

博士論文

プロトン駆動性オリゴペプチド輸送体の構造機能解析  
(Structural and biochemical analyses of proton-dependent  
oligopeptide transporter)

平成 26 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

道喜 慎太郎

指導教員 濡木 理



## 要旨

膜輸送体タンパク質はイオンやペプチドなどの小分子を、脂質二重膜を介して輸送を行う。輸送体膜タンパク質の輸送メカニズムの解明には、「基質選択性」や「輸送制御」の理解が必要であり、輸送体膜タンパク質の立体構造の解明が必須である。本研究では、Proton-dependent Oligopeptide Transporter (POT) ファミリータンパク質に着目し、X線結晶構造解析や機能解析、分子動力学シミュレーションなどを用いて、輸送メカニズムの解明を目的とした。

### オリゴペプチド輸送体 POT の構造解析

タンパク質の取り込みは生物が生命活動を維持する上で必須である。POT はプロトンの濃度勾配を輸送駆動力として利用し、タンパク質の主要な消化産物であるジペプチドやトリペプチドの取り込みを行っている。また、POT はペプチドに似た構造をもつ薬剤も基質として輸送する事が知られており、POT の幅広い基質選択性の解明は薬剤設計の分野でも注目されている。本研究では、*Geobacillus kaustophilus* 由来の POT (GkPOT) の高分解能の結晶構造を単体構造と基質アナログである alafosfalin との複合体構造で決定した。今回明らかにした GkPOT の結晶構造は共に Inward-open 状態であった。結晶構造と機能解析により、基質結合部位に存在する Glu310 残基が基質と共輸送されるプロトンの結合部位である事が示唆された。alafosfalin との複合体構造により、alafosfalin の側鎖に保存されている疎水性ポケットや alafosfalin の C 末端にトリペプチドが結合可能な空間が確認された。

### オリゴペプチド輸送体 POT の輸送メカニズムの解明

POT はプロトンの濃度勾配を駆動力としてオリゴペプチドを輸送する共輸送体タンパク質である。共輸送体タンパク質は、プロトンと基質の両方が結合した状態、もしくはどちらも結合していない状態で構造変化が起こり、プロトンと基質が片方だけ結合した状態では構造変化が起こらないように輸送制御されている。しかしながら、これまでの研究で、POT がどのようにしてこのような輸送制御を行っているかは不明のままであった。本研究では、GkPOT の結晶構造を用いた MD シミュレーションにより、Glu310 残基のプロトン化や基質ペプチドの結合が GkPOT の構造変化に与える影響を調べた。その結果、Glu310 残基がプロトン化することで基質ペプチドのカルボキシル基の結合が可能となる。Glu310 が脱プロトン化する事で、基質ペプチドを放出する。脱プロト

ン化した Glu310 が Arg43 と塩橋を形成する事で Inward-open 状態から Occluded 状態に構造変化が可能となる輸送モデルを提唱した.

## **Abstract**

Membrane transporter proteins transport small molecules such as ion and peptide across lipid bilayer membrane. The structural information of membrane transporters is essential to reveal its transport mechanisms including “selective substrates” and “transport control”. In this study, I focused on Proton-dependent Oligopeptide Transporter (POT) family proteins, and tried to reveal its transport mechanisms using X-ray crystal structure, biochemical, and computational analyses

### Structural analysis of oligopeptide transporters POT

The uptake of dietary proteins is essential for organisms to maintain biological activity. POT mediates the uptake of dipeptides and tripeptides, originating from main digestion of dietary proteins, using a proton gradient. In addition to the uptake of peptides, POT is also involved in the uptake of peptide-like drug products as substrate. Therefore, the study of broadly selective substrates of POT family is important in pharmaceutical drug design. In this study, we determine the high-resolution crystal structures of POT from *Geobacillus kaustophilus*. These currently structures are inward-open state in the presence of a dipeptide analog, alafosfalin. The crystal structure and biochemical analyses reveal that the conserved glutamate residue (Glu310) in peptide binding site is proton binding site. This proton is transported with substrate. The crystal structure in complex with alafosfalin suggests additional space of C-terminal side of alafosfalin and hydrophobic pocket near the side chain of substrate.

### Transport mechanism of POT

POTs are symporter proteins to transport oligopeptides using a proton gradient. The structural transition of symporter proteins occurs when both proton and substrate are bound to the symporter, or when none is bound to symporter. In contrast, the structural transition cannot occur when only proton or substrate is bound. However, the question of how POT is coupled to both proton and substrate binding, and transition remains unclear. In this study, we performed MD

simulations, based on the high-resolution crystal structure of GkPOT, to investigate the effect of structural transition that protonated Glu310 and binding of substrate give. Therefore, we propose a symport mechanism of GkPOT. In this mechanism, the protonated Glu310 can bind the carboxyl group of dipeptide. The deprotonation of Glu310 release dipeptide. The salt bridge formation between deprotonated Glu310 and Arg43 induce the structural transition between the inward-open and occluded states.

## 目次

要旨 .....	- 1 -
Abstract.....	- 3 -
目次 .....	- 5 -
略語表 .....	- 7 -
アミノ酸略称 .....	- 8 -
序章 .....	- 9 -
1. 輸送体膜タンパク質 .....	- 9 -
2. Major Facilitator Superfamily (MFS).....	- 10 -
序章の図表 .....	- 12 -
第一章 .....	- 15 -
1.1. 序章 .....	- 15 -
1.1.1. Proton-dependent Oligopeptide Transporter (POT) ファミリー .....	- 15 -
1.1.2. 研究目的 .....	- 16 -
1.2. 材料と方法 .....	- 17 -
1.2.1. GkPOT の調製 .....	- 17 -
1.2.2. LCP 法による GkPOT の結晶化 .....	- 18 -
1.2.3. 回折実験および回折データの解析 .....	- 19 -
1.2.4. 構造決定と精密化 .....	- 20 -
1.2.5. 基質ペプチドや基質アナログとの共結晶化.....	- 21 -
1.2.6. GkPOT の機能解析 .....	- 21 -
1.3. 結果と考察 .....	- 23 -
1.3.1. GkPOT の調製 .....	- 23 -
1.3.2. LCP 法による GkPOT の結晶化 .....	- 23 -
1.3.3. 回折実験 .....	- 23 -
1.3.4. 構造精密化 .....	- 24 -
1.3.5. GkPOT の機能解析 .....	- 24 -
1.3.6. GkPOT の全体構造 .....	- 25 -

1.3.7. GkPOT (SO <sub>4</sub> 型) と GkPOT (free 型) の構造比較 .....	- 26 -
1.3.8. GkPOT (SO <sub>4</sub> 型) と SoPOT, StPOT の構造比較 .....	- 26 -
1.3.9. 基質ペプチドや基質アナログとの共結晶化.....	- 27 -
1.3.10. 回折実験と構造精密化 (2).....	- 28 -
1.3.11. GkPOT (WT) と変異体 GkPOT (E310Q) の構造比較.....	- 29 -
1.3.12. Alafosfalin の認識メカニズム .....	- 29 -
1.3.13. ジペプチド, トリペプチドの認識メカニズム .....	- 31 -
まとめ .....	- 33 -
第一章の図表 .....	- 35 -
第二章 .....	- 69 -
2.1. 序章 .....	- 69 -
2.1.1. 共輸送体の共役輸送メカニズム .....	- 69 -
2.1.2. 研究目的 .....	- 69 -
2.2. 材料と方法 .....	- 70 -
2.2.1. 分子動力学 (MD) シミュレーション .....	- 70 -
2.2.2. 全反射減衰フーリエ変換赤外分光法 (ATR-FTIR).....	- 71 -
2.3. 結果と考察 .....	- 71 -
2.3.1. 基質非存在下での MD シミュレーション .....	- 71 -
2.3.2. ジペプチド存在下での MD シミュレーション .....	- 73 -
2.3.3. ATR-FTIR を用いた GkPOT の動的解析 .....	- 74 -
2.3.4. Arg43 と Glu310 の機能解析 .....	- 75 -
まとめと総括 .....	- 77 -
プロトンとオリゴペプチドの共輸送メカニズム .....	- 77 -
今後の展望 .....	- 77 -
第二章の図表 .....	- 79 -
参考文献 .....	- 93 -



外部発表 ..... - 99 -

謝辞 ..... - 100 -

### 略語表

略称	正式名称
ADA	N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid
AMCA	Aminomethylcoumarin
APBS	Ada ptive Poisson-Boltzmann Solver
ATP	adenosine triphosphate
ATR-FTIR	attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy
cAMP	cyclic AMP
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
DDM	n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GFP	Green Fluorescent Protein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
LCP	Lipidic Cubic Phase
MD	Molecular dynamics
MFS	Major facilitator superfamily
MME	mono methyl ether
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
PAGE	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PDB	Protein Data Bank
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

POT	Proton-dependent Oligopeptide Transporter
RMSD	root mean square deviation
RMSF	root mean square fluctuations
SDS	sodium dodecyl sulfate
SeMet	Selenomethionine
TCDB	Transporter Classification Database
TEV	Tobacco Etch Virus
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethane
2-ME	2-mercaptoethanol

### アミノ酸略称

一文字略	三文字略	正式名称	一文字略	三文字略	正式名称
A	Ala	alanine アラニン	M	Met	methionine メチオニン
C	Cys	cyctein システイン	N	Asn	asparagine アスパラギン
D	Asp	aspartic acid アスパラギン酸	P	Pro	proline プロリン
E	Glu	glutamic acid グルタミン酸	Q	Gln	glutamine グルタミン
F	Phe	phenylalanine フェニルアラニン	R	Arg	arginine アルギニン
G	Gly	glysine グリシン	S	Ser	serine セリン
H	His	histidine ヒスチジン	T	Thr	threonine スレオニン
I	Ile	isoleusine イソロイシン	V	Val	valine バリン
K	Lys	lysine リジン	W	Trp	tryptophan トリプトファン
L	Leu	leucine ロイシン	Y	Tyr	tyrosine チロシン

# 序章

## 1. 輸送体膜タンパク質

細胞は生命の基本単位であり、細胞膜により細胞質と外界を隔離している。細胞膜を構成する脂質分子は、コリンやリン酸基などからなる親水性の頭部と、炭化水素鎖からなる疎水性の尾部を持つ。脂質の尾部は向かい合い、頭部を細胞内外に向けて整列することで脂質二重膜が形成される。尾部によって形成される疎水的領域により、各種イオン、アミノ酸、糖、脂肪酸やビタミンといった低分子化合物などは、大きな極性や電荷をもつため、脂質二重膜を通過することはできない。このような物質の脂質二重膜を越えた輸送には、細胞膜上に埋め込まれた輸送体膜タンパク質が行っている。

輸送体膜タンパク質は、大きく3つに分類される(図 p-1)。1つは、基質を濃度勾配など脂質二重膜の内外で生じる化学ポテンシャルに従って受動的に輸送する膜輸送体タンパク質であり、受動輸送体(チャネル)と呼ばれている。対照的に、基質を化学ポテンシャルに逆らって能動的に輸送する輸送体膜タンパク質を能動輸送体と呼び、基質を輸送するために駆動力を必要とする。能動輸送体は、駆動力の違いにより更に2つに分類される。1つは、光などの物理的エネルギーやATPの加水分解による化学的エネルギーを駆動力として、イオンなどを輸送する一次性能動輸送体(Primary Active Transporter)であり、もう1つは、一次性能動輸送体によって蓄えられたプロトンやナトリウムイオンなどの化学ポテンシャルを駆動力として、小分子を輸送する二次性能動輸送体(Secondary Active Transporter)に分類される。

輸送体膜タンパク質は、細胞内環境を維持するために、基質を正確に選択する「基質選択性」と、必要な時に必要な量だけ基質を輸送する「輸送制御」を持つ。カリウムイオンチャネルであるKcsAは、基質であるカリウムイオンは輸送するが、よりイオン半径の小さいナトリウムイオンは輸送しないことが知られていた。しかしながら、KcsAがどのようにして基質の選択を行っているかは謎であった。1998年にDA. DoyleらによってKcsAの結晶構造が報告され<sup>(1)</sup>、選択フィルターと呼ばれるイオン結合部位の存在が明らかになった。KcsAのイオン結合部位は、カリウムイオンの半径や配位に適した形をとっており、これによりカリウムイオンのみを選択していることが解明された。輸送体膜タンパク質は、必要な時にだけ基質を輸送する事が出来るように、特定の刺激な

どに応じて輸送制御を行っている。この刺激には、カルシウムイオンや cAMP などのセカンドメッセンジャーや pH や基質濃度などの化学刺激、光や圧力、温度などの物理刺激が存在し、輸送制御に関わっている。

輸送体膜タンパク質の輸送メカニズムの解明には、「基質選択性」や「輸送制御」の理解が必要であり、輸送体膜タンパク質の立体構造の解明が必須となる。しかしながら、輸送体を含めた膜タンパク質は、多くの疎水性領域を持ち脂質二重膜中に存在する為、精製するには、界面活性剤を用いた可溶化を行う必要がある。膜タンパク質は界面活性剤中で不安定である事が多く、水溶性タンパク質と比較して、立体構造の解明は困難であると言われている。1985年に Deisenhofer J らによって光合成反応中心が解明されたのが、膜タンパク質の初めて立体構造である<sup>(2)</sup>。2014年11月の時点では、Membrane Proteins of Known 3D Structure (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>) によると、512種類で1563個の膜タンパク質の立体構造が報告されている。一方で、Protein Data Bank (PDB, <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) には同時点で2556個の膜タンパク質の構造が報告されており、膜タンパク質の構造は水溶性タンパク質と比較して未だ限定的であると言える。

しかしながら、1985年以降、膜タンパク質の構造解析に対する技術が蓄積され、ゲノムプロジェクトの進展や放射光施設の発展、解析用ソフトウェアの進歩などにより、膜タンパク質の構造報告数は指数関数的に増加している傾向にあり<sup>(3)</sup>、輸送体膜タンパク質の基質輸送メカニズムに対する理解も進展しつつある。

## 2. Major Facilitator Superfamily (MFS)

Major Facilitator Superfamily (MFS) は古くから存在する輸送体ファミリーであり、1万種以上の輸送体が属している、二次能動輸送体の中で1番大きなファミリーである<sup>(4,5)</sup>。MFSは、イオンや糖、脂質やアミノ酸など広範囲の基質をターゲットとしており、系統解析や基質の特性、輸送メカニズムに基づいて、76個のサブファミリーに分けられている (TCDB; Transporter Classification Database (<http://www.tcdb.org/>))。MFS輸送体の機能について、未だに解明されていないタンパク質が多く存在するが、ラクトース輸送体である LacY のように<sup>(6,7)</sup>、いくつかの MFS 輸送体についてよく研究されている。MFS輸送体は、様々な生物種に広く保存されており、代謝やホメオスタシス、薬剤耐性など、多岐にわたって機能している。

2003年に初めて LacY と GlpT の結晶構造が報告されてから<sup>(8,9)</sup>、現在までに12種

類, 25 個の MFS 輸送体の結晶構造が報告されている (表 1) <sup>(8-19)</sup>. そのうち, 20 個の結晶構造が 2010 年以降に報告されており, 真核生物由来の MFS 輸送体の結晶構造が報告され始めた事からも, MFS 輸送体の輸送メカニズムに関する研究は注目されている. MFS 輸送体は, サブファミリー間においてアミノ酸の配列相動性は低く輸送基質や駆動力も異なるが, どのサブファミリーも N 側の膜貫通ヘリックス 6 本で構成される N 端バンドルと C 側の膜貫通ヘリックス 6 本で構成される C 端バンドルを共通構造として持つ共通のヘリックス配置を持っている. MFS 輸送体の基質結合位置は, N 端バンドルと C 端バンドルの間にある溝に存在し, この溝が細胞外側に開いている Outward-open 状態から, 両側とも閉じている Occluded 状態を経て, 細胞内側に開いている Inward-open 状態へと構造が変化する事で基質を輸送する, alternative access mechanism という輸送メカニズムが提唱されている<sup>(20)</sup> (図 p-2).

## 序章の図表

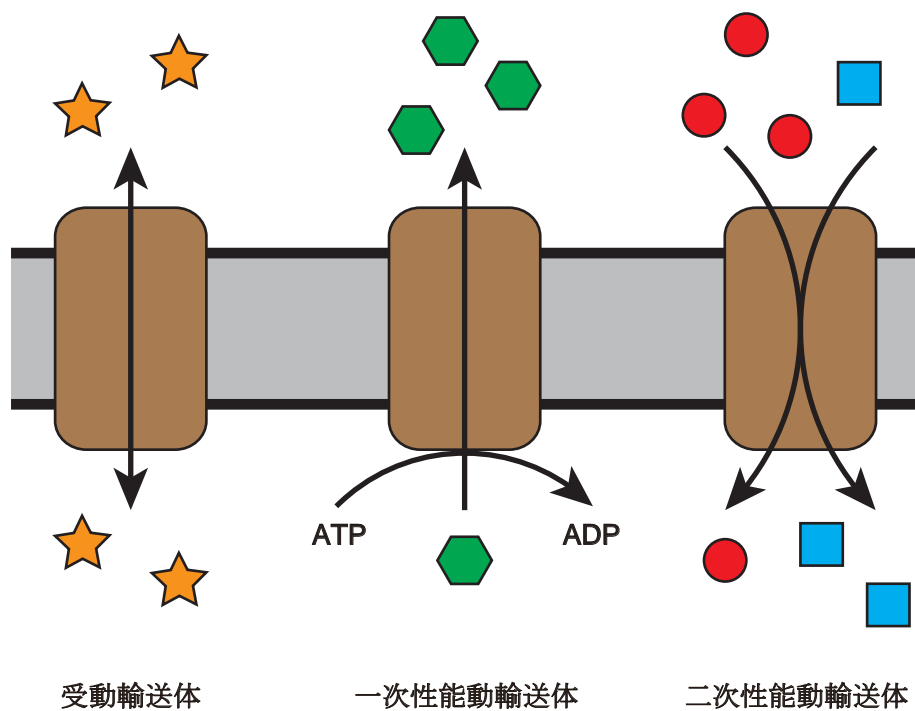


図 p-1 輸送体膜タンパク質の分類

輸送体膜タンパク質は、基質の濃度勾配などに従って輸送する受動輸送体、ATPの加水分解エネルギーなどを利用して基質を輸送する一次性能動輸送体、プロトンなど基質とは異なる物質の濃度勾配を利用して基質を輸送する二次性能動輸送体に分類される。

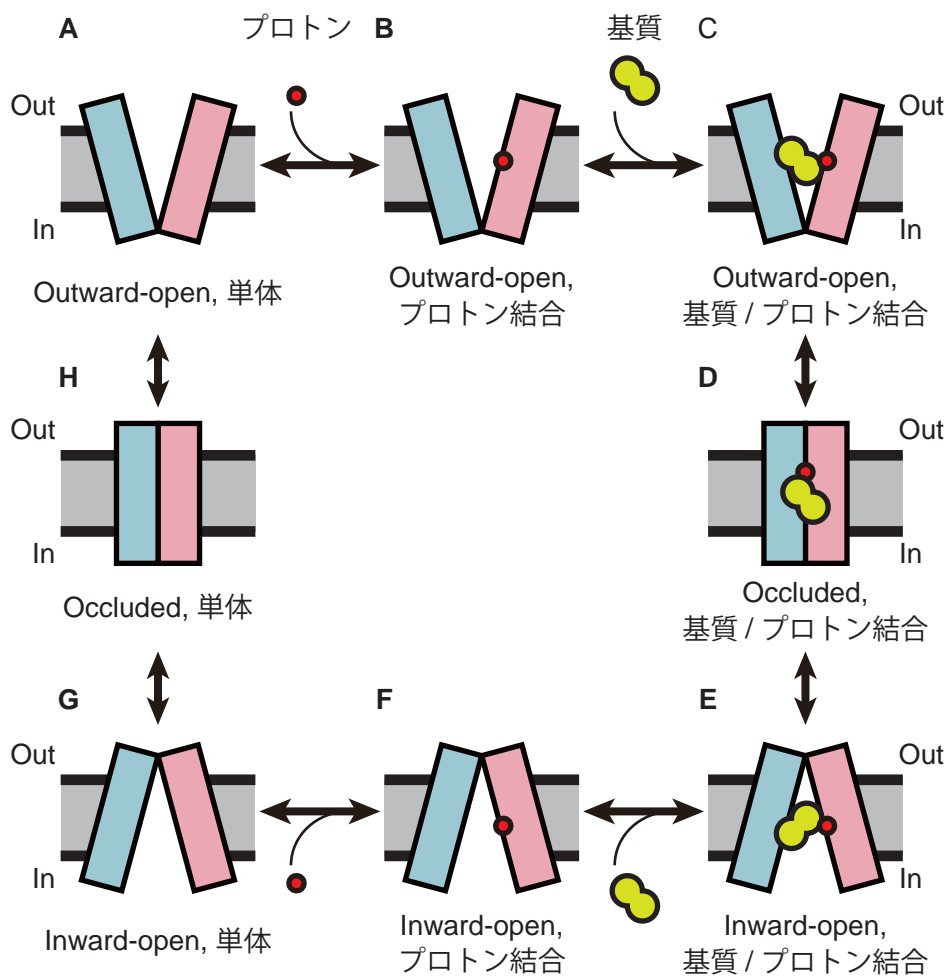


図 p-2 MFS 輸送体の共輸送メカニズムの模式図

A, B, C; Outward-open 状態, E, F, G; Inward-open 状態, D, H; Occluded 状態

MFS 輸送体の N 側を水色, C 側をピンク色, 脂質二重膜を灰色で表し, プロトンを赤色の球, 基質を黄色で示した.

表 1 構造既知の MFS 輸送体

タンパク質名	機能	生物種	論文掲載年
LacY	Lactose:proton symporter	Escherichia coli	2003
GlpT	Glycerol-3-phosphate:Pi antiporter	Escherichia coli	2003
EmrD	Multidrug transporter	Escherichia coli	2006
FucP	L-Fucose:proton symporter	Escherichia coli	2010
POT	Peptide:proton symporter	Shewanella oneidensis	2011
XylE	D-Xylose:proton symporter	Escherichia coli	2012
PiPT	Phosphate:proton symporter	Piriformospora indica	2013
NarU	Nitrate transporter	Escherichia coli	2013
YajR	Drug Efflux transporter	Escherichia coli	2013
GlcP	Glucose:proton symporter	Staphylococcus epidermidis	2013
MelB	Melibiose:Na <sup>+</sup> symporter	Salmonella typhimurium	2014
GLUT1	Glucose transporter	Homo sapiens	2014



# 第一章

## 1.1. 序章

### 1.1.1. Proton-dependent Oligopeptide Transporter (POT) ファミリー

#### POT タンパク質の発見

タンパク質は炭水化物や脂質と並びヒトの三大栄養素の一つであり、タンパク質の取り込みは生物が生命活動を維持する上で必須である。タンパク質の取り込みは、小腸の柔突起で行われるが、この取り込みは長い間、タンパク質がアミノ酸単体に加水分解され、様々なアミノ酸輸送体膜タンパク質が行っていると信じられていた。ところが、1970年代に、小腸での主要なタンパク質の消化産物は、ジペプチドやトリペプチドといったオリゴペプチドであるという研究結果が明らかになり、小腸内にオリゴペプチドの輸送機構があると示唆された<sup>(21)</sup>。それから約20年後、ウサギ<sup>(22)</sup>やヒト<sup>(23)</sup>、マウス<sup>(24)</sup>などの小腸から、オリゴペプチド輸送体のクローニングに成功し、タンパク質の取り込みはオリゴペプチド輸送体膜タンパク質である PepT1 が行っている事が明らかになった。PepT1 は機能的特徴から Proton-dependent Oligopeptide Transporter (POT) ファミリーという新規のファミリーに分類され、POT ファミリーは MFS 輸送体のメンバーに分類された<sup>(25, 26)</sup>。

#### POT タンパク質の基質選択性と輸送制御

POT タンパク質は、細胞膜を介して生じるプロトンの濃度勾配を輸送駆動力として利用し、細胞外にあるオリゴペプチドを細胞内に共輸送する二次能動輸送体である。原核生物からヒトを含めた真核生物まで広く保存されており<sup>(27, 28)</sup>、ヒトが持つ POT タンパク質として、小腸に存在する PepT1 や、腎臓や肺、中枢神経などに存在する PepT2 が知られている<sup>(29)</sup>。PepT1 や PepT2 は、MFS 輸送体と同様に12本の膜貫通ヘリックスを持ち、それぞれ6本の膜貫通ヘリックスから構成されるN端バンドルとC端バンドルが輸送経路を形成すると予測されている<sup>(22, 30)</sup>。POT タンパク質は、アミノ酸の種類に関係なく、ほとんど全てのジペプチドやトリペプチドを輸送する幅広い基質選択性を持っている。それに加えて、βラクタム系の抗生物質である Cefadroxil や抗ウイルス薬である Valacyclovir など、ペプチドに類似した構造を持つ薬剤も基質として輸送する

事が知られている<sup>(31-35)</sup>. このような特徴により, PepT1 は経口投与した薬剤吸収に影響していると考えられており, POT タンパク質の基質選択性や輸送制御に関する研究は注目されている<sup>(36)</sup>.

