

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14911

研究課題名(和文)新奇セカンドメッセンジャーによる輸送体のアロステリック制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Study of allosteric regulation of solute transporter by a second-messenger and its structural analysis.

研究代表者

阿部 敬悦 (ABE, Keietsu)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：50312624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のAspartate:Alanine交換輸送体AspTは産業上有用な排出輸送体である。本研究では、AspTの構造解析を目指してAspTの高発現・高純度精製条件を確立した。AspT野生型および耐熱性変異体の各種リガンド共存下での熱安定条件を探索し、AspTの結晶化を試みた。結晶が得られてX線構造解析に着手した。現在、4 Åまで分解能が上がってきている。AspTは細菌制御物質cyclic-di-AMP(c-diAMP)と相互作用することが推定されたが、輸送活性制御への大きな効果は無かった。

研究成果の概要(英文)：Aspartate:alanine antiporter AspT and its orthologues are industrially important solute exporters in bacteria. We established expression and purification systems for AspT with high yield and purity. We screened thermo-stable conditions for AspT in the presence of several ligands including substrates and their analogs. We performed crystallization of AspT and obtained some crystals at several optimized conditions. We collected X-ray diffraction data of AspT with the resolution of 4-6 Å, and are trying to improve molecular packing of crystals of AspT for better resolution.

研究分野：応用微生物学

キーワード：輸送体 物質生産 構造解析

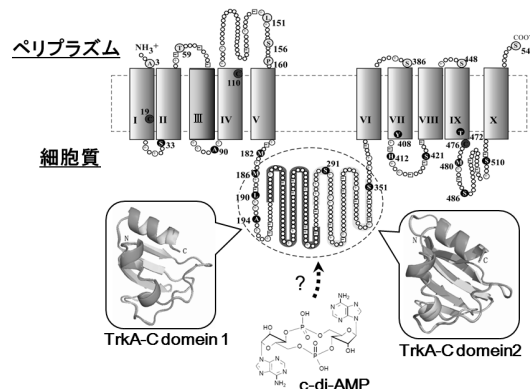
科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

Protein Data Bank に登録された立体構造は 10 万個を超えるが、その中で膜蛋白質(輸送体を含む)は 1000 個に満たない。水溶性蛋白質に比べて膜蛋白質は不安定で、発現・精製・結晶化が困難である。細胞膜に局在する膜輸送体(トランスポーター)は物質の取り込みと排出に機能し、生物の恒常性維持ならびに微生物物質生産に重要な役割を果たす。発酵生産には輸送体が重要であるが、輸送体の生化学に基づく応用は未達である。

細菌の Aspartate (Asp) : Alanine (Ala) Exchanger ファミリー輸送体(AAEx 輸送体)は多くの産業微生物に見出され、アスパラギン酸やコハク酸等の有用化合物を輸送する。我々は AAEx 輸送体を発見し、精製輸送体の輸送能を生化学的に証明し、二次構造解析を進めた(文献 1)。その結果、AAEx 輸送体の二つの膜貫通ドメイン間に機能未知の TrkA_C ドメインを発見した(図 1)。AAEx 輸送体 AspT は Asp:Ala 交換輸送体で、Asp の細胞内脱炭酸と共役し ATP を生成する(文献 2)。AAEx ファミリー輸送体は産業上有用な排出輸送体を多数含み、利用価値の高い改変体作製の好材料である。

近年、核酸類似化合物 cyclic-di-AMP (c-diAMP) が、新規のセカンドメッセンジャーとして報告され、その結合保存領域の報告がなされた(文献 3,4)。一方で、我々は、AspT の細胞質側中央ループに c-diAMP 結合推定領



域が保存されていることを見出した(図 1)。
図 1 AAEx ファミリー輸送体の二次構造と c-diAMP 結合領域(引用文献 1, 2)

2. 研究の目的

本研究では、c-diAMP が AAEx 輸送体の新規のアロステリックなリガンドであるか否かを輸送解析により検証する。さらに AspT をモデルに、立体構造解析に挑戦する。本研究は、AAEx 輸送体の機能強化や基質選択性の改変による産業応用へ向けた基礎的知見を得るのみならず、輸送体の生化学・構造生物学に寄与する。

