

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05398

研究課題名(和文)放線菌門がもつタンデム型ABCトランスポーターの構造機能と生理的意義の解明

研究課題名(英文) Study on the structures and functions of the tandemly located ABC transporters in an operon from Actinomycetes

研究代表者

矢嶋 俊介 (YAJIMA, SHUNSUKE)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：90301548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自然界には存在しないヒドラジド化合物のいくつかを唯一の炭素源として生育可能な細菌(*Microbacterium hydrocarbonoxydans*)が、どのような仕組みで化合物を資化するのか、その仕組みについて遺伝子と蛋白質の視点から研究を行ってきた。X線結晶構造解析法という手法で、蛋白質の形を明らかにし、天然に無い化合物を蛋白質が結合、分解する仕組みを示すことができた。この結果により、様々な環境に対応して生存する細菌の適応能力の仕組みの一端を示すことできたと思える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人間が単離可能な細菌の種類は、地球上に存在するうちの3%程度と言われる。細菌は様々な環境で生息をし、その中には、バイオレメディエーションのように、環境に望ましくない非天然の化合物を分解する能力を示す細菌もいる。本研究では、X線結晶構造解析法を用い、蛋白質の立体構造を明らかにすることで非天然のヒドラジド化合物を資化する機構を分子レベルで解明した。この知見は、遺伝子配列に従って作られる蛋白質構造から、分解可能な化合物を予測し、目的にあった細菌を選抜することに向けて新たな知見を提供できたと思える。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to elucidate the mechanism of how bacteria (*Microbacterium hydrocarbonoxydans*) can grow using some of the hydrazide compounds that do not exist in nature as a sole carbon source from the perspective of genes and proteins. Using the technique of X-ray crystallography, the structures of the proteins were solved, which demonstrated how the proteins bind and degrade non-natural compounds. These results could have led to the understanding of one aspect of the mechanism of the adaptive ability of bacteria to survive in a variety of environments.

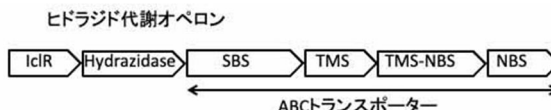
研究分野：蛋白質科学

キーワード：X線結晶構造解析 基質認識 コンフォメーション変化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、自然界には存在しないヒドラジド化合物 4-hydroxybenzoic acid 1-phenylethylidene hydrazide (HBPH)を唯一の炭素源として資化可能な *Microbacterium hydrocarbonoxydans* のヒドラジド代謝オペロン由来蛋白質の研究を行ってきた。このオペロンには右図のような遺伝子が並んでいる。開始当初までに、リガンドフリーの転写因子 IclR ホモログ、Hydrazidase の結晶構造解析を行った。また、SBS と基質との結合キネティクス解析から、HBPH が ABC トランスポーターにより取り込まれ、hydrazidase によって分解され生じる 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA) が代謝経路に入ることが考えられ、ゲノム解析により代謝経路の存在を確認している。また、HBPH 添加培地で、オペロン遺伝子発現が誘導されることを観察している。



オペロン中の ABC トランスポーターは相同性検索により Type I インポーターである dipeptide/oligopeptide/nickel transporter とアノテーションされる。このトランスポーターが (di)peptide を取り込み、amidase ファミリーに属する hydrazidase が (di)peptide を加水分解する、という流れは自然とも思えるが、hydrazidase の結晶解析からはペプチドが基質になる可能性が低いこと、また dipeptide を用いた hydrazidase 酵素活性測定からも同様の結果が得られている。よって、このトランスポーターの本来の基質が不明である。

またオペロン中には、Type I トランスポーターの膜貫通サブユニット (TMS) と ATPase サブユニット (NBS) が融合した遺伝子も存在している。Blast 検索では Type I における TMS と NBS に相当する部分が融合した遺伝子としてアノテーションされるが、立体構造予測では、エキスポーターである B-family トランスポーターの構造と予測される。よって、このオペロン中のトランスポーターは Type I の遺伝子も含め、どのような構成を取っているのか、インポーターとエキスポーターが同時に存在するのか、その生理的意義は何であるか、細菌の生存戦略に深く関わる可能性が考えられた。実際、当該菌のみならず、他の放線菌にも同様のオペロンが存在する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒドラジド代謝オペロンを構成する新規 ABC トランスポーターの構造・機能解析と、基質探索を行い、細菌におけるこのオペロンの生理的意義を解明すること、である。

現在に至るまで、ABC トランスポーター研究の焦点は、どのように基質は ATP 加水分解を活性化するか、ATP 加水分解はどのように分子輸送を可能にするか、にあり、Type I (マルトース、モリブデン、アルギン酸)、Type II (ビタミン B12) の各トランスポーターで全体構造が解かれている。

今回研究対象とした TMS-NBS 融合型の ABC トランスポーターについては、過去の研究報告が見られず、相同性をもとにした情報では、実際の構成や機能を明らかにできない。一方で、相同性検索から、このオペロンは大腸菌や枯草菌などには見られないが、放線菌門に広く存在する。