### **POT タンパク質の立体構造**

PepT1 のもつ基質選択性や輸送制御をより詳細に解明するためには, POT タンパク質の立体構造情報が必要不可欠である. 2007 年に, MFS 輸送体である LacY の構造情報を基にヒト由来 PepT1 の立体構造モデルが作製された<sup>(37)</sup>. しかしながら, ヒト由来の PepT1 と *E.coli* 由来の LacY との配列相同性は低く, 輸送基質もラクトースとオリゴペプチドとで大きく異なることから, POT タンパク質の幅広い基質選択性や輸送制御を予測することは困難であった.

2011 年, POT タンパク質としては最初となる細菌 *Shewanella oneidensis* 由来の POT (SoPOT) の結晶構造が Newstead 博士らによって報告された<sup>(42)</sup>. この報告により, SoPOT は 14 本の膜貫通ヘリックスを持ち, それぞれ 6 本の膜貫通ヘリックスで構成される N 端バンドルと C 端バンドルに加えて, 2 本の付随ヘリックスを持つことが明らかになった. N 端バンドルと C 端バンドルの間には輸送経路と考えられる溝が存在しており, 大まかな基質結合部位も示唆された. その後, 2012 年に乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* 由来の POT (StPOT) の結晶構造が報告された<sup>(38)</sup>. 構造比較や機能解析により, 輸送機能に重要な残基の発見や SoPOT が Inward-open 状態と Occluded 状態の間である Inward-Occluded 状態であり, StPOT が Inward-open 状態であることが明らかになった.

しかしながら, どちらの構造も POT タンパク質単体の立体構造であり, 分解能が 3.6-3.3 Å と不十分であったことから, 基質ペプチドの結合様式やプロトンの結合位置など, POT タンパク質の持つ幅広い基質選択性や輸送制御は依然不明なままであった.

#### **1.1.2. 研究目的**

本研究では, X 線結晶構造解析を用いて, 真正細菌由来 POT の結晶構造を基質との複合体構造として明らかにすることで, POT タンパク質の持つ幅広い基質選択性や輸送制御のメカニズムの解明を目指した.

## 1.2. 材料と方法

当研究室の岩瀬修士, 加藤博士による先行研究により, 7種類の真正細菌由来の POT において発現量と単一性の比較が行われ, 好熱性細菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来の POT (GkPOT) が結晶化に適していると判断された. 精製条件や結晶化条件の検討により, GkPOT の微結晶を得ることには成功していたが, 分解能が 6 Å 程度の回折像しか得られておらず, 立体構造の解明には到らなかった.

そこで本研究では, これらの先行研究に基づき, GkPOT の X 線結晶構造解析を試みた.

### 1.2.1. GkPOT の調製

結晶化に適している判断された GkPOT は, 以下の要領で調整した.

発現用ベクターには pCGFP-BC<sup>(39)</sup>の改変ベクターである pCGFP-BCty を用いた. pCGFP-BCty は, pCGFP-BC のトロンビンプロテアーゼ切断配列を TEV プロテアーゼ切断配列に置換したプラスミドである. これにより, GkPOT 全長を, C 末端 GFP-His8 タグ融合タンパク質として発現させるコンストラクトを構築した. このプラスミドを用いて形質転換させた大腸菌 C41 (DE3) ΔacrB 株 (東京大学 伊藤耕一教授より恵与) を, 50-100 μg/ml のアンピシリンを含む LB 培地を用いて 37°C で培養した. OD<sub>600</sub>=0.4-0.6 になるまで培養した後, 終濃度 0.5 mM となるように IPTG を添加して発現誘導を行い, 20°C に移して 18 時間培養した. 培養した菌体を 5,000 g, 10 分間の遠心分離により収集した後, 懸濁用緩衝液 (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 300 mM NaCl) で再度懸濁した. 以後の精製操作は, 全て氷上または 4°C で行った.

Microfluidizer (Microfluidics, 15,000 psi) を用いて菌体の破碎を行い, 破碎液を 28,000 g, 30 分間の遠心分離にかけて上清を回収した. 超遠心機 Optima™ L-90K (Beckman coulter) を用いて, 上清を 125,000 g, 1 時間の超遠心分離にかけることで膜画分を得た. 疎水性の膜タンパク質を可溶化する為に, 可溶化用緩衝液 (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole-HCl pH 7.0, 3 mM 2-ME, 1 mM PMSF, 3% (w/v) DDM) を膜画分に対して等量加え, 穏やかに 2 時間攪拌した後, 150,000 g, 30 分間の超遠心分離を行うことで不溶性画分を除去した.

C 末端 GFP-His8 タグ融合タンパク質として発現させた GkPOT を, ニッケルアフィニティー精製を行うことで分離した. Ni カラム精製用緩衝液 (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole-HCl pH 7.0, 3 mM 2-ME, 0.03 % (w/v)

DDM) で平衡化済みの樹脂 Ni-NTA Superflow (Qiagen) に可溶化後に超遠心分離した上清を添加し、穏やかに 30 分間攪拌することで GkPOT を樹脂に吸着させた。Ni カラム精製用緩衝液を樹脂の 2 倍量流すことで吸着していない不純物を洗浄し、Ni カラム洗浄用緩衝液 (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazole, 3 mM 2-ME, 0.03 % (w/v) DDM) を樹脂の 10 倍量流すことで、樹脂に非特異的に吸着している不純物を取り除いた。Ni カラム溶出用緩衝液 (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazole-HCl pH 7.0, 3 mM 2-ME, 0.03 % (w/v) DDM) により、樹脂に吸着していた GkPOT を溶出した。溶出タンパク質 1 mg に対して、His<sub>6</sub> タグ融合 TEV プロテアーゼ (当研究室で調製) を 0.1 mg 添加し、透析用緩衝液 (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 150 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM) で 16 時間透析を行いながら、4°C にて GFP-His<sub>8</sub> タグの切断を行った。プロテアーゼ処理したサンプルを透析外液で平衡化した樹脂 Ni-NTA Superflow (Qiagen) に添加し、素通り画分を回収することで切断した GFP-His<sub>8</sub> タグや TEV プロテアーゼを取り除いた。回収した素通り画分を Amicon Ultra-15 (50,000 MWCO) (Millipore) を用いた限外濾過法により濃縮し、液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer 10S (GE Healthcare) を用いて、ゲル濾過用緩衝液 (20 mM HEPES-NaOH pH7.0, 150 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM) で平衡化した Superdex 200 10/300 GL (GE healthcare) を用いて、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。各ステップにおいてサンプルの確認は、全て CBB 染色による SDS-PAGE 分析により行った。

セレノメチオニン (SeMet) 置換体 GkPOT の調製は、メチオニン要求性大腸菌 C41 (DE3) Rosetta Met-株 (東京大学 伊藤耕一教授より恵与) 及び L-セレノメチオニン (ナカライテスク) を含む Core 培地 (和光純薬) を用いた以外は、Native GkPOT と同様の方法で発現、精製を行った。

変異体 GkPOT は、Quick Change 法によりコンストラクトを作製し、GkPOT (WT) と同様の方法で培養、精製を行った。

### 1.2.2. LCP 法による GkPOT の結晶化

GkPOT の濃度は、ExpASY Proteomics Server (<http://web.expasy.org/>) 上の ProtParam tool を使用し、アミノ酸組成から換算した波長 280 nm の光に対するモル吸光係数 ( $=79300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) を基に算出した。精製試料を Amicon Ultra-4 (50,000 MWCO) (Millipore) を用いた限外濾過法により、タンパク質濃度が 10 mg/ml になる

まで濃縮を行い、超遠心機 Optima™ MAX (Beckman coulter) を用いて 72,000 g, 30 分間の超遠心分離を行い、上清を回収して結晶化用タンパク質試料とした。

岩瀬修士，加藤博士らの先行研究では，蒸気拡散法による結晶化が行われており，精製条件の検討や結晶化条件の最適化により分解能が最大 6 Å 程度の回折像しか得られなかった。理由として，GkPOT は大きな親水性領域を持たず，ほとんど膜貫通ヘリックスで構成されていることが考えられる (図 1-1)。膜タンパク質は疎水性である膜貫通領域を持ち，界面活性剤により疎水性領域を覆うことで水溶液中に可溶化されている。結晶の形成は，均一な分子がきれいに整列した産物であり，分子間の相互作用が重要である。親水性領域が少ない GkPOT は，界面活性剤により覆われることで分子間の相互作用が起こりにくく，良質な結晶が得られていないのではないかと考えられる。そこで，膜タンパク質を脂質中へ埋め込んだ状態で結晶化を行う，Lipidic Cubic Phase (LCP) 法による結晶化を試みた。LCP 法は，目的タンパク質をメソ相の脂質に再構成した状態で，結晶化を行う手法であり<sup>(40)</sup>，脂質相へ埋め込むことで，疎水性領域においても分子間の相互作用が可能となり，良質な結晶を得ることができると期待される。再構成には，脂質モノオレイン (Nu-Chek prep) を使用した。

結晶化は以下の手順で行った。42°C で溶解させたモノオレインとタンパク質溶液を 3 : 2 の重量比で混合した。混合の際には gas-tight syringe (Hamilton) 2 本を syringe coupler (アズワン) により連結して使用することで行なった。初期スクリーニングは，結晶化ロボット Mosquito LCP (TTP LabTech) を用いたバッチ法により，20°C で行った。バッチ法は，96 ウェル LCP Screening kit (SWISSCI) に，再構成した LCP を 50~100 nL アプライし，そこへ結晶化試薬を 700~1000 nL 被せた後，96 穴プレートにシールを貼ることで行った。結晶化の初期スクリーニングは JB Screen 1,2,4,5 (Jena Biosciences), MemSys, MemStart, MemGold, MemMeso (Molecular Dimensions) を用いた。

初期スクリーニングで結晶が得られた条件については，沈殿剤の濃度や種類，緩衝液の pH や種類，塩濃度や種類，LCP や結晶化条件の量を変化させることで結晶化条件の最適化を試みた。同時に，添加剤のスクリーニングによる結晶化条件の改良を試みた。添加剤には Additive Screen, SaltRX (Hampton Research) を用いてスクリーニングを行う事で最適な結晶化条件を探索した。

### 1.2.3. 回折実験および回折データの解析

LCP 法で得られた結晶を回収する際、ドロップを挟み込んでいる一方の面を切り開く必要がある。このとき、脂質の流動性を下げたから操作を行わなければ結晶が移動してしまい、回収が不可能となってしまう場合がある。一般的に、結晶化条件中の PEG 濃度を下げることで脂質の流動性を抑えることができる。しかし、PEG の濃度を下げ過ぎると抗凍結効果が失われ、液体窒素で結晶を凍結する際に氷の結晶が生じることがある。そのため、PEG400 の濃度を 20% (v/v)、および 25% (v/v) にした 2 種類の結晶化条件を回収用溶液として作製した。開封前に 20% (v/v) PEG400 の回収用溶液を開けた穴から流し込み、脂質の流動性を低下させた後に開封した。その後、凍結を防ぐため、25% (v/v) PEG400 の回収用溶液を加え、周囲の脂質と共に結晶を回収し、液体窒素にて凍結した。

回折データの収集は、放射光施設 SPring-8 の BL32XU において波長 1.0 Å、カメラ長 190-300 mm、振動角 1.0° の設定で、検出器は MX225HE (Rayonix) を用いて行った。すべての回折データ収集は、X 線照射による結晶への損傷を最小限に抑えるため、窒素ガスによるクライオストリーム条件下にて温度 100 K で行った。

SeMet 置換体 GkPOT の回折データの収集は、Se 原子のピーク波長である 0.97910 Å に変更した以外はネイティブタンパク質と同様に行った。

回折データの指数づけ、積分、スケーリングは HKL2000 (HKL Research), XDS<sup>(41)</sup> を使用した。

#### 1.2.4. 構造決定と精密化

SeMet 置換体 GkPOT から得られた Se 原子のピーク波長の回折データを用いて、単波長異常分散法 (SAD 法) による位相決定を行った。HKL2000 を用いて処理した回折データから、プログラム ShelxC / D<sup>(42)</sup> を利用し、Se 原子の位置を特定した。GkPOT には 16 残基のメチオニンが含まれており、そのうち 14 個の Se 原子位置を特定した (図 1-2, 表 1-1)。得られた Se 原子の位置を基にプログラム SHARP<sup>(43)</sup> を用いた位相計算とプログラム SOLOMON<sup>(44)</sup> を用いた溶媒平滑化を行うことで、図 1-3 に示すような初期電子密度を得た。SoPOT の構造 (PDB ID: 2XUT) を初期モデルとして利用し、可能な限りモデル構築を試みた。その後、プログラム Molrep<sup>(45)</sup> を用いて、ネイティブ結晶から得られた構造因子へ分子置換を行い、モデルの構築・精密化を進めた。手動でのモデル構築にはプログラム Coot<sup>(46)</sup> を、モデルの精密化にはプログラム Phenix<sup>(47)</sup> を用いた。

タンパク質の立体構造の図は、CueMol2 (<http://www.cuemol.org/ja/>) を用いて作成

した。静電ポテンシャルの計算には、PDB2PQR<sup>(48)</sup>と APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver)<sup>(49)</sup>を使用した。

### 1.2.5. 基質ペプチドや基質アナログとの共結晶化

GkPOTの基質選択性を解明する為、基質ペプチドや基質アナログとの複合体構造の解明も試みた。結晶化に使用した化合物を図 1-4 に示す。これらの化合物と結晶化用試料 GkPOT を 4°C で 30 分間以上混合した後、超遠心機 Optima™ MAX (Beckman Coulter) により、72,000 g, 30 分間の超遠心分離を行うことで、不溶性画分やほこりなどのゴミを取り除いた。LCP 法では、乾燥を防ぐために密封状態で結晶化を行う必要がある。その為、ソーキング法による複合体構造の解析は困難であった。そこで、化合物を加えた条件で結晶化することで、複合体の構造解析を試みた。

初期スクリーニングや結晶化条件の最適化は、1.2.2.と同様の方法で行った。

回折データの収集や構造決定は、それぞれ 1.2.3. や 1.2.4.と同様の方法で行った。

### 1.2.6. GkPOT の機能解析

#### 1.2.6.1. $\beta$ -Ala-Lys-AMCA を用いた *in vivo* での輸送活性測定

$\beta$ -Ala-Lys-AMCA はリジン側鎖のイプシロン位置に蛍光基 AMCA を付加したジペプチドである(図 1-4)。 $\beta$ -Ala-Lys-AMCA は POT ファミリータンパク質の輸送基質である事が知られており、POT ファミリータンパク質の輸送活性測定にもよく利用されている<sup>(12)</sup>。GkPOT の輸送活性を調べる為、 $\beta$ -Ala-Lys-AMCA を用いて以下の手順で測定を行った。

GkPOT を 1.2.2.と同様の方法で過剰発現させた大腸菌 C41 (DE3)  $\Delta$ acrB 株を、培養液 5 mL を 6,000 g, 3 分間の遠心分離により収集した。OD<sub>600</sub>=4 になるように測定用緩衝液 (50 mM NaCitrate pH5.0, 300 mM NaCl, 50  $\mu$ M  $\beta$ -Ala-Lys-AMCA) で菌体を再度懸濁し、37°C で 15 分間培養した。6,000 g, 3 分間の遠心分離により菌体を収集し、洗浄用緩衝液 (50 mM NaCitrate pH5.0, 300 mM NaCl) での懸濁と遠心分離による菌体収集を 2 回ずつ繰り返すことで、大腸菌が取り込んでいない外液の  $\beta$ -Ala-Lys-AMCA を取り除いた。プレートリーダー ARVO™ X3 (Perkin Elmer) を用いて、蛍光基 AMCA の蛍光強度(吸収波長 355 nm, 蛍光波長 460 nm)を測定し、大腸菌内部に取り込まれた  $\beta$ -Ala-Lys-AMCA の量を測定した。各測定は 3 回以上繰り返した。

### 1.2.6.2. プロテオリポソームによる *in vitro* での活性測定

プロテオリポソームを用いた機能解析は、オックスフォード大学の Newstead 博士、Nicolae 博士との共同研究により行った。プロテオリポソームを用いた *in vitro* による機能解析を行うことで、目的タンパク質だけの活性を測定することが可能となり、リポソームの内部や外部の測定条件を変更することでより詳細な機能解析を行うことが可能となる<sup>(38)</sup>。

#### プロテオリポソームの作製

プロテオリポソームを以下の手順で作製した。GkPOT 1 mg あたり脂質 E. coli Polar Lipid Extract (Avanti) 50 mg の割合で混合し、20 分間 4°C で攪拌した。タンパク質溶液に含まれている DDM を除く為、緩衝液 (50 mM HEPES-NaOH pH 7.0) を用いて、臨界ミセル濃度以下まで希釈した。超遠心機 Optima L-90K Ultracentrifuge (Beckman coulter) を用いて 125,000 g, 3 時間の超遠心分離を行う事でプロテオリポソーム収集し、液体窒素による凍結・融解を 5 回繰り返した。

#### プロトン駆動による輸送活性測定

プロテオリポソームを超遠心機 Optima™ L-90K (Beckman coulter) を用いて 125,000 g, 3 時間の超遠心分離を行う事で、リポソーム外液を取り除いた。内部緩衝液 (120 mM HEPES-KOH pH 7.0, 2 mM MgSO<sub>4</sub>) に懸濁し、Mini-Extruder (Avanti, 0.03 μm) に通すことでプロテオリポソームのサイズを均一にした。再度、超遠心分離を行い、外部緩衝液 (120 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 μM Valinomycin, 2 μM <sup>3</sup>H-AlaAla) に懸濁し、25°C で 5 分間振盪した。ニトロセルロース膜フィルター (Millipore, 0.22 μm) にプロテオリポソームを吸着させ、冷やした 100 mM LiCl 溶液を用いて 2 回洗浄する事で、リポソーム外液にある放射性ジペプチド <sup>3</sup>H-AlaAla を取り除いた。測定は、液体シンチレーションカウンター LSC5100 (ALOKA) を使用した。各測定は 3 回以上繰り返した。

#### 基質ペプチドの交換活性測定

内部緩衝液を (50 mM MES-NaOH pH 6.5, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM AlaAla), 外部緩衝液 (50 mM MES-NaOH pH 6.5, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 μM <sup>3</sup>H-AlaAla) に変更した以外は、プロトン駆動による輸送活性測定と同様の方法で測定した。



### 1.3. 結果と考察

#### 1.3.1. GkPOT の調製

GkPOT について、7.5 L スケールで大量培養及び精製を行った。ゲル濾過クロマトグラフィーでの単一ピークから得られた最終収量は、1 L 培養量あたりおよそ 0.5 mg であった。ゲル濾過精製におけるクロマトグラムと CBB 染色によるゲル濾過精製後の SDS-PAGE 分析結果を図 1-5 に示す。

SeMet 置換体においては、同様の精製手順を行う事で、最終収量が 1 L 培養あたり約 0.2 mg であった。

変異体 GkPOT は、GkPOT (WT) と同様の方法で培養・精製を行った。

#### 1.3.2. LCP 法による GkPOT の結晶化

初期スクリーニングの結果、以下の条件で予備的な結晶を得ることに成功した。

- 100 mM NaCl, 120 mM Tris-HCl pH9.4, 20% (v/v) PEG400 (MemGold #63)
- 300 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM ADA-NaOH pH6.5, 30% (v/v) PEG400 (Memstart #23)
- 100 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM HEPES-NaOH pH7.0, 40% (v/v) PEG200 (MemMeso #A10)
- 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM Tris-HCl pH8.0, 30% (v/v) PEG400 (MemMeso #D12)

結晶を改善する為、塩濃度や種類、緩衝液の pH や種類、沈殿剤の濃度や種類を変化させた。同時に、Additive Screen, SaltRX (Hampton Research) を用いた添加剤のスクリーニングも行った。以下に良質な結晶を得られた結晶化条件を示す。

A; 300 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 38% (v/v) PEG400, 30 mM SrCl<sub>2</sub>

B; 160 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM ADA-NaOH pH6.5, 40% (v/v) PEG400, 4 mM SrCl<sub>2</sub>

位相決定を行う為、SeMet 置換体 GkPOT についても同様の方法で結晶化を行い、Native GkPOT と似たような条件で良質な結晶が得られた。

C; 120-300 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM ADA-NaOH pH6.5, 30% (v/v) PEG400, 4 mM SrCl<sub>2</sub>

結晶は 3 日程度で出現し、7 日程度で成長した。各条件の結晶写真を図 1-6-1 に示す。

#### 1.3.3. 回折実験

前述の方法により得られた結晶の中で、回折実験を行うことが可能な大きさの結晶に関して、回折実験を行った。その結果、条件 A, B で得られた結晶から、それぞれ分解能 2 Å 程度、1° 振りで 360 枚分のデータセットの測定に成功した。一方、条件 C で得られた SeMet 置換体 GkPOT の結晶から、Se 原子のピーク波長 0.97910 Å において、分解能 3.2 Å 程度、1° 振りで 1080 枚分のデータセットの測定に成功した。

回折像は図 1-7-1 に示した。

#### 1.3.4. 構造精密化

得られたデータセットを用いて、SoPOT の構造をサーチモデルとした分子置換法を行ったが、解を得ることが出来なかった。そこで、SeMet 置換体 GkPOT を用いた単波長異常分散法 (SAD 法) により位相決定を行った。SoPOT の構造を参考にモデル構築を行い、Coot および Phenix を用いて精密化を行った。その後、ネイティブ結晶から得られた条件 A のデータセットに分子置換を行い、引き続き精密化を行った。

条件 B のデータセットは、条件 A により決定した GkPOT の結晶構造をサーチモデルとした分子置換法により位相決定を行い、Coot および Phenix を用いて精密化を行った。

各構造の解析結果の統計値を表 1-2, 1-3, 1-4 に、最終モデルのラマチャンドラプロット<sup>(50, 51)</sup>を図 1-8-1 に、crystal packing を図 1-8-2 に示した。

#### 1.3.5. GkPOT の機能解析

##### 1.3.5.1. $\beta$ -Ala-Lys-AMCA を用いた輸送活性測定

GkPOT を発現させた大腸菌は、発現させてない大腸菌と比較して蛍光強度が増加し、プロトンのイオノファアである CCCP を加えると蛍光強度が減少した (図 1-9 A, B)。この結果から、GkPOT はプロトンの濃度勾配を駆動力として、 $\beta$ -Ala-Lys-AMCA を基質ペプチドとして細胞内に輸送することが確認された。ジペプチド(Ala)<sub>2</sub> やトリペプチド(Ala)<sub>3</sub>、テトラペプチド(Ala)<sub>4</sub> の輸送能を確認する為、 $\beta$ -Ala-Lys-AMCA を用いた競争阻害測定を行った (図 1-9 B)。この結果から、GkPOT は他の POT タンパク質と同様に、ペプチドの長さを識別し、ジペプチドとトリペプチドを基質として輸送することが明らかになった。それぞれの変異体 GkPOT の輸送活性測定の結果を図 1-9 C に示した。GkPOT (WT) の蛍光強度を基準として、それぞれ変異体の蛍光強度を割合で示した。

### 1.3.5.2. プロテオリポソームによる $^3\text{H}-(\text{Ala})_2$ を用いた輸送活性測定

プロテオリポソームの内部にカリウムイオン, 外部にナトリウムイオンが存在する条件でプロテオリポソームを作製し, カリウムイオンのイオノフォアである Valinomycin を加えることで, プロテオリポソーム内外で電位差を生じさせた. その後, プロテオリポソーム外に放射性ジペプチド  $^3\text{H}-(\text{Ala})_2$  を加えることで, GkPOT が電位差を輸送駆動力として  $^3\text{H}-(\text{Ala})_2$  の輸送活性を測定した (図 1-10 A).

放射性ジペプチド  $^3\text{H}-(\text{Ala})_2$  に対する競争阻害測定を行った結果を図 1-10 B に示し, それぞれの変異体 GkPOT の輸送活性測定の結果を図 1-10 C に示した. その結果, 1.3.6.1.と同様に, アラニンやテトラペプチド以上のペプチドでは, 放射性ジペプチド  $^3\text{H}-(\text{Ala})_2$  に対する競争阻害は起こらなかった. また, GkPOT はトリペプチドよりジペプチドの方が輸送能は高く, D 体のジペプチドは輸送しないことが明らかになった. ジペプチドの種類に対しても選択性が観測され, alafosfalin や  $(\text{Phe})_2$  は輸送するが,  $(\text{Lys})_2$  や  $(\text{Glu})_2$  は輸送しにくいことが明らかになった.

