

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25年6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22687007

研究課題名（和文）

二次性能動輸送体による細胞環境維持機構の構造生物学

研究課題名（英文）

Structural biology of secondary active transporters

研究代表者

石谷 隆一郎 (ISHITANI RYUICHIRO)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：90361568

研究成果の概要（和文）：

細胞内外の環境維持に重要な能動輸送体は、エネルギーを消費して細胞膜を介した物質輸送を行う膜蛋白質であり、二次性輸送体は一次性輸送体が作り出した H^+ 、 Na^+ 等のイオンの濃度勾配をエネルギー源として、低分子化合物を能動的に輸送する役割を持つ。特にこの二次性輸送体は、アミノ酸、核酸、糖、薬剤など、重要な生理活性物質の細胞内外の分布を決定づけている。そのため、これらの輸送体のヒトにおける機能異常は様々な疾病と深く関係している。本研究は、生物学的、医学的応用の両面から重要である二次性能動輸送体、多剤排出輸送体 MATE、 Ca^{2+} カチオン交換体 CaCA、オリゴペプチド輸送体 POT の X 線結晶構造解析・機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Active transporters are membrane protein that mediates translocation of various substrates across the biological membrane by consuming energy, and thus are important for maintaining intra- and extracellular environment. The secondary active transporters translocate the small molecules, including amino acids, nucleic acids, sugars and drugs, by utilizing the electrochemical gradient of H^+ or Na^+ across the membrane. In this project, we focused on the three important secondary active transporters, multidrug efflux transporter MATE, Ca^{2+} /cation exchanger CaCA, and oligopeptide symporter POT, and performed structural and functional analyses of these targets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2012年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
総計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学，構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析，膜蛋白質，膜輸送体，ドラッグデリバリー，多剤排出因子

1. 研究開始当初の背景

細胞内外の環境維持に重要な能動輸送体は、

エネルギーを消費して細胞膜を介した物質輸送を行う膜蛋白質であり、一次性と二次性

能動輸送体に分けられる。一次性輸送体がATP加水分解等のエネルギーを利用して細胞内外のイオン濃度勾配を作り出す一方で、二次性輸送体は一次性輸送体を作り出した H^+ 、 Na^+ 等のイオンの濃度勾配をエネルギー源として、低分子化合物を能動的に輸送する役割を持つ(右図)。特にこの二次性輸送体は、アミノ酸、核酸、糖、薬剤など、重要な生理活性物質の細胞内外の分布を決定づけている。そのため、これらの輸送体のヒトにおける機能異常は様々な疾病と深く関係している。したがって、膜蛋白質は全般的に結晶構造解析が困難であるが、新規の二次性輸送体の構造情報は、生物学的、医学的な応用の観点からも世界的にインパクトが大きい。本研究では、構造が未知で新規性の高い、以下の二次性能動輸送体を課題として取り上げる。

2. 研究の目的

【多剤排出輸送体 MATE】

抗生物質や抗癌剤が効かない薬物耐性細胞の出現は、化学療法に基づいた近代医療に対する脅威となっている。この薬剤耐性獲得の機構は幾つか知られているが、中でも多剤排出輸送体と呼ばれる膜蛋白質により多種多様な薬剤を能動的に排出し、蓄積を阻害する機構が重要である。多剤排出輸送体は、物理化学的性質が異なる多様な薬剤を認識し排出する。この薬剤に対する認識機構の理解は、排出されにくい薬剤の設計につながる。本研究で取り上げる MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) 輸送体は、カチオン性の有機低分子を H^+ や Na^+ と対向輸送することで、能動的に薬剤を排出し、病原菌においては、シプロフロキサシン等の抗生物質への耐性の一因となっている。研究課題の一つとして細菌由来 MATE 輸送体を取り上げ、その構造・機能を解明することで、幅広いカチオン性有機物の認識機構、 H^+ 濃度勾配をエネルギー源とした能動的な排出機構の構造基盤を解明する。

【 Ca^{2+} カチオン交換体 CaCA】

Ca^{2+} カチオン交換体 CaCA (Calcium cation antiporter) は、 Ca^{2+} を Na^+ あるいは H^+ の濃度勾配を利用して対向輸送する交換体である。CaCA はヒトを含む真核生物から、細菌、古細菌にわたって広く存在しており、いずれも細胞内の Ca^{2+} を細胞外へ汲み出し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性を保つという重要な働きを持つ。CaCA のメンバーであるヒト由来 NCX1 は、心筋細胞等において低アフィニティー・高容量の Ca^{2+} 輸送を行うことで、Caポンプと共に細胞内 Ca^{2+} 濃度を低く保ち、心筋・血管平滑筋の収縮機構において重要な役割をはたしている。そしてその機能異常は、心筋・腎臓における虚血再還流障害や、食塩摂取過剰に

