

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔研究進捗評価用〕

平成24年度採択分  
平成27年3月19日現在

膜輸送体の作動機構の構造基盤の解明  
Structural basis for molecular mechanisms of  
membrane transporters

課題番号：24227004

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，生物物理学，生化学，分子生物学

キーワード：チャンネル，トランスポーター，X線結晶構造解析，電気生理学，遺伝学

1. 研究開始当初の背景

膜輸送体タンパク質は、ヒトでは全遺伝子の10%にコードされる、生理学的に極めて重要なタンパク質であるが、試料調製などの問題から立体構造決定は困難であり、これらの理解は世界的にも限られた状況にある。その一方で、我々は真核生物の膜蛋白質を動物細胞にて大量調製する技術、抗体や環状ペプチドといった” binder ”を用いて動的な膜蛋白質の構造を安定化し結晶を改善する技術、脂質中にて結晶化を行うLCP法の技術等、膜蛋白質の高分解能構造解析の基盤を構築し、既に6つの膜輸送体の構造決定を行い先駆的な成果を挙げてきた。

2. 研究の目的

本研究は、現在我々のグループで推進している膜蛋白質の構造生物学という先駆的な研究をさらに発展させ、この生命現象の根幹をなす輸送体について、(A) その機能の本体である「輸送の機構」、(B) 輸送する基質の認識機構、(C) 輸送の制御機構を総合的に理解することを目的とする。

3. 研究の方法

標的である膜輸送体について、1. X線結晶構造解析による構造的基盤の解明、2. 分子動力学(MD)シミュレーションによるダイナミクスの解明、3. in vivo/vitroにおける機能解析による実験的な検証、3つの手法を協奏的に駆使し問題解決を図る。

4. これまでの成果

1. **イオンの輸送機構**

Mg<sup>2+</sup>輸送体 MgtE の膜貫通ドメインと Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>との複合体構造を 2.3, 2.2 Å 分解能で決定し、2 価金属イオンが完全水和状態で輸送されることを初めて明らかにし、アロステリックな遷移金属識別機構を解明した (*Nat. Commun.*, 2014)。また、小胞体イオンバランスに働く TRIC チャンネルの構造を 2.6 Å 分解能で明らかにし、3 量体化することで K<sup>+</sup>輸送が安定化され、脂質で輸送が制御されることを示した。トランスポーターに関しては、Ca<sup>2+</sup>と H<sup>+</sup>を対抗輸送する CAX の構造を 2.3 Å 分解能で決定し、陽イオンの結合に依存して細胞内開口構造と細胞外開口構造を往復する構造変化の基盤を解明した (*Science*, 2013)。さらに、慢性炎症に伴う鉄欠乏性貧血に関わるフェロポーチン (FPN) の原核生物アナログの細胞内・細胞外開口構造を 2.3 Å 分解能で決定し、遷移金属の認識機構、輸送に伴う構造変化の基盤を明らかにするとともに、FPN の輸送活性を抑制するペプチドホルモンであるヘプシジンの作用機序を明らかにした。また、陰イオン輸送体に関しては、硝酸/亜硝酸交換輸送体である NarK に関して、異なる 3 状態の高分解能構造 (2.3-2.4 Å) の決定に成功し、3 本の膜貫通ヘリックスが Gly クラスタで曲がることで状態変化が起こることを解明した。

2. **有機物の輸送機構**

植物からバクテリアまで糖の排出に働く新規ユニポーターである SWEET の構造を、2 つ

の異なる状態で決定することに成功し、“PQ-ループ”モチーフ中のPro残基が丁番の働きをすることで、「洗濯バサミ」のように動いて細胞内開口状態と細胞外開口状態を往復することで輸送を行なうことを明らかにした (*Nat. Commun.*, 2015). また、プロトンの濃度勾配を利用してオリゴペプチドを細胞内に取り込む輸送体 POT の結晶構造を 1.9 Å 分解能で決定し、MDシミュレーションと組み合わせることで、プロトンに依存したペプチドの輸送機構を解明した (*PNAS*, 2013). さらに、 $H^+$ や $Na^+$ の濃度勾配を利用して細胞にとって異物となる多様な物質(薬剤)を細胞外に排出する膜輸送体 MATE と抗生物質および阻害ペプチドとの複合体の構造を 2.1-3.0 Å 分解能で決定し、 $H^+$ の結合に依存して薬剤は排出される仕組みを明らかにするとともに、阻害剤の創出が不可能であった MATE に対するペプチド創薬の道を開いた (*Nature*, 2013). また最近では、新規のアミノ酸排出膜輸送体 YddG の結晶構造を 2.5 Å 分解能で決定し、10本の膜貫通ヘリックスが1つ飛びに並んだ新規なフォールドを持ち、インギンチャクのように透過孔を開閉することを示唆した. さらに、メタボローム解析、リポソーム解析の結果、Thrの輸送に働くことを突き止めた.