### 1.3.5.3. プロテオリポソームによる $^3\text{H}-(\text{Ala})_2$ を用いた基質交換活性測定

基質交換活性は, プロテオリポソームを内部に cold の  $(\text{Ala})_2$  が存在する条件で作製し, 外部に放射性ジペプチド  $^3\text{H}-(\text{Ala})_2$  を加えることで, GkPOT が cold の  $(\text{Ala})_2$  と  $^3\text{H}-(\text{Ala})_2$  の交換活性を測定した (図 1-11 A).

それぞれの変異体 GkPOT の基質交換活性の結果を図 1-11 B に示した.

## 1.3.6. GkPOT の全体構造

GkPOT は 14 本の膜貫通ヘリックスを持つ V 字型構造の輸送体である事が分かった (図 1-12). GkPOT の構造は, N 末側のヘリックス 6 本から成る N 端バンドル (H1-H6) と C 末側のヘリックス 6 本から成る C 端バンドル (H7-H12), これらを繋ぐ 2 本の付随ヘリックス (HA, HB) で構成されていた. N 端バンドルと C 端バンドルは擬二回対称の関係にあり, 界面に位置するヘリックス (H1, H2, H4, H5, H7, H8, H10, H11) が GkPOT の中心に親水性の大きな溝を形成していた. この溝は細胞外側が閉じており, 細胞内側に開いていることから, GkPOT の構造は Inward-open 状態であると考えられる.

条件 A により得られた構造では, この溝の内部に正四面体状の電子密度が観測され

た (図 1-13). 電子密度の大きさや形状, 結晶化条件に 300 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> が含まれていることから, この電子密度は硫酸イオンによるものだと考えられる. 一方, 結晶化条件に 160 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> が含まれている条件 B で得られた構造では, 溝の内部に硫酸イオンの電子密度は観測されなかった (図 1-14). 硫酸イオンが 200 mM 以上の条件で得られた結晶構造において, この電子密度が観測されたことから, 硫酸イオンであると考えられる.

以降, 条件 A の構造を GkPOT (SO<sub>4</sub>型), 条件 B の構造を GkPOT (free 型) と表記する.

### 1.3.7. GkPOT (SO<sub>4</sub>型) と GkPOT (free 型) の構造比較

GkPOT (SO<sub>4</sub>型) と GkPOT (free 型) の構造を比較する為, 構造の重ね合わせを行った. その結果, HA の傾きや H1 に存在する Arg43 残基と H2 に存在する Tyr78 残基の側鎖の向きに違いが観測された (図 1-15). GkPOT (SO<sub>4</sub>型) では, この 2 つの残基は硫酸イオンと水素結合を形成しているのに対して, GkPOT (free 型) では, どちらの残基も相互作用を形成していなかった. 一方, 全 492 アミノ酸残基の C $\alpha$ 原子について RMSD 値を計算すると 1.03 Å であり, 主鎖構造やほとんどの側鎖構造に変化は観測されず, どちらの構造も Inward-open 状態であった.

### 1.3.8. GkPOT (SO<sub>4</sub>型) と SoPOT, StPOT の構造比較

POT タンパク質は, 先行研究により SoPOT (PDB ID: 2XUT)<sup>(12)</sup> と StPOT (PDB ID: 4APS)<sup>(38)</sup> の 2 つの結晶構造が報告されていた. それぞれ GkPOT とのアミノ酸配列を比較すると, 配列同一性はそれぞれ 26% (SoPOT) と 46% (StPOT) であった (図 1-16). GkPOT (SO<sub>4</sub>型) と 2 つの構造を比較する為, 構造の重ね合わせを行った (図 1-17). その結果, GkPOT の構造は SoPOT より StPOT の構造に似ており, それぞれの RMSD 値を計算すると SoPOT は 311 アミノ酸残基の C $\alpha$ 原子について 2.2 Å であり, StPOT は 407 アミノ酸残基の C $\alpha$ 原子について 1.7 Å であった. N 端バンドルや C 端バンドルのヘリックス配置はどちらの構造ともよく似ており, 親水性の溝を形成しているアミノ酸残基は POT ファミリー間で良く保存されていた (図 1-18). 一方, 細胞内のヘリックスループや HA に違いが見られた. SoPOT の HA は HB の近くに位置していたのに対して, GkPOT や StPOT の HA は HB と離れて N 端バンドルの近くに位置していた. GkPOT や SoPOT について, HA やその周辺領域の B-factor は高く, 動きやすいこと

が示唆された。いくつかの POT タンパク質や他の MFS 輸送体では、この領域が長いループに置換されており、輸送メカニズムには直接関与していないと考えられる。

GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) で確認された硫酸イオンは、POT ファミリー間で良く保存されていた親水性の溝に存在していた。この親水性の溝は、SoPOT や StPOT において、基質結合部位と示唆されている。それゆえ、この硫酸イオンが基質ペプチドの C 端カルボキシル基を模倣している可能性が考えられる。硫酸イオンは基質結合部位を形成している Glu310 残基の側鎖カルボキシル基の近傍に位置しており、この Glu310 残基は、POT ファミリータンパク質間でよく保存されている (図 1-16)。この硫酸イオンの酸素原子と Glu310 側鎖のカルボキシル基の距離が 2.7 Å で水素結合を形成しており (図 1-13)、硫酸イオンの pKa 値が低いことを考えると、Glu310 側鎖のカルボキシル基は水素結合を形成する為にプロトン化されている可能性が示唆された。

### 1.3.9. 基質ペプチドや基質アナログとの共結晶化

Glu310 側鎖のカルボキシル基がプロトン化部位である可能性を検証するため、プロトン化した Glu310 残基を模倣している変異体 GkPOT (E310Q) の結晶構造の解明を試みた。また、GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) の結晶構造において、Glu310 残基が基質ペプチドの C 端カルボキシル基を模倣していると考えられる硫酸イオンを認識していた。そこで、詳細な基質認識メカニズムを解明する為、基質ペプチドに加えて、(Ala)<sub>2</sub> の C 端カルボキシル基をリン酸基に置換した alafosfalin やスルホ基を持つ taurine などの基質アナログ (図 1-4) との複合体構造の解明を試みた。複合体の構造解析は、GkPOT (WT) と変異体 GkPOT (E310Q) の両方で行った。その結果、多くの条件において結晶を得ることに成功し、結晶化条件の最適化により以下の条件において良質な結晶を得た。

(a); 375 mM (Ala)<sub>2</sub> 添加, GkPOT (WT)

240 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 36% PEG400

(b); 40 mM (Leu)<sub>2</sub> 添加, GkPOT (WT)

200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 36% PEG400

(c); 30 mM (Phe)<sub>2</sub> 添加, GkPOT (WT)

120 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM ADA-NaOH pH 6.5, 39% PEG400

(d); 520 mM Ala-Lys 添加, 変異体 GkPOT (E310Q)

40 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM ADA-NaOH pH 6.5, 41% PEG400

(e); 100 mM Lys-Ala 添加, GkPOT (WT)

200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 33% PEG550MME

(f); 1mM  $\beta$ -Ala-Lys-(AMCA)添加, GkPOT (WT)

280 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 100 mM ADA-NaOH pH6.5, 40% (v/v) PEG400, 4 mM  $\text{SrCl}_2$

(g); 500 mM Alafosfalin 添加, 変異体 GkPOT (E310Q)

200 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 100 mM ADA-NaOH pH 6.5, 40% PEG400

(h); 520 mM Alafosfalin 添加, 変異体 GkPOT (E310Q)

300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 26% PEG400

(i); 229 mM AMPA 添加, 変異体 GkPOT (E310Q)

200 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 100 mM ADA-NaOH pH 6.5, 41% PEG400

(j); 294 mM Taurine 添加, 変異体 GkPOT (E310Q)

200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 31% PEG400

(k); 変異体 GkPOT (E310Q)

150 mM  $(\text{Ala})_2$ , 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 32% PEG400

(l); GkPOT (WT)

75 mM  $(\text{Ala})_2$ , 200 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 100 mM ADA-NaOH pH 6.5, 34% PEG400

各条件の結晶写真を図 1-6-2 に示す.

### 1.3.10. 回折実験と構造精密化 (2)

1.3.9.により得られた結晶について, 1.3.3.と同様に回折実験を行い, それぞれの結晶からデータセットの測定に成功した. 得られたデータセットについて, GkPOT ( $\text{SO}_4$ 型) の結晶構造をサーチモデルとした分子置換法により位相決定を行い, 構造の精密化を行った.

その結果, 条件(h)から得られた変異体 GkPOT (E310Q) の結晶構造は, 分解能 2.4 Å で決定し, 基質アナログである alafosfalin と思われる電子密度が基質結合部位に確認された (図 1-19). 一方, それ以外の条件で得られた結晶構造については, 基質ペプチド (基質アナログ) と思われる電子密度は観測されず GkPOT 単体の結晶構造であった. 変異体 GkPOT (E310Q) の結晶構造は, GkPOT (WT) と同様に, 基質結合部位に硫酸イオンの電子密度が観測される構造と, 何も電子密度が観測されない構造が得られた. それぞれ条件(g), (d)から得られた結晶構造の分解能が一番高かった.

今後、条件(h)から得られた alafosfalin との複合体構造を GkPOT (E310Q, alafos 型)、条件(g)から得られた硫酸イオンとの複合体構造を GkPOT (E310Q, SO<sub>4</sub>型)、条件(d)から得られた単体構造を GkPOT (E310Q, free 型)と表記する。

回折像は図 1-7-2 に、各構造の解析結果の統計値を表 1-5, 1-6 に、最終モデルのラマチャンドラプロットを図 1-8-1 に示した。

### 1.3.11. GkPOT (WT) と変異体 GkPOT (E310Q) の構造比較

1.3.10.で明らかにした変異体 GkPOT (E310Q)の結晶構造には、基質結合部位に硫酸イオンが確認された GkPOT (E310Q, SO<sub>4</sub>型) の構造と、電子密度が確認されなかった GkPOT (E310Q, free 型) の構造がある。そこで、GkPOT (WT) の結晶構造と比較する為、構造の重ね合わせを行った (図 1-20)。その結果、全 492 アミノ酸残基の C $\alpha$ 原子についての RMSD 値はそれぞれ 0.24 Å (SO<sub>4</sub>型) と 0.48 Å (free 型) であり、全体構造や側鎖の位置に変化は観測されなかった。

GkPOT (E310Q, SO<sub>4</sub>型) の構造では、GkPOT (SO<sub>4</sub>型) と同様に、Gln310 残基の側鎖アミド基が硫酸イオンと水素結合を形成していた。Gln 残基はプロトン化した Glu 残基の中性電荷を模倣しており、Glu310 残基を Gln へ置換した変異体 GkPOT (E310Q) においても基質結合部位の周辺構造に変化が観測されなかった。これは、GkPOT (WT) においても基質結合部位の周辺は中性電荷環境であり、Glu310 残基がプロトン化していることを示唆している。

### 1.3.12. Alafosfalin の認識メカニズム

1.3.10.により変異体 GkPOT (E310Q) と基質アナログ alafosfalin との複合体の結晶構造、GkPOT (E310Q, alafos 型) が明らかになった。alafosfalin は POT タンパク質の基質として輸送されることが知られており<sup>(52-54)</sup>、GkPOT においても放射性ジペプチド <sup>3</sup>H-(Ala)<sub>2</sub> に対して競争阻害が起こることが確認された (図 1-10)。その為、alafosfalin は GkPOT においても基質ジペプチドと同様に認識されていると考えられる。GkPOT (E310Q, alafos 型) と GkPOT (SO<sub>4</sub>型) の構造を比較する為、構造の重ね合わせを行った。その結果、全 492 アミノ酸残基の C $\alpha$ 原子に対する RMSD 値は 0.37 Å であり、全体構造にほとんど違いは観測されなかった。基質結合部位には、alafosfalin の電子密度が観測され、ジペプチドの C 端カルボキシル基に相当する alafosfalin のリン酸基が GkPOT (SO<sub>4</sub>型) で観測された硫酸イオンと同様の位置に存在していた (図 1-13, 1-21)。

alafosfalin のリン酸基は, Gln310 残基の側鎖アミド基と Arg43 残基の側鎖グアニジウム基, Tyr40 残基や Tyr78 残基の側鎖ヒドロキシル基に認識されており, 基質ジペプチドの C 端カルボキシル基がプロトン化した Glu310 残基を含めたこれらの残基に認識されることを示唆している. 一方, alafosfalin の主鎖のカルボニル基は, リン酸基の認識にも関与している Tyr40 残基の側鎖ヒドロキシル基に認識されていた. また, Tyr40 残基の側鎖ヒドロキシル基は, Arg36 残基の側鎖グアニジウム基との水素結合ネットワークの形成にも関与していた. alafosfalin の N 端のアミノ基は, Asn342 残基と Glu413 残基に認識されていた.

alafosfalin の認識に関与していた残基の重要性を調べる為, 大腸菌を用いた *in vivo* による輸送活性測定とプロテオリポソームを用いた *in vitro* による輸送活性測定, 基質交換活性測定を行った (図 1-9, 1-10, 1-11). 基質ジペプチドの C 端カルボキシル基に相当するリン酸基の認識に関与していた Tyr40 残基を Ala に置換した変異体では, 輸送活性と基質交換活性が共に著しく低下した. これは, Tyr40 残基が基質ジペプチドの C 端認識に重要であることを示唆している. Arg36 残基を Ala に置換した変異体においても, 輸送活性と基質交換活性が共に著しく低下した. これは, Arg36 残基が基質認識に関与する Tyr40 残基の固定化に重要である可能性を示唆している. 先行研究である StPOT において, GkPOT の Tyr40 残基に相当する Tyr 残基を Phe 残基に置換した変異体の輸送活性測定が行われており, Phe 残基に置換した変異体の輸送活性測定の低下が観測されている<sup>(38)</sup>. また, Arg36 残基や Tyr40 残基は, POT ファミリーにおいてよく保存されている ExxERFxYY モチーフを形成している残基であり (図 1-16), このモチーフは基質ペプチドの輸送に必要不可欠だと言われている<sup>(27, 38)</sup>. この結果からも, Tyr40 残基の側鎖ヒドロキシル基による基質認識や Arg36 残基との水素結合ネットワークの重要性が示唆される. Arg43 残基を Gln に置換した変異体では, 輸送活性が低下したのに対して基質交換活性では低下が見られなかった. これは, Arg43 残基が基質ペプチドの認識ではなく, 基質を輸送する際の構造変化に重要な残基である可能性が示唆される. Glu310 残基を Gln に置換した変異体では, 輸送活性と基質交換活性が共に著しく低下した. Glu310 残基がプロトンの結合部位であること, プロトン化を模倣した Gln310 残基が alafosfalin を認識していたことから, Inward-open 状態で基質を結合する際には Glu310 残基にプロトンが結合し, それ以外の状態では Glu310 残基は脱プロトン化している可能性が示唆される.

一方, alafosfalin の N 端のアミノ基は, H8 にある Asn342 残基と H10 にある Glu413



残基に認識されていた。Asn342 残基を Ala や Gln に置換した変異体において輸送活性や基質交換活性を測定したところ、共に低下は見られなかった。対照的に、Glu413 残基を Gln に置換した変異体では、輸送活性と基質交換活性が共に著しく低下した。Glu413 残基は、全ての POT タンパク質において、H10 の同様の位置に保存されており (図 1-16)、これまでの研究においても Glu413 残基の重要性は報告されていた<sup>(55)</sup>。これらの結果から、GkPOT の構造が Inward-open 状態から Occluded 状態へと構造変化することで、Glu413 残基が基質ペプチドの N 端アミノ基を直接認識する可能性が示唆された。

### 1.3.13. ジペプチド, トリペプチドの認識メカニズム

今回の研究で、GkPOT (E310Q, alafos 型) の結晶構造を解明したことにより、基質ペプチドであるジペプチドやトリペプチドの結合様式を示唆することが可能になる。

これまでの研究により、POT タンパク質はかさの高い側鎖や疎水性の側鎖を持つジペプチドを他のジペプチドより選択的に輸送することが知られていた<sup>(38, 56)</sup>。そこで、GkPOT の基質選択性を調べる為に、プロテオリポソームを用いた輸送活性測定を行った。その結果、他の POT タンパク質と同様に、GkPOT は(Glu)<sub>2</sub>や(Lys)<sub>2</sub>などの荷電性側鎖をもつジペプチドより、(Phe)<sub>2</sub> や(Ala)<sub>2</sub>などのかさの高い側鎖、または疎水性側鎖を持つジペプチドを選択的に輸送することが明らかになった (図 1-10)。GkPOT の分子表面を表示すると、alafosfalin の側鎖メチル基の周辺にいくつかの溝が観測された (図 1-22)。POT ファミリーにおいて保存されている Tyr78 残基や Trp306 残基、Trp440 残基が形成する疎水性ポケットが、alafosfalin の C 側の側鎖メチル基周辺に位置していた。疎水性ポケットを壊すと考えられる Tyr78 残基や Trp306 残基を Ala へ置換した変異体について輸送活性測定を行ったところ、輸送活性が著しく低下した (図 1-10)。対照的に、疎水性ポケットを維持すると考えられる Tyr78 残基を Phe へ置換した変異体では、輸送活性の低下は見られなかった (図 1-10)。これらの結果から、疎水性ポケットが基質ペプチドの C 側の側鎖の認識に重要であると考えられる。

また、GkPOT は他の POT タンパク質と同様に、トリペプチドも基質として輸送するが、テトラペプチドは輸送できない (図 1-9, 1-10)。GkPOT (E310Q, alafos 型)の構造では、alafosfalin のリン酸基周辺に空間が存在していた (図 1-22)。この空間がトリペプチドの認識に関与することが考えられ、図 1-23 に示すような結合様式モデルを作製した。

GkPOT (E310Q, alafos 型)の構造には, 上記に述べた溝や空間に加えて, Asn166 残基や Gln309 残基, Asn342 残基, Glu413 残基の周辺に小さな空間が確認された (図 1-22). これらの空間は GkPOT が Inward-open 状態から Occluded 状態へ構造変化することで消滅し, これらの残基が基質ペプチドの主鎖の認識に関与する可能性が考えられる. Asn166 残基を Ala に置換した変異体では, 輸送活性と基質交換活性が共に低下しており, Asn166 残基が基質の輸送に重要であり, Occluded 状態での基質ペプチドの認識に関与している可能性を示唆している.

## まとめ

本研究では、好熱性細菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来の POT (GkPOT) の発現、精製に成功し、GkPOT 単体の結晶構造を分解能 1.9-2.3 Å で決定し、基質アナログである alafosfalin との複合体構造を 2.4 Å で決定することに成功した。基質結合部位に硫酸イオンが結合している GkPOT (SO<sub>4</sub>型) の結晶構造により、基質結合部位を形成している Glu310 残基がプロトン化部位であることが示唆された。Glu310 残基のプロトン化を模倣した変異体 GkPOT (E310Q) の結晶構造の解明により、変異体 GkPOT (E310Q) の基質結合部位の周辺構造は GkPOT (WT) と比較しても変化はなく、基質結合部位の周辺は中性電荷環境にあり、Glu310 残基がプロトン化部位であることが強く示唆された。基質アナログである alafosfalin との複合体構造 GkPOT (E310Q, alafos 型) の解明と機能解析により、基質ペプチドの認識に重要な残基が明らかになった。プロトン化部位である Glu310 残基や Tyr40 残基は、基質ジペプチドの C 末端カルボキシル基の認識に重要であり、Glu310 残基のプロトン化・脱プロトン化の変化が基質の輸送に重要である可能性が示唆された。また、alafosfalin の C 端のリン酸基を認識していた Arg43 残基は基質認識以外の構造変化に重要である可能性が考えられた。一方、N 末端のアミノ基の認識には Glu413 残基が重要である可能性が示唆された。Tyr78 残基と Trp306 残基、Trp440 残基が形成する疎水性ポケットが C 末側の側鎖認識に関与しており、Asn166 残基や Gln309 残基、Asn342 残基、Glu413 残基が Occluded 状態の時に、基質ジペプチドの主鎖認識に関与している可能性が示唆された。GkPOT (E310Q, alafos 型) の結晶構造を解明した後、StPOT とジペプチド Ala-Phe との複合体構造が 2014 年に報告された<sup>(67)</sup>。その結果、ジペプチド Ala-Phe の結合様式が明らかになり、GkPOT で観測された alafosfalin の結合様式と一致していた。GkPOT において基質認識に重要だと示唆された残基は、StPOT においても良く保存されており、残基の位置や配向などもほとんど同じであったことから、重要性は強く支持されていると考えられる。

本研究により、プロトンの結合位置や基質ペプチドの結合様式、C 端カルボキシル基や N 端アミノ基の認識メカニズムは明らかになった。しかしながら、側鎖の認識メカニズムや薬剤などの基質アナログの認識メカニズムなど不明な点が多くある。本研究により、POT ファミリーにおいて保存性の高い疎水性ポケットの存在は明らかになったが、生物種で異なる基質ペプチドの選択性と POT 構造の相関は依然不明なままである。また、ヒト由来の POT である PepT1 と PepT2 では、基質ペプチドの選択性と基質選

択の正確性に違いがあると言われている<sup>(36)</sup>. それらの理解の向上には, 様々な基質ペプチドや基質アナログとの複合体構造の解明や真核生物由来の POT の恒常情報が重要であり, 今後の研究が期待される.