よる高血圧などの病因に関連していると考えられている。本課題では細菌由来 CaCA 交換体を取り上げ、その構造・機能を解明することで、基質イオンの認識機構、対向輸送メカニズムの構造基盤を明らかにする。本研究による CaCA による対向輸送機構の解明は、NCX1 に関連した疾病に対する治療薬開発を可能にすると期待される。

【オリゴペプチド輸送体 POT】

POT (Proton-dependent oligopeptide transporter) 輸送体は、 H^+ の濃度勾配を利用してオリゴペプチドを細胞内に取込む共輸送体ファミリーである。ヒトにおける POT 輸送体メンバー PEPT (Peptide transporter) 1, PEPT2 は、本来の基質であるペプチドの取り込み以外に、経口摂取した薬剤 (β ラクタム系抗生物質、降圧作用をもつ ACE 阻害薬、一部の抗ウイルス薬など) の血流への取り込みに重要な役割を果たしている。そのため、もし PEPT を含む POT 輸送体の構造が解明されれば、より rational な方法で吸収効率の高い薬剤を設計できると期待される。本課題では細菌由来 POT 輸送体を取り上げ、その構造・機能を解明することで、基質ペプチドやペプチド類似薬剤の認識機構、 H^+ 濃度勾配をエネルギー源とした能動輸送機構の構造基盤を明らかにする。本研究から得られる POT 輸送体の構造情報は、より効率的に取込まれる新規薬剤の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) MATE の X 線結晶構造解析

まず、様々な生物種由来の MATE の大腸菌を使用した大量発現系を作成し、構造解析に適した系を探索する。標的蛋白質を GFP との融合蛋白質として発現させ、GFP の蛍光を指標として、発現量、界面活性剤による膜面からの可溶化量を検討する。さらに、GFP の蛍光を指標としたゲル濾過クロマトグラフィーによって、可溶化後の膜蛋白質の単分散性の評価を行う。結晶化に成功したのに関しては、沈殿剤、pH、添加物、界面活性剤などを振ることで、結晶化条件の精密化を進める。一方で、MATE は疎水性アミノ酸の割合が高く、大半が膜に埋もれた疎水性ヘリックスで構成されていると推測される。結晶化に際し、結晶の分子間パッキングに貢献しうるのは膜から出た親水性領域のみであり、これが高分解能結晶を得ることが困難な原因の一つとなっている。そこで、本研究では MATE に対して特異的に結合する抗体断片 (Fab) を作製し、Fab との共結晶を作成することで、強固なパッキングを持った高分解能結晶を得ることを目指す。構造解析に適した結晶が得られた場合、放射光施設 (SPring-8, PF) にて回折データの収集を行う。さらに MATE の

セレンメチオン置換体結晶を作成して放射光施設にて回折データを測定し、多波長異常分散法による位相決定を行う。

(2) CaCA の X 線結晶構造解析

上記①MATE の戦略と同様に、様々な生物種（特に構造解析例が多い生物種、好熱性細菌を中心に）ゲノムからクローニングを行い、構造解析に適した系の探索を行う。上記①MATE の戦略と同様に結晶化条件の精密化を行う。またさらに、未試行の生物種に関しても①と同様の戦略でスクリーニングを並行して続け、より高分解能の結晶を得ることを目指す。結晶が得られた場合、実験室系や放射光施設 (Spring-8, PF) にて回折データの測定を行う。そして構造解析に十分な質の結晶を得て、上記①MATE の戦略と同様に位相決定・構造決定を目指す。

(3) POT の X 線結晶構造解析

上記①MATE の戦略と同様に、様々な生物種（特に構造解析例が多い生物種、好熱性細菌を中心に）ゲノムからクローニングを行い、構造解析に適した系の探索を行う。上記(1)MATE の戦略と同様に界面活性剤の検討や結晶化条件の精密化を行うことで、構造解析可能な結晶を得る。結晶が得られた場合には、実験室系や放射光施設 (Spring-8, PF) にて回折データの測定を行う。構造解析に十分な質の結晶が得られた系に関しては、上記(1)MATE の戦略と同様に位相決定・構造決定を進める。以上の戦略で POT の構造情報が得られれば、POT がペプチドと H⁺ を共輸送するメカニズムについての作業仮説が構築可能となる。また、細菌 POT とヒト PEPT の配列類似性から PEPT の構造モデルの作成し、従来の PEPT の機能解析データと統合することで、PEPT が薬剤を認識する機構についても、作業仮説を構築することが可能となる。

4. 研究成果

(1) MATE の X 線結晶構造解析

本研究では、最終的に MATE の 2 つの異なる状態の構造と、薬剤ノルフロキサシン誘導体の共結晶構造を最高 2.1 Å という高分解能で解明することに成功した。構造と、構造に基づいた機能解析により、アミノ末端側 (N) lobe に存在する Asp41 残基のプロトン化が膜貫通ヘリックス TM1 の折れ曲がりを誘起することが明らかとなった。そして、このヘリックス TM1 の構造変化が N lobe に存在する基質結合キャビティを押しつぶし、結合した薬剤を細胞外に排出するという能動輸送モデルを提唱した。本研究成果を論文としてまとめ、科学誌 Nature に発表した。

