

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06972

研究課題名(和文) 金属耐性に関わる輸送体膜タンパク質の構造基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the structural basis of transporter proteins involved in metal tolerance

研究代表者

田中 良樹 (TANAKA, Yoshiki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：10632333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の金属耐性に関わる輸送体とされる多剤排出輸送体MATEに関して、結晶構造解析を行い、*Camelina sativa* (アマナズナ)由来のMATE構造を決定し報告した。MATEファミリーについては、原核生物では複数の生物種で構造がわかっていたが、真核生物では未だ報告数は少ない。今回明らかにした構造では、酸性のアミノ酸側鎖が内側ポケット部分に集中している部分があり、比較的疎水的な化合物を排出する原核MATEとアルミニウムのような陽イオンを排出するとされる植物MATEでは基質結合領域の様相が異なることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We conducted a crystal structure analysis on the multidrug efflux transporter MATE, which is a transporter related to plant metal tolerance, and reported its structure. In the structure revealed, it became clear that some acidic amino acid side chains are concentrated in the inner pocket part. It was found that the aspect of the substrate binding region is different between the prokaryotic MATE which discharges hydrophobic substrates and the plant MATE which is related to emit cation such as aluminum.

研究分野：X線結晶構造解析

キーワード：タンパク質構造 膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

生命活動を維持するためには細胞内の各種代謝産物の濃度を一定の範囲に維持する必要がある。この機能は生体膜に埋め込まれた輸送体膜タンパク質によって担われている。輸送体における「選択性」と「輸送制御機構」などの輸送体のメカニズム理解のためには、原子分解能レベルの立体構造解析必須である。

輸送体膜タンパク質の構造面からの輸送の仕組みの理解は進展しつつあるが、未だ解かれている構造情報は原核生物由来のものが大半であり、高等生物における解析例は少ない状況にある。これは一般に高等真核生物のタンパク質を大量に発現させることの困難さや、サンプルの安定性が原核生物に比べて低いことなどが理由である。ヒトの疾患の原因究明や作物の品種改良などにも関わる膜タンパク質の機能解明は重要性が高いと言える。そのため、分子レベルでの機能解明の壁となっている問題の解決のために、解析例の増加が求められている。

## 2. 研究の目的

生体内で金属原子は酵素の活性化のための補因子などに使われることが多い。そのため、金属イオンは生命活動の為に必須となる。一方で、必要以上の濃度では、本来の結合部位と異なる結合や、補因子と入れ替わるなどして、酵素の機能を損なわせ細胞に障害を与える。そのため細胞質のイオン濃度は厳密に制御されている。イオン濃度を下げる方法として、細胞質外・液胞内部への輸送がある。細胞や細胞の各区画は、疎水的な脂質膜によって分けられているため、膜を越えて水溶性の物質を輸送するためには適切な輸送経路が必要である。また、細胞にとって不要あるいは有害な化合物を無害化する方法を排出輸送体膜タンパク質が担っている。この場合、基質の選択性と能動的な排出を行なう機構を知ることが重要であるため、輸送に伴う構造変化の解明も目的である。

このような細胞の防御機構に関わる膜タンパク質輸送体の中でも特に植物由来の輸送体に着目し、構造面からの機能の理解を第一の目的とする。そして、タンパク質の機能を理解した上で、植物体の持つ環境への耐性の仕組みの解明、および耐性向上を目指す。

## 3. 研究の方法

構造解析に適した発現系を構築するため、様々な生物種由来の目的遺伝子をデータベースから選別し、合成する。タンパク質発現には高等真核生物由来のタンパク質を大量に発現させるため、真核生物発現系で比較的扱いが安価なメタノール産化酵母を利用する。

GFP タグを融合させて蛍光ゲルろ過を行な

う手法 (FSEC 法) や His タグに結合する抗体を利用したウエスタンブロッティングによって、少量での発現状況を確認した上で次の工程へ進める。効率を上げるため、少量培養の時点で良好な生物種遺伝子や発現条件を検討して大量培養へと進める。