# 第一章の図表

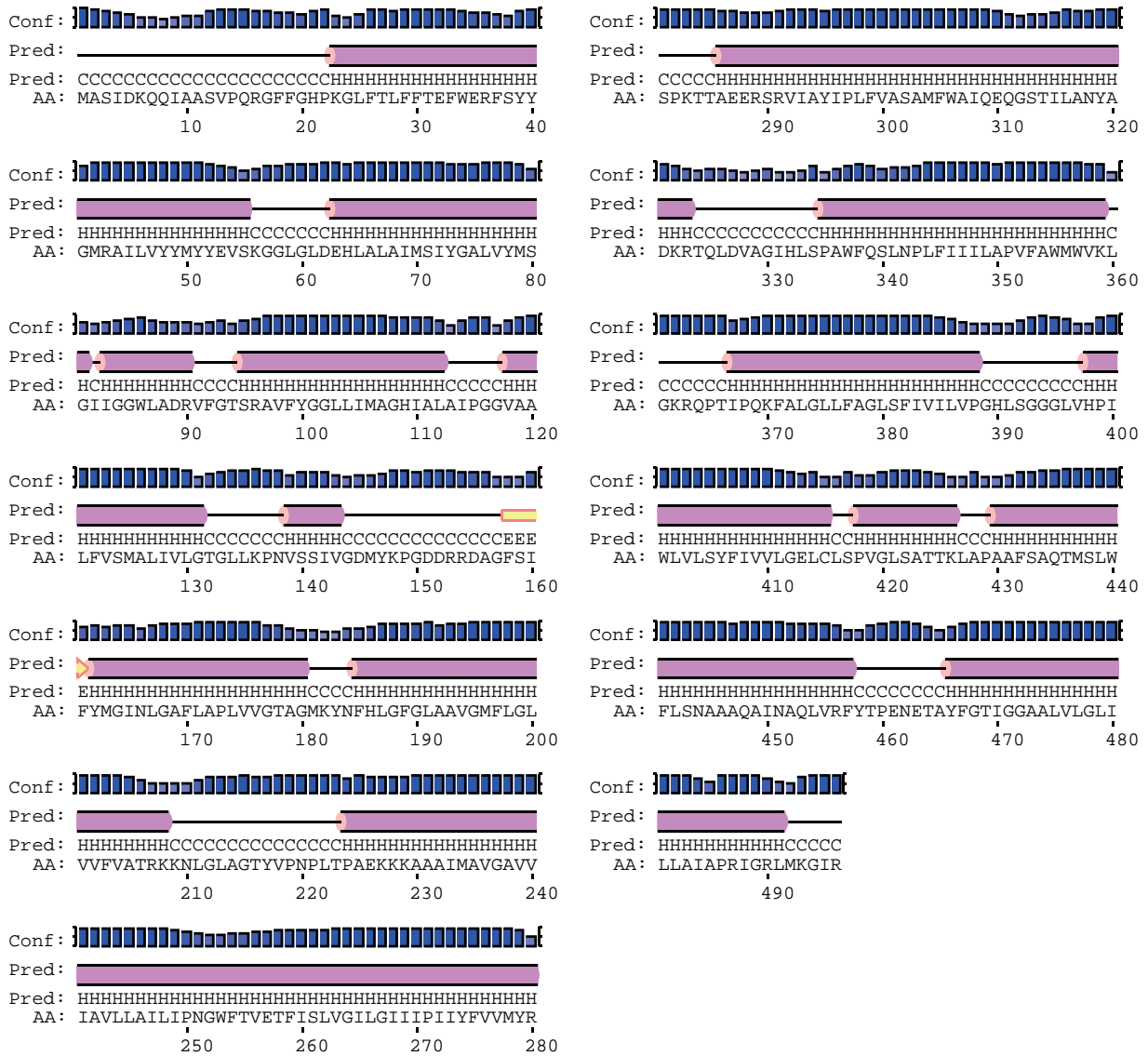


図 1-1 GkPOT の二次構造予測

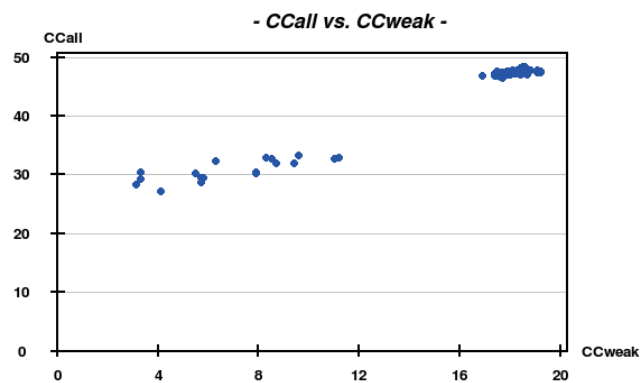
二次構造予測には、PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) を用いた。

Conf は予測結果の信頼性を示し、棒グラフが高いほど信頼性も高い。

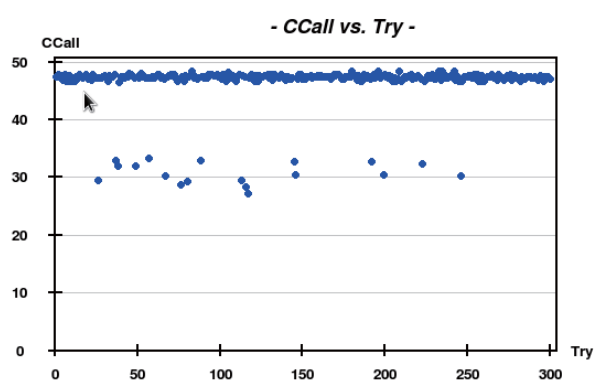
Pred は二次構造を示し、ヘリックス構造をピンク色、ストランド構造を黄色矢印で示した。

AA はアミノ酸配列を示す。

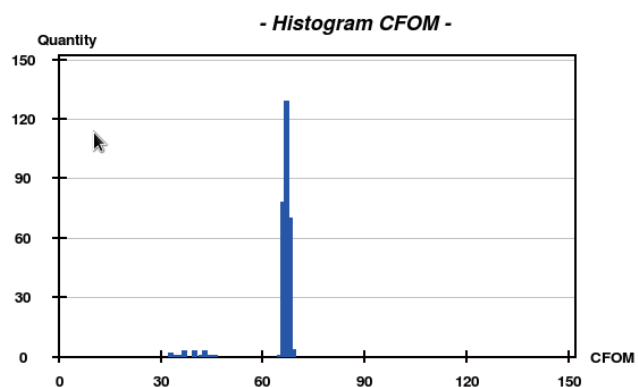
A



B



C



D

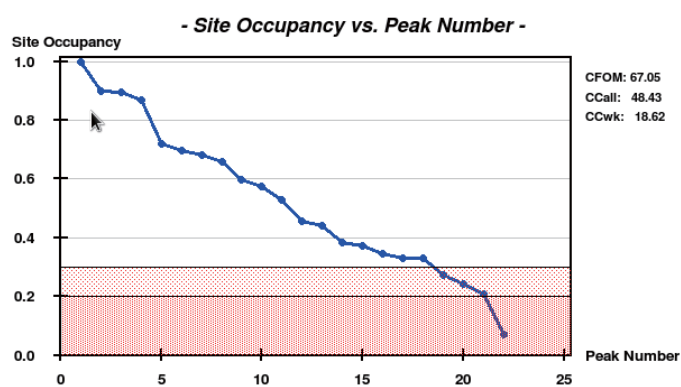


図 1-2 SeMet 置換体 GkPOT 結晶の回折データを用いた SHELXD の処理結果

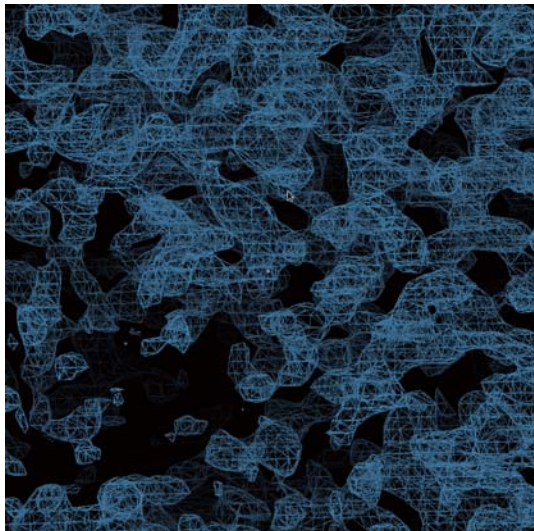
A; CCall vs CCweak.

B; CCall vs Try.

C; Histogram CFOM.

D; Site Occupancy vs Peak Number.

A



B



C

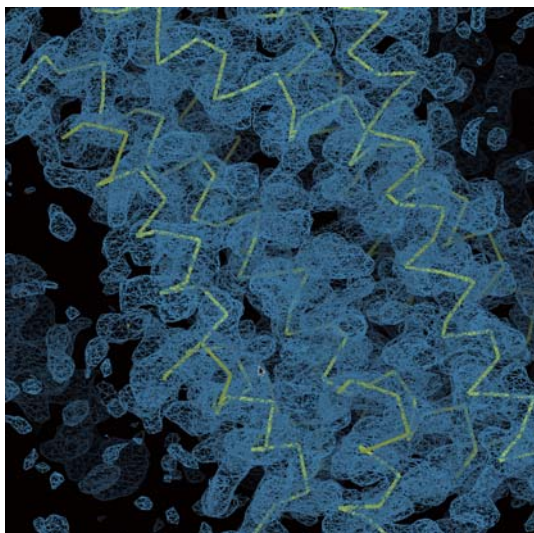


図 1-3 GkPOT の初期電子密度

A: SeMet 置換体 GkPOT の SHARP による初期位相マップ

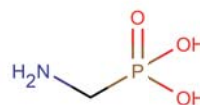
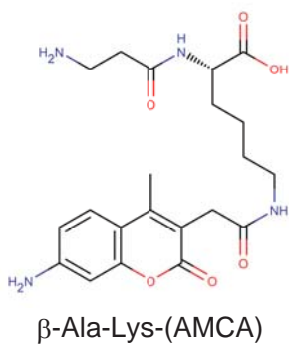
B: SOLOMON による溶媒平滑化後の電子密度マップ

C: Native 結晶へ分子置換後の電子密度とモデル構造 (黄色)  
電子密度は Contour level = 1.0  $\sigma$  で示した.

### ジペプチド・トリペプチド

- H-L-Ala-L-Ala-OH ((Ala)<sub>2</sub> と表記)
- H-L-Leu-L-Leu-OH ((Leu)<sub>2</sub> と表記)
- H-L-Phe-L-Phe-OH ((Phe)<sub>2</sub> と表記)
- H-L-Ala-L-Lys-OH (Ala-Lys と表記)
- H-L-Lys-L-Ala-OH (Lys-Ala と表記)
- H-L-Ala-L-Ala-L-Ala-OH ((Ala)<sub>3</sub> と表記)

### 基質ペプチドアナログ



(Aminomethyl) phosphonic acid

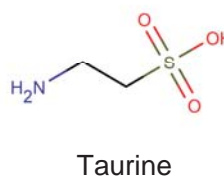
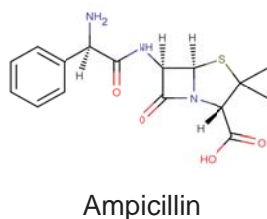


図 1-4 GkPOT との共結晶化に用いた基質ペプチド，基質アナログ



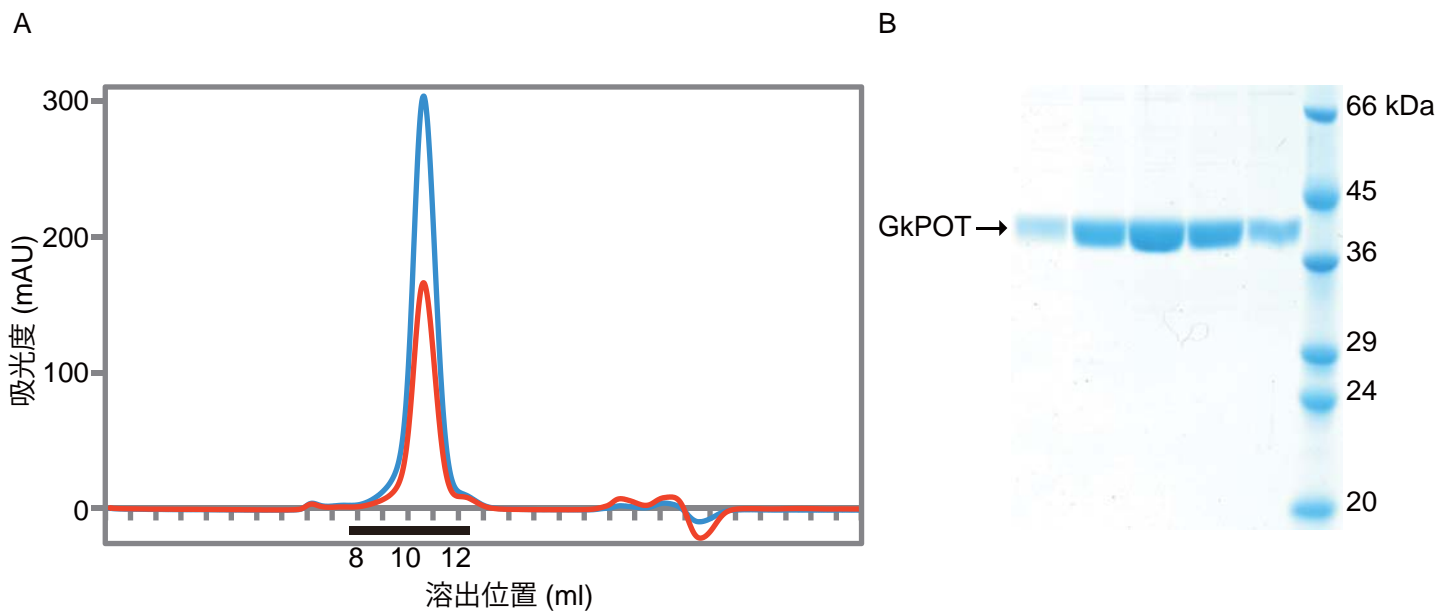
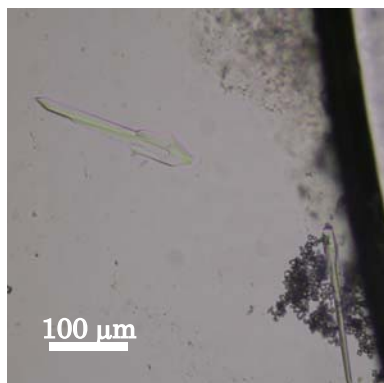


図 1-5 A; GkPOT の精製結果

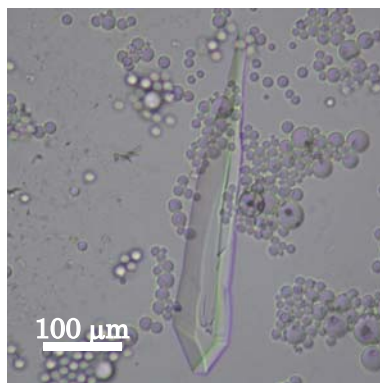
A; Superdex 200 10/300 のクロマトグラム. 280 nm の吸光度を青線, 260 nm の吸光度を赤線で示した. SDS-PAGE 検出した領域を黒線で示した.

B; ゲル濾過精製後 GkPOT の SDS-PAGE 検出結果.

A



B



C

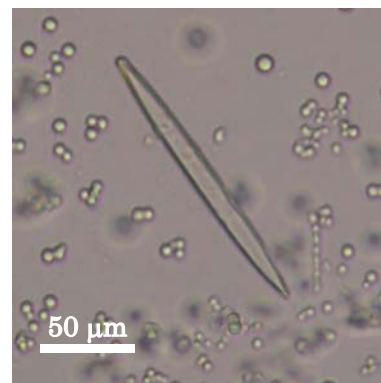


図 1-6-1 GkPOT の結晶

A, B; GkPOT (WT) 結晶

C; SeMet 置換体 GkPOT 結晶

結晶化条件は本文中記号と一致している.

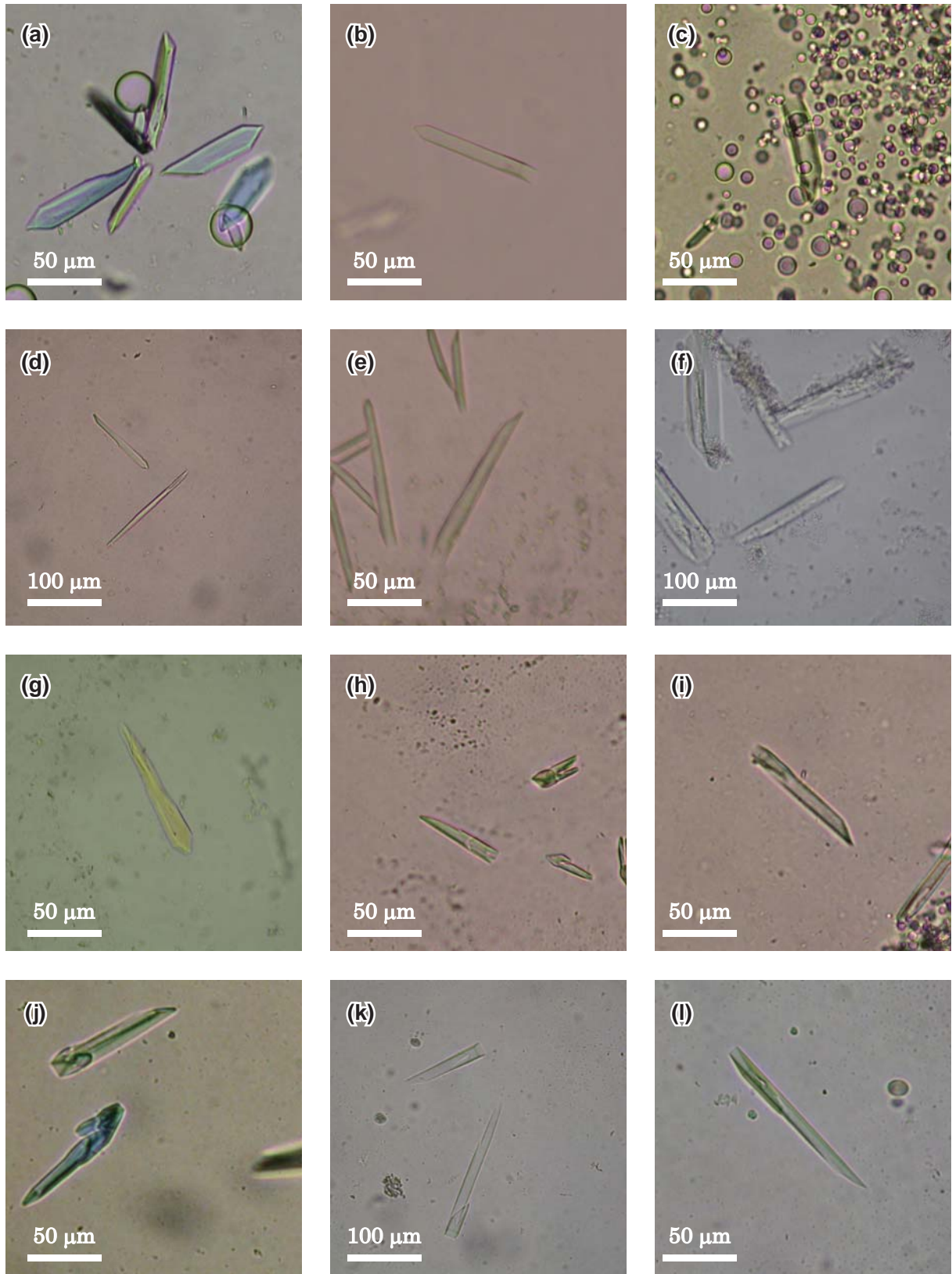
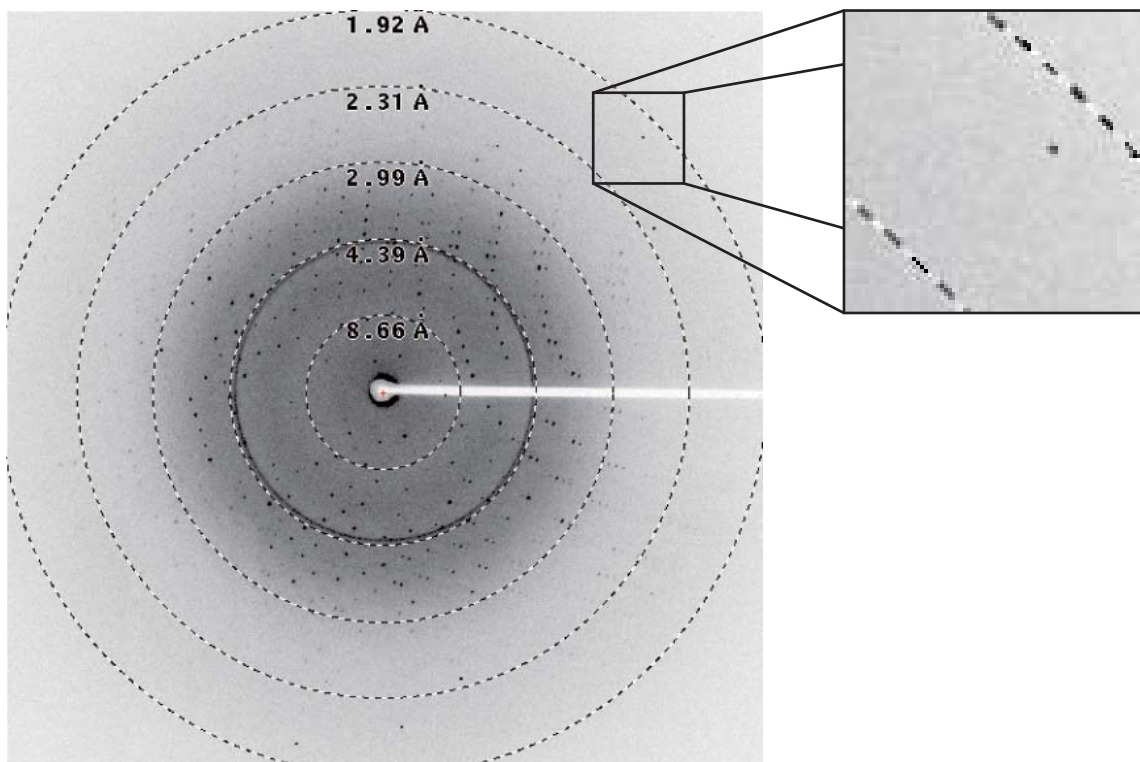


図 1-6-2 基質ペプチド（基質アナログ）との GkPOT 結晶  
結晶化条件は本文中記号と一致している.

A



B

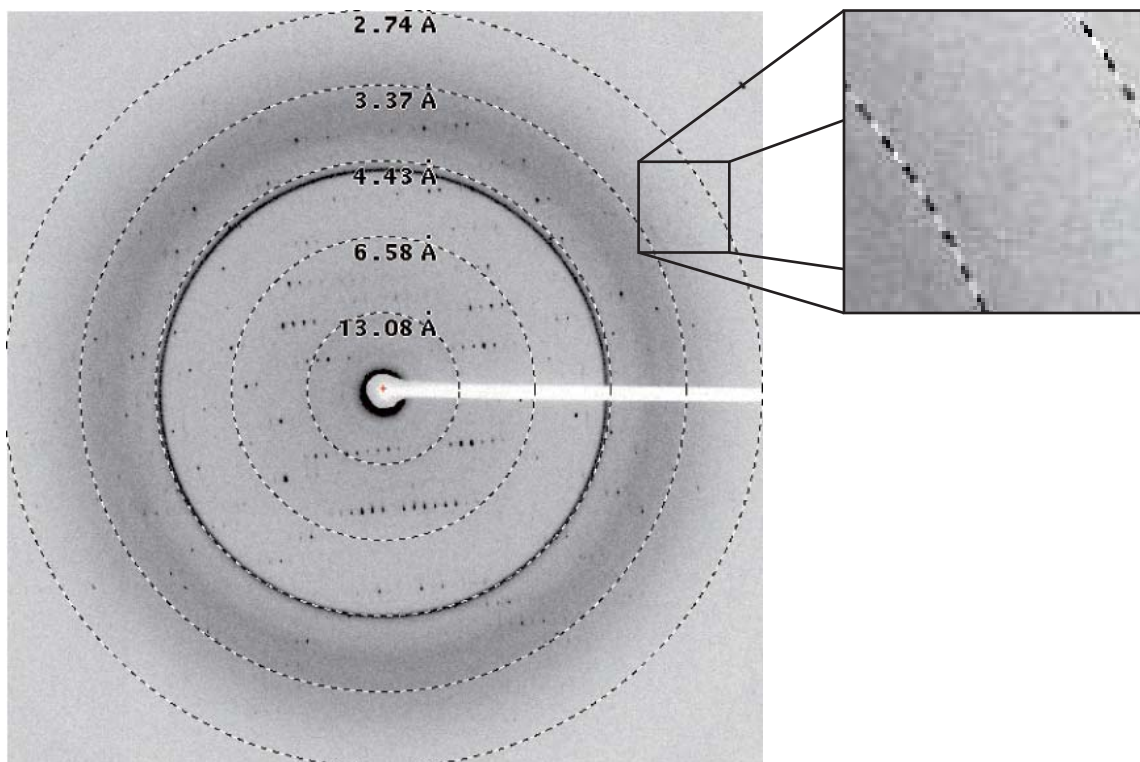


図 1-7-1 GkPOT 結晶の回折像 (1)

A; GkPOT (WT) 結晶の回折像  
最外殻の反射を拡大図中に示した.

