

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04757

研究課題名(和文)イオン駆動力供給体の電子線とX線による作動機構の解明

研究課題名(英文)Structural study of ion-driven energizers by cryo-EM and X-ray crystallography

研究代表者

米倉 功治 (Koji, Yonekura)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：50346144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：高等動物から原核生物に至るまで、生体膜内外のプロトン濃度勾配(プロトン駆動力)は、生命活動を担う重要なエネルギー源になる。本研究では、プロトン駆動力を鉄や栄養素の輸送に供給し、これまで構造情報の不足していた膜蛋白質複合体ExbBDの構造解析を行った。X線結晶構造解析からExbBの構造を2.8 Å分解能で決定し、さらに単粒子解析からExbB/ExbD複合体の構造を明らかにした。その結果、pHの変化に伴いサブユニットの数が変化し、これがチャンネル活性に大きな影響を及ぼすことを明らかになった。これは膜タンパク質がダイナミックに構造を変化させることで活性化する新しい作動機構と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、生命の根源的なエネルギーであるプロトン駆動力を利用するExbBDの構造をX線結晶構造解析と単粒子クライオ電子顕微鏡法により決定した。また、これまで知られていなかった膜蛋白質のダイナミックな形態変化という新しい現象の一端が明らかになった。同様の機構は、他の膜蛋白質でも機能の制御などに利用されている可能性も考えられる。このような研究を通じて、実際に薬剤が機能していく段階や過程を可視化することで、新しい創薬技術の創出へと発展することも期待できる。今後、導入した新型クライオ電子顕微鏡を用いて、より高い分解能での単粒子解析と高精度な電子線三次元結晶構造解析を進め、研究を加速したい。

研究成果の概要(英文)：Gram-negative bacteria import essential nutrients such as iron and vitamin B12 through outer membrane receptors. This process utilizes proton motive force harvested by the Ton system made up of three inner membrane proteins, ExbB, ExbD and TonB. ExbB and ExbD form the proton channel that energizes uptake through TonB. We present structures of hexameric complexes of ExbB and ExbD revealed by X-ray crystallography and single particle cryo-EM. Image analysis shows that hexameric and pentameric complexes coexist, with the proportion of hexamer increasing with pH. Channel current measurement and 2D crystallography support the existence and transition of the two oligomeric states in membranes. The hexameric complex consists of six ExbB subunits and three ExbD transmembrane helices enclosed within the central channel. We propose models for activation / inactivation associated with hexamer and pentamer formation and utilization of proton motive force.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 X線結晶構造解析 単粒子解析 電子線三次元結晶構造解析 イオンチャンネル プロトン駆動力 構造多型 ダイナミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高等動物から原核生物に至るまで、生体膜内外のプロトン濃度勾配(プロトン駆動力)は、生命活動を担う重要なエネルギー源になる。このエネルギーを使って、ATP合成、栄養素や合成した蛋白質の輸送、薬剤の取り込みや排出、運動の駆動等が実現される。細菌では、同じファミリーに属する膜蛋白質がいろいろな生命活動にプロトン駆動力を供給しているが、その構造情報は不足していた。

2. 研究の目的

生命活動にプロトン駆動力を供給する膜蛋白質の内、鉄輸送に関わる ExbBD 等の電子線及び X 線結晶構造解析と電子線単粒子解析を進めた。これにより、いろいろなイオン環境下における構造やコンフォメーションの変化を高い空間分解能で捉える他、イオン通路等の機能部位の荷電状態の精密解析に繋げる基盤を造ることを目的とした。以上から、この膜蛋白質ファミリーに共通するイオン駆動力の利用、機能発現に繋がる分子機構の詳細の解明を目指した。

