

## 論文の内容の要旨

### Structural and functional analyses of nitrate transporters (硝酸イオン輸送体の構造・機能解析)

福田 昌弘

#### 【背景・目的】

窒素は核酸やタンパク質など多くの生体物質の構成要素であり、生物の生存に必須の元素である。自然界において窒素は窒素ガス ( $N_2$ ) として最も豊富に存在するがこれは極めて反応性に乏しいため、細菌から高等植物に至る多くの生物は硝酸イオン ( $NO_3^-$ ) や亜硝酸イオン ( $NO_2^-$ ) などの反応性の高い形態で窒素を外界から取り込む。細胞内に取り込まれた  $NO_3^-$  や  $NO_2^-$  は順次還元されてアミノ酸などの生合成に用いられるほか、細菌や真菌では嫌気条件下における硝酸呼吸の呼吸基質としても用いられる。 $NO_3^-$  や  $NO_2^-$  の能動的な細胞内への取り込みおよび細胞外への排出は、主に Nitrate/Nitrite Porter (NNP) family が担っている。NNP family は、古細菌から真正細菌、高等植物まで広く保存されており、細胞膜を介した二次性能動輸送を司る最大のスーパーファミリー Major Facilitator Superfamily (MFS) の一種である。一般に、MFS による輸送過程では、細胞外側に開いている状態 (outward-open state) と細胞内側に開いている状態 (inward-open state) とが、閉状態 (occluded state) を経て両方向的に構造変化する点は共通であるが、各 family の基質選択性や駆動力は多岐に渡る。本研究では、NNP family のうちで特によく研究されてきた大腸菌由来 NarK に着目した。NarK は  $NO_3^-$  あるいは  $NO_2^-$  の細胞膜を介した能動的な輸送に重要な役

割を果たすことは知られていたものの、その基質輸送機構に関しては、 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 対向輸送、 $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ 共輸送、 $\text{NO}_2^-/\text{H}^+$ 対向輸送など諸説あり、議論が続いていた。近年、大腸菌由来 NarK の立体構造が  $\text{NO}_2^-$ 結合型 inward-open state にて報告されたものの (Zheng *et al.*, *Nature*, 2013), 報告された構造は単一の状態のみであり、その基質輸送に伴うダイナミクスへの理解は不十分であった。そこで本研究では、X 線結晶構造解析によって NarK の立体構造を原子レベルで明らかにし、さらに構造情報に基づいた生化学的解析や遺伝学的解析を組み合わせることで、NarK による基質輸送機構の解明を目指した。

### 【方法・結果】

*Escherichia coli* 由来 NarK を GFP との融合タンパクとして大腸菌に発現させ、高純度に精製を行った。脂質キュービック相 (Lipidic Cubic Phase; LCP) 法によって異なる 3 つの結晶化条件から結晶が得られ、水銀由来の異常分散効果を用いた単一重原子同形置換 (SIRAS) 法によって位相を決定し、最終的に 3 種類の NarK の構造を分解能 2.35-2.40 Å で決定した (図 1)。NarK の全体構造は構造既知の他の MFS と同様に 12 本の膜貫通ヘリックス (TM1-TM12) から構成され、N-bundle (TM1-TM6) と C-bundle (TM7-TM12) を形成していた。得られた 3 つのうち 2 つの構造中には、N-bundle と C-bundle の間に三角形型の電子密度が観測された。これは精製過程や結晶化中に含まれる  $\text{NO}_3^-$  とよく一致したことから、この部位が NarK の  $\text{NO}_3^-$  結合部位であると考えられた。またこの部位は、先行研究において明らかとなっていた  $\text{NO}_2^-$  結合

