

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2009～ 2011
課題番号：21370043
研究課題名（和文） X線結晶構造解析による核酸塩基-陽イオン共輸送体の輸送機構の解明
研究課題名（英文） Elucidation of the transport mechanism of a secondary active transporter, Mhp1.
研究代表者 島村 達郎 （Tatsuro Shimamura） 京都大学・医学研究科・特定講師 研究者番号：90391979

研究成果の概要（和文）：

輸送体（トランスポーター）は、交互アクセスモデルと呼ばれる機構で生体膜を介して物質を輸送する。交互アクセス機構とは、基質結合部位を膜の外側、内側に交互に開閉して基質を輸送するとするものである。この機構を分子レベルで理解するために、我々は、二次性能動輸送体 Mhp1 を用いて、交互アクセス機構の主要な3種の間状態（外向き構造、閉じた構造、内向き構造）の構造を決定した。これらの構造を比較することで、Mhp1 は、4本のヘリックスを他の部位に対して剛体として動かすことで輸送を行っていることが明らかとなった。この機構は、Mhp1 が含まれる LeuT スーパーファミリーでは基本的に共通と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Transporters transport the substrates across the membrane by the alternating access mechanism in which the proteins have three functionally distinct conformational states (outward-facing, occluded, and inward-facing). Mhp1 is a secondary active transporter belonging to the LeuT superfamily. We succeeded to determine the Mhp1 structures in these three states of the alternating access mechanism. By the comparison of these structures, the conformational changes between these states are found to be achieved by the rigid body movement of the four helices relative to the rest of the protein. The molecular basis of the alternating access mechanism should be common among the LeuT superfamily.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、輸送体、ヒダントイン、トランスポーター、交互アクセスモデル、膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

輸送体は、図1のように、基質結合部が構造

変化により膜の異なる側からアクセスできるようになるとする“Alternating access

model” という共通する輸送機構で輸送を行う (Nature 211, 969-970, 1966)。ATP の加水分解エネルギーを利用して輸送を行う一次性能動輸送体では、Ca²⁺-ATPase で多くの中間体構造が決定されており、この機構は詳しく解明されている (Arch. Biochem. Biophys. 474, 3-11, 2008)。一方、細胞内外のイオンの濃度勾配と共役させて他の分子を輸送する二次性能動輸送体に関しては、構造情報が少なく、輸送機構について分子メカニズムの理解が進んでいなかった。

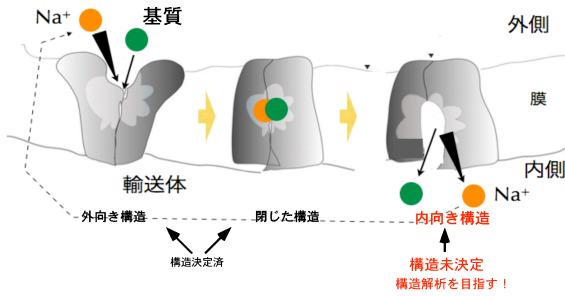


図 1 交互アクセスモデル

2. 研究の目的

Microbacterium liquefaciens 由来の Mhp 1 は、pH 依存的にアミノ酸誘導体ヒダントインを輸送する二次性能動輸送体として同定された (J. Bacteriol. 188, 3329-3336, 2006)。その後、申請者らにより Mhp 1 の構造生物学的研究がスタートした。その結果申請者らは、Mhp 1 がナトリウムイオンと共役させて基質の輸送を行う核酸塩基-陽イオン共輸送体 (NCS1 ファミリー) に属することを示し、更に、Mhp 1 の構造を図 1 の「外向き構造」と「閉じた構造」の中間体で決定し、Mhp 1 の構造は、ヒトの神経伝達物質輸送体や、小腸において糖の取り込みを行うナトリウム依存糖グルコース輸送体と類似の構造であることを解明した (Science 322, 709-713 2008)。また、Mhp 1 と構造上の類似性の高い、ガラクトース輸送体 vSGLT の図 1 の「内向き構造」に相当する構造 (Science 321, 810-4, 2008) との比較により、これらの輸送体では、図 1 のように、外向き/内向きの空洞が対称的な形で存在し、同期して開閉するという分子メカニズムの一端も明らかにした。

しかし、Mhp 1 と vSGLT の間には、基質及びイオンの結合部位のずれが存在すること等により、詳細な分子メカニズムはまだ分かっていない。これを解決するために、Mhp 1 で「内向き構造」に相当する中間体の構造を決定することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

Mhp 1 の「内向き構造」を安定化させるために、蒸気拡散法による結晶化を行い、より多くの結晶化条件をスクリーニングした。また、抗体を結合させたり、キュービックフェーズ法による結晶化も行った。

4. 研究成果

Mhp 1 は、Na⁺イオンと共役してアミノ酸関連物質であるヒダントインを輸送する。我々は、既に構造を決定していた「外向き構造」、「閉じた構造」に加え、「内向き構造」を決定した (図 2)。