3. 研究の方法

(1) c-diAMP による AAEx 輸送体の基質輸送制御の解析 ~ AAEx ファミリー輸送体は、2 つの

膜貫通ドメインの間に TrkA_C ドメインと呼ばれる特徴的なドメイン構造を有している(図 1)。このドメインは、他の微生物の K⁺ チャンネルにおいて、新奇核酸セカンドメッセンジャー c-diAMP が結合し物質輸送制御を行うと推定されている(文献 3,4)。予備的検討により、AspT の親水性ループ領域が c-diAMP に結合することを確認した。そこで、本研究では c-diAMP の AAEx 輸送体の輸送活性制御因子としての可能性を検討するために、AAEx 輸送体の AspT を人工膜小胞に再構成し、c-diAMP による基質輸送活性への影響を評価した。

(2) AAEx 輸送体の結晶化と立体構造解析 ~

一般的に膜蛋白質の結晶化は機能性構造の安定性と相関している。また、輸送体の構造は細胞外側に開いている状態(outward-open)、中間体状態(occluded)、細胞内側に開いている状態(inward-open)の三状態が遷移状態で揺らいだ状態にあり、一状態に固定することが結晶化の鍵となる。そこで、基質化合物・阻害剤の添加、pH やカチオン種の検討を行い、輸送体の構造を安定化する条件を見だし、その条件で結晶化条件の探索を行った。

(2-1) AspT の高純度精製方法の確立: AspT の結晶化条件探索には、高純度の AspT が必要となることから、従来の大腸菌での発現精製法を見直し、大腸菌株の選定、培養条件、精製条件を検討した。

(2-2) 高純度精製 AspT を用いた熱安定化条件の探索: 界面活性剤 DDM で可溶性精製した AspT を用いて、リガンド(基質化合物・阻害剤)の添加、緩衝液種とその pH、カチオン種、界面活性剤種を変えて、AspT を加熱した後、超遠心で凝集物を除いて可溶性で残存する AspT をゲルろ過クロマトに供して、残存する安定 AspT を蛍光で検出した(fluorescence-detection size-exclusion chromatography-based thermostability assay - FSEC-TS 法)。

(2-3) AspT の結晶化条件の探索:

輸送体を含む膜蛋白質の結晶化には、界面活性剤や沈殿剤など様々な条件の検討が必要になる。本研究では、まず初めに、膜蛋白質結晶化専用のスクリーニングキット MemGold1/2(Molecular Dimensions 社)を用い、蒸気拡散法にて初期スクリーニングを行った。キット中の 192 条件のうち、結晶創成の確認できた条件について、結晶化条件の最適化を行い、X 線回折実験を行った。

4. 研究成果

(1) c-diAMP による AAEx 輸送体の基質輸送制御の解析 ~ 等温滴定法を用いて c-diAMP を含む各種リガンドの結合定数解析を試みたが、AspT の熱安定性の低さと各リガンドの AspT

への低親和性から結合定数の決定にいたらなかった。また、AspTを人工膜小胞に再構成してc-diAMPを添加したが輸送活性に顕著な変化は見られなかった。そこで、c-diAMPを用いた解析は中断し、(2)の結晶化へ注力することとした。

(2) AEx 輸送体の結晶化と立体構造解析

(2-1) AspTの高純度精製方法の確立:

大腸菌 XL3 株に加え、BL21 (DE3) 株由来の C43 株、C43_pLysS 株を宿主として、それぞれの菌株を pTrc99A 及び pET25b に *aspT* または *aspDaspT* の配列を導入したプラスミドで形質転換し、IPTGにより AspT の発現を誘導した。培養後の菌体について、抗 AspT 抗体を用いた Western blotting により菌体あたりの AspT の発現量を比較した。その結果、pTrc*aspD/T* を導入した C43 株において AspT の発現量が最も高かった。次に、C43 株を用いて、培養条件の検討を行い AspT の発現に適した培養条件を決定した。最後に、TALON Metal Affinity Resin を用いた精製方法を再検討し、従来法に比べ培養液 1 L あたり得られる精製タンパク質を約 10 倍に増加させ、1.4 mg/L 培養液の精製 AspT を得ることに成功した (図 2)。高生産法により得られた精製 AspT は、従来法で得られた精製 AspT と同等の輸送活性と分子サイズを持つことを確認した (図 3)。