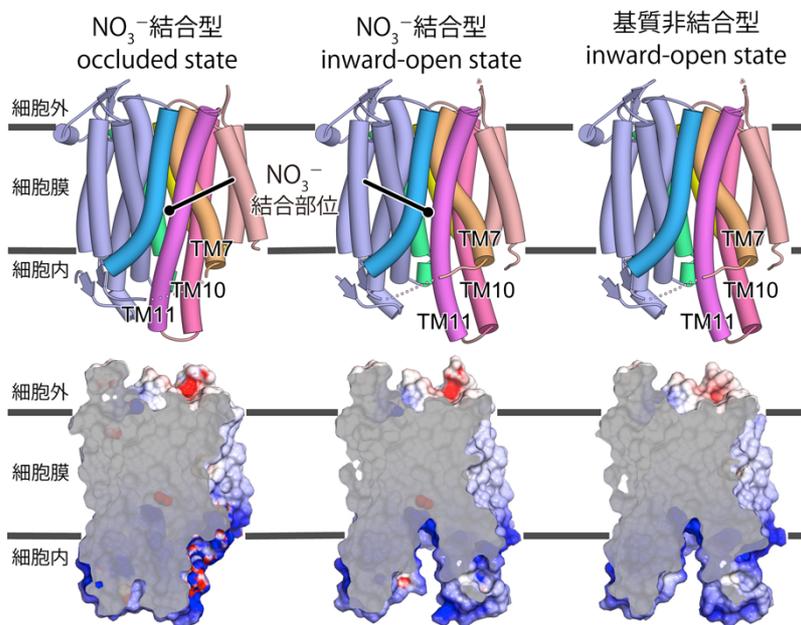


図 1 NarK の全体構造

上段の図において、TM2, TM5, TM7, TM8, TM10, TM11 をそれぞれ水色, 緑, オレンジ, 黄, 濃ピンク, 紫で着色し、残りの TM は、N-bundle はうす青色, C-bundle はうすピンクで表した。下段は細胞膜に対して垂直方向の断面図を表す。

部位と一致したことから, NarK に対して  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  ともに結合可能であるものの, その結合は競合的であることが明らかとなった. 今回得られた3種の構造には, この基質結合部位が細胞内側へ露出している inward-open state と, 細胞内外側ともに閉塞している occluded state の2種類が存在し, それぞれ基質の結合状態と合わせて,  $\text{NO}_3^-$  結合型 occluded state,  $\text{NO}_3^-$  結合型 inward-open state, 基質非結合型 inward-open state と名付けた.

今回得られた occluded state と inward-open state の構造は全体としてはよく重なるものの, 構造的な違いが主に C-bundle に見られた. 具体的には, 他の TM ヘリックスに比べて細胞内側に長く突き出した TM10, TM11 に保存性の高い Gly 残基群を起点とした折れ曲がりが生じており, さらにこれらの TM10, TM11 と接している TM7 にも高度に保存された Gly268 を起点としてわずかな折れ曲がりが見られた (図 2 左). これら TM の折れ曲がりの重要性を検証するために遺伝学的解析を行ったところ (東京大学伊藤耕一博士との共同研究), Gly 残基変異体 NarK を発現させた大腸菌では  $\text{NO}_3^-$  取り込み活性が消失したことから, これらの Gly 残基に起因する TM のフレキシビリティが基質輸送に重要であることが明らかとなった. さらに, occluded state と inward-open state の基質結合部位を比較すると, 基質認識様式に違いが見られた (図 2 右). 具体的には, inward-open state では Tyr263, およびこれと水素結合を形成している Arg305 に N-bundle 側から遠ざかる方向への構造変化が生じている結果, occluded state と比べて基質認識部位の空間体積が増大している上,  $\text{NO}_3^-$  との相互作用様式や  $\text{NO}_3^-$  の配向にも変化が生じていた. Tyr263 は TM7 上に存在しており, この Tyr263 の動きは TM7 の折れ曲がりに由来するものであった. これら基質認識部位の残基の重要性を検証するために遺伝学的解析を行ったところ (東京大学伊藤耕一博士との共同研究), 基質認識残基はすべて  $\text{NO}_3^-$  取り込みに重要であるが, そのうちでも特に Tyr263 と Arg305 が重要であることが明らか

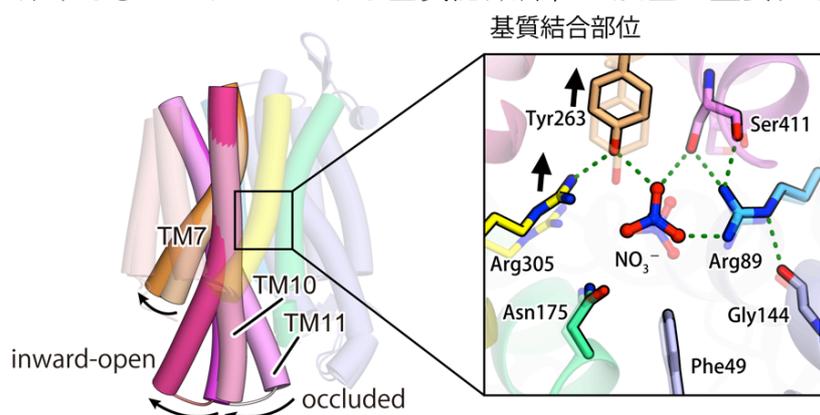


図 2 TM の折れ曲がりと基質結合部位

occluded state を濃色, inward-open state を淡色として重ね合わせた. 右の図中の緑の破線は inward-open state における水素結合を表す.

