論文の内容の要旨

論文題目

Structures and dynamics of a MATE multidrug transporter from *Vibrio cholerae*

（*Vibrio cholerae* に由来する多剤排出輸送体 MATE の構造とダイナミクス）

氏名　草木迫　司

細胞にとって有害な異物を細胞内から細胞外へ排出することは，生物に備わった基本的な生体防御機構である．このような生体異物の排出は，多剤排出輸送体とよばれる膜タンパク質によって担われている．Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) トランスポーターは，真正細菌・古細菌から高等真核生物に至るまで広く保存された多剤排出輸送体の一つである．MATE は，細胞膜を介した Na^+または H^+の濃度勾配を利用した対向輸送により，細胞にとっての異物 (主に有機カチオン性化合物や薬剤) を能動的に排出する．そのため，病原性細菌に由来する MATE は多剤耐性菌出現の一因となっており，その基質輸送機構の解明が待ち望まれている．2010 年以降，MATE の生化学的・構造生物学的な研究が急速に進展し，原核生物に由来する MATE の結晶構造が複数報告された．原核生物に由来する MATE の構造は，12 本の膜貫通 (transmembrane; TM) ヘリックスをもち，TM1-TM6 からなる N-lobe と TM7-TM12 からなる C-lobe が擬似的な対称性をもって向き合っているという共通の特徴がある．このような構造的な知見が広がる一方で，H^+駆動型の MATE はどのような構造変化によって基質を輸送するのか，その分子機構についてはこれまで統一的な見解が得られていなかった．そこで本研究では，原核生物に由来する H^+駆動型 MATE ホモログの立体構造を X 線結晶構造解析により原子分解能レベルで明らかにし，さらに構造情報に基づき電子-電子二重共鳴 (Double Electron-Electron Resonance; DEER) 分光法を用いたダイナミクス解析をおこなうことで，H^+駆動型 MATE による基質輸送機構の解明を目指した．

Vibrio cholerae に由来する MATE ホモログタンパク質のうち，H^+駆動型とされる VcmN を構造解析の対象とした．精製した VcmN を脂質キュービック相法により結晶化し，異なる結晶化条件から結晶 I (pH 7.5–8.0) および結晶 II (pH 5.0) を得た．結晶 I および結晶 II から，異なる 2 つの

VcmN の構造をそれぞれ 2.2 Å および 2.5 Å 分解能で決定した. 得られた VcmN の全体構造は, 構造既知の全ての MATE ホモログと同様に, N-lobe (TM1-TM6) と C-lobe (TM7-TM12) からなり, その間隙は細胞外側に開いていた. 結晶 I および結晶 II から得られた構造はよく似ていたが, 結晶 I から得られた構造では TM1 がまっすぐ伸びている一方で, 結晶 II から得られた構造では TM1 が Pro20 を基点として折れ曲がっていた. このことから, 結晶 I および結晶 II から得られた構造をそれぞれ straight form および bent form と名づけた. この TM1 の構造変化は, さきに構造の報告された古細菌 *Pyrococcus furiosus* に由来する H^+駆動型 MATE (PfMATE) においても同様に見られたことから, 古細菌に由来する H^+駆動型 MATE で見られた構造変化が, 真正細菌に由来する H^+駆動型 MATE である VcmN でも起こることが明らかになった. 構造変化の見られた TM1 の細胞外側では, TM1 の Asp35 を含む複数のアミノ酸残基が水素結合ネットワークを形成していたが, その相互作用様式は 2 つの構造で大きく異なることが見出された. 2 つの構造における Asp35 の周囲の環境や結合様式の違いから, straight form では Asp35 は脱プロトン化しており, bent form では Asp35 がプロトン化していることが推測された. これらの知見から, H^+が Asp35 に結合することによって水素結合ネットワークの再編成が起こり, その結果として Asp35 を含む TM1 の細胞外側がタンパク質内部へと引き込まれることで, TM1 の Pro20 を基点とした折れ曲がりが誘起されることが示唆された. VcmN の straight form では, N-lobe 内部に結晶化で使用した脂質モノオレイン分子が疎水性相互作用で結合しており, このモノオレインが VcmN の基質を模していると考えられた. PfMATE においては, 基質結合部位である N-lobe 内部の容積の減少が基質の結合を妨げる役割を果たすことが示唆されている. VcmN と PfMATE で類似の構造変化が見られたことから, この基質輸送機構は VcmN においても保存されていることが示唆された. 以上の結果と, N-lobe の水素結合ネットワークに関わるアミノ酸残基および TM1 の Pro20 の保存性が高いことを合わせて考えると, pH 依存的な N-lobe の水素結合ネットワーク再編成および TM1 の構造変化を伴う基質輸送機構は, 真正細菌および古細菌に由来する H^+駆動型 MATE において保存されていることが示唆された. 次に, 結晶構造から示唆された pH 依存的な TM1 の構造変化を確かめるために, DEER 分光法によるダイナミクス解析をおこなった. その結果, TM1/TM4 および TM1/TM8 に標識したスピン間の距離分布が, 低 pH 条件下でより短い距離にシフトすることが確認された. さらに, 界面活性剤 DDM を含む条件下だけでなく, 水溶液中で脂質二重膜の環境を再現できるナノディスクに VcmN を再構成した条件下でも, 同様の結果が得られた. このことから, 脂質二重膜環境中における VcmN の pH 依存的な TM1 の構造変化が支持された. 結晶構造と DEER 解析から得られた知見を統合して, 真正細菌および古細菌に由来する H^+駆動型の MATE において保存された輸送機構モデルを提唱した.

さらに, VcmN のダイナミクスをより明らかにするために, 細胞外側の TM 端同士・細胞内側の TM 端同士の距離分布を異なる pH 条件下で測定した. その結果, 細胞外側の動的な特徴に対して, 細胞内側は静的であることが示唆された. このことから, 一般的に考えられている MATE が細胞外開状態と細胞内開状態を行き来することで, 基質を細胞内から細胞外へ排出するという従来の輸送サイクルに加えて, 細胞内開状態を経ないもう一つの輸送サイクルが仮説として示唆された.