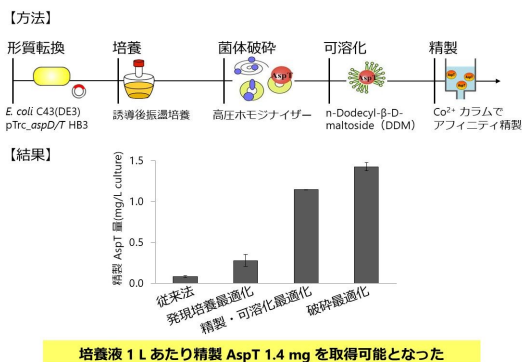


図 2 AspT の高発現・高純度精製法の確立

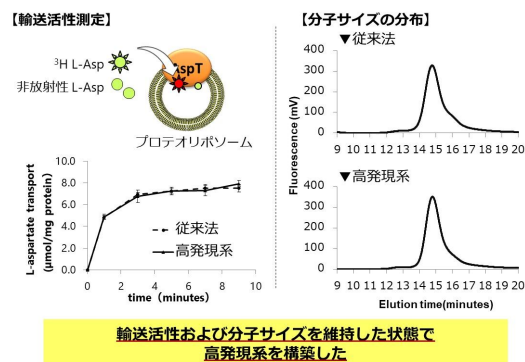


図 3. 高純度 AspT と従来法精製 AspT の輸送活性と分子量サイズ

(2-2) 高純度精製 AspT を用いた熱安定化条件の探索:

(2-1)の高生産法により得られた精製 AspT、の緩衝液をスピングル過カラムを用いて

各種リガンドや、カチオン、buffer 組成を変えて置換し、任意の温度に加熱、精密ゲルろ過カラム (Superdex200 increase 10/300) に供し、AspT のトリプトファン蛍光を検出する FSEC-TS 法により、可溶化 AspT への安定性に関する要因の探索を行った (図 4)。その結果、陽イオン種・pH・グリセロール濃度が AspT の構造安定性に寄与することが分かり、基質非存在下での熱安定性の向上に成功した。AspT は低親和性基質である L-Ala 500 mM 存在下において、33、10 分間の加熱条件下で L-Ala による熱安定性の向上が顕著に観察できた。同加熱条件下で基質濃度による熱安定性の変化を観察したところ、L-Ala 存在下では濃度依存的に熱安定性が向上した (図 5)。

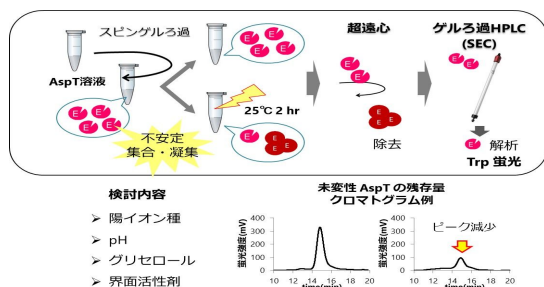


図 4. AspT の根知安定性評価法 ~ FSEC-TS 法

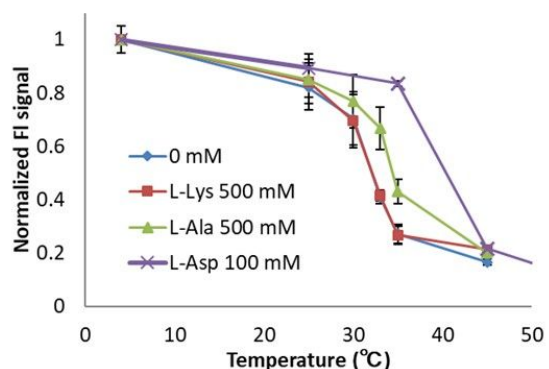
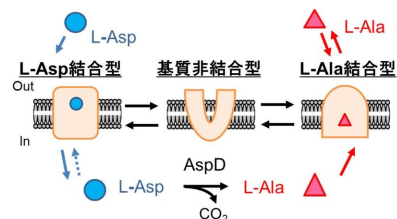


