

論文の内容の要旨

論文題目 : Structural and functional studies of the transporters involved in plant nutrient allocation

(植物の栄養分配に関わる輸送体の構造機能解析)

氏名 李 勇燦

植物がもつ輸送体は、光合成、炭素・窒素代謝、栄養吸収、ストレス耐性、種子形成など、植物の成長、増殖、および環境適応に重要な役割を果たす。特に糖などの炭素化合物を運ぶ輸送体は、光合成や篩管を通じた栄養転流など、植物に特有の機能に関わる。本研究では、これらのプロセスにおいて重要な役割を果たす 2 種類の輸送体、SWEET および TPT に着目し、その分子メカニズムの解明を目指した。論文の第一章では、植物の炭素代謝に関わる輸送体に関して概説し、それらの構造やメカニズムに関して未解明な点を整理した。第二章では、SWEET ファミリーに属する原核生物由来の糖輸送体である SemiSWEET の X 線結晶構造解析および機能解析を行い、その結果について考察した。第三章では、葉緑体からの光合成産物の排出を担うトリオースリン酸/リン酸輸送体の X 線結晶構造解析および機能解析を行い、その結果について考察した。第四章では、研究成果を総括したうえで、最近報告された他の研究との比較を行い、今後の展望について記述した。

SWEET の原核生物ホモログである SemiSWEET の X 線結晶構造解析

SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) ファミリータンパク質は 2010 年に発見された新規な糖輸送体である。SWEET は 7 本の膜貫通 (TM) ヘリックスをもち、その N 末端側、C 末端側の 3 本の TM ドメイン (TM1-3、TM5-7) は、高い配列相同性を示すため、「3-TM リpeat」と呼ばれる。SWEET のこのようなドメイン構成は、12-TM 型のドメイン構造を持つ既知の糖輸送体とは全く異なる。2013 年には SWEET の原核生物

ホモログが発見され、それらは「3-TM リpeat」を一つしか持たないことから SemiSWEET と名付けられた。SemiSWEET は既知の糖輸送体の中では最も小さいが（100 残基程度）、3 本の TM のみで糖輸送体として機能するとは考えにくいため、多量体を形成することで SWEET と同じ構造を取り、機能を果たすと考えられた。しかしながら、SWEET、および SemiSWEET の構造は不明であるため、その糖輸送機構は不明であった。

本研究では、SWEET の原核生物型ホモログである SemiSWEET に着目し、その結晶構造をコンフォメーションの異なる 2 つの状態（内向き開状態、外向き開状態）において 2.0 Å および 3.0 Å 分解能で決定した。結晶構造から、SemiSWEET は二量体を形成し、その二量体の中央に基質結合ポケットを持つことが明らかとなった。ポケット内部には、糖認識タンパク質においてよく見られるトリプトファン残基（Trp50）、アスパラギン残基（Asn66）が保存されており、これらのアミノ酸残基によって糖を認識することが示唆された。これらのアミノ酸残基の変異体を用いてリポソームによる糖輸送アッセイを行ったところ、これらの変異体は糖輸送に大きな影響を与え、このポケットが糖の輸送に重要な役割を果たすことが確認された。基質結合ポケットは、内向き開状態においては細胞内側に、外向き開状態においては細胞外側に開いており、輸送体の構造変化を伴って膜の両側にアクセスすると予想された。両状態の構造を比較すると、内向き開状態では TM1 が約 30° キンクした構造をとっている一方、外向き開状態では TM1 はまっすぐな構造をしていた。キンク部位には高度に保存されたプロリン残基（Pro21）が存在していたことから、このプロリン残基に起因するヘリックスのキンクが構造変化に重要であると考えられた。この仮説は変異体解析によっても支持され、TM1 のキンクは構造変化を引き起こす「ヒンジ」の役割を果たすことが明らかになった。これらの結果に基づき、SemiSWEET および SWEET による糖輸送機構のモデルを提唱した。

トリオースリン酸/リン酸輸送体 (TPT) の X 線結晶構造解析

植物や藻類が持つ葉緑体は、カルビン回路を通じて二酸化炭素を固定し、有機化合物を合成する。葉緑体内で作られた有機化合物は、トリオースリン酸（ジヒドロキシアセトンリン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸）の形で細胞質へと運び出される。この際、葉緑体からのトリオースリン酸の運び出しを担うのはトリオースリン酸/リン酸輸送体 (TPT) とよばれる膜輸送体である。TPT は葉緑体ストロマ内のトリオースリン酸と、細胞質の無機リン酸を交換輸送することで、葉緑体から細胞質へと有機炭素骨格を効率的に運び出すことが出来る。また、TPT はトリオースリン酸と 3-ホスホグリセリン酸の交換輸送反応も触媒することができ、これにより ATP と還元力の間接的な運び出しにも関わる。このように、TPT は光合成代謝において中心的機能を果たしており、1960 年代から詳細な生化学研究がなされてきた。しかしながら、TPT がどのようにトリオースリン酸、3-ホスホグリセリン酸、無機リン酸を認識し、交換輸送を行うのか、その分子機構は不明であった。

本研究では、好熱性紅藻の一種である *Galdieria sulphuraria* 由来の TPT を結晶化し、

その構造を 3-ホスホグリセリン酸、および無機リン酸との結合状態でそれぞれ 2.1 Å、2.2 Å 分解能で決定した。TPT は 10 本の TM からなり、N 末端側の半分 (TM1-5) と C 末端側の半分 (TM6-10) は、二回対称軸で関連付けられる疑似二回対称構造を示していた。このフォールドは近年報告された Drug/Metabolite Transporter スーパーファミリー (DMT) 輸送体である YddG と類似していた。3-ホスホグリセリン酸および無機リン酸は TM1-4、TM6-9 によって囲まれた分子中央の基質結合部位に結合していた。基質結合部位には正電荷を帯びたアルギニン残基 (Arg363)、リジン残基 (Lys204、Lys362) が並んでおり、これらの残基は静電的相互作用によってリン酸基の負電荷を認識していた。また、3-ホスホグリセリン酸が結合した状態の構造では、ポケットの逆側にグリセリン酸基が伸び、ヒスチジン残基 (His185) による追加の相互作用が形成されていた。この結合様式に基づき、トリオースリン酸の結合様式も予測することが出来た。今回の構造では、基質分子はタンパク質内部に閉じ込められており、膜の外側、内側のどちら側からもアクセスできない「閉塞状態」となっていた。基質の結合、放出に必要な構造変化を予測するため、類似のフォールドを持つ DMT 輸送体である YddG の「外向き開状態」との構造比較を行ったところ、TM3、TM4 の傾きによる構造変化が示唆され、この構造変化により基質が外側 (細胞質側) へと露出されることが示唆された。また、TM3、TM4 と疑似二回対称の関係にある TM8、TM9 においても同様の構造変化が起こると予想された。分子動力学シミュレーションによって構造変化を解析したところ、基質の存在下でのみ「閉塞状態」が安定であり、基質の非存在下では「内向き開状態」あるいは「外向き開状態」への構造変化がおこることが観測された。したがって、基質との静電的相互作用が「閉塞状態」への構造変化を誘起することで、「外向き開状態」、「内向き開状態」間の構造変化を可能にしていると考えられた。このような基質依存的な構造変化はあらゆる交換輸送体において共通に見られる機構である。これらの結果に基づき、TPT によるトリオースリン酸/リン酸交換輸送機構のモデルを提唱した。