このような本研究は、近年の細菌のゲノム情報の蓄積とともに、今まで見落とされていた ABC トランスポーターの新規構造機能を明らかにすることが期待される。また、このオペロンにより、さまざまな化合物を栄養源として取り込み生育ができるように獲得、進化してきたと考えられる細菌の生存戦略を分子レベルから明らかにすることにつながると考える。

3. 研究の方法

(1) ABC トランスポーター基質結合サブユニットの X 線結晶構造解析

M. hydrocarbonoxydans よりクローニングした ABC トランスポーター基質結合サブユニット (SBS) 遺伝子に Hisx6-tag を付加し、大腸菌による大量発現系を構築した。Ni-カラムによる精製を行い、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。分子置換法による解を得ることができなかったため、セレノメチオニン (Se-Met) 置換タンパク質を作成し、結晶化を行い、放射光施設 Spring-8 において X 線回折データの収集を行い、異常分散法を用いて初期位相の決定を行った。その後、モデリングと精密化を繰り返し、最終的な構造を得た。基質認識メカニズムを解明するためには、基質との複合体構造が必要である。そこで、4-hydroxybenzoic acid hydrazide (4-HBH) を用いソーキングにより結晶を得た。この構造も分子置換法で解が得られなかったため、同様に Se-Met 置換結晶による異常分散法を用いて初期位相の決定を行った。回折データ収集は Photon Factory にて行った。

(2) IclR ホモログ転写因子の X 線結晶構造解析

M. hydrocarbonoxydans 由来の IclR ホモログ遺伝子をクローニングし、大腸菌による大量発現系を構築した。すでに IclR ホモログのリガンドフリー構造は報告している。そこで Hydrazidase による HBPH の分解産物である 4-HBA との複合体構造を得るためソーキングによる手法を用いた。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。リガンドフリーの IclR ホモログ構造を

サーチモデルとし、分子置換法により初期構造を得た。放射光施設 Photon Factory において X 線回折データの収集を行った。

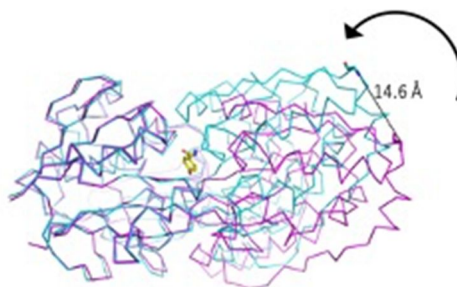
(3) 膜貫通部位の発現系構築

従前より大腸菌による発現系、*in vitro* 翻訳系とリボソームを組み合わせた発現系、それぞれの構築に成功をしていたものの、結晶化や機能解析を行うために必要な目的タンパク質の量を確保するために、各種プラスミドによる発現系構築を試みた。また、当該の ABC トランスポーターは *Streptomyces antibioticus* のゲノムにも存在することから、放線菌を発現宿主として *M. hydrocarbonoxydans* 由来、*S. antibioticus* 由来の膜貫通タンパク質の発現系構築を行った。

4. 研究成果

(1) ABC トランスポーター基質結合サブユニットの X 線結晶構造解析と基質認識機構

SBS のリガンド非結合、結合のそれぞれの立体構造を分解能 1.8Å と 2.2 Å で解明した(右図)。リガンド非結合型については、Se-Met 置換タンパク質を用いた場合のみ、解析に良好な結晶を得ることができた。全体構造は、アミノ酸配列からアノテーションされる oligopeptide/Ni トランスポーターの SBS と同様の、三角形をした構造であった。二つのドメインから構成され、そのドメイン間にある溝が基質結合部位であった。Hydrazidase の基質である 4-HBH との複合体構造では、基質の 4 位のヒドロキシ基と 1 位の官能基にあるカルボニル基、ヒドラジド基が SBS の 4 つ

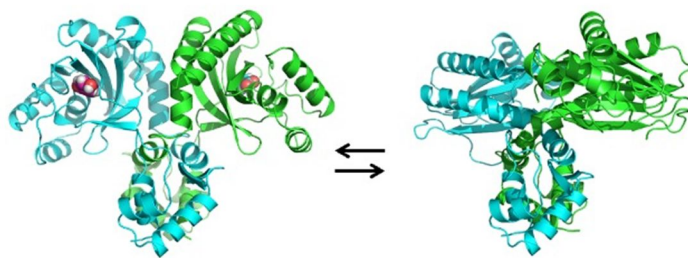


青: リガンド結合有、赤: リガンド無

のアミノ酸残基と水素結合を形成していた。また、リガンド結合の有無による SBS の立体構造を重ね合わせて比較したところ、2 つのドメインのうち、どちらか一方を重ね合わせることで、もう一方のドメインの末端が 15Å ほど動いていることが明らかとなった。すなわち、リガンドを結合することにより、リガンド結合部位を閉じるコンフォメーションとなっていた。このような大きなコンフォメーション変化が起こることから、初期構造を得るにあたり、分子置換法による解が得られなかったと考えられた。