B; SeMet 置換体 GkPOT 結晶の回折像

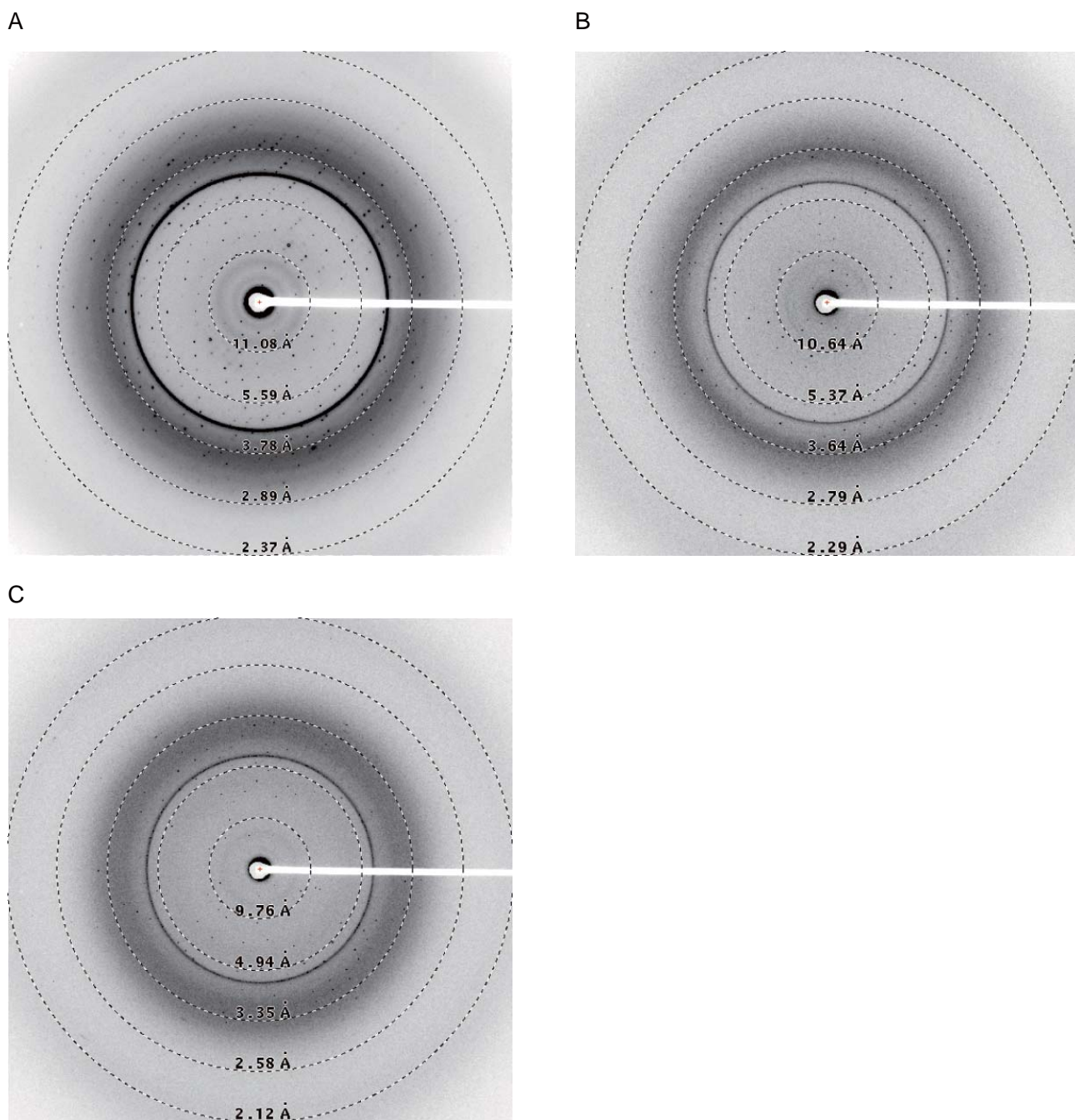


図 1-7-2 GkPOT 結晶の回折像 (2)

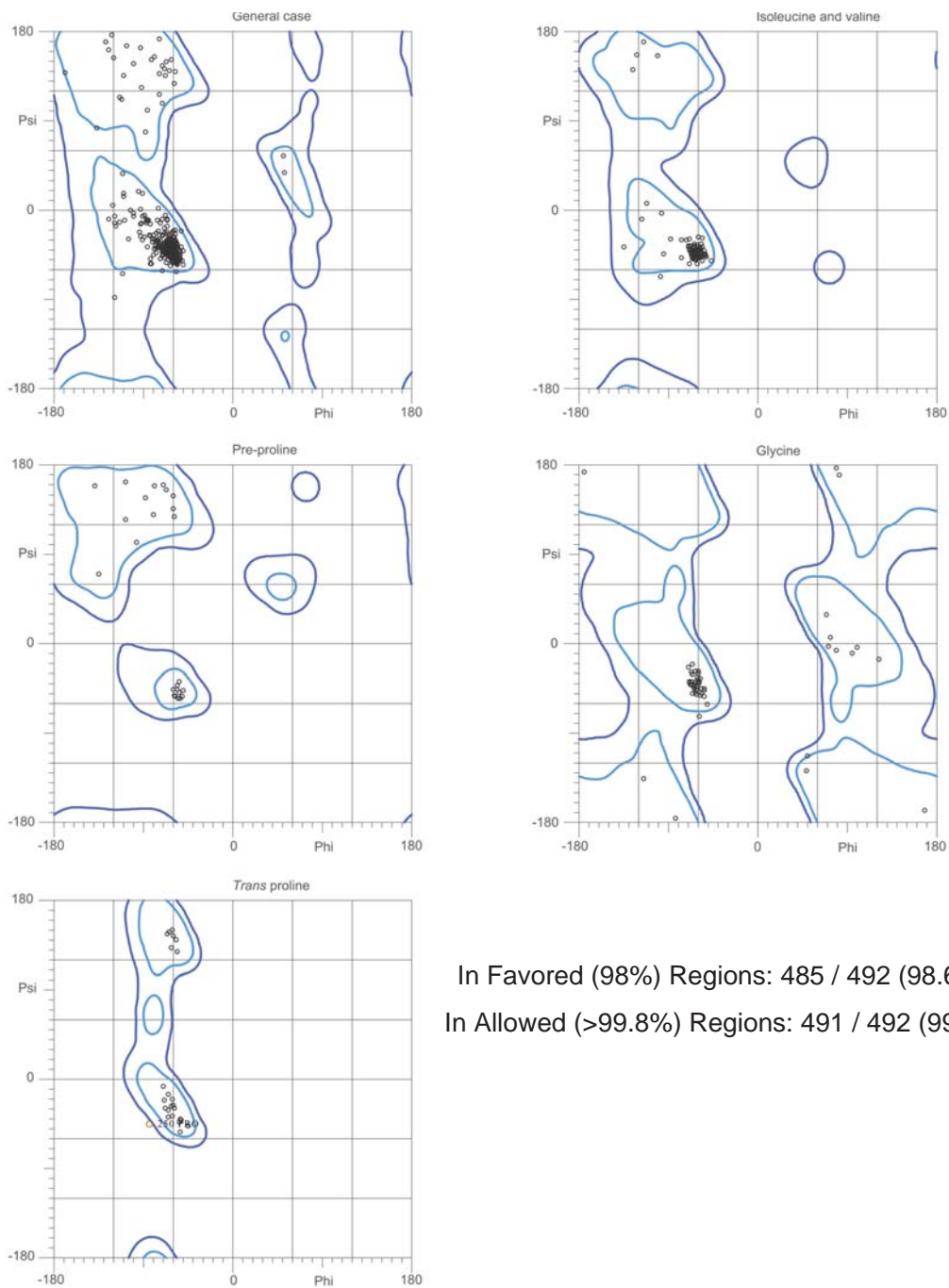
A; Alafosfalin 添加変異体 GkPOT (E310Q) 結晶の回折像 (条件 (g) に相当).

B; Ala-Lys 添加変異体 GkPOT (E310Q) 結晶の回折像 (条件 (d) に相当).

C; Alafosfalin 添加変異体 GkPOT (E310Q) 結晶の回折像 (条件 (h) に相当).

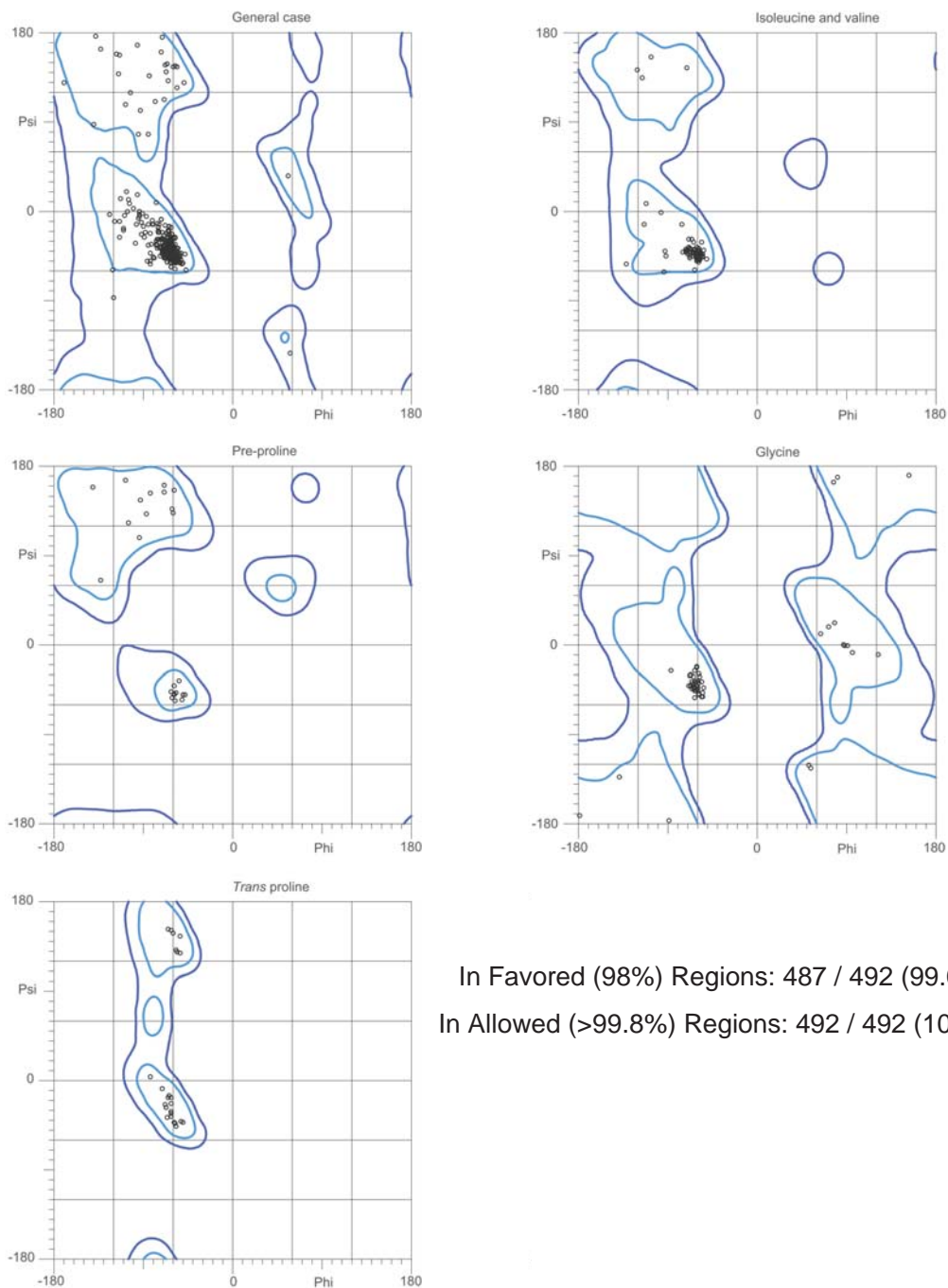
A

GkPOT (SO<sub>4</sub>型)



In Favored (98%) Regions: 485 / 492 (98.6%)  
In Allowed (>99.8%) Regions: 491 / 492 (99.8%)

B GkPOT (free 型)

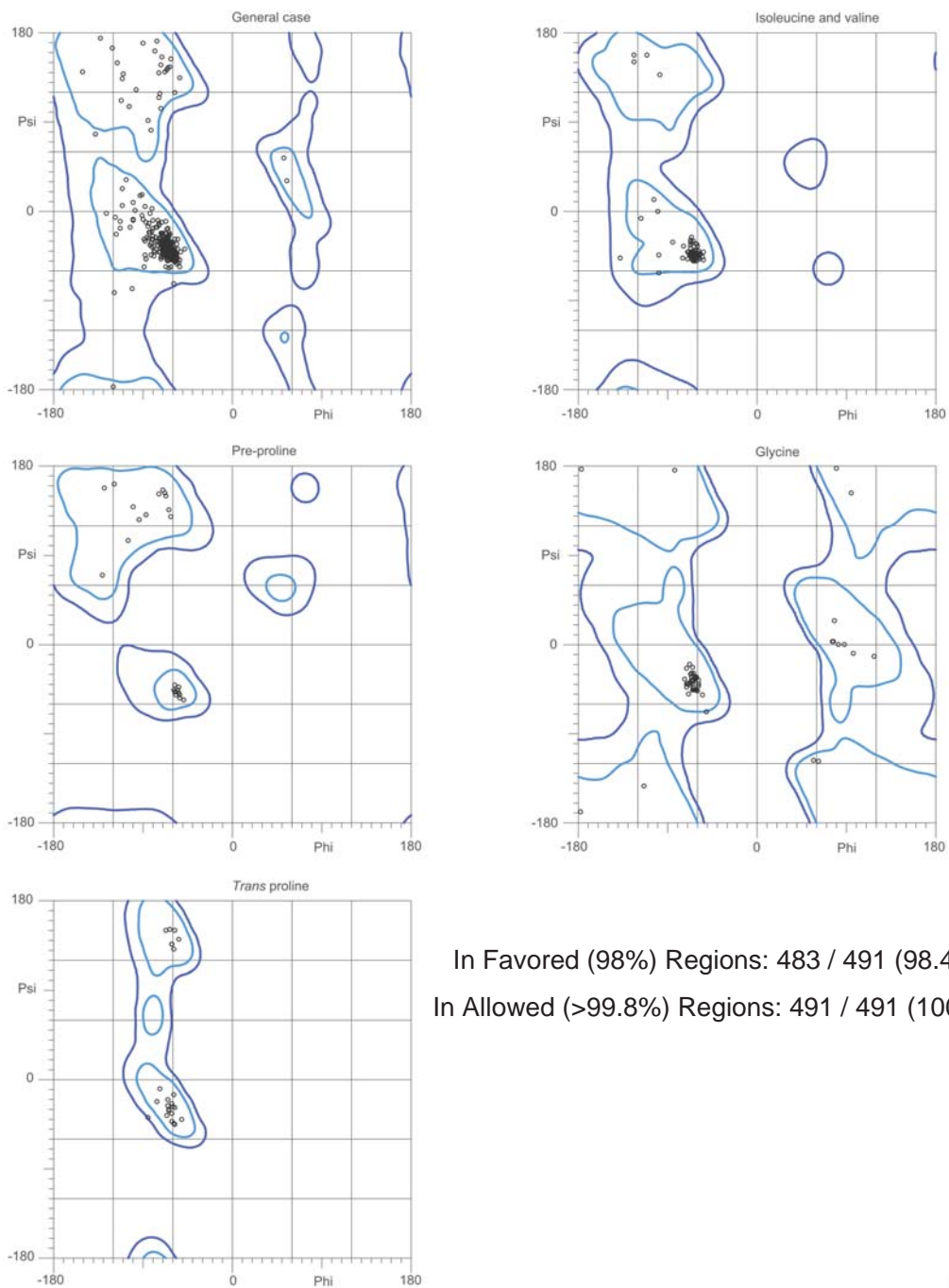


In Favored (98%) Regions: 487 / 492 (99.0%)  
In Allowed (>99.8%) Regions: 492 / 492 (100.0%)



C

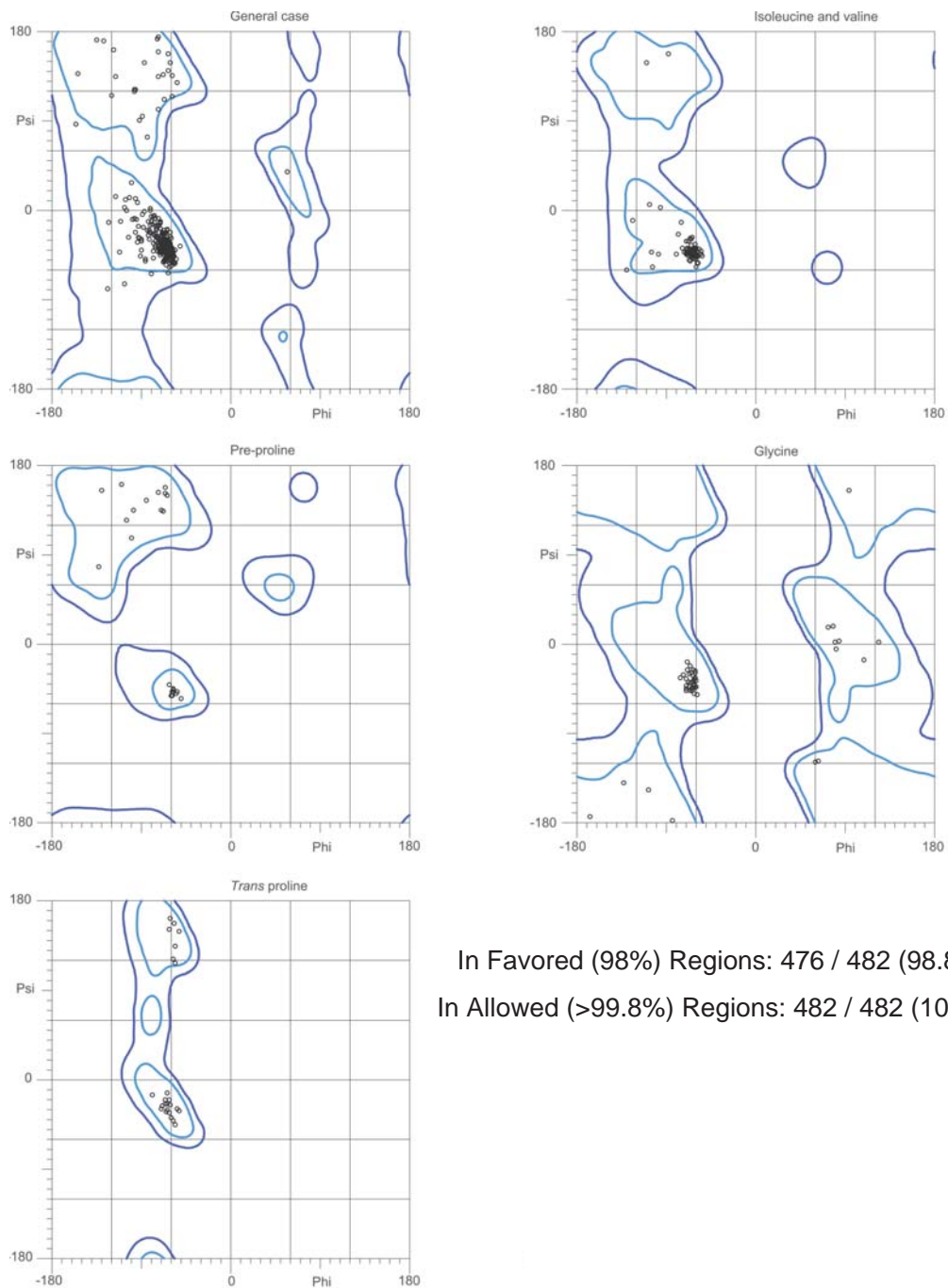
GkPOT (E310Q, SO<sub>4</sub> 型)



In Favored (98%) Regions: 483 / 491 (98.4%)  
In Allowed (>99.8%) Regions: 491 / 491 (100.0%)

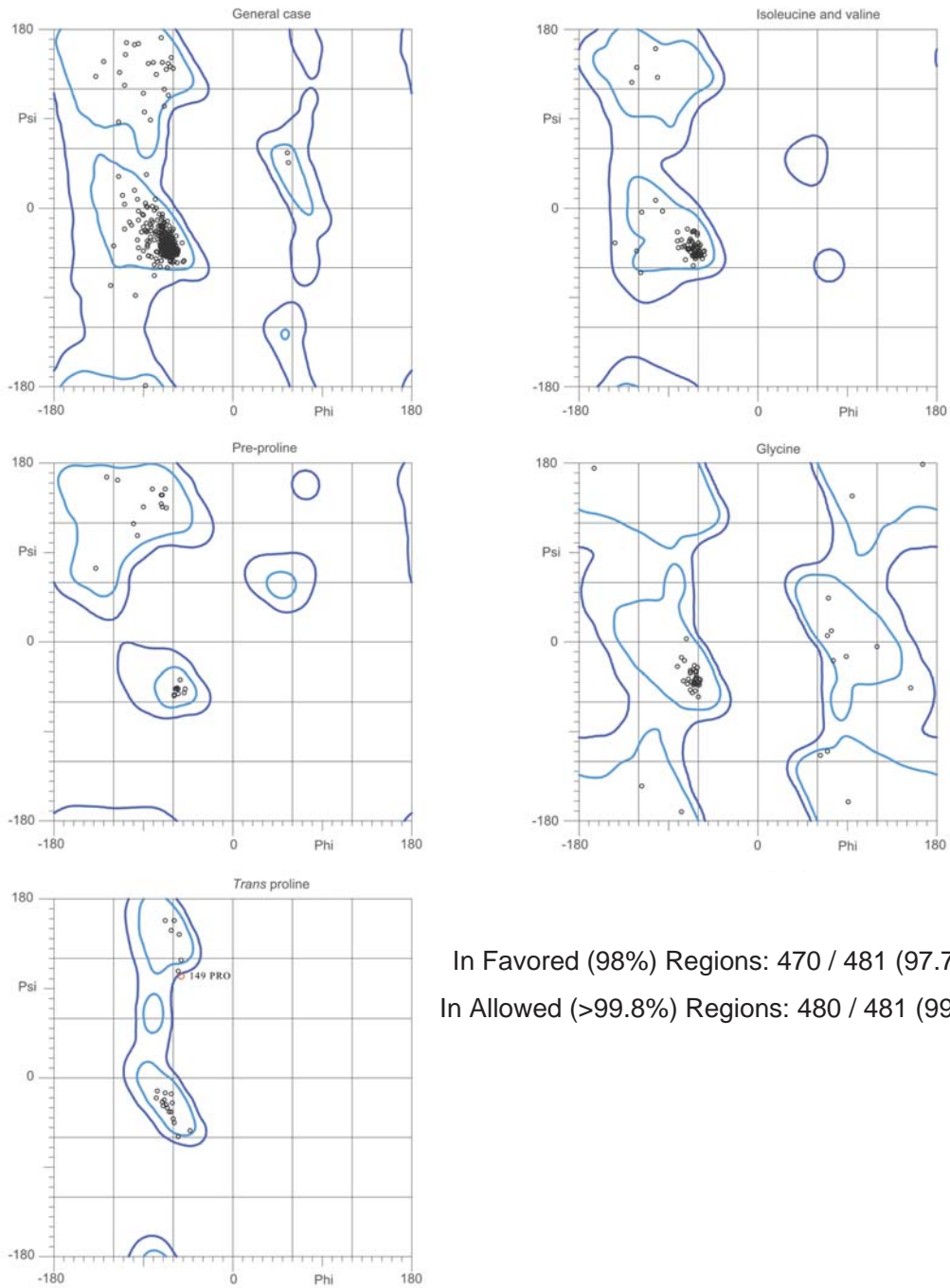
D

GkPOT (E310Q, free 型)



In Favored (98%) Regions: 476 / 482 (98.8%)  
In Allowed (>99.8%) Regions: 482 / 482 (100.0%)

E GkPOT (E310Q, alafos 型)



In Favored (98%) Regions: 470 / 481 (97.7%)  
 In Allowed (>99.8%) Regions: 480 / 481 (99.8%)

図 1-8-1 GkPOT の最終モデルにおけるラマチャンドラプロット

- A; GkPOT (SO<sub>4</sub> 型)
- B; GkPOT (free 型)
- C; GkPOT (E310Q, SO<sub>4</sub> 型)
- D; GkPOT (E310Q, free 型)
- E; GkPOT (E310Q, alafos 型)

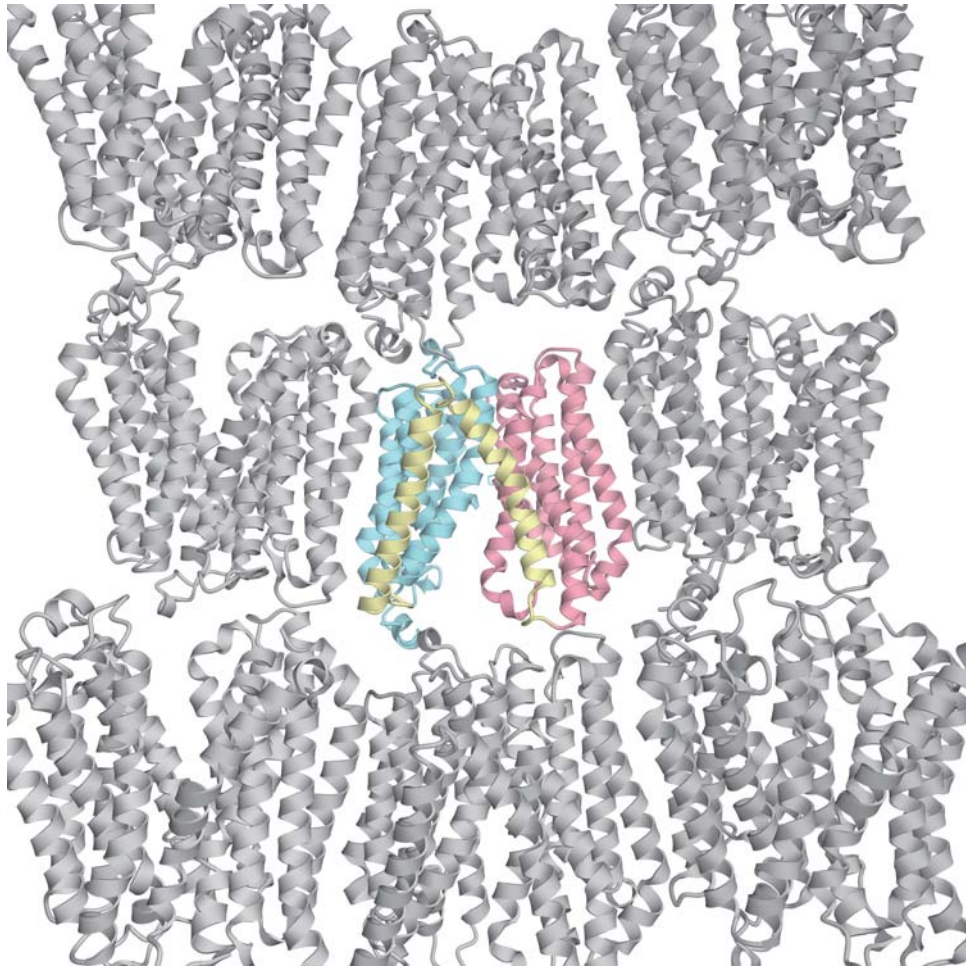


図 1-8-2 GkPOT の crystal packing

GkPOT (free 型) の crystal packing の様子. 非対称単位に含まれる構造をカラーで, その他の sym 分子を灰色で示した.

