

膜輸送体による基質認識・輸送調節機構の構造基盤の解明

Structural basis for molecular mechanisms of substrate recognition and transport regulation by membrane transporters



濡木 理 (NUREKI OSAMU)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究の概要

膜輸送体タンパク質は、物質を生体内外に輸送することで細胞内の環境を一定に保ち、生命を維持している。本研究では、X線結晶構造解析、分子動力学シミュレーション、構造に基づいて設計した変異体の機能解析を組み合わせることで、各種膜輸送体の輸送駆動機構、基質認識機構、輸送制御機構を原子分解能のレベルで明らかにする。

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：構造生物科学

キーワード：膜輸送体、X線結晶構造解析、計算機科学、電気生理学、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は細胞の内外の境界を決め細胞質を外部環境と異なる状態で維持し、細胞の生存にとって不可欠な役割を果たす。物質を生体内外に輸送することでこの異なる環境を作り出しているのが、膜に埋め込まれた輸送体タンパク質である。膜輸送体は、ゲノムにコードされた遺伝子の約10%を占める重要なタンパク質である。膜タンパク質の結晶化・構造解析は、可溶性タンパク質に比べて著しく困難であり、本研究の研究開始当初も、膜輸送体の構造機能研究はきわめてチャレンジングなテーマであった。

2. 研究の目的

本研究では、膜輸送体による輸送駆動機構、輸送基質の認識機構、輸送制御機構を解明することで、膜輸送体の特異的な物質輸送を適切に行うメカニズムを原子分解能で解明する。

3. 研究の方法

本研究では、カチオン、糖、アミノ酸、薬剤、タンパク質の輸送に働く膜輸送体の立体構造を、X線結晶構造解析で決定し、その動的な構造を分子動力学シミュレーションで解明し、それらの結果機能に重要であることが示唆されたアミノ酸残基に変異を入れた変異体を調製し、遺伝学、分光学、電気生理学などを駆使して、膜輸送体の機能解析を行う。

4. これまでの成果

1. **二価金属イオンの輸送機構**

Mg²⁺輸送体 MgtE の全長構造を 2.9 Å 分解能で決定し、分子動力学シミュレーションにより、細胞内の Mg²⁺濃度に依存してセンサードメインの構造が開閉することを計算機内で再現した。さらに、マグネシウム要求性大腸菌株を用いた遺伝学実験と電気生理学解析により、MgtE は Mg²⁺特異的なチャネルであり、その細胞質ドメインがマグネシウムセンサーとして働くことで、細胞内 Mg²⁺濃度を一定に保つことを世界に先駆けて解明した。Fe²⁺輸送体 FeoB と重金属排出輸送体 CDF に関しては、細胞質ドメインの立体構造を解明し、これらが細胞内金属イオン濃度を検知するセンサーとして働くことを示唆した。また、Mg²⁺排出輸送体 ACDP2 に関しては、細胞質ドメインの構造解析により、細胞内 ATP 濃度に依存して Mg²⁺排出が制御される機構を示唆した。Na⁺と Ca²⁺を対抗輸送する NCX 輸送体に関しては、古細菌ホモログである CaCA の結晶化に初めて成功し、5 Å 分解能のデータを収集している。

2. **物理刺激による輸送制御**

温度センサーである、ヒト由来 TRPV1 の C 末端の TRP ドメインとカルモデュリンの複合体の結晶構造を 2.0 Å 分解能で決定し、カルモデュリンが TRPV1 のカチオン輸送をフィードバック輸送する機構を示唆した。また、酵母の TRP チャネルを