(2) IcIR 転写因子の X 線結晶構造解析

M. hydrocarbonoxydans 由来のヒドラジド分解オペロンは IcIR ファミリーに属する転写因子によって、遺伝子発現が制御されていることが示唆されている。IcIR ファミリー転写因子は、LysR ファミリーと同様に、リガンド結合ドメイン(LBD)と DNA 結合ドメイン(DBD)から構成され、低分子性のリガンドが LBD に結合することで、転写を活性化あるいは抑制する制御を行うことが知られている。そこで、Hydrazidase の分解産物である 4-BHA を IcIR のリガンドとして、IcIR との複合体構造解析を行った。2 種類



左: リガンド結合有、右: リガンド結合無

の空間群 ($P4_12_12_1$, $P2_12_12_1$) に対し 2.0 Å と 2.1 Å の分解能で構造の取得に成功した。解析の結果、両空間群の構造に違いが無かったことから、より分解能が高い $P4_12_12_1$ の構造で解析を進めた。(右図) その結果、LBD に結合した 4-HBA は、4 位のヒドロキシ基と 1 位のカルボン酸由来酸素に、IcIR のアミノ酸残基が水素結合を形成していた。また、リガンド結合部位に位置するループ構造が、リガンドの結合により、その結合部位を覆うようにコンフォメーションが変化していた。リガンド非結合型の IcIR との重ね合わせによる立体構造比較を行ったところ、LBD、DBD の相対的位置が大きく変化するコンフォメーション変化が起きていた。また、非対称単位中の分子数がリガンド結合の有無で 2 分子と 4 分子と異なっていたが、結晶中のコンタクトによる影響も考えられたため、ゲル濾過により溶液中の量体数確認を行った。その結果、IcIR はリガンド非結合では 4 分子、リガンド結合により 2 分子となることが明らかとなった。よって、IcIR はリガンド結合によりコンフォメーション変化と量体形成に変化が起こり、DNA 結合の有無やポリメラーゼへの制御が変化すると考えられた。一方、リガンド結合有無で大きなコンフォメーション変化があったものの、初期構造の取得において分子置換法により解が得られた要因として、ドメインの相対配置は変化するものの、各ドメインそのものの構造は一部のループ部分を除き変化していなかったためと考えられた。

今回、IcIR ファミリータンパク質において、リガンド結合有無の両状態の立体構造を明らかにした初めての例となった。

(3) 膜貫通部位の発現系構築

大腸菌による組換えタンパク質としてトランスポーターの発現確認は成功していたが、結晶化

や機能解析を行うためには大量のタンパク質が必要である。そのための発現系構築を目指した。まず *in vitro* 翻訳系をリボソームとカップリングさせることを試みた。しかしながら、発現量を増やす結果には至らなかった。*Microbacterium* は放線菌に属すること、また *S. antibioticus* のゲノム配列中にもヒドラジド分解のオペロンが存在することから、*M. hydrocarbonoxydans* 由来遺伝子および *S. antibioticus* 由来遺伝子を *S. antibioticus* または *S. coelicolor* で発現させる系の構築を試みた。しかしながら、放線菌中での目的タンパク質の発現には至らなかった。

以上の研究から、細胞外の SBS のリガンドと細胞内の Hydrazidase の基質の結合様式が一致し、また Hydrazidase の分解産物と IcIR のリガンド結合様式が一致する結果が得られた。このことから、オペロン遺伝子から翻訳されるトランスポーターが基質を取り込み、その基質を Hydrazidase が分解し、分解産物の 4-BHA が代謝経路を経て資化されることが強く示唆された。また、同じく Hydrazidase の分解産物である 4-BHA は転写因子の機能を制御していることを強く示唆することができた。今後、トランスポーター膜貫通領域の構造解析が行われることでより詳細な機能解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akiyama Tomonori, Sasaki Yasuyuki, Ito Shinsaku, Yajima Shunsuke	4. 巻 1869
2. 論文標題 Structural basis of the conformational changes in Microbacterium hydrocarbonoxydans IcIR transcription factor homolog due to ligand binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140644 ~ 140644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2021.140644	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimamura K, Akiyama T, Yokoyama K, Takenoya M, Ito S, Sasaki Y, Yajima S.	4. 巻 525
2. 論文標題 Structural basis of substrate recognition by the substrate binding protein (SBP) of a hydrazide transporter, obtained from Microbacterium hydrocarbonoxydans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 720-725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島村香穂、秋山友了、竹野谷美穂子、伊藤晋作、佐々木康幸、矢嶋俊介
2. 発表標題 Microbacterium hydrocarbonoxydans 由来ABC トランスポーター 基質結合サブユニットの立体構造解析
3. 学会等名 平成30年度 日本結晶学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島村香穂、秋山友了、竹野谷美穂子、伊藤晋作、佐々木康幸、矢嶋俊介
2. 発表標題 Microbacterium hydrocarbonoxydans 由来 ABC トランスポーター基質結合サブユニットの結晶構造解析による基質認識機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------