者

()

研究者番号: