

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05779

研究課題名（和文）有機酸排出トランスポーターの基質輸送メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study of substrates transport mechanism of organic acids exporter

研究代表者

七谷 圭（NANATANI, KEI）

東北大学・未来型医療創成センター・助教

研究者番号：00547333

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）：有機酸などの極性の高い化合物を微生物を用いて生産する際、最終生成物は膜を透過できないため、菌体外に排出する膜輸送体が必要である。膜輸送体の機能が十分でない場合、生産物は細胞内に蓄積し、細胞内での代謝反応の阻害する負のフィードバックを引き起こす。本研究では、生産物の細胞外排出を強化することを目的とし、有機酸排出トランスポーターによる基質輸送メカニズムの解明をめざし研究を実施した。その結果、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析により、有機酸排出トランスポーターホモログの分子構造の解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化石資源への依存度を減らすことは、持続可能な社会の構築に欠かすことができない。有機酸は、プラスチックの原料として広く使われていることから、有機酸を植物性原料から微生物を用いて生産する技術は非常に重要である。しかしながら、有機酸などの様に膜不透過性の化合物の生産には、生産物を細胞外に排出する輸送体が不可欠で、排出輸送体の機能の強化は重要な課題である。本研究では、有機酸排出トランスポーターの機能メカニズムの全容を明らかにするために重要な知見を得ることができた。今後、これらの知見を活かして、有機酸排出機能の強化を行うことにより、有機酸生産の効率化に資する。

研究成果の概要（英文）：When highly polar compounds such as organic acids are produced using microorganisms, the final product cannot permeate membranes and requires membrane transporters that expel the product out of the bacteria. If the membrane transporters are not fully functional, the products accumulate inside the cell, causing negative feedback that inhibits metabolic reactions in the cell. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of substrate transport by organic acid efflux transporters in order to enhance product efflux out of the cell. As a result, the molecular structure of the organic acid efflux transporter homologue was successfully elucidated by single-particle analysis using cryo-electron microscopy. The results of this study have provided important insights into the overall functional mechanism of the organic acid efflux transporter.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物 有機酸 トランスポーター クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

近年の地球温暖化を背景に、化石資源に依存しない持続可能な社会の構築が必要とされている。プラスチックは現代社会に欠かせないにも関わらず、原料の大部分を化石燃料に依存しており、植物原料への転換が急務である。なかでも有機酸はプラスチックの原料として広く使われ、微生物による有機酸生産技術の開発が世界中で進められている。しかしながら、生産コストの視点から化石燃料由来に勝ることができず、植物原料由来への置き換えが進んでいないのが現状である。したがって、植物を原料とし安価に有機酸を生産する技術の開発が求められている。

微生物を用いた有機酸などの極性化合物の生産においては、生産化合物が細胞膜を透過できないことから、細胞内に蓄積し、細胞内での生産反応を阻害する負のフィードバックの原因となる。そこで、本研究では有機酸を細胞外に排出する有機酸排出トランスポーターに着目し、機能強化により有機酸生産を効率化することを最終目標として、トランスポーターの機能強化に必要な基盤的知見を得ることを目的とした。

2. 研究の目的

微生物は様々なトランスポーターを有し、生育に必要な栄養素を取り込み、老廃物を排出することで恒常性を維持している。トランスポーターは生物の生育にとって重要なタンパク質でありながら、膜タンパク質であるために生じる研究材料としての取り扱いの困難さから、他の可溶性のタンパク質と比較して研究の進捗が大きく遅れている。本研究で、着目している有機酸排出トランスポーターやそのホモログタンパク質についても、多くの場合、分子構造は明らかにされておらず、基質輸送のメカニズムは明らかにされていない。本研究では、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析や X 線結晶構造解析を実施し、有機酸トランスポーターまたはホモログタンパク質の分子構造を明らかにし、さらに生化学的な解析を実施することにより基質輸送メカニズムを解明することを目的とした。基質輸送メカニズムを解明によって、蛋白質工学的な改変により、基質輸送速度の向上や基質特異性の改変などの試みができるようになり、有機酸生産の効率化につながると期待できる。

3. 研究の方法

(1) 有機酸トランスポーターの分子構造解析

はじめに、有機酸トランスポーターおよびホモログタンパク質の分子構造の解明に向けて、大腸菌を宿主として蛋白質の発現条件の最適化を行った。発現ベクターには pTrc99A を、宿主として大腸菌 XL3 株、C43(DE3)株を用いた。集菌した菌体をフレンチプレスを用いて破碎し、超遠心により膜画分を取得した。界面活性剤 DDM を用いて、膜画分から膜タンパク質を可溶化し、Ni-NTA によるアフィニティークロマトグラフィーにより粗精製タンパク質を得た。その後、ゲルろ過クロマトグラフィーに供し高純度精製産物を得た。精製産物を SEC-MALS および BN-PAGE によって、複合体構造の解析を行った。

精製産物を濃縮後、結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件の探索を行った。得られた結晶は、大型放射光施設 (Spring8, KEK) を利用して回折実験を行った。また、精製したタンパク質をクライオ電子顕微鏡用グリッド (Quantifoil 1.2/1.3 Cu 200 mesh) にアプライし、急速凍結装置 (Vitrobot, サーマサイエンティフィック または EMGP2, Leica) を用いて、氷包埋グリッドを作製した。作製した氷包埋グリッドをクライオ電子顕微鏡 (Taitan, Krios サーマサイエンティフィックまたは CRYOARM300II, JEOL) を用いて撮影した。撮影データの解析を Relion, cryoSPARC を用いて解析し、3D 再構成を実施した。

(2) エネルギー変換メカニズムの解明

基質輸送メカニズムの解明に向けて、駆動力となるエネルギーを構造変化という機械的エネルギーへ変換するメカニズムを解明するため、部位特異的蛍光ラベリング法、およびクライオ電子顕微鏡を用いて基質結合構造と基質非結合構造を比較することにより、基質輸送に伴う構造変化を明らかにし、エネルギー変換のメカニズムを検討した。はじめに、Cys 残基を 1 残基のみ導入した Single Cysteine 変異体を作製した。これらの変異体が大腸菌を宿主として発現させ、浸透圧破壊法により細胞膜を取得した。取得した細胞膜を buffer (基質有もしくは無) に懸濁し、Cys 修飾試薬オレゴングリーンマレイミド (OGM) を添加した。OGM 処理後、細胞膜を洗浄後、細胞膜より膜タンパク質を可溶化、トランスポーターを精製した。精製後のトランスポーターを SDS-PAGE に供し蛍光を検出した。

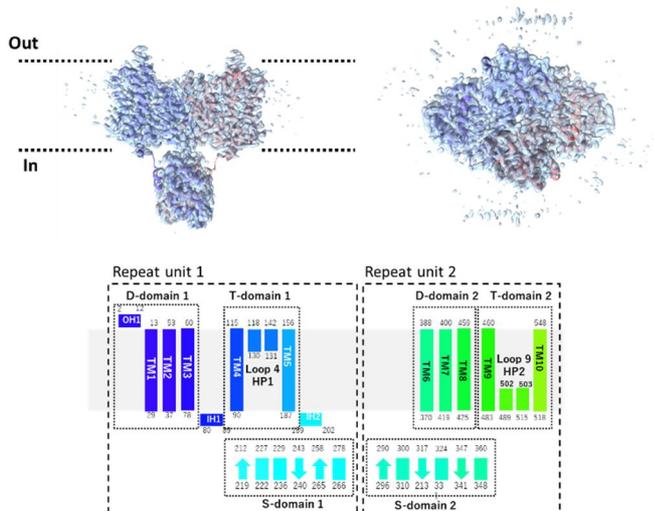
(3) 輸送活性制御メカニズムの解明

対象とした有機酸トランスポーターホモログは、リガンドが結合し、活性を制御すると推察される可溶性ドメインを有していた。そこで、リガンド結合による輸送活性制御メカニズムを明らかにするため、リガンドの探索とプロテオリポソーム再構成法による輸送制御メカニズムの解析を行った。

4. 研究成果

(1) トランスポーターの分子構造解析

蛋白質の発現条件の最適化を行った結果、C43(DE3)株を宿主として、IPTG添加による発現誘導後、80rpmの振盪速度で培養した時に高い収量を得ることができた。さらに可溶化、精製タンパク質を用いたSEC-MALSおよびBN-PAGEによる複合体解析により、トランスポーターが2量体を形成することを明らかにした (Miyamoto et al. 2022)。次に、基質非結合構造の解明をめざし、クライオ電子顕微鏡による解析を行った。はじめに野生型を精製し、クライオ電子顕微鏡観察を実施したが、高分解能構造を得ることはできなかった。そこで、熱安定変異体の精製を行い基質非存在下でクライオ電子顕微鏡観察を行った。