酵母内で大量調製し可溶化することに成功し、結晶化を目指している。

3. **有機物の輸送機構**

糖の輸送とリン酸化をカップルしたグルーブ輸送を行う糖輸送体 PTS に関して、3.8Å分解能を持つ結晶の作成に成功し、構造解析を進めている。また、H⁺あるいはNa⁺と薬剤を対抗輸送し、様々な薬剤の排出に働く（ヒトでは腎臓や脳関門での異物排出に働く）MATE に関して、結晶化に成功し、2.4Å分解能のデータを収集した。現在、位相決定・構造決定を行っている。さらに、H⁺とジペプチド・薬剤を symport し、高等真核生物では小腸でのペプチドの吸収に働いている POT に関して、1.99Å分解能での構造解析に成功した。現在、ジペプチドおよび各種薬剤との複合体の構造解析を進めている。さらに、低分子にとどまらず、細胞質中で合成されたタンパク質を、SecA ATPase モーターに駆動されて、変性状態で細胞膜を輸送し、あるいは膜タンパク質を細胞膜に埋め込む Sec 膜透過因子の構造機能解析を精力的に進めた。まず、タンパク質の膜透過チャネルである SecYE の結晶構造を、特異的抗体との複合体の形で、3.2Å分解能で決定した。これまで報告されていた古細菌の SecYEβが閉構造であったのに対し、我々の構造は、膜貫通ヘリックスが互いに開いて、疎水性の凹みを形成した開構造であった。システインクロスリンク法を用いた生物化学的解析と結晶構造解析・MD シミュレーションにより、SecA が結合すると閉構造から開構造へと構造変化することを突き止めた。さらに、SecA と SecYE のシステインクロスリンクを行い、SecA も SecYE と結合すると開構造となり、ATPase 活性が活性化されることを明らかにした。さらに、SecYE と協働する SecDF に関して、3.3Å分解能での結晶構造を解明した。生化学的解析により、SecDF は、SecA が変性したタンパク質を SecYE に押し込んだ後の、タンパク質膜透過後期過程を、プロトンの濃度勾配のエネルギーを用いて促進する機能を持つことを明らかにした。さらに、システインクロスリンクにより、SecDF の第一ペリプラズムドメインが2つの構造をダイナミックに往復することで、タンパク質を SecYE チャネルから引きずり出すことを明らかにした。さらに、パッチクランプ解析と蛍光分光解析により、SecDF がプロトンを輸送し、これを駆動力としてタンパク質の膜輸送を促進するシャペロンとして働くことを実証し、さらに、プロトン輸送に働くアミノ酸残基を同定することに成功した。

5. 今後の計画

二価金属輸送体に関しては、X 線結晶構造解析および分子動力学シミュレーションと分光学を駆使し、開構造の MgtE に関する知見を得る。また CaCA の結晶構造を、特異的抗体との複合体の形で決定し、対抗輸送の機構を明らかにする。物理刺激による輸送制御に関しては、酵母由来 TRPV1 の結晶構造を解明し、温度を検知してゲートが開閉する機構に関する知見を得る。有機物の輸送機構に関しては、PTS, MATE, POT と輸送基質の複合体の結晶構造解析と変異体の機能解析により、基質認識機構、輸送（制御）機構を解明する。タンパク質膜透過装置に関しては、膜タンパク質の膜組み込みに働く YidC の構造決定、さらに、Sec 膜透過装置として、SecYEG 量体と SecA の複合体、SecYEG と 70S リボソームの複合体の結晶構造解析を推進する。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

1. “Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export” T. Tsukazaki (8名) A. Maturana, K. Ito and O. Nureki *Nature*, *in press* (2011).
2. “Mg²⁺-dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg²⁺ homeostasis” M. Hattori (6名) K. Ito, A. Maturana and O. Nureki *EMBO J.* **28**, 3602-3612 (2009).
3. “Structural basis of novel interactions between the small-GTPase and GDI-like domains in prokaryotic FeoB iron transporter.” M. Hattori (6名) K. Ito and O. Nureki. *Structure* **17**, 1345-1355 (2009).
4. “Crystal structure of the cytosolic domain of the cation diffusion facilitator family protein.” T. Higuchi (3名) O. Nureki. *Proteins* **76**, 768-771 (2009).
5. “Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures” T. Tsukazaki (9名) O. Nureki. *Nature* **455**, 988-991 (2008).
6. “Mg²⁺-sensing mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE probed by molecular dynamics study” R. Ishitani (4名) O. Nureki *Proc. Natl. Acad. USA.* **105**, 15393-15398 (2008).

平成 20 年 日本学術振興会賞 濡木理
平成 21 年 持田記念学術賞 濡木理
平成 22 年 第 18 回木原記念財団学術賞
濡木理
平成 23 年 第 27 回井上学術賞 濡木理

ホームページ等

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