となった. 以上の結果から, TM ヘリックスの折れ曲がりというグローバルな構造変化は, 基質認識部位の Tyr263 と Arg305 の側鎖のローカルな動きと共役しており, 基質認識様式の変化および基質認識部位の空間体積の増加を生じさせることで NarK の基質へのアフィニティーを低下させ, 細胞内側への基質輸送を促進していることが示唆された.

NarK による輸送機構をさらに詳細に調べるため, 精製した NarK を人工的な脂質二重膜であるリポソームに再構成して,  $\text{NO}_2^-$  特異的に反応する蛍光物質 DAF-FM を用いた  $\text{NO}_2^-$  輸送アッセイを行った. その結果, NarK が  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  対向輸送体であることを *in vitro* で初めて実験的に実証した. また, 分子動力学シミュレーションの結果, occluded state は基質存在下ではシミュレーション時間中で大きな構造変化が起こらない一方で, 基質非結合状態では基質結合部位の 2 つの正電性残基 (Arg89 と Arg305) 同士の静電的な反発のため短時間で構造に変化が生じ, TM10 や TM11 が細胞内側に開く動きが観察された. この結果は NarK が単輸送体としてではなく対向輸送体として働くという仮説を支持するものであった.

### 【総括】

本研究では, NarK が  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  対向輸送体であることを明らかにし, さらに, X線結晶構造解析と生化学的, 遺伝学的解析を組み合わせることで構造変化と基質認識の共役による  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  対向輸送モデルを提唱した (図 3).

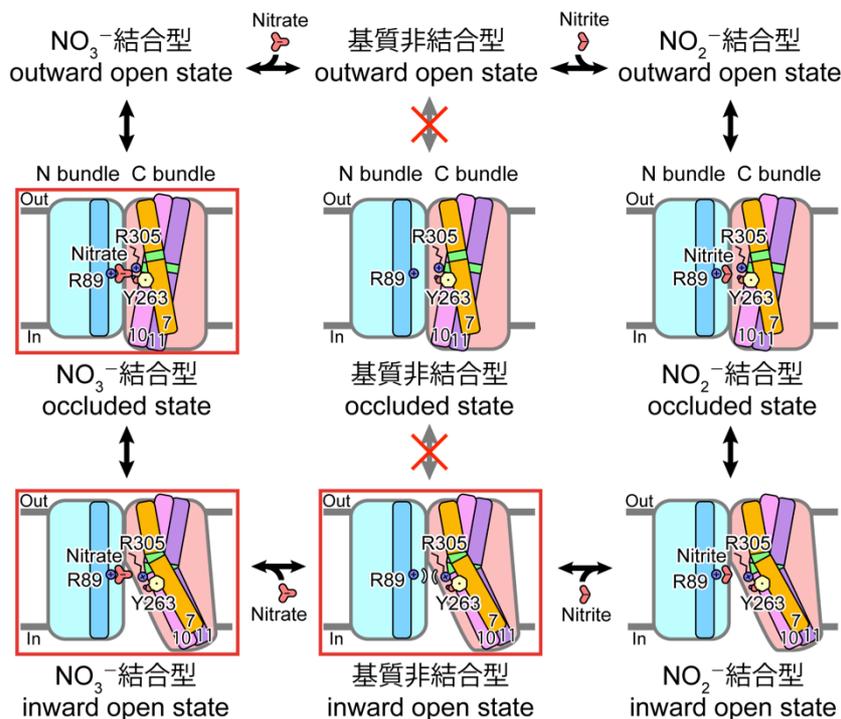


図 3 NarK による  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  対向輸送モデル

図中では, Arg89, Tyr263, Arg305 および輸送基質である  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NO}_2^-$  を模式的に表した. Gly 残基群による TM7, TM10, TM11 の折れ曲がり部位は黄緑色で表した. また, N-bundle と C-bundle はそれぞれうす青色, うすピンクで表した. 今回得られた構造に相当する状態は赤枠で囲んだ.