この熱安定変異体は、2量体を形成に関与する残基に Cys 残基を置換した変異体であり、Cys-Cys 結合の形成により2量体構造が安定化し、構造の固定化および安定化が実現できた変異体である (Miyamoto et al. 2022)。この熱安定変異体の構造解析により、有機酸トランスポーターの高分解能構造の取得に成功した (図 上段)。本輸送体は、10回の膜貫通領域と中央に親水性の可溶性ドメイン(S-domain)を有していた (図 下段)。膜貫通ドメインは、基質輸送に関与するT-domainと2量体化に関与するD-domainから構成されていた。膜貫通領域は、N末端側とC末端側がシュードシンメトリーの関係にあった。さらに、N末端側とC末端側にそれぞれ短いヘリックス2本から成るヘアピンループと呼ばれる構造が観察された。類似構造の探索により、膜貫通領域は微生物由来クエン酸トランスポーターCitSと類似の構造を有することが明らかとなった。さらに、S-domainにもTrkA_Cドメインと呼ばれる構造が2つありこちらも繰り返し構造であることが分かった。

(2) エネルギー変換メカニズムの解明

OGMを用いた部位特異的ラベリング法により、基質存在下、非存在下におけるラベリング効率をパターン分析した。その結果、本トランスポーターは、基質の種類によって、異なるラベリングパターンが得られたことから、複数のコンフォメーションを有することを明らかにした (Suzuki et al. 2022)。さらに、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析により、基質存在下において野生型の構造を得ることに成功した。以上の結果から、本トランスポーターは基質結合状態、非結合構造を有し、複数のコンフォメーション変化を繰り返すことにより、基質輸送を成し遂げていることが示唆された。

(3) 輸送活性制御メカニズムの解明

クライオ電子顕微鏡単粒子解析の結果からS-domainにはリガンドが結合し、基質輸送を制御する可能性のあるドメインが存在することが明らかとなった。そこで、S-domainに結合し基質輸送を制御するリガンドの探索を目的としFSEC-TS法による探索を行った。可溶化後、精製した蛋白質に各種化合物を添加後、加熱処理した。加熱後の未変性タンパク質の残存量をFSECを用いて解析する (FSEC-TS法) により、熱安定性に寄与する化合物の探索を行った。その結果、ピリドキサル5'リン酸存在下で、トランスポーターの熱安定性がわずかに向上することが示唆された。さらに、精製タンパク質をプロテオリポソームに再構成し、放射性同位元素を用いてトランスポーターの基質輸送活性を測定した結果、PLPの添加によりトランスポーターの活性を向上することが示唆された。以上の結果から、PLPがS-domainに結合し基質輸送を制御する可能性が示唆された (Kunii et al. 2023)。

研究成果の統括

本研究では、微生物の有機酸生産に非常に重要な役割を果たす有機酸トランスポーターの分子構造の解析を行った。クライオ電子顕微鏡による単粒子解析により分子構造の解明に成功した。さらに、得られた分子構造と部位特異的ラベリング実験の結果より、本トランスポーターが基質輸送に伴いコンフォメーションが変化することを明らかにし、トランスポーターの基質輸送メカニズムの一端を明らかにした。本研究の成果は、蛋白質工学的手法により、有機酸トランスポーターの機能強化の土台となる重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Akari Miyamoto, Takashi Yamanaka, Satomi Suzuki, Kota Kunii, Kenichiro Kurono, Akira Yoshimi, Masafumi Hidaka, Satoshi Ogasawara, Kei Nanatani, Keietsu Abe	4. 巻 172
2. 論文標題 Oligomeric state of the aspartate:alanine transporter from <i>Tetragenococcus halophilus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 217-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac057	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 Satomi Suzuki, Fumika Chiba, Takuya Kimura, Nanase Kon, Kei Nanatani, Keietsu Abe	4. 巻 12
2. 論文標題 Conformational transition induced in the aspartate:alanine antiporter by L-Ala binding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19974-z	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 Kunii Kota, Yamanaka Takashi, Miyamoto Akari, Nanatani Kei, Abe Keietsu	4. 巻 175
2. 論文標題 Thermostability optimization of the aspartate/alanine exchange transporter from <i>Tetragenococcus halophilus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 439 ~ 446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad104	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3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中 空、宮本 あかり、國井 宏太、七谷 圭、阿部 敬悦
2. 発表標題 醤油乳酸菌 <i>Tetragenococcus halophilus</i> 由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体 (AspT) の複合体構造
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 七谷 圭
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるアミノ酸トランスポーターの基質輸送メカニズムの解析
3. 学会等名 INGEM & ToMMoセミナーシリーズ第23回（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 七谷圭, 菅野亮, 日高將文, 山中空, 宮本あかり, 渡部聡, 稲葉謙次, 川端猛, Lan Guan, 光岡薫, 阿部敬悦, 小柴生造
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による微生物由来アミノ酸トランスポーターの単粒子解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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		
米国	テキサス工科大		