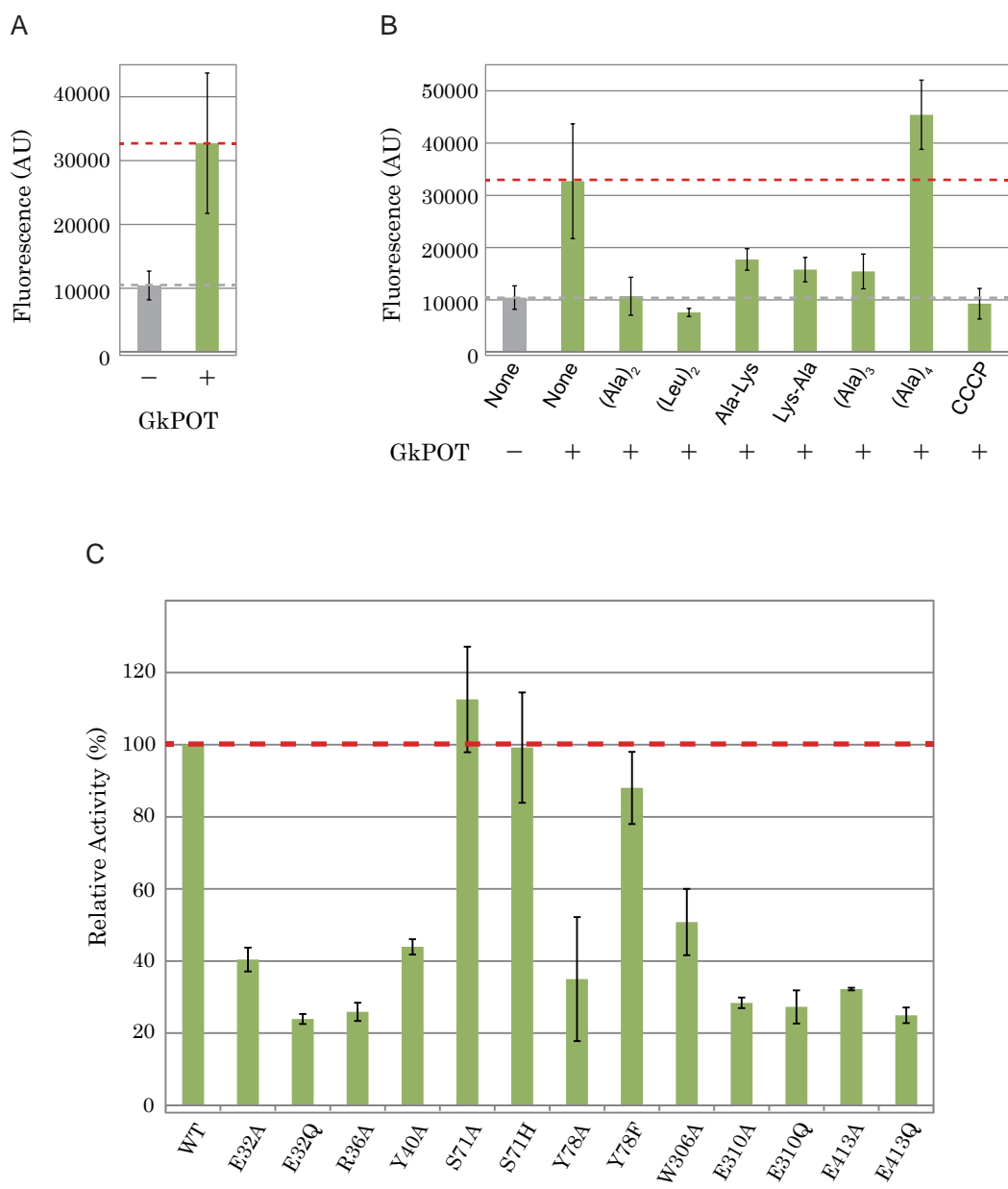


図 1-9  $\beta$ -Ala-Lys-AMCA を用いた GkPOT の輸送活性測定

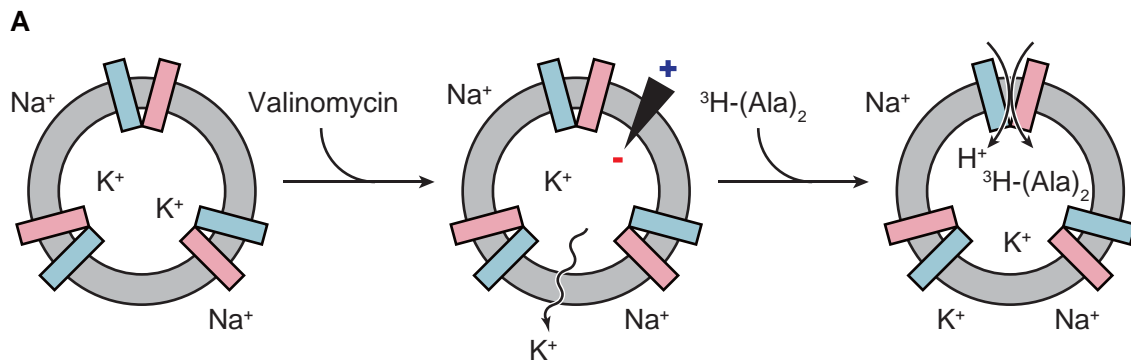
A; GkPOT(WT) の有無によるの蛍光強度の比較

B; GkPOT(WT) における基質選択性の比較

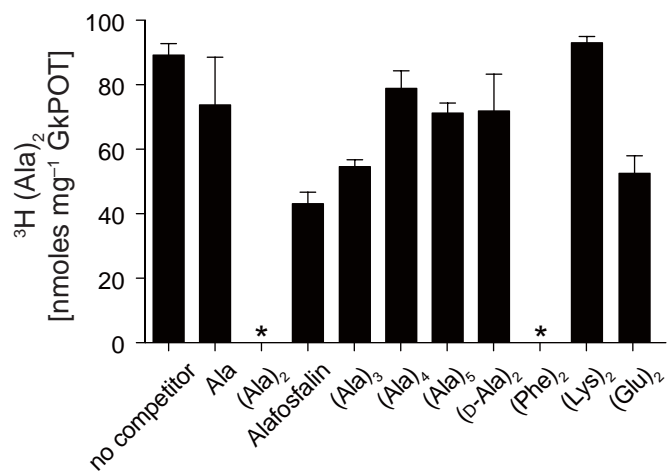
C; 変異体 GkPOT の蛍光強度の比較

緑の棒グラフは GkPOT を発現させた場合を表し、灰色の棒グラフは発現させていない場合を示した。

各実験は 3 回以上行い、エラーバーは標準偏差を示した。



**B** プロトン駆動による競争阻害活性



**C** プロトン駆動による輸送活性

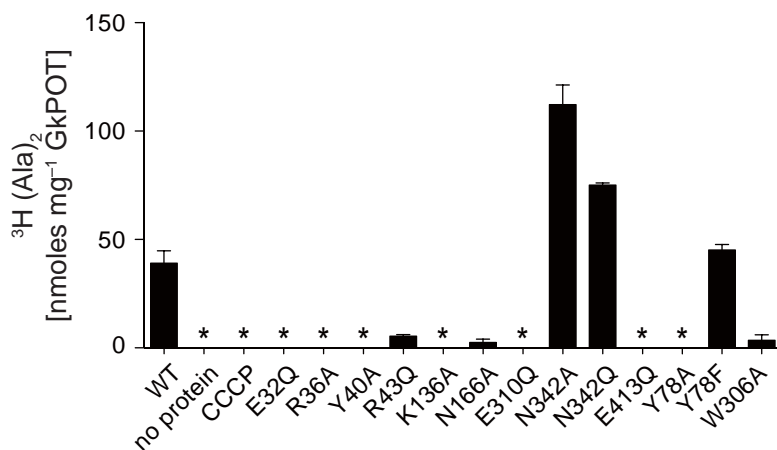


図 1-10 プロトン駆動による輸送活性測定

A; プロトン駆動による輸送活性測定モデル図. プロテオリポソームを灰色, GkPOT をピンク色と水色で示した. プロテオリポソームを内部にカリウムイオン, 外部にナトリウムイオン存在下で作製した. valinomycin 添加により電位差を生じさせ, 放射性<sup>3</sup>H-(Ala)<sub>2</sub> の輸送活性を測定した.

B; GkPOT (WT) による競争阻害活性測定.

C; 変異体 GkPOT を用いた輸送活性測定.

各実験は 3 回以上行った. エラーバーは標準偏差を示し, アスタリスクは検出できない活性を示した.

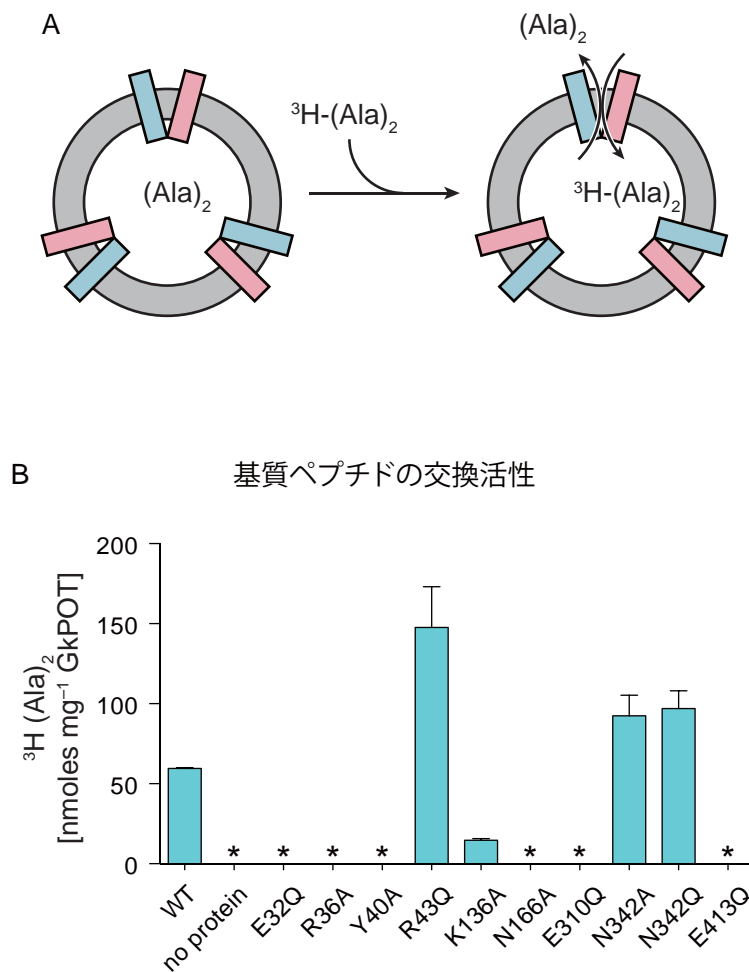


図 1-11 基質ペプチドの交換活性測定

A; 基質ペプチドの交換活性測定モデル図. プロテオリポソームを灰色, GkPOT をピンク色と水色で示した. プロテオリポソームを内部に  $(\text{Ala})_2$  存在条件下で作製し, 放射性  $^3\text{H}-(\text{Ala})_2$  と  $(\text{Ala})_2$  の交換活性を測定した.

B; 変異体 GkPOT を用いた輸送活性測定.

各実験は 3 回以上行った. エラーバーは標準偏差を示し, アスタリスクは検出できない活性を示した.

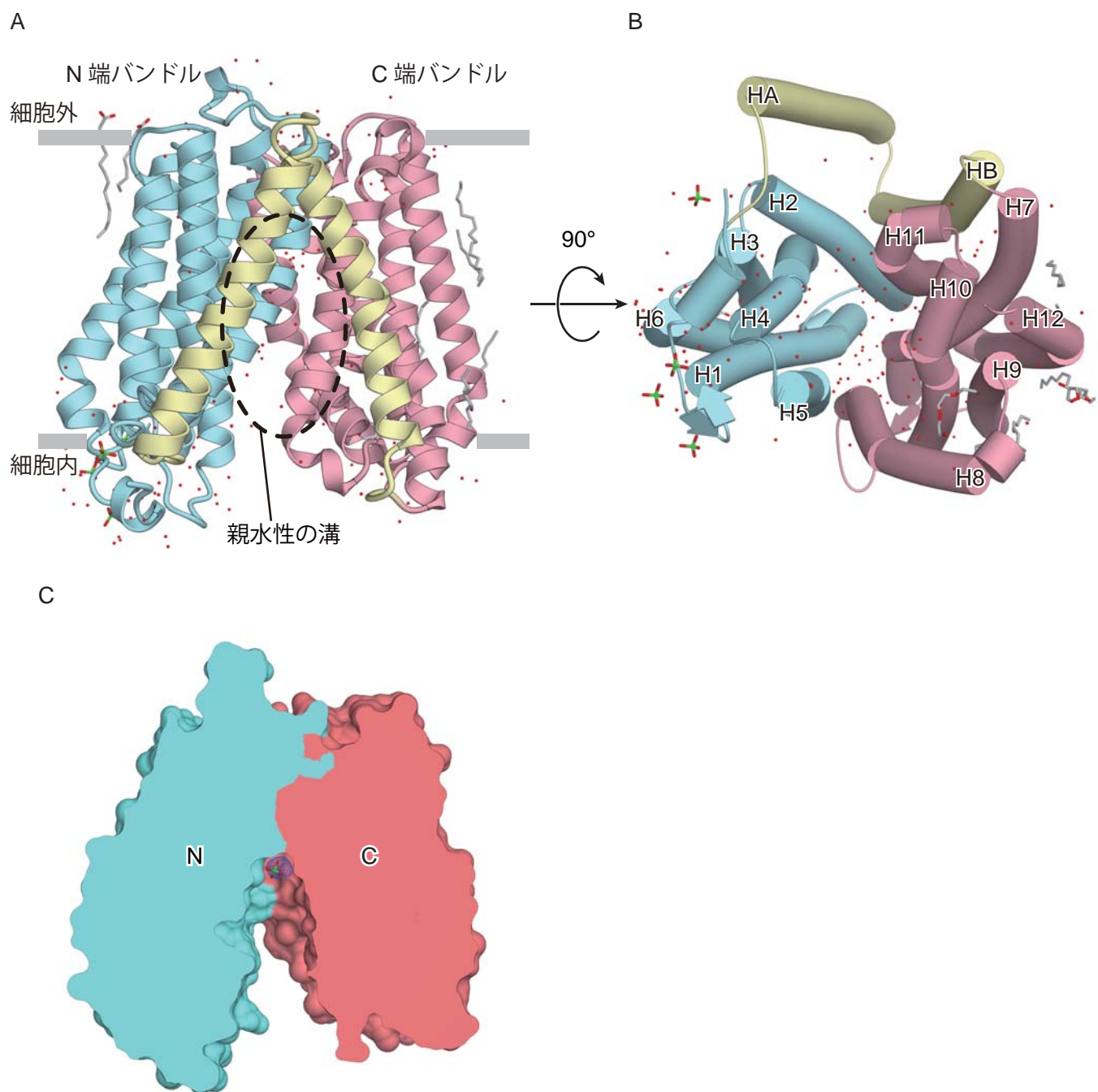


図 1-12 GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) の全体構造

A,B; GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) の全体構造.

C; GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) を親水性の溝で切断した分子表面の断面図.

N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色, 付随ヘリックスを黄色, 細胞膜を灰色で示した.  
水分子やイオン分子, 脂質分子をスティック表示で表した.

硫酸イオンの Fo-Fc omit 電子密度マップ (contour level = 3.0  $\sigma$ ) を青色で示した.



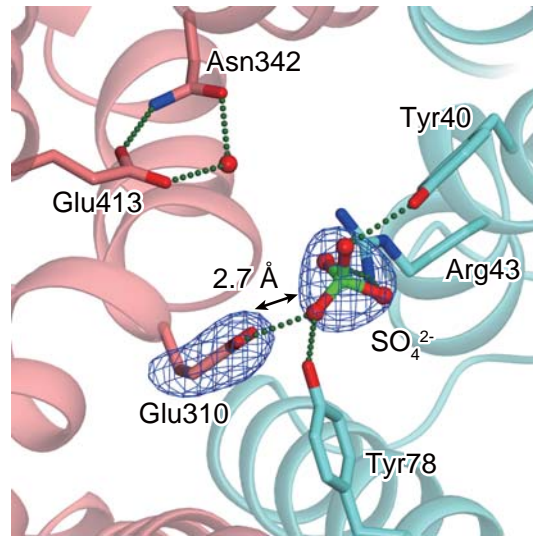


図 1-13 GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) の親水性の溝内部

N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色で示した.  
水分子やイオン分子をスティック表示で表し, Fo-Fc omit 電子密度マップ (contour level = 3.0  $\sigma$ ) を青色で示した.

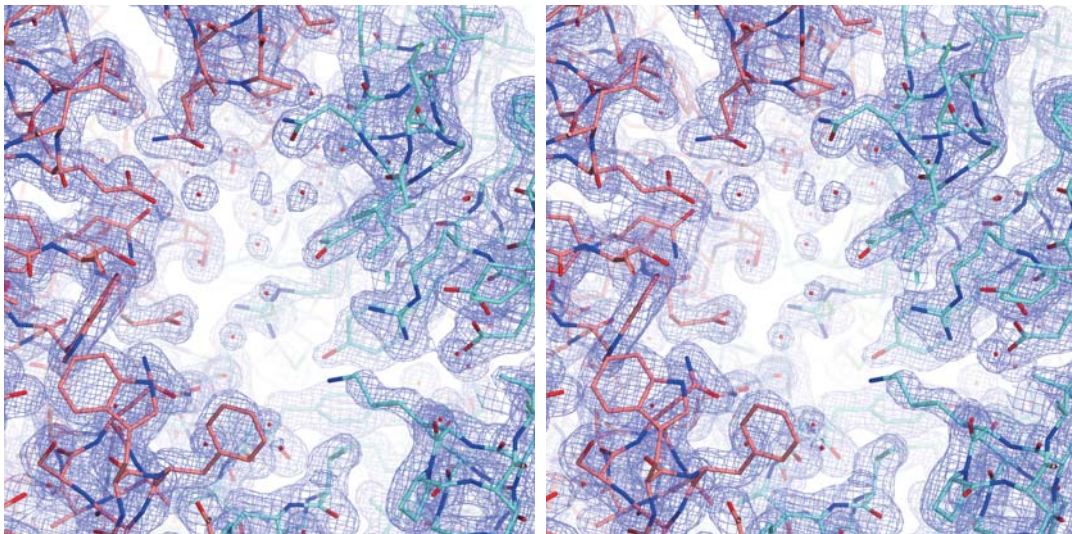


図 1-14 GkPOT (free 型) の親水性の溝周辺のステレオ図

2Fo-Fc 電子密度マップ (contour level = 1.0  $\sigma$ ) を青色, N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色で示した.

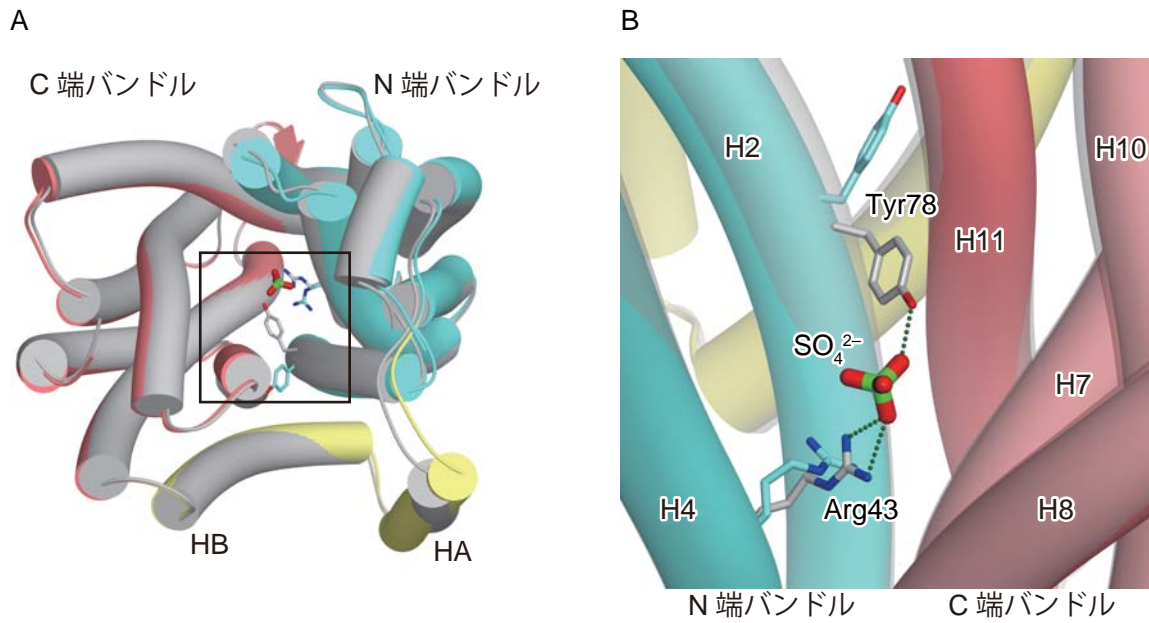


図 1-15 GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) と GkPOT (free 型) の構造比較

A; 細胞内側から見た全体構造

B; 親水性の溝内部

GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) の構造を灰色で表示し, GkPOT (free 型) の構造をカラーで表示した.

N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色, 付随ヘリックスを黄色で示した.