3. 研究の方法

大量に発現、精製した蛋白質溶液を薄い氷に凍結し、単粒子解析を行うと共に、試料を結晶化し X 線結晶構造解析を進めた。X 線結晶構造解析から ExbB の高分解能で構造を決定し、さらに、単粒子解析からは空間分解能はやや劣るが結晶格子に縛られない ExbB/ExbD 複合体の構造を得ることができた。さらに、より生理的な環境に近い脂質二重膜中での二次元結晶化やリポソーム中でのチャンネル活性の測定を行った。その結果、ExbB/ExbD 複合体のダイナミックな活性化の機構を明らかにできた。

また、量子化学計算によるイオン散乱因子の同定、より高い分解能で単粒子解析と電子線三次元結晶構造解析のため、新型クライオ電子顕微鏡をデザインし導入した。

4. 研究成果

X 線結晶構造解析により ExbB の 2.8Å 分解能での構造決定に成功した。さらに単粒子解析から ExbB/ExbD 複合体の 5 量体と 6 量体の 2 種類の構造を明らかにした(図 1)。

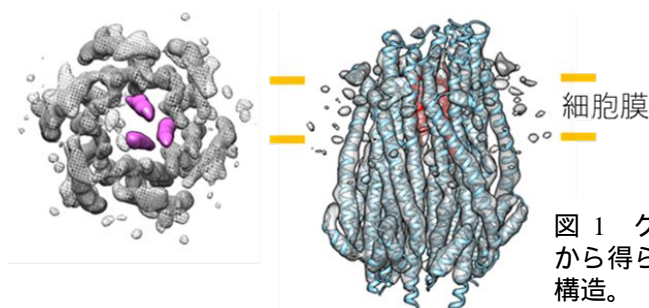


図 1 クライオ電子顕微鏡の単粒子解析から得られた ExbB/ExbD 複合体の 6 量体構造。

また、脂質膜中で二次元結晶を作製、画像解析したところ、より生理的な環境に近い状態においても 5 量体と 6 量体の両者が含まれることが分かった。さらに、リポソームに組み込み異なる pH でチャンネル活性を測定する等の解析の結果、この二つの構造が相互に変換することが示された。以上から、pH の変化に伴いサブユニットの数が変化し、これがチャンネル活性に大きな影響を及ぼすことが明らかになった (Maki-Yonekura et al., eLife, 2018)。これは膜蛋白質がダイナミックに構造を変化させることで活性化する新しい作動機構と考えられる(図 2)。

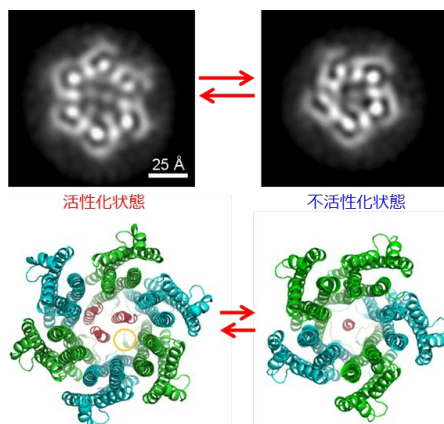


図 2 ExbB/ExbD 複合体の 6 量体と 5 量体の構造変化による活性制御の機構。上段はクライオ電子顕微鏡の分子像の 2 次元平均、下段はその原子モデル。左の活性化状態(ExbB の 6 量体と ExbD の 3 量体)では、黄色の丸で示した水素イオンの通り道が形成されるが、右の不活性化状態(ExbB の 5 量体と ExbD の単量体)では、水素イオンが透過するスペースは存在しないことが分かる。