これらの構造を比較することで、Mhp 1 が基質を輸送する際の動きが明らかになった。Mhp 1 は、12本の膜貫通ヘリックス (TM1-12) を持つ。また、膜貫通ヘリックスのうち最初の10本のヘリックス (TM1-10) が輸送機構に関与する。一方、C末端の残

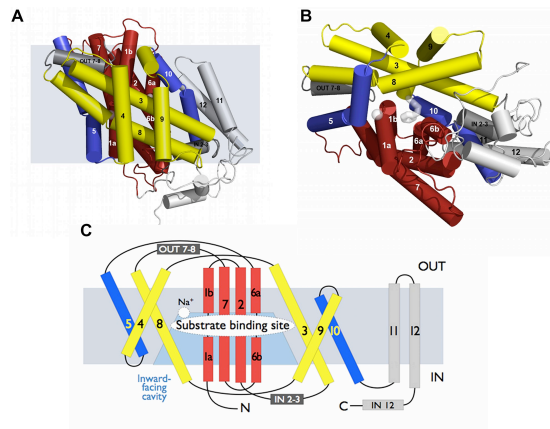


図 2 Mhp 1 の内向き構造

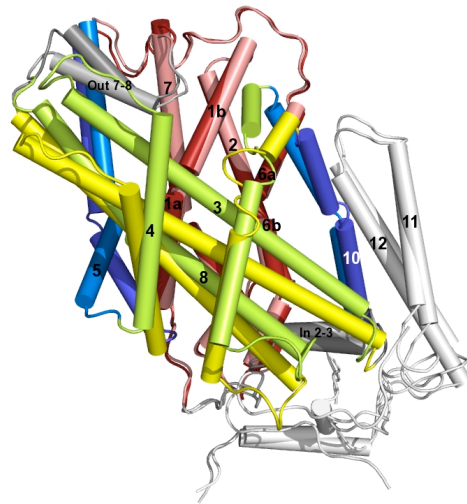


図 3 外向き構造と内向き構造の重ね合わせ

りの二本のヘリックス (TM11, 12) は輸送機構には関与せず、その役割は分かっていない。輸送機構に関わる10本のヘリックス

は、3個の部位に分けると輸送機構を考え易い。それらは、4本のヘリックス (TM 1, 2, 6, 7) からなる bundle motif (図2、赤色)、4本のヘリックス (TM3, 4, 8, 9) からなる hash motif (図2、黄色)、そして、青色で示す TM5, TM10 である。「外向き構造」と「内向き構造」を重ねると図3のようになる。図3からわかるとおり、輸送の前後で bundle motif (赤色) は動かず、hash motif (黄色) が動いていることが分かる。一方、輸送の前後で、hash motif の構造上の変化は見られなかった。また、「外向き構造」から「閉じた構造」への変化では、TM 10 が折れて細胞外へ向かう基質の通路を塞ぎ、「閉じた構造」から「内向き構造」への変化では、TM 5 が折れて細胞内に向かう基質の通路を開いていた。

これらのことから、Mhp 1 は、hash motif を剛体として TM 3 に沿う回転軸の周りに約 30 度回転させることで輸送を行っていることが解明された (図4)。また、青色の TM5 と 10 は、膜の外側、内側で、基質の通路の扉の役割を果たしており、輸送体の動きに応じて、扉を開閉していると考えられた。

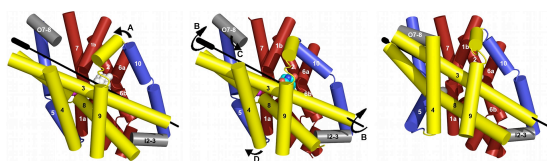


図4 Mhp 1 の輸送過程における動き

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 11 件)

- ① Jackson SM, Ivanova E, Simmons K, Patching SG, Weyand S, Shimamura T, Brueckner F, Iwata S, Sharples DJ, Baldwin SA, Sansom MPS, Beckstein O, Cameron AD, Henderson PJF*. "The Na⁺-hydantoin membrane transport protein, Mhp1." Encyclopedia of Biophysics Springer (2012) 掲載確定
- ② Shiroishi M, Kobayashi T, Ogasawara S, Tsujimoto H, Ikeda-Suno C, Iwata S, Shimamura T. "Production of the stable human histamine H(1) receptor in Pichia pastoris for structural determination." Methods. **55**(4):281-286 (2011) 査読有り DOI: 10.1016/j.ymeth.2011.08.015
- ③ Tokuda N, Igarashi K, Shimamura T (co-1st author), Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Ito K, Sugawara T, Asada H, Murata T, Nomura N, Iwata S, Kobayashi T. "Cloning, expression and purification of the anion exchanger 1 homologue from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium." Protein. Expr. Purif. **79**(1):81-7 (2011). 査読有り DOI: 10.1016/j.pep.2011.04.006
- ④ Asada H, Uemura T, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Shimamura T, Tsujimoto H, Ito K, Sugawara T, Nakane T, Nomura N, Murata T, Haga T, Iwata S, Kobayashi T. "Evaluation of the Pichia pastoris expression system for the production of GPCRs for structural analysis." Microb. Cell. Fact. **10**:24 (2011). 査読有り DOI: 10.1186/1475-2859-10-24
- ⑤ Ito K, Ito S, Shimamura T (co-1st author), Weyand S, Kawarasaki Y, Misaka T, Abe K, Kobayashi T, Cameron AD, Iwata S. "Crystal Structure of Glucansucrase from the Dental Caries Pathogen Streptococcus mutans." J. Mol. Biol. **408** (2):177-86 (2011). 査読有り DOI: 10.1016 /j. jmb. 2011. 02. 028
- ⑥ Weyand S, Shimamura T, Beckstein O,