### 3. 物理刺激による輸送制御

近年神経科学の分野で、光遺伝学ツールとして盛んに使われている、光駆動型陽イオンチャネルであるチャネルロドプシン (ChR) の結晶構造を 2.3 Å 分解能で決定し、イオン透過孔およびゲーティング機構を明らかにした (*Nature*, 2012). さらに、MDシミュレーションと組み合わせることで、光に駆動されてイオンを透過する機構を示唆することに成功した. これに基づき、ChRのブルーシフト変異体、レッドシフト変異体を作成し、立体構造に基づいて吸収波長がシフトする仕組みをあきらかにしつつあり、より有用な光遺伝学ツールを創出できることが期待される. さらに最近、緑色光で駆動される $Na^+$ ポンプ KR2 の立体構造を 2.3 Å 分解能で決定し、濃度勾配に逆らって $Na^+$ を輸送する機構を原子分解能で解明した (*Nature*, 2015). さらに、KR2が、これまでの光駆動型Cl<sup>-</sup>チャネルやアーケロドプシンと異なり非侵襲的で、ニューロンの発火を長時間にわたって抑制することのできる極めて有用な抑制性の光遺伝学ツールとして使える技術を確認した.

### 5. 今後の計画

これまで多くの輸送体の構造機能解析を行なうことで、普遍的な輸送機構、基質認識機構、輸送制御機構が見えて来た. 今後は、これらのメカニズムをより普遍的な原理に昇華するために、多くのチャネル、トランスポーターの構造機能解析を推進するとともに、

より高次の細胞機能に働く膜蛋白質にも注目して研究を進める.

### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

- H. E. Kato, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, Y. Kato, H. Ono, M. Konno, T. Ishizuka, M. R. Hoque, S. Hososhima, H. Kunitomo, J. Ito, S. Yoshizawa, K. Yamashita, M. Takemoto, T. Nishizawa, R. Taniguchi, K. Kogure, A. D. Maturana, Y. Iino, H. Yawo, R. Ishitani, H. Kandori and O. Nureki\* “Structural basis for  $Na^+$  transport mechanism by a light-driven  $Na^+$  pump” *Nature in press*. (2015).
- Y. Lee, T. Nishizawa, K. Yamashita, R. Ishitani and O. Nureki\* “Structural basis for the facilitative diffusion mechanism by SemiSWEET transporter” *Nat. Commun.* **6**, 6112 (2015).
- “Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions” H. Suzuki, T. Nishizawa, K. Tani, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki\* and Y. Fujiyoshi\* *Science* **344**, 304-307 (2014).
- “Structural basis for Sec-independent membrane protein insertion by YidC” K. Kumazaki, S. Chiba, M. Takemoto, A. Furukawa, K. Nishiyama, Y. Sugano, T. Mori, N. Dohmae, K. Hirata, Y. Nakada-Nakura, A. D. Maturana, Y. Tanaka, H. Mori, Y. Sugita, F. Arisaka, K. Ito, R. Ishitani, T. Tsukazaki and O. Nureki\* *Nature* **509**, 516-520 (2014).
- “Structural basis for the counter-transport mechanism of a  $H^+/Ca^{2+}$  exchanger” T. Nishizawa, S. Kita, A. D. Maturana, N. Furuya, K. Hirata, G. Kasuya, S. Ogasawara, N. Dohmae, T. Iwamoto, R. Ishitani, O. Nureki\* *Science* **341**, 168-172 (2013).
- “Structural basis for the novel mechanism of drug extrusion by a MATE multidrug transporter.” Y. Tanaka, C. J. Hipolito, A. D. Maturana, K. Ito, T. Kuroda, T. Higuchi, T. Katoh, H. E. Kato, M. Hattori, K. Kumazaki, T. Tsukazaki, R. Ishitani, H. Suga and O. Nureki\* *Nature* **496**, 247-251 (2013).
- “Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel” H. E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A. D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth and O. Nureki\* *Nature* **482**, 369-374 (2012).

<受賞>

- 2013年度上原賞 受賞
- 2014年度 武田医学賞 受賞

ホームページ等

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