さらに、新型クライオ電子顕微鏡を導入し、電子線三次元結晶構造解析(Yonekura et al., J. Struct. Biol., 2019)と単粒子解析(Hamaguchi et al., J. Struct. Biol., 2019)において、高精度の構造解析に成功した。また、荷電状態解析のため参照データが存在しなかった水素、炭素、窒素、リン、硫黄のイオン散乱因子を量子化学計算により決定した (Yonekura et al., IUCrJ, 2018)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- (1) 米倉 功治, "クライオ EM 革新後のイメージングセオリー", 顕微鏡, in press (査読あり)
- (2) 西山 裕介, 米倉 功治, "微小な結晶から構造を見る - 電子回折を用いた低分子医薬品の結晶構造解析", 現代化学, in press (査読なし)
- (3) T. Hamaguchi, S. Maki-Yonekura, H. Naitow, Y. Matsuura, T. Ishikawa, and K. Yonekura, "A new cryo-EM system for single particle analysis", *J. Struct. Biol.*, **207**, 40-48 (2019) (査読あり)
- (4) K. Yonekura, T. Ishikawa, and S. Maki-Yonekura, "A new cryo-EM system for electron 3D crystallography", *J. Struct. Biol.*, **206**, 243-253 (2019) (査読あり)
- (5) K. Yonekura, R. Matsuoka, Y. Yamashita, T. Yamane, M. Ikeguchi, A. Kidera, and S. Maki-Yonekura, "Ionic scattering factors of atoms that compose biological molecules", *IUCrJ* **5**, 348 - 353 (2018) (査読あり)
- (6) S. Maki-Yonekura, R. Matsuoka, Y. Yamashita, H. Shimizu, M. Tanaka, F. Iwabuki, and K. Yonekura, "Hexameric and pentameric complexes of the ExbBD energizer in the Ton system", *eLife* **7**, e35419 (2018) (査読あり)
- (7) 米倉 功治, 眞木 さおり, "三次元結晶、単粒子複合解析による膜タンパク質の構造 - 荷電・プロトン化状態、構造変化・多型を可視化する", 実験医学 **36**, 1333-1338 (2018) (査読なし)
- (8) 米倉 功治, 眞木 さおり, "蛋白質の薄い三次元結晶の電子線結晶構造解析と電荷の精密化", 日本結晶学会, **59**, 88-95 (2017) (査読あり)
- (9) K. Yonekura, and S. Maki-Yonekura, "Refinement of cryo-EM structures using scattering factors of charged atoms", *J. Appl. Cryst.* **49**, 1517-1523 (2016) (査読あり)
- (10) E. Nango, S. Akiyama, S. Maki-Yonekura, Y. Ashikawa, Y. Kusakabe, E. Krayukhina, T. Maruno, S. Uchiyama, N. Nuemket, K. Yonekura, M. Shimizu, N. Atsumi, N. Yasui, T. Hikima, M. Yamamoto, Y. Kobayashi, A. Yamashita, "Taste substance binding elicits conformational change of taste receptor T1r heterodimer extracellular domains", *Sci. Rep.*, **6**, 25745 (2016) (査読あり)

〔学会発表〕(計 21 件)