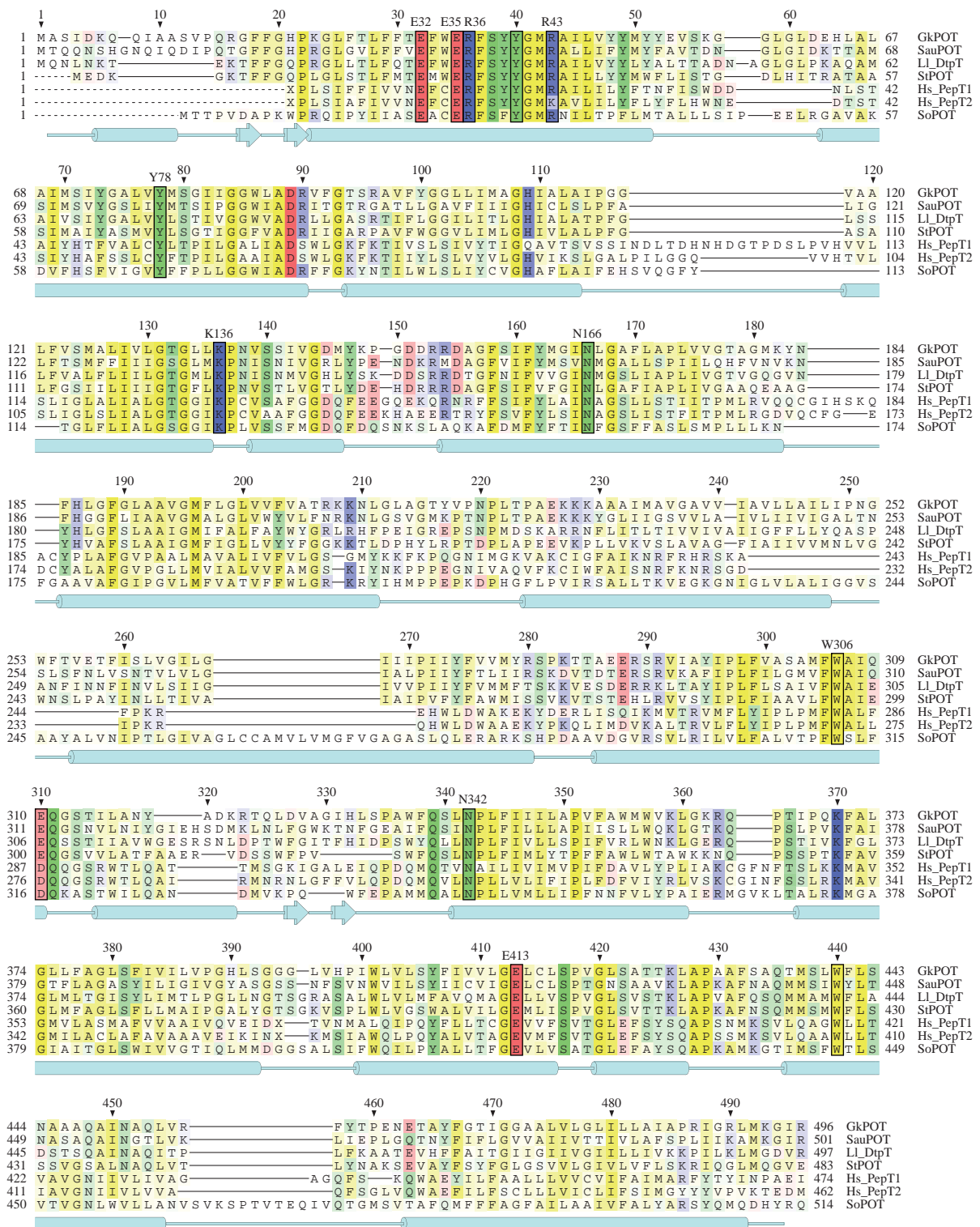


図 1-16 POT ファミリータンパク質のアライメント

GkPOT; *Geobacillus kaustophilus*

SauPOT; *Staphylococcus aureus*,

Ll\_DtpT; *Lactococcus lactis*

StPOT; *Streptococcus thermophilus*

Hs\_PepT1, Hs\_PepT2; *Homo sapiens*

SoPOT; *Shewanella oneidensis*

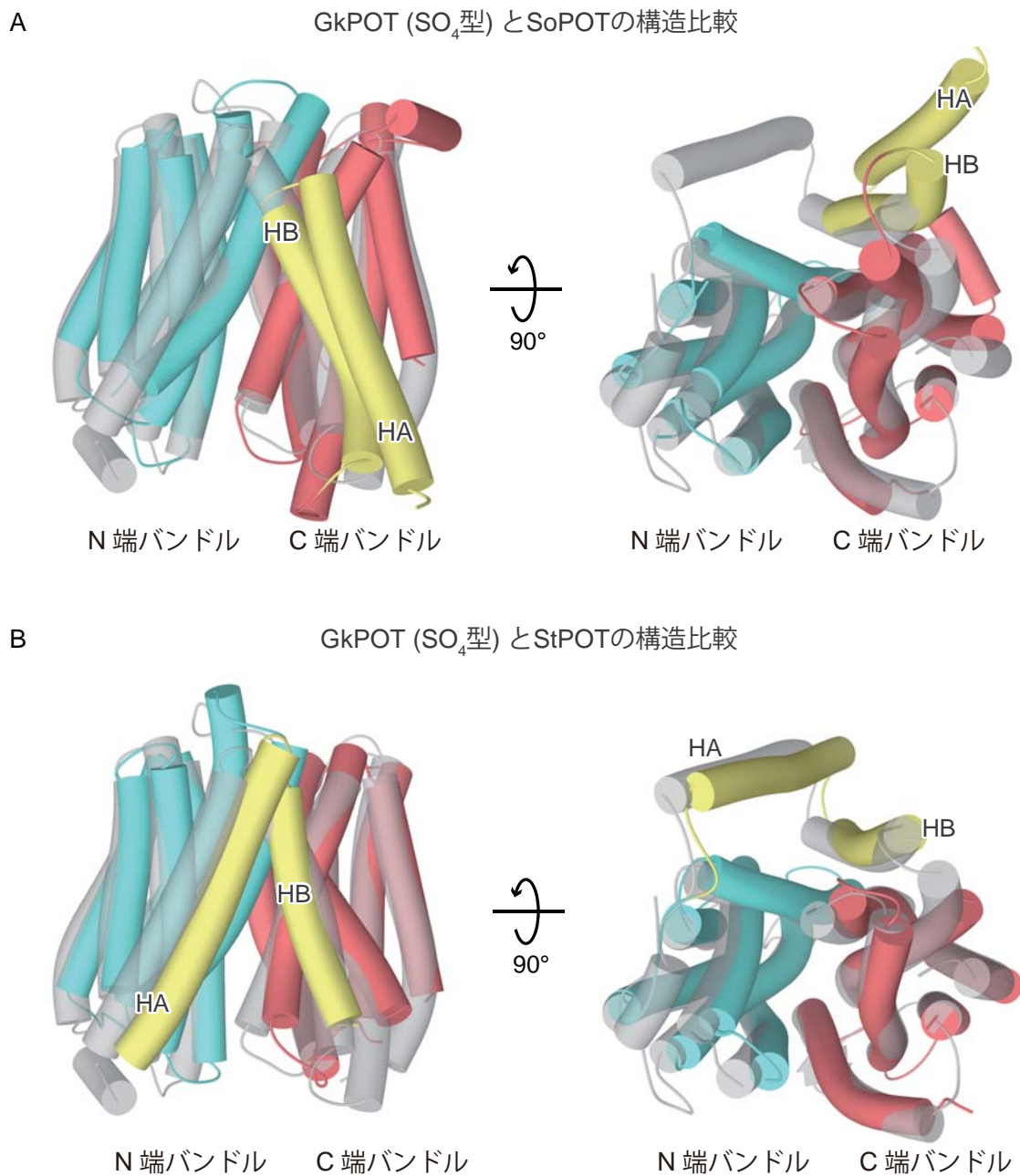


図 1-17 GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) と SoPOT, StPOT の構造比較

A; GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) と SoPOT の構造比較

B; GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) と StPOT の構造比較

GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) の構造を灰色で表示し, SoPOT, StPOT の構造をカラーで表示した.  
N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色, 付随ヘリックスを黄色で示した.

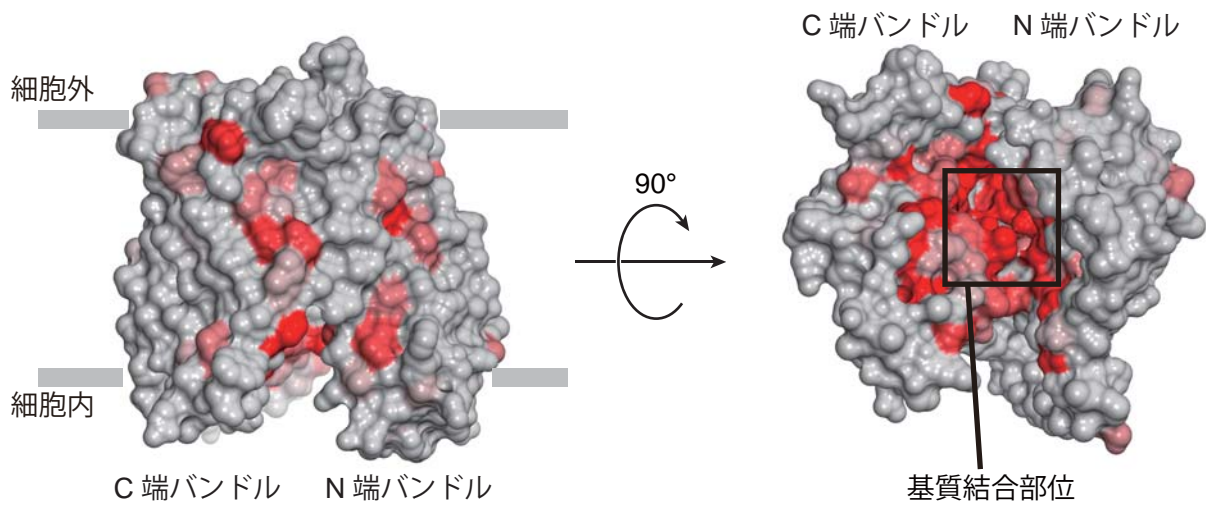


図 1-18 POT ファミリータンパク質の保存性残基

図 1-16 で示したアライメントを基に、POT ファミリータンパク質で保存性の高い残基を GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) の構造に赤色で示した。その結果、基質結合部位（親水性の溝）に保存された残基が集中している。

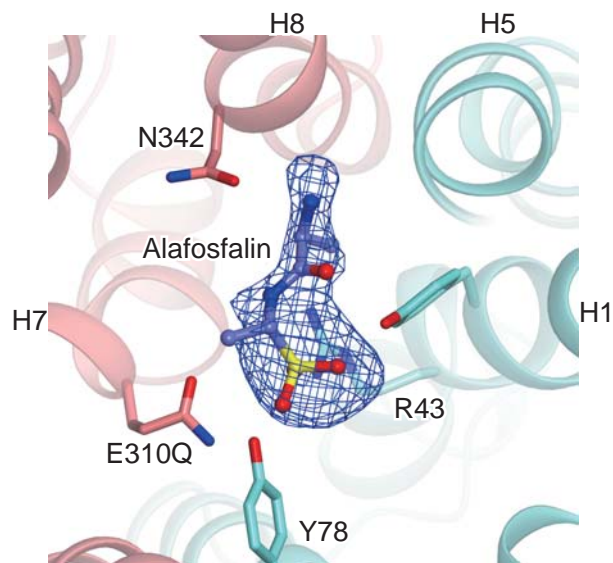


図 1-19 GkPOT (E310Q, alafos 型) の基質結合部位

N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色で示した.

水分子やイオン分子をスティック表示で表し, Alafosfalin の Fo-Fc omit 電子密度マップ (contour level = 3.0  $\sigma$ ) を青色で示した.

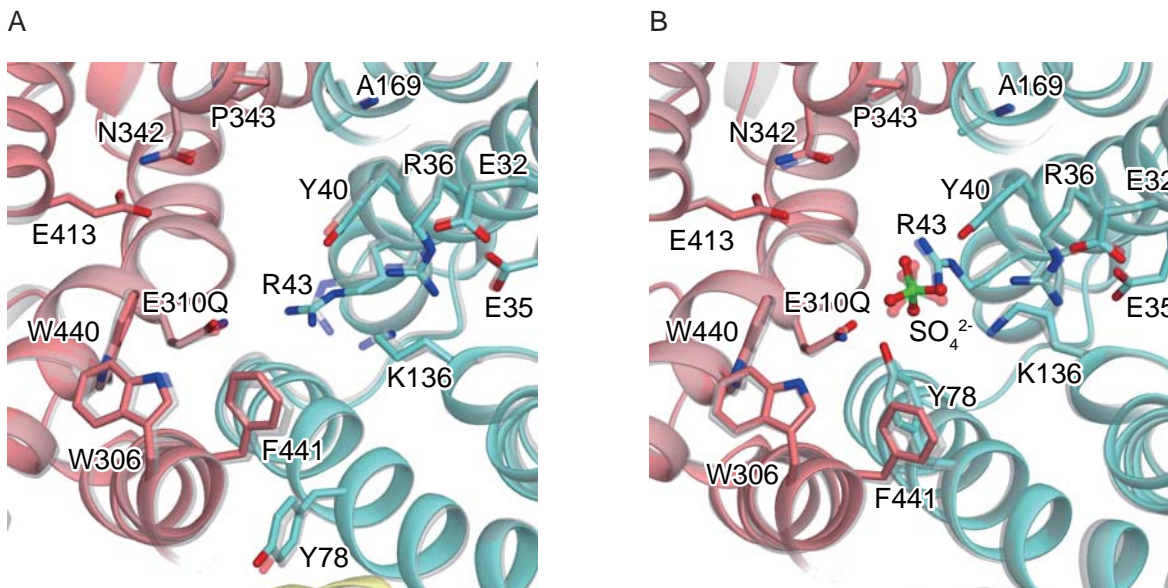


図 1-20 GkPOT (WT) と GkPOT (E310Q) の構造比較

A; 基質結合部位の GkPOT (free 型) と GkPOT (E310Q, free 型) の構造比較

B; 基質結合部位の GkPOT ( $\text{SO}_4$  型) と GkPOT (E310Q,  $\text{SO}_4$  型) の構造比較

N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色で示した.

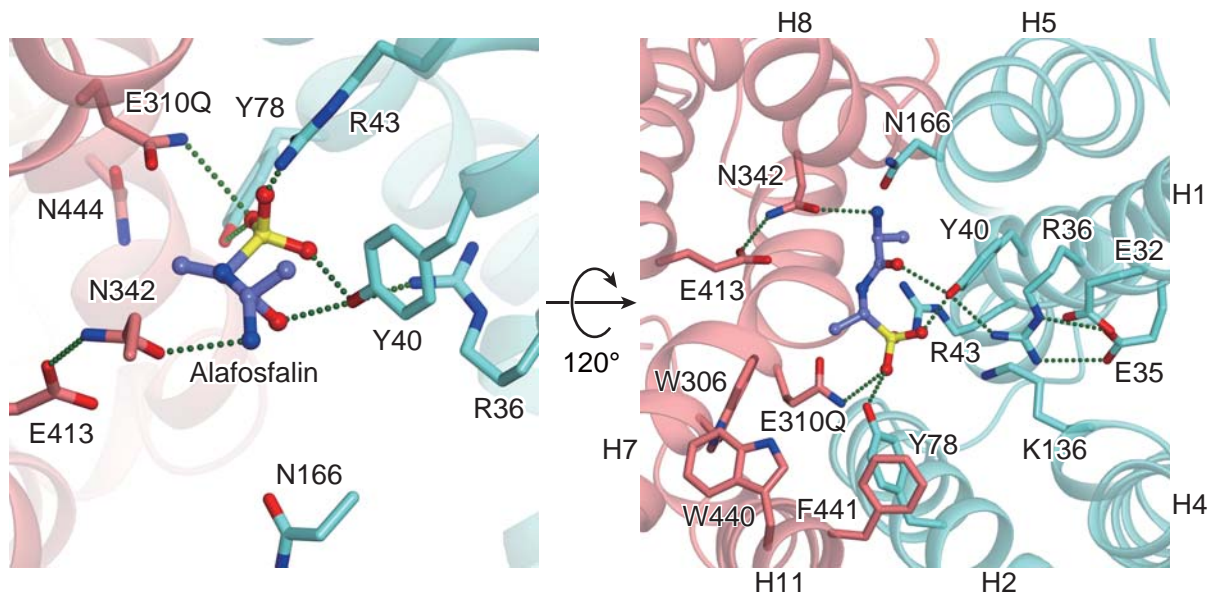


図 1-21 GkPOT (E310Q, alafos 型) の基質結合部位 (2)

N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色, Alafosfalin を紫色で示した.  
Alafosfalin のリン酸基を Tyr40, Arg43, Tyr78, Gln310 残基が認識しており, N 端のアミド基を Asn342, Glu413 残基が認識している.

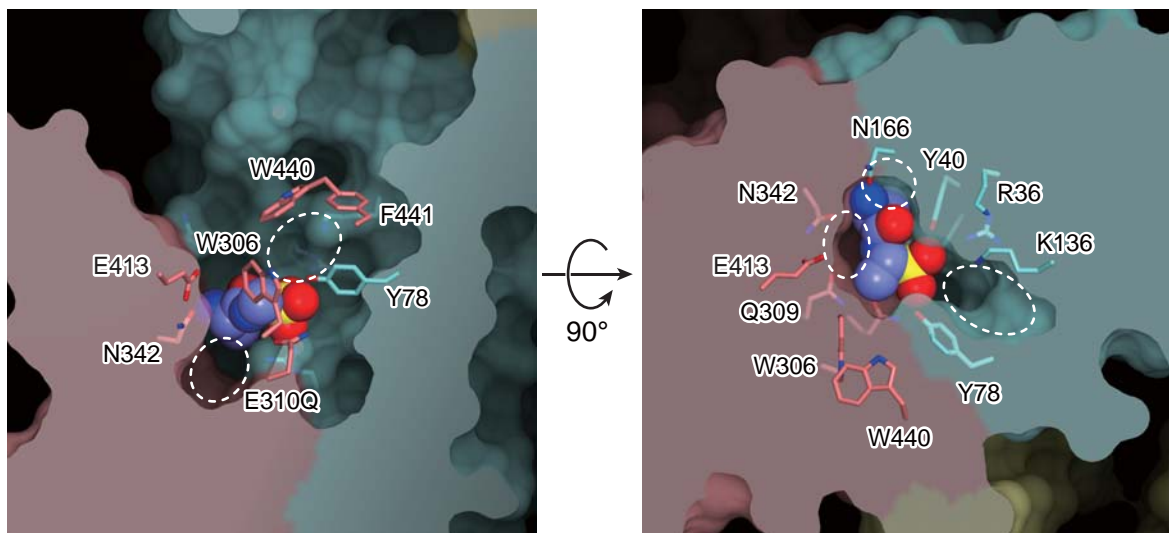


図 1-22 GkPOT (E310Q, alafos 型) の基質結合部位 (3)

N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色, Alafosfalin の主鎖を紫色で示した.  
Alafosfalin と GkPOT の間には, いくつかの空間が確認される. (白点線で表示)

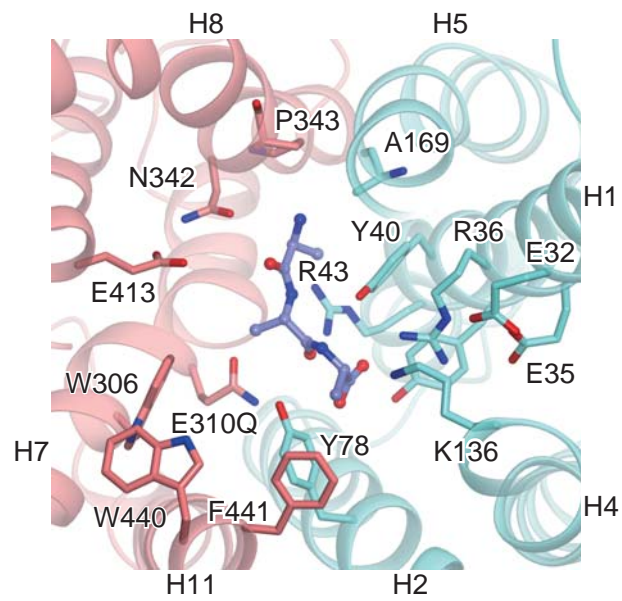


図 1-22 GkPOT と基質トリペプチド (Ala)<sub>3</sub> の複合体構造モデル

N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色, 基質トリペプチド (Ala)<sub>3</sub> を紫色で示した. GkPOT (E310Q, alafos 型) の構造を基に複合体構造モデルを作製した.



表 1-1 SeMet 置換体 GkPOT の SHELXC の統計値

Resolutin	6.67	5.30	4.63	4.20	3.90	3.67	3.49	3.34	3.21	3.10	3.00
N (data)	980	926	933	945	922	947	919	908	938	911	949
<I/sig>	42.0	26.0	29.3	26.9	23.2	17.7	13.4	10.3	8.2	6.9	5.3
Completeness	99.9	99.7	99.7	98.8	99.8	99.8	99.6	99.7	99.7	99.6	99.4
<d" /sig>	2.72	1.91	1.46	1.21	1.11	1.05	0.99	0.88	0.89	0.83	0.85
CC (1/2)	86.4	68.1	53.5	41.7	38.0	30.3	21.8	18.0	19.2	9.4	18.4

表 1-2 Native GkPOT (WT) の回折データ統計値

	WT-free 型	WT-SO <sub>4</sub> 型
<b>Data collection</b>		
Beamline	SPring-8 BL32XU	SPring-8 BL32XU
Wavelength (Å)	1.00000	0.97944
Space group	<i>P2<sub>1</sub></i>	<i>P2<sub>1</sub></i>
Cell dimensions		
<i>a, b, c</i> (Å)	50.76, 94.92, 57.25	52.51, 93.73, 57.27
β (deg)	111.10	112.33
Resolution (Å)	50-1.90	50-2.00
	(1.93-1.90) *	(2.03-2.00) *
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	5.3 (20.1)	10.4 (35.2)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	26.48 (3.37)	13.29 (1.92)
Completeness (%)	88.2 (72.2)	96.0 (88.7)
Redundancy	2.8 (1.9)	4.1 (2.5)

\*Highest resolution shell is shown in parenthesis

表 1-3 SeMet 置換体 GkPOT の回折データ統計値

	SeMet 置換体
<b>Data collection</b>	
Beamline	SPring-8 BL32XU
Wavelength (Å)	0.97910
Space group	<i>P2<sub>1</sub></i>
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	50.93, 94.93, 57.29
β (deg)	110.94
Resolution (Å)	50-3.20
	(3.26-3.20) *
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	13.0 (20.0)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	24.21 (6.25)
Completeness (%)	94.7 (91.8)
Redundancy	11.3 (4.6)

\*Highest resolution shell is shown in parenthesis

表 1-4 Native GkPOT (WT) の回折データ統計値

	WT-free 型	WT-SO <sub>4</sub> 型
<b>Refinement</b>		
Resolution (Å)	50-1.9 (1.95-1.9) *	50-2.0 (2.06-2.0) *
No. reflections	35,267	33,030
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.1808/0.2157 (0.2261/0.2647)	0.1962/0.2325 (0.2899/0.3242)
No. atoms		
Protein	3,731	3,708
Ions / Ligand	20	45
Lipid	102	162
Water	141	131
Average B-factors (Å <sup>2</sup> )		
Protein	31.29	32.60
Ions / Ligand	54.19	60.4
Lipid	54.67	55.21
Water	35.55	35.94
Coordinates error (Å)	0.45	0.55
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.007	0.006
Bond angles (deg)	1.053	1.019

\*Highest resolution shell is shown in parenthesis

表 1-5 変異体 GkPOT (E310Q) の回折データ統計値

	E310Q-SO <sub>4</sub> 型	E310Q-free 型	E310Q-alafoS 型
<b>Data collection</b>			
Beamline	SPring-8 BL32XU	SPring-8 BL32XU	SPring-8 BL32XU
Wavelength (Å)	1.00000	1.00000	1.00000
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	52.63, 93.53, 57.50	54.14, 95.23, 57.59	53.52, 94.08, 57.85
$\beta$ (deg)	112.38	111.20	112.65
Resolution (Å)	50-2.10 (2.14-2.10) *	50-2.30 (2.34-2.30) *	50-2.40 (2.44-2.40) *
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	8.4 (29.5)	10.6 (34.3)	12.1 (36.6)
<i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i>	16.72 (2.56)	11.96 (2.88)	8.74 (2.00)
Completeness (%)	92.8 (85.3)	92.4 (86.1)	88.2 (77.9)
Redundancy	2.7 (2.0)	3.7 (2.3)	2.5 (1.8)

\*Highest resolution shell is shown in parenthesis

表 1-6 変異体 GkPOT (E310Q) の回折データ統計値

	E310Q-SO <sub>4</sub> 型	E310Q-free 型	E310Q-alafox 型
<b>Refinement</b>			
Resolution (Å)	50-2.1 (2.18-2.1) *	50-2.3 (2.4-2.3) *	50-2.4 (2.52-2.4) *
No. reflections	27,920	22,460	18,215
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	0.2138/0.2485 (0.3350/0.3467)	0.2213/0.2516 (0.2991/0.3258)	0.2384/0.2877 (0.3697/0.3984)
No. atoms			
Protein	3,688	3,680	3,628
Ions / Ligand	35	20	42
Lipid	100	16	0
Water	89	83	49
Average B-factors (Å <sup>2</sup> )			
Protein	41.60	32.11	43.01
Ions / Ligand	65.84	73.37	68.35
Lipid	62.05	48.23	
Water	40.86	27.48	37.04
Coordinates error (Å)	0.68	0.63	0.88
R.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.003	0.002	0.002
Bond angles (deg)	0.733	0.660	0.688

\*Highest resolution shell is shown in parenthesis



# 第二章

## 2.1. 序章

### 2.1.1. 共輸送体の共役輸送メカニズム

POT ファミリータンパク質は、プロトンの濃度勾配を利用して基質ペプチドを細胞内に輸送する共輸送体である。POT タンパク質を含めた MFS 共輸送体は、図 p-2 に示すような輸送メカニズムを提唱されている<sup>(20)</sup>。Outward-open 状態の POT はプロトンと基質ペプチドが結合することで構造変化を起こし (図 p-2 A-C), Occluded 状態や Inward-open 状態へ変化する (図 p-2 C-E)。その後、Inward-open 状態の POT がプロトンと基質を放することで構造変化を起こし (図 p-2 E-G), Occluded 状態や Outward-open 状態へと変化する (図 p-2 G-A)。この共輸送メカニズムの重要な点は、プロトンと基質が両方とも結合した状態 (図 p-2 C, E), もしくはプロトンと基質ペプチドがどちらも結合していない単体状態 (図 p-2 A, G) のみ構造変化が起こり、どちらか片方だけが結合した状態 (図 p-2 B, F) では構造変化が起きない点である。仮に、POT がプロトンだけが結合した状態で構造変化を起こすとプロトンの受動輸送体として機能する。その為、POT はプロトン・基質ペプチドの結合(もしくは乖離)と構造変化が共役する輸送メカニズムを持つ必要があるが、未だその輸送メカニズムは明らかになっていない。