安定に膜タンパク質を水溶液中で取り扱う上での重要な要素である界面活性剤や塩濃度、pH の検討など、精製条件の検討を繰り返し、大量培養・精製を行い、最終的に 90% 以上の高純度のサンプルを調製する。精製できたところで自動分注機を使用した広範囲の結晶化スクリーニングを行なう。結晶化手法には蒸気拡散法や脂質中での結晶化法などを試す。

結晶が得られた場合、放射光施設において回折実験を行なって構造を決定。モデルを構築して、構造に基づいて変異を導入し、変異体実験を通して重要な残基の特定などの機能解析に努める。一方、結晶が上手く得られなかった場合は、熱安定性評価を利用して、精製条件やコンストラクションの修正を行なう。

機能解析については、精製タンパク質を利用したりポソーム再構成系、過剰発現させた細胞での基質の蓄積状況を追跡する実験などを行なう。結晶構造の条件検討によって、複数状態の構造を決定することを目標として、輸送における構造変化を可視化していく。輸送制御や特異性を認識する部位が輸送体に存在すると考えられており、基質の有無や種類を変更し構造解析を行うことで構造機能相関の解明を目標とする。

## 4. 研究成果

植物由来の多剤排出輸送体ファミリーと金属イオン輸送体ファミリーについて精製系の確立および結晶構造解析を試みた。ウエスタンブロッティングや FSEC 法を用いた少量培養での発現確認および発現条件の検討を行なった後、結晶化のためのサンプル精製を行なった。次に、精製条件を検討し、結晶化に必要なサンプルを得られるものを探索した。複数の植物種からクローニングした多剤排出輸送体 MATE や亜鉛輸送体ファミリーのタンパク質について結晶化を行なえる質・量を得ている。

### (1)

本研究計画中で一つの植物由来多剤排出輸送体 MATE について結晶構造を決定し、報告している (*Camelina sativa* 由来の MATE 構造、Yoshiki Tanaka, Shigehiro Iwaki, Tomoya Tsukazaki, 2018 Structure)。輸送体単体の構造決定ではあるが、高等生物由来のものとしては初めてであった。MATE 全体構造は原核生物由来のもので既知の通り、6 回膜貫通ヘリックスが繰り返した 12 回の膜貫通ヘリックスから構成されている (図 1)。

今回決定した構造も概ねこれまで通りの細胞外側に開いた構造をとっており、内部には基質を認識し、輸送するための空洞が存在する。この MATE 内部の空洞はこれまで知られていた原核生物の疎水的環境に比べて、酸性残基の露出が多くなっており、親水的な状態と考えられる (図 2)。これは基質と考えられているアルミニウムイオンなどをプラスに荷電した基質を認識可能な状態である。基質内部の性質や大きさなどを既知構造や他の植物由来 MATE のアミノ酸配列と比較して報告した。植物由来の構造を決定出来たことで、これまで原核生物由来の構造情報からの予測構造よりも精度を高く、基質結合領域に関する情報を得ることが可能になった。今後は、引き続き輸送基質との複合体構造の解明やニコチンなど植物特有な基質選択性を有する種類の MATE ファミリータンパク質の構造決定を目指して研究を深化させ、MATE ファミリーのもつ役割についての研究を進展させたい。