- Sansom M, Iwata S, Henderson P, Cameron A. "The Alternating Access Mechanism of Transport as Observed in the Sodium-Hydantoin Transporter Mhp1." *J. Synchrotron Rad.* **18**, 20-23 (2011).
査読有り
DOI: 10.1107/S0909049510032449
- ⑦ Weyand S, Ma P, Beckstein O, Baldwin J, Jackson S, Suzuki S, Shimamura T, Sansom M, Iwata S, Cameron A, Baldwin S, Henderosn P.
"The Nucleobase-Cation-Symport-1 family of Membrane Transport Proteins."
Handbook of Metalloproteins, Volumes 4 & 5, edited by Albrecht Messerschmidt. Chichester. UK: John Wiley and Sons, Ltd, pp. 848-864 (2011). 査読無し
DOI: 110.1002/0470028637
- ⑧ 島村達郎、岩田想
「ヒダントイン輸送体に見る膜輸送機構の構造基盤」
生物物理 **51**, 004-009 (2011). 査読有り DOI:無し
- ⑨ Ito K, Ito S, Shimamura T, Kawarasaki Y, Abe K, Misaka T, Kobayashi T, Iwata S. "Crystallization and preliminary X-ray analysis of a glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*."
Acta Crystallogr. F **66**, 1086-1088 (2010). 査読有り
DOI: 10.1107/ S1744309110029714
- ⑩ 島村達郎、Alexander D. Cameron、岩田想 「立体構造より明らかとなったヒダントイン輸送体 Mhp 1 の輸送機構」 *実験医学* **28**, 2639-2642 (2010). 査読無し DOI:無し
- ⑪ Shimamura T, Weyand S, Beckstein O, Rutherford NG, Hadden JM, Sharples D, Sansom MSP, Iwata S, Henderson PJ, Cameron AD.
"Molecular Basis of Alternating Access Membrane Transport by the Sodium-Hydantoin Transporter Mhp1."
Science (Article) **328**, 470-473 (2010).
査読有り
DOI: 10.1126/science.1186303
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 島村達郎 「膜蛋白質の結晶化」第12回日本蛋白質科学会 2012.6.20 (発表確定) 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ② 島村達郎 「微結晶を用いた創薬ターゲット膜タンパク質の構造解析とSACLAの可能性」第25回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム2012.1.9鳥栖市民文化会館 (佐賀県)
- ③ Shimamura T. "Structural studies of human G-protein coupled receptors." 日本農芸化学会2012年度大会2012.3.25京都女子大学 (京都府)
- ④ 島村達郎 「二次性能動輸送体Mhp1の交互アクセス機構の解明」2011年度 日本生体エネルギー研究会2011.12.21京都産業大学 (京都府)
- ⑤ Shimamura T. "Structural basis of secondary active transport in the sodium-hydantoin transporter Mhp1." The JSPS/iCeMS International Symposium. 2011.11.17 京都大学 (京都府)
- ⑥ 島村達郎 「ヒト由来ヒスタミン受容体H1の構造解析戦略」第84回日本生化学会大会 2011.9.24京都国際会館 (京都府)
- ⑦ 島村達郎 「ヒダントイン輸送体Mhp 1 の基質輸送中の動き」生理研研究会2011.9.8岡崎

コンファレンスセンター (愛知県)

⑧ Shimamura T. et al. "Structure of the human histamine H1 receptor with doxepin." International Union of Crystallography, XXII Congress and General Assembly. 2011.8.29 Madrid (Spain)

⑨ Shimamura T. "THREE CRYSTAL STRUCTURES REVEAL THE ALTERNATING ACCESS MECHANISM OF A SECONDARY ACTIVE TRANSPORTER, MHP1." The 3rd Annual NIH Roadmap Meeting on Membrane Protein Technologies. 2010.11.17-18, San Diego (USA)

⑩ 島村達郎、"Crystal structure of the secondary-active transporter, Mhp1." 第10回日本蛋白質科学会年会 2010.6.16-18 札幌コンベンションセンター (北海道)

[その他]

ホームページ等

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2010/100423_1.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島村 達郎 (Tatsuro Shimamura)
京都大学・医学研究科・特定講師
研究者番号：90391979

(2) 研究分担者

小林 拓也 (Takuya Kobayashi)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：20311730

白石 充典 (Mitsunori Shiroishi)
九州大学・薬学研究院・助教
研究者番号：00380527