図 5. AspT の基質存在下の加熱変性



トランスポーターはコンフォメーションを変化させながら基質を輸送する

【AspTの基質輸送】

- L-Asp、L-Alaで異なる結合部位を有する (Sasahara 2011)
- AspTへの結合親和性はL-AspのほうがL-Alaよりも大きい
- L-Asp、L-AlaのK_m値はそれぞれ0.35 mM, 26 mM (Sasahara 2011)
- 基質非結合型、L-Asp結合型、L-Ala結合型の3つのコンフォメーションをとる (S. Suzuki et al., under revision)

(FSEC-TS)

図 6. AspT の基質結合とコンフォメーション変化

また、L-Ala 以外にもアナログ基質である L-Ser、D-Ala において熱安定性の向上がみられた。L-Asp、D-Asp では 100 mM の低濃度、加熱温度 35 で熱安定性が向上したのに対し、L-Ala はより高濃度 500 mM、かつ低い加熱温度条件 33 で熱安定性の向上が観察さ

れた。これは AspT への結合親和性が L-Asp よりも L-Alaの方が低いこと、各基質は異なる結合型コンフォメーションをとるというこれまでの推察と一致する(図 6)。また、それぞれの結合型コンフォメーションは熱安定性が異なり、L-Asp 結合型よりも L-Ala 結合型の方が不安定な構造をとることが示唆された。

(2-3) AspT の結晶化条件の探索 :

得られている高純度精製野生型 AspT および、FSEC-TS 法で見出された野生株よりも 5 耐熱性が上昇した変異体 AspT-G439W(図 7)を用いて結晶化条件を探索したところ、いくつかの条件で結晶が得られた(図 8)。

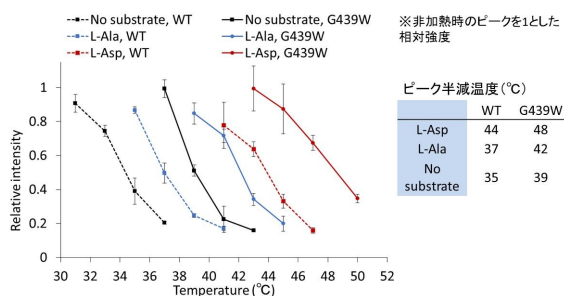


図 7. AspT-G439W 変異体の耐熱性

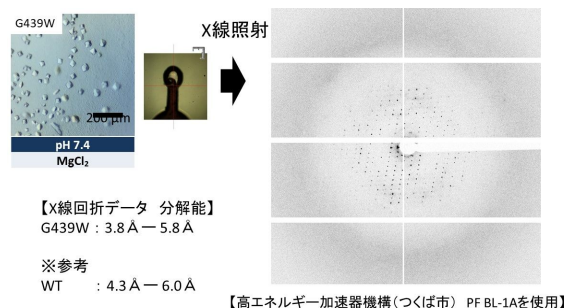


図 8. AspT-G439W の結晶化と X 線回折データ

X 線回折データを取得したところ、3.8-5.6 の分解能のデータが得られ、今後、結晶のパッキングを向上させる条件を探索する予定である。

< 引用文献 >

- Nanatani K. et al., Topology of AspT, the aspartate/alanine transporter of *Tetragenococcus halophilus*, determined by site-directed fluorescence labeling, *J. Bacteriol.* 189:7089-7097 (2007)
- Nanatani K. et al., Structure and functional importance of transmembrane domain 3 (TM3) in the aspartate:alanine antiporter AspT: Topology and function of the residues of TM3 and oligomerization of AspT. *J. Bacteriol.* 191:212 (2009)
- White G. et al., Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Mol Cell* 30:167 -178