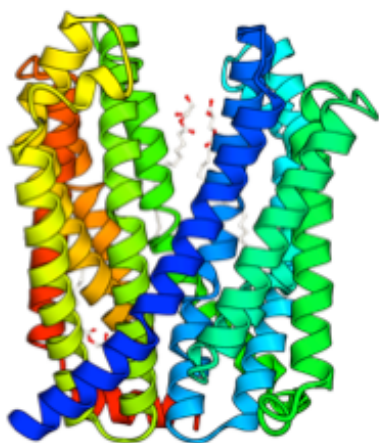


図 1 *Camelina sativa* 由来 MATE 立体構造モデル

12 回の膜貫通ヘリックスで構成される。膜貫通領域に含まれる疎水的な部位に、結晶化の際に用いたモノオレインが結合していることが電子密度から推測される。

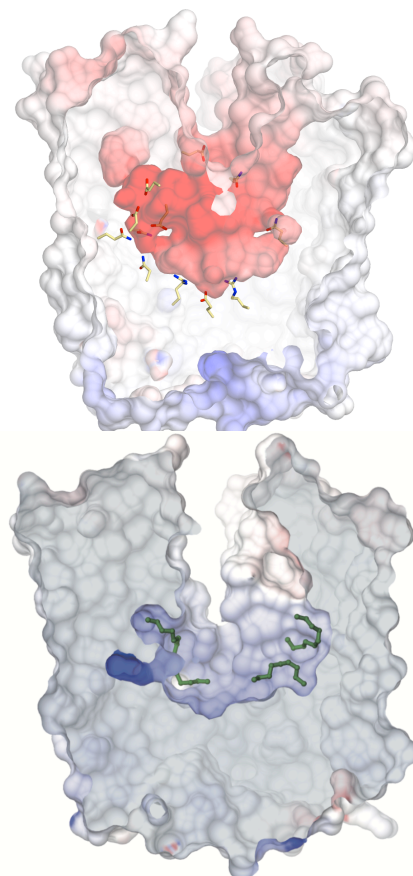


図 2 基質結合ポケット内部の電荷表示  
上：*Camelina sativa* 由来 MATE、下：*Pyrococcus furiosus* 由来 MATE (Tanaka et al., 2013)。

*Camelina sativa* 由来 MATE では酸性残基が多数露出しており、負に帯電した部分が赤く表示されている。一方、*Pyrococcus furiosus* 由来 MATE は疎水的な化合物が基質として知られており、内部空間も疎水性が高く、結晶化に用いた脂質が空洞の内部深くに結合した状態で結晶構造が決定されている。

## (2)

解析目標の一つである亜鉛輸送体ファミリーに関しては、30 種ほどの生物種から遺伝子を選択してクローニングを行い発現条件の検討を行い、結晶化を行なえる質・量となる複数の発現系を有している。構造解析には予備的な結晶が得られるまで進行しており、結晶を改善させるために特異的結合抗体との複合体を調製して現在も結晶条件の検討を進行中である (図 3)。また、ディスオーダー部位を取り除きや、表面残基エントロピー減少法による変異導入などを行い、結晶の再現性の向上も試みている。

十分量の精製系の確立が達成出来たため、構造解析と共に、機能解析の系構築を進めている。解析対象の輸送体ファミリーは、亜鉛輸送体とされており、金属耐性に関わりがあることまでは知られているものの、基質の選択性について完全に解明されていない。こ

れを明らかにすることも目標との一つであり、輸送基質の選択性を明確にすることで結晶化、および構造解析に置いても有益な情報となると期待される。今後も引き続き機能解明のための研究を行う計画である。

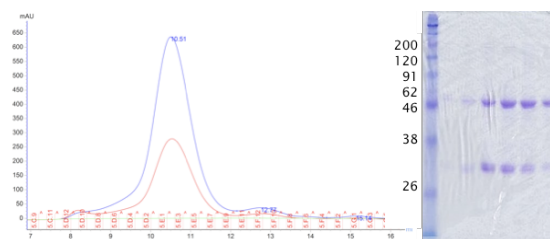


図 3 抗体との複合体のゲルろ過クロマトグラフィーの結果  
左：単一ピークのクロマトグラフ、右：SDS-PAGE 結果

#### 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 1 件)

① Tanaka Y, Iwaki S, and Tsukazaki T. "Crystal Structure of a Plant Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family Protein" *Structure* 25. 9: 1455-1460 (2017). DOI: 10.1016/j.str.2017.07.009 (査読あり、オープンアクセス)

[学会発表] (計 2 件)

① 岩木 薫大, 田中 良樹, 塚崎 智也. "MATE トランスポーターの結晶構造解析", 第 59 回日本植物生理学会 (2018)

② Iwaki S "Rapid estimation of monodispersity and stability of a drug-transporter for its structural analyses", The Tri-lateral NAIST-TLL-CU Joint Symposium 2016: Animal-Plant-Microbe Ecological Networks (2016).

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中良樹 ( TANAKA, Yoshiki )  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・助教  
研究者番号：10632333

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

塚崎智也 ( TSUKAZAKI Tomoya )  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・准教授  
研究者番号： 80436716

(4) 研究協力者

岩木薫大 ( IWAKI Shigehiro )