- (1) K. Yonekura, "A new cryo-EM system for higher-resolution single particle analysis and electron 3D crystallography", RSC Cryo-Electron Microscopy Symposium, Harima, Mar. (2019)
- (2) 米倉 功治, "300kV CFEG cryo-EM による電子線三次元結晶構造解析と高分解能単粒子解析", 第 1257 回生物科学セミナー, 東京, Mar. (2019)
- (3) 米倉 功治, "クライオ EM, ED による構造生物学", RSC ミニシンポジウム, Feb. (2019)
- (4) 米倉 功治, "クライオ EM と放射光による構造生物研究", 第 32 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 福岡, Jan. (2019)
- (5) 米倉 功治, "プロトン駆動力供給チャネルのクライオ EM 解析 -- 構造多型、荷電状態の解析 --", 平成 30 年度膜タンパク質研究会, 淡路島, Oct. (2018)
- (6) 米倉 功治, "クライオ電子顕微鏡と放射光による構造生物研究", 第 8 回 JASRI ワークショップ「高分解能イメージング技術」, 播磨, Sep. (2018)
- (7) K. Yonekura, and S. Maki-Yonekura, "Electron 3D crystallography and single particle cryo-EM of membrane proteins --- Analysis of charge and Damage", The 10th international workshop on X-ray damage to biological samples, Brookhaven National Laboratory, Long Island, USA, Sep. (2018).
- (8) 米倉 功治, "プロトン駆動力変換チャネル ExbBD の作動機構の解明 --- クライオ EM と放射光の相補的利用", 第 9 回 SPRUC 放射光構造生物学研究会&第 18 回日本蛋白質科学会, 新潟, Jun (2018)
- (9) K. Yonekura, "Cryo-EM and crystallography of an energizer membrane protein ExbBD in the Ton system --- Visualization of multi-conformational states and charges", Takada Lab Seminar, Kyoto University, May (2018)
- (10) 米倉 功治, "プロトン駆動力利用機構のクライオ EM と結晶構造解析", ワークショップ「機能の直接可視化によって解き明かすバクテリア膜蛋白質デバイスの動作原理」, 第 91 回日本細菌学会総会, 福岡, Mar. (2018)
- (11) T. Hamaguchi, "Visualization and structures of membrane proteins by cryo-electron microscopy", The 9th OCARINA international symposium, Osaka, Mar. (2018).
- (12) 米倉 功治, "膜蛋白質の単粒子クライオ電子顕微鏡解析と電子線三次元結晶構造解析",

TIA”かけはし”プロジェクト、つくば市、Oct. (2017)

- (13) K. Yonekura, “Electron 3D crystallography and single particle cryo-EM of membrane proteins for visualization of charges”, PSI / CCP4 Workshop 3D Electron Crystallography for Macromolecular Compounds, Brugg, Switzerland, Sep. (2017).
- (14) K. Yonekura, “Electron 3D crystallography and single particle cryo-EM of membrane proteins for visualization of charges”, Institut de Biologie Structurale (IBS) Seminar, Grenoble, France, Sep. (2017)
- (15) K. Yonekura, “Electron 3D crystallography of protein crystals for visualization of charges”, Micro symposium “Quantitative electron diffraction”, 24th Congress & General Assembly of the International Union of Crystallography 2017, Hyderabad, India, Aug. (2017)
- (16) 米倉 功治, “膜蛋白質の結晶構造解析および単粒子解析”、東北大学工学研究科応用物理学専攻数理物理学研究室セミナー、仙台、Jan. (2017)
- (17) K. Yonekura, “Cryo-EM single particle analysis and crystallography for pioneering structural biology”, Symposium for exploring prospective research Pioneering New Fields: Forefront of RIKEN’s Science and Beyond, Wako, Nov (2016)
- (18) 米倉 功治, “膜蛋白質の電子線単粒子及び結晶構造解析”、理研シンポジウム「クライオ電子顕微鏡が拓く未来-構造生物学研究のパラダイムシフト-」、横浜、2016年11月
- (19) K. Yonekura, “Cryo EM infrastructure at SR facility”, Three-Way Meeting 2016, DESY, Germany, Sep (2016)
- (20) 米倉 功治, 眞木 さおり, 山下 良樹, “膜蛋白質の電子線三次元結晶構造解析と単粒子解析”、「最先端のクライオ電顕で何が見えるのか？」 第16回日本蛋白質科学会年会、福岡、Jun. (2016)
- (21) 米倉 功治, “低温電子顕微鏡法による三次元結晶と単粒子構造解析”、第58回構造生物応用研究会、東京、Jun. (2016)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：結晶構造解析システム及び結晶構造解析方法

発明者：西山 裕介、米倉 功治

権利者：西山 裕介、米倉 功治

種類：特許

番号：08836-JP

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

膜タンパク質のダイナミックな構造変化を解明

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180417_2/

生体分子を構成する原子のイオンの散乱因子の決定

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180427_1/

タンパク質やその複合体の高分解能・高精度解析に成功

http://www.riken.jp/pr/press/2019/20190521_1/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：眞木 さおり

ローマ字氏名：Saori Maki-Yonekura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。