(2008)

Corrigan et al., Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. *PNAS* 110:9084-9069 (2013)

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 4 件)

Fukui K., Nanatani K., Hara Y., Tokura M., K. Abe, Identification of EayjJPB encoding a dicarboxylate transporter important for succinate production under aerobic and anaerobic conditions in *Enterobacter aerogenes*. *J. Biosci. Bioeng.* (2018) In Press 査読 有 doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.007

Fukui K., Nanatani K., Hara Y., Yamakami S., Yahagi D., Chinen A., Tokura M, and K. Abe, *Escherichia coli yjJPB* genes encode a succinate transporter important for succinate production. *Biosci. Biotech. Biochem.* 81:1837-1844 (2017) 査読 有 doi: 10.1080/09168451.2017.1345612.

Suzuki S., Nanatani K., and K. Abe*, R76 in transmembrane domain 3 of the aspartate : alanine transporter AspT is involved in substrate transport. *Biosci. Biotech. Biochem.* 80(4):744-747 (2016) 査読 有 doi: 10.1080/09168451.2015.1123609.

阿部敬悦, 七谷 圭, 醤油醸造微生物の温故知新 - 乳酸菌を例に -, 醤油の研究, と技術 41:109-116 (2015)

[学会発表](計 11 件)

増田歩、七谷 圭、勝部 哲、米山 裕、阿部敬悦, 大腸菌Ala排出機能欠損株を用いた乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate : Alanine 交換輸送体 AspT の輸送評価系の構築, 生物工学会北日本支部シンポジウム 2017 福島 2017

千葉文香、金ななせ、七谷 圭、阿部敬悦, Aspartate:Alanine 交換輸送体 AspT の結晶化へ向けた熱安定変異体探索, 生物工学会北日本支部シンポジウム 2017 福島 2017

宮本あかり、國井宏太、黒野健一郎、七谷 圭、阿部敬悦, 乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate : Alanine 交換輸送体 AspT の多量体構造の解明, 日本乳酸菌学会 2017 年度大会, 2017

鈴木聡美、木村拓哉、七谷 圭、阿部敬悦, 乳酸菌由来アミノ酸トランスポー

ターの基質結合によるコンフォメーション変化, 第 12 回トランスポーター研究会年会 2017

金ななせ, 千葉文香, 小笠原諭, 七谷圭, 阿部敬悦, 乳酸菌由来アミノ酸トランスポーターの基質結合による熱安定化, 第 12 回トランスポーター研究会年会 2017

宮本あかり, 國井宏太, 光岡薫, 小笠原諭, 七谷圭, 阿部敬悦, Aspartate: Alanine 交換輸送体 AspT の立体構造解析に向けた高発現系・精製系の構築, 第 12 回トランスポーター研究会年会 2017

宮本あかり, 鈴木聡美, 小笠原諭, 七谷圭, 阿部敬悦, 乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体 AspT の高生産系の構築およびその解析, 生体エネルギー研究会第 42 回討論会 2016

千葉文香, 金ななせ, 鈴木聡美, 七谷圭, 阿部敬悦, 低親和性基質結合による乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体 (AspT) の熱安定性の向上, 生体エネルギー研究会第 42 回討論会 2016

阿部敬悦, 七谷圭, 発酵生産とトランスポーター: エネルギー生成に共役するトランスポーターを例に, 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016

金ななせ, 鈴木聡美, 七谷圭, 阿部敬悦, 基質結合による構造の安定化を用いた乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 AspT の基質特異性解析, 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016
鈴木聡美, 七谷圭, 阿部敬悦, L-Aspartate: L-Alanine 交換輸送体 AspT の基質輸送における GxxxG モチーフと R76 の役割, 第 76 回日本生物工学会大会 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類:
番号:
出願年:
取得年:
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

阿部敬悦 (ABE, Keietsu)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 50312624

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

七谷圭 (NANATANI, Kei)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 00547333

小笠原諭 (OGASAWARA, Satoshi)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 30546685

(4) 研究協力者

()