(2) CaCA の X 線結晶構造解析

本研究では最終的に Ca²⁺ と H⁺ を対向輸送する好熱菌由来 CaCA の結晶構造を 2.3 Å 分解能で解明することに成功した。構造は、既に報告されていたメタン古細菌由来 CaCA の外向き開状態とは異なり、内向き開状態をとっていた。また、結晶中には 2 つの異なる状態 (H⁺ 結合前と結合後) と考えられる構造が見いだされた。これらの構造を比較することで、Ca²⁺ と H⁺ が排他的に CaCA に結合し、対向輸送されるメカニズム、さらに、TM1 と TM6 で構成される gating bundle が Ca²⁺ あるいは H⁺ 結合にトリガーされて滑るように動くことで、能動輸送が行われるという輸送メカニズムを提唱した。さらに、生化学実験によりこの輸送メカニズムの検証を行った。本研究成果を論文としてまとめ、科学誌 Science に発表した。

(1) POT の X 線結晶構造解析

本研究では、最終的に細菌由来 POT の結晶構造を 1.9 Å で解明した。またさらに、基質ジペプチドの類似体である alafosfalin との複合体構造を解明した。構造からは、Glu310 がプロトン化サイトの一つであり、さらには基質のカルボキシル基認識サイトとしても重要であることを突き止めた。そして結晶構造に基づいた MD シミュレーションを行い、H⁺ あるいはペプチドの結合が POT の構造変化を誘起するメカニズムを提唱し、その仮説を変異体解析により検証した。本研究成果を論文としてまとめ、米国科学アカデミー紀要に発表した。

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 9 件)

- ① Nishizawa T, Kita S, Maturana AD, Furuya N, Hirata K, Kasuya G, Ogasawara S, Dohmae N, Iwamoto T, Ishitani R[†], Nureki O[†]. Structural Basis for the Counter-Transport Mechanism of a H⁺/Ca²⁺ Exchanger. *Science* (掲載決定) (2013) 査読あり
- ② Doki S, Kato HE, Solcan N, Iwaki M, Koyama M, Iwase N, Tsukazaki T, Hattori M, Sugita Y, Kandori H, Newstead S[†], Ishitani R[†], Nureki O[†]. Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc Natl Acad Sci U S A* (掲載決定) (2013) 査読あり
- ③ Kawaguchi M, Okabe T, Okudaira S, Nishi

masu H, Ishitani R, Kojima H, Nureki O, Aoki J, Nagano T. Screening and X-Ray Crystal Structure-based Optimization of Autotaxin (ENPP2) Inhibitors, Using a Newly Developed Fluorescence Probe. *ACS Chem Biol*, (掲載決定) (2013), 査読あり.

④ Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, Ito K, Kuroda T, Higuchi T, Katoh T, Kato HE, Hattori M, Kumazaki K, Tsukazaki T, Ishitani R, Suga H[†], Nureki O[†]. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* **496**, 247-251 (2013), 査読あり

⑤ Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, Matsumoto N, Nishizawa T, Nakanaga K, Aoki J, Ishitani R, Siomi H, Siomi MC[†], Nureki O[†]. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, **491**, 284-287 (2012), 査読あり

⑥ Koyama M, Nishimasu H, Ishitani R[†], Nureki O[†]. Molecular Dynamics Simulation of Autotaxin: Roles of the Nuclease-like Domain and the Glycan Modification. *J Phys Chem B*, **116** 11798-11808 (2012), 査読あり

⑦ Kobayashi K, Saito K, Ishitani R[†], Ito K, Nureki O[†]. Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex. *Nucleic Acids Res*, **40** 9319-9328 (2012), 査読あり

⑧ Imai S, Maruyama T, Osawa M, Hattori M, Ishitani R, Nureki O, Shimada I[†]. Spatial distribution of cytoplasmic domains of the Mg²⁺-transporter MgtE, in a solution lacking Mg²⁺, revealed by paramagnetic relaxation enhancement. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 1129-1135 (2012), 査読あり

⑨ Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan

C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, Hegemann P, Maturana AD, Ishitani R, Deisseroth K[†], Nureki O[†]. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* **482**, 369-374 (2012), 査読あり

[学会発表] (計3件)

① 石谷隆一郎, Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α complex, XXIV tRNA Conference, 2012年12月02日~2012年12月06日, Olmue, Chile

② 石谷隆一郎, 結晶構造解析と分子動力学シミュレーションから調べるタンパク質のダイナミクス, JSIAM2012, 2012年08月30日~2012年08月30日, 稚内

③ 石谷隆一郎, Structural basis for H⁺-coupled symport mechanism by POT, GRC on Membrane Transport Proteins, 2012年07月01日~2012年07月06日, Les Diablerets Conference Center, Les Diablerets, Switzerland

[その他]

ホームページ等

<http://www.nurekilab.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石谷 隆一郎 (ISHITANI RYUICHIRO)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 90361568