### 2.1.2. 研究目的

第一章において、高分解能の GkPOT の結晶構造を解明する事で、プロトンの結合部位が基質結合部位に存在する Glu310 残基の側鎖カルボキシル基であることや、基質ペプチドの結合様式を示唆した。そこで第二章では、結晶構造を基にした分子動力学 (MD) シミュレーションや全反射減衰フーリエ変換赤外分光法 (ATR-FTIR) を用いて、GkPOT の構造変化がプロトンや基質ペプチドの結合と共役する制御メカニズムの解明を目指した。

## 2.2. 材料と方法

### 2.2.1. 分子動力学 (MD) シミュレーション

MD シミュレーションは、当研究室の光山博士、石谷准教授との共同研究により行った。MD シミュレーションには、モノオレイン分子や硫酸イオン、機能に重要ではないと言われている付随ヘリックス HA を除いた GkPOT (SO<sub>4</sub>型) の結晶構造を利用し、脂質 POPC 二重膜存在下で行った。プログラムは、NAMD 2.8<sup>(58)</sup>を使用した。4 種類の条件に対して MD シミュレーションを行い、それぞれ 200 ns 測定を行った。ただし、S-E310 だけは 200 ns 分を 2 回測定し、S-E310p-AA は 100 ns 測定した<sup>(59)</sup>。測定条件を表 2-1 に示す。

### MD シミュレーションの条件

MD シミュレーションは、第一章で明らかにした GkPOT (SO<sub>4</sub>型) の結晶構造を基に行った。GkPOT (SO<sub>4</sub>型) の構造に含まれているモノオレイン分子や硫酸イオンを除き、水分子は観測された位置のまま使用した。ファミリー間で保存性が低く、輸送メカニズムに影響しないと考えられる付随ヘリックス HB を除いて行った。結晶構造ではディスオーダーをしていて観測されなかった側鎖や水素原子はプログラム VMD を用いてモデル構築を行った<sup>(60)</sup>。His 残基の側鎖のプロトン化はプログラム PROPKA を用いて決定した<sup>(48)</sup>。その結果、His64 残基と His398 残基はε原子を、His21 残基と His109 残基、His186 残基、His390 残基はσ原子を、His332 残基は両方の原子をプロトン化した。Asp 残基と Glu 残基の側鎖に関しては、Glu310 残基を除いて全てをイオン化して行った。

結晶構造で観測された硫酸イオンを脂質リン酸基の指標として、GkPOT を水和させた脂質 POPC 二重膜に埋め込んだ。タンパク質と重なっている脂質分子を除去し、塩濃度が 150 mM になるようにナトリウムイオンと塩化物イオンを加えた。シミュレーションの系は、100×100×100 Å で行い、分子のトポロジーや力場のパラメーターは CHARMM27 と  $\phi, \Psi$  cross-term map correction (CMAP) を使用した<sup>(61)</sup>。

MD シミュレーションは、プログラム NAMD2.8 を用いて行った<sup>(58)</sup>。初めの 1000 ステップは、水素原子以外を固定した状態でエネルギーの最小化を行い、水素原子の位置を決定した。次の 1000 ステップは、10 kcal/mol のエネルギー存在下で、水素原子以外の GkPOT 原子の位置を決めた。平衡化の間は NPT で行い、最後の 100 ns は制限をかけず NPAT で行った。これらのシミュレーションは、気圧 1 atm、温度 300 K で行



った。静電相互作用の計算は、particle mesh Ewald (PME) 法により行った。

### 2.2.2. 全反射減衰フーリエ変換赤外分光法 (ATR-FTIR)

全反射減衰フーリエ変換赤外分光法 (ATR-FTIR) は、名古屋工業大学の岩城特任教授、神取教授との共同研究により行った。ATR-FTIR には、1.2.2.と同様の方法で培養・精製した GkPOT を利用した。名古屋工業大学にて、GkPOT と混合脂質 POPE/POPG をモル比で 1:30 の割合で混合したプロテオリポソームを作製し、測定試料として使用した。測定は、2 種類の pH 条件 (pH 5.0 と pH 7.0) に対して、それぞれ基質非存在下条件と基質ジペプチドである 2 mM Ala-Ala 存在下条件にて行った<sup>(59)</sup>。各測定は、7 回以上繰り返した。

## 2.3. 結果と考察

### 2.3.1. 基質非存在下での MD シミュレーション

第一章において、GkPOT の Glu310 残基の側鎖カルボキシル基がプロトン化部位であることが示唆された。そこで、Glu310 残基のプロトン化が GkPOT の構造変化にどのような影響を与えるかを調べる為に、高分解能で明らかにした結晶構造 GkPOT (SO<sub>4</sub> 型) を初期構造として、Glu310 残基の側鎖をプロトン化した状態で行った MD シミュレーションと脱プロトン化した状態で行った MD シミュレーションの比較を行った。以降、それぞれのシミュレーションを S-E310p と S-E310 と表記する。

それぞれのシミュレーションにおいて、GkPOT がどれだけ変化したかを調べる為、各残基に対して時間平均の RMSF をプロットした (図 2-1)。どちらのシミュレーション結果においても、N 端残基や C 端残基、付随ヘリックス HB は 3 Å 程度構造が変化しており、N 端バンドル (H1-6) や C 端バンドル (H7-12) のほとんどは 1 Å 程度の構造変化であることは共通していた。結晶のパッキングに関与していた H9 と H10、その間のループ領域に少し構造変化が見られたことも共通しており、これらの変化は Glu310 残基のプロトン化による影響ではないと考えられる。一方、H4 と H5、その間のループも結晶のパッキングに関与していた領域であり、プロトン化状態の S-E310p において 3 Å 程度の構造変化が観測された。しかしながら、脱プロトン化状態の S-E310 では、5 Å 程度の構造変化が観測され、この構造変化の違いは Glu310 残基のプロトン化による影響ではないかと考えられる。

細胞内側に位置している H4-5 (141-156 残基) と H10-11 間 (420-440 残基) の距離

をシミュレーション時間に対してプロットした結果を図 2-2 A に示した。プロトン化状態の S-E310p では、H4-5 と H10-11 間の距離が 20 Å からほとんど変化していなかった。一方、脱プロトン化状態の S-E310 では、H4-5 と H10-11 間の距離が S-E310p より接近する傾向にあり、84.52 ns 時点では最大 14 Å 程度まで接近していた。84.52 ns 時点での S-E310 の構造（以降、S-E310 (84.52 ns) と表記）は、初期構造と比べて、H4-5 が C 端バンドルの H8, H10, H11 に接近しており、細胞内側に開いていた基質結合部位を部分的に塞いでいた（図 2-2 B, C）。H4, H5 を初期構造と比較すると、H4 に存在する Pro137 残基と H5 に存在する Pro173 残基を基点にヘリックスが曲がっていることが明らかになった（図 2-3 A）。RMSF について変化の少なかった C 端バンドルを基準に構造の重ね合わせを行うと、H4-5 が C 端バンドルの方向に傾いていることが明らかになった（図 2-3 B）。

次に、H4-5 の傾きがドメインレベルの変化に起因するものかを調べる為、N 端バンドルに着目した。C 端バンドルを基準に構造の重ね合わせを行い、N 端バンドルが初期構造から変化した角度をシミュレーション時間に対してプロットした（図 2-4）。その結果、プロトン化状態の S-E310p では、N 端バンドルが約 2 度変化していた。一方、脱プロトン化状態の S-E310 では、N 端バンドルが S-E310p より回転する傾向にあり、84.52 ns 時点では約 10 度変化していた。この N 端バンドルの回転により、2 つの Pro 残基を基点に折れ曲がっていた H4 と H5 が C 端バンドル側にさらに押し出され、細胞内側の基質結合部位を狭くし、基質結合部位の N 端バンドルと C 端バンドルの界面を接近させていた。

S-E310 (84.52 ns) の構造を Outward-open 状態の結晶構造が報告されたフコース輸送体 FucP<sup>(11)</sup>と比較すると、FucP の H4-5 は C 端バンドルの方向に傾いており、H8, H10, H11 に近接していた（図 2-5 A）。また、Occluded 状態の結晶構造が報告された EmrD<sup>(10)</sup>と比較すると、EmrD の H4-5 は S-E310 (84.52 ns) と同様の位置に存在しており、全体構造がよく似ていた（図 2-5 B）。これらの構造比較から、S-E310 (84.52 ns) は Occluded 状態の構造であり、脱プロトン化状態の S-E310 で観測された構造変化は、Inward-open 状態から Outward-open 状態へ構造変化する際の初期動作であると考えられる。この構造変化は、脱プロトン化状態の S-E310 において、Occluded 状態へ構造が変化した後、再び Inward-open 状態へ構造が変化していた（図 2-2 A）。これは、脱プロトン化状態の GkPOT が、Inward-open 状態と Occluded 状態の平衡状態にある事を示唆している。新たに行った脱プロトン化状態のシミュレーション (S-E310-2) に

においても、Inward-open 状態と Occluded 状態の平衡状態が確認されたことから強く示唆される (図 2-6). 加えて、S-E310 (84.52 ns) の構造において結晶構造では見られなかった相互作用である Glu310 と Arg43 の塩橋が観測された (図 2-7 A). Glu310 残基と Arg43 残基の間の距離をシミュレーション時間に対してプロットすると (図 2-7 B), 脱プロトン化状態の S-E310 において安定して塩橋を形成しており, この相互作用が N 端バンドルと C 端バンドルを接近させる駆動力だと考えられる.

### 2.3.2. ジペプチド存在下での MD シミュレーション

次に, 基質ペプチドの結合が GkPOT の構造変化にどのような影響を与えるかを調べる為に, プロトン化状態の S-E310p と Glu310 残基の側鎖をプロトン化した状態の GkPOT に基質ジペプチド(Ala)<sub>2</sub> を結合させた複合体状態で行った MD シミュレーション (以降, S-E310p-AA と表記) を比較した. 基質ジペプチド(Ala)<sub>2</sub> の結合位置は, 第一章で明らかにした GkPOT (E310Q, alafos 型) の alafosfalin の結合様式を基に作製した. (Ala)<sub>2</sub> 複合体状態の S-E310p-AA では, (Ala)<sub>2</sub> は基質結合部位に安定して結合していた. (Ala)<sub>2</sub> の C 側のカルボキシル基は, GkPOT (E310Q, alafos 型) で観測されたように, Arg43 残基や Glu310 残基の側鎖との水素結合を維持しており, (Ala)<sub>2</sub> の N 側のアミド基は, 初期構造と比較して Glu413 残基の側鎖方向への移動が観測された (図 2-8). しかしながら, 100 ns 間のシミュレーションでは, GkPOT の全体構造にほとんど変化は観測できなかった.

POT ファミリータンパク質は, 親水性ジペプチドより疎水性ジペプチドの方が高い親和性を示すことが報告されている<sup>(38, 56)</sup>. そこで, より疎水性の高いジペプチド(Phe)<sub>2</sub> を基質ペプチドとして使用し, 再度複合体状態の MD シミュレーションを行った (以降, S-E310p-FF と表記). 基質ペプチド(Phe)<sub>2</sub> の結合位置は, 100 ns 時点の S-E310p-AA の構造を基に作製した. (Phe)<sub>2</sub> 複合体状態の S-E310p-FF では, GkPOT の全体構造に大きな変化が観測され, H4-5 と H10-11 間の距離が S-E310p より接近する傾向が見られた (図 2-9 A). この距離が一番接近したのは 183.47 ns 時点であり, 14 Å 程度まで接近していた. また, N 端バンドルは, プロトン化状態の S-E310p と比較してより回転する傾向にあり, 183.47 ns 時点では約 10 度回転していた (図 2-10). この構造変化は, 脱プロトン化状態の S-E310 で観測された構造変化と似ており, H4-5 が C 端バンドルの H8, H10, H11 に接近しており, 細胞内側に開いていた基質結合部位を部分的に塞ぐことで基質ペプチド(Phe)<sub>2</sub> を閉じ込めていた (図 2-9 B, C). 基質ペプチド(Phe)<sub>2</sub> は, シ

ミュレーションの間、安定して基質結合部位に結合しており、相互作用様式に大きな変化は観測できなかった。プロトン化した Glu310 残基の側鎖は、(Phe)<sub>2</sub> の C 側のカルボキシル基と水素結合を形成し続けており、Glu413 残基の側鎖は、(Phe)<sub>2</sub> の N 側のアミノ基との塩橋を形成し続けていた (図 2-11)。基質ペプチド(Phe)<sub>2</sub> の C 側の側鎖フェニル基は、Tyr78 残基や Trp306 残基、Trp440 残基が形成している疎水ポケット近傍に存在しており、これらの残基と疎水性相互作用を形成していた。一方、(Phe)<sub>2</sub> の N 側の側鎖フェニル基は、基質結合部位周辺に存在する溝に位置していた (図 2-11)。基質ペプチド(Phe)<sub>2</sub> が基質結合部位の N 端バンドルと C 端バンドルの両方と相互作用を形成していることから、これらの基質ペプチドを介した相互作用が N 端バンドルと C 端バンドルを接近させる駆動力だと考えられる。

### 2.3.3. ATR-FTIR を用いた GkPOT の動的解析

MD シミュレーション結果により、Inward-open 状態から Occluded 状態への構造変化は、H4 や H5 などの膜貫通ヘリックスの構造変化により起きると示唆された。そこで、基質ペプチドの結合により GkPOT の構造が変化するかを ATR-FTIR を用いて測定を行った。

2 種類の pH 条件 (pH 5.0 と pH 7.0) に対して、基質ジペプチド Ala-Ala 存在条件での測定スペクトルと非存在条件での測定スペクトルの差スペクトルを図 2-12 に示した。差スペクトルで表示することにより、基質ジペプチド存在条件に特有のシグナルがプラス方向に現れ、非存在条件に特有のシグナルがマイナス方向に現れる。pH 5.0 の条件の差スペクトルを青線で表示すると、差スペクトルはベースラインとほとんど一致していた。このことから、pH 5.0 の条件では、基質ペプチドの結合による構造変化は起きていないと考えられる。一方、pH 7.0 の条件の差スペクトルを赤線で表示すると、いくつかのピークが観測され、基質ペプチドの結合により構造変化が起きたと考えられる。これらの結果は、様々な pH 条件下で行ったプロトン駆動の輸送活性測定の結果とも一致しており、GkPOT は pH 7.0 の条件で一番高い活性を示した (図 2-13 A)。

1660/1651 cm<sup>-1</sup> や 1549 cm<sup>-1</sup> に現れたピークは特徴的な  $\alpha$ -ヘリックス由来のピークであり、それぞれアミド 1 (C=O の伸縮振動) とアミド 2 (N-H の変角振動, C-N の伸縮振動) を示す。これらのピークがマイナス方向に現れたことから、基質ペプチドの結合により  $\alpha$ -ヘリックス構造が部分的に乱れたことを示している。1700-1670 cm<sup>-1</sup> や 1640-1600 cm<sup>-1</sup> に現れたプラス方向のピークはアミド 1 を、1533 cm<sup>-1</sup> に現れたプラス

方向のバンドはアミド 2 を示している。1533 cm<sup>-1</sup>は基質ペプチドの結合によりα-ヘリックスの水素結合が弱くなったことを示している。また、1700-1670 cm<sup>-1</sup>のピークは、基質ペプチドの結合によりペプチド結合の C=O 基との水素結合が弱まったことを示しており、1640-1600 cm<sup>-1</sup>のピークは、基質ペプチド存在するペプチド結合を示していると考えられる。これらの結果は、MD シミュレーションで予測された構造変化を支持していると考えられる。

### 2.3.4. Arg43 と Glu310 の機能解析

2.3.1.で行った脱プロトン化状態の S-E310 において、Arg43 残基と Glu310 残基が塩橋を形成しており、この相互作用が Inward-open 状態から Occluded 状態へ構造変化する際の駆動力と考えられる。そこで、この相互作用の重要性を検証する為、これらの残基について変異体 GkPOT を作製し、1.2.6.と同様の方法で機能解析を行った (図 1-10, 1-11)。変異体 GkPOT (R43Q) について、プロトン駆動による輸送活性は GkPOT (WT) と比較して著しく低下していたのに対して、基質ペプチドの交換活性は維持していた。プロトン駆動による輸送活性は、図 p-2 に示すような輸送サイクルが可能であるか (A→H) を示しており、基質ペプチドの交換活性は、基質が結合した状態で構造変化が可能であるか (C→E→C) を示している。Arg43 残基と Glu310 残基の塩橋形成は、Inward-open 単体状態から Occluded 分離状態へ構造変化する際 (G→H) に行われる。変異体 GkPOT (R43Q) では、Gln43 残基は Glu310 残基と水素結合は形成できるが、塩橋を形成することはできない。そのため、水素結合では N 端バンドルと C 端バンドルを近づける駆動力としては弱く、プロトン駆動による取り込み活性だけが低下した為と考えられる。

また、Arg43 残基と Glu310 残基の塩橋形成は、Glu310 残基の脱プロトン化の安定化に関与している可能性も考えられる。一般的に、細胞膜の内部は低誘電性環境であり、グルタミン酸残基の側鎖は負電荷を帯びている脱プロトン化状態より、中性であるプロトン化状態の方が安定である。Arg43 残基の側鎖グアニジル基の正電荷が、Glu310 残基の側鎖カルボキシル基の近くに存在することで、脱プロトン化を促進していると考えられる。変異体 GkPOT (R43Q) では、Gln43 残基の側鎖は中性であり Glu310 残基の脱プロトン化を促進できない。その結果、Glu310 残基のプロトン化状態が強まり、Occluded 単体状態への構造変化が阻害されている可能性も考えられる。GkPOT (WT) と変異体 GkPOT (R43Q) について、プロトン駆動による取り込み活性を様々な pH 条

件下において測定した (図 2-13). その結果, GkPOT (WT) では pH 7 の条件で活性が一番高くなるのに対して, 変異体 GkPOT (R43Q) では pH 9 の条件で活性が一番高くなった. これは, Arg43 残基が Glu310 残基の脱プロトン化に参与している可能性を示唆していると考えられる.

一方, 変異体 GkPOT (E310Q) も, Gln310 残基は Arg43 残基と水素結合は形成できるが, 塩橋を形成することができない. その為, 変異体 GkPOT (R43Q) と同様にプロトン駆動による取り込み活性だけが低下すると考えられた. しかしながら, 変異体 GkPOT (E310Q) では, プロトン駆動による取り込み活性と基質ペプチドの交換活性が両方とも低下した (図 1-10, 1-11). MFS 輸送体であるラクトース輸送体 LacY では, プロトンの結合位置が複数存在し, 構造状態の変化にプロトンの転位が必要だと示唆されている<sup>6)</sup>. その為, POT ファミリータンパク質も Outward-open 状態でのプロトン結合部位と Inward-open 状態でのプロトン結合部位 (Glu310 残基) が異なることが考えられる. 変異体 GkPOT (E310Q) は, Glu310 残基のプロトン化を模倣した変異体であり Inward-open 状態での基質ペプチドとの結合は可能であるが, プロトンの転位は不可能である. その結果, Inward-open 状態から Outward-open 状態への構造変化が妨げられることで, プロトン駆動による取り込み活性と基質ペプチドの交換活性がどちらも低下したと考えられる.

## まとめと総括

### プロトンとオリゴペプチドの共輸送メカニズム

第一章で解明した高分解能の結晶構造と第二章で行った MD シミュレーションや ATR-FTIR, プロテオリポソームなどを用いた機能解析から得られた知見を統合することで, 図 2-14 に示すような POT の構造変化がプロトンと基質の結合と共役する共輸送メカニズムを提案する. この共輸送メカニズムでは, Arg43 残基と Glu310 残基が重要な役割を担っている. 「プロトン化状態の Glu310 残基と Arg43 残基が基質ペプチドを認識 (図 2-14 A)」, または「脱プロトン化状態の Glu310 残基が Arg43 残基と塩橋を形成 (図 2-14 B)」が N 端バンドルと C 端バンドルを引き寄せ駆動力となり, Inward-open 状態と Occluded 状態間の構造変化が起こる. 対照的に, プロトン化状態の Glu310 残基だけでは Arg43 残基と弱い水素結合しか形成できず, N 端バンドルと C 端バンドルを引き寄せられずに構造変化が起こらない (図 2-14 C). また, 脱プロトン化状態の Glu310 残基では, 基質ペプチドの C 末端カルボキシル基の負電荷と静電反発を起こす為に基質ペプチドと結合できず, 構造変化は起こらない (図 2-14 D). この共輸送メカニズムは, POT ファミリータンパク質の構造変化がどのようにしてプロトンと基質がどちらも結合してない場合, または両方が結合した場合のみ起こるのかを明確に説明できている.

### 今後の展望

本研究により, POT ファミリータンパク質の持つ共輸送メカニズムの一端は明らかになった. しかしながら, Outward-open 状態と Occluded 状態の間の輸送メカニズムは依然不明のままである. POT には, ファミリー間でよく保存された ExxERFxYY モチーフが H1 に存在する (図 1-16). そのモチーフの一部である Glu32 残基を Gln へ置換した変異体 GkPOT (E32Q) は, 輸送活性も基質交換活性も著しく低下した (図 1-10, 1-11). これは, プロトン化部位と示唆された Glu310 を Gln へ置換した変異体 GkPOT (E310Q) と同様の結果であり, Glu32 残基が Outward-open 状態と Occluded 状態の間の構造変化に重要なプロトン化部位ではないかと予測している.

POT タンパク質の完全な共輸送メカニズムを解明するには, 未だ明らかになっていない Outward-open 状態の結晶構造を高分解能で解明する事が必要である. 現在までに, GkPOT を様々な pH 条件下で結晶化を行ってきたが, どの構造も Inward-open 状態の構造であった. ほとんどの MFS 輸送体が未だに Inward-open 状態の結晶構造, もしくは Outward-open 状態の結晶構造しか報告されていない現状を考えると,

Outward-open 状態の結晶構造を解明するには GkPOT を Outward-open 状態に固定させる必要があると考える。N 端バンドルと C 端バンドルに存在する細胞内側の残基をそれぞれ Cys に置換した変異体を作製し、ジスルフィド結合による Outward-open 状態への固定化する手法や細胞外側の相互作用部位を Trp 残基などのかさが高い残基に置換した変異体を作製し、Inward-open 状態への構造変化を阻害する手法を試みたが、残念ながら Outward-open 状態 GkPOT の構造解析には至らなかった。今後の研究により、近い未来 Outward-open 状態の POT の構造が解明されると思われるが、どのような手法を用いて解明するのか楽しみである。



## 第二章の図表

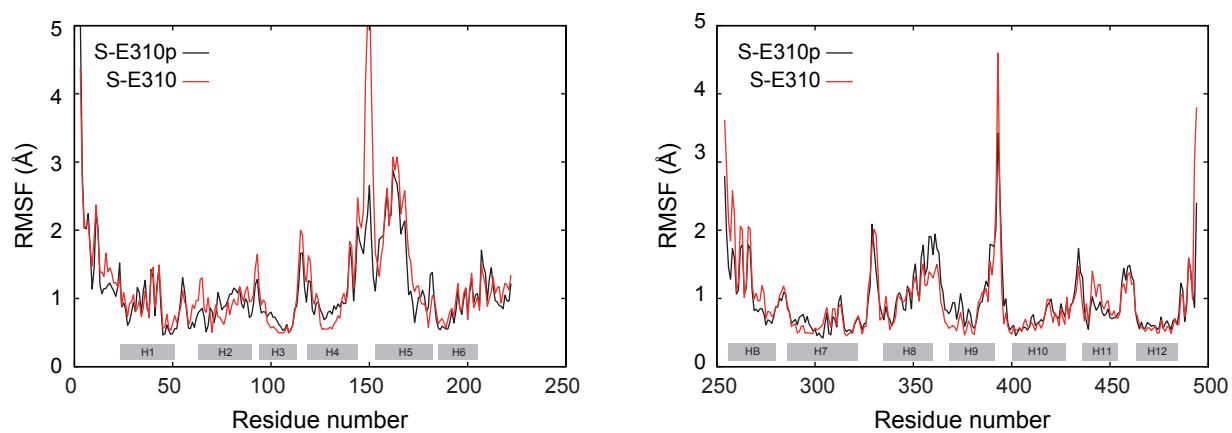


図 2-1 基質非存在下条件での MD シミュレーションにおける各残基の RMSF の平均値

プロトン化状態のシミュレーション (S-E310p) を黒線, 脱プロトン化状態のシミュレーション (S-E310) を赤線で示した. 膜貫通ヘリックスの領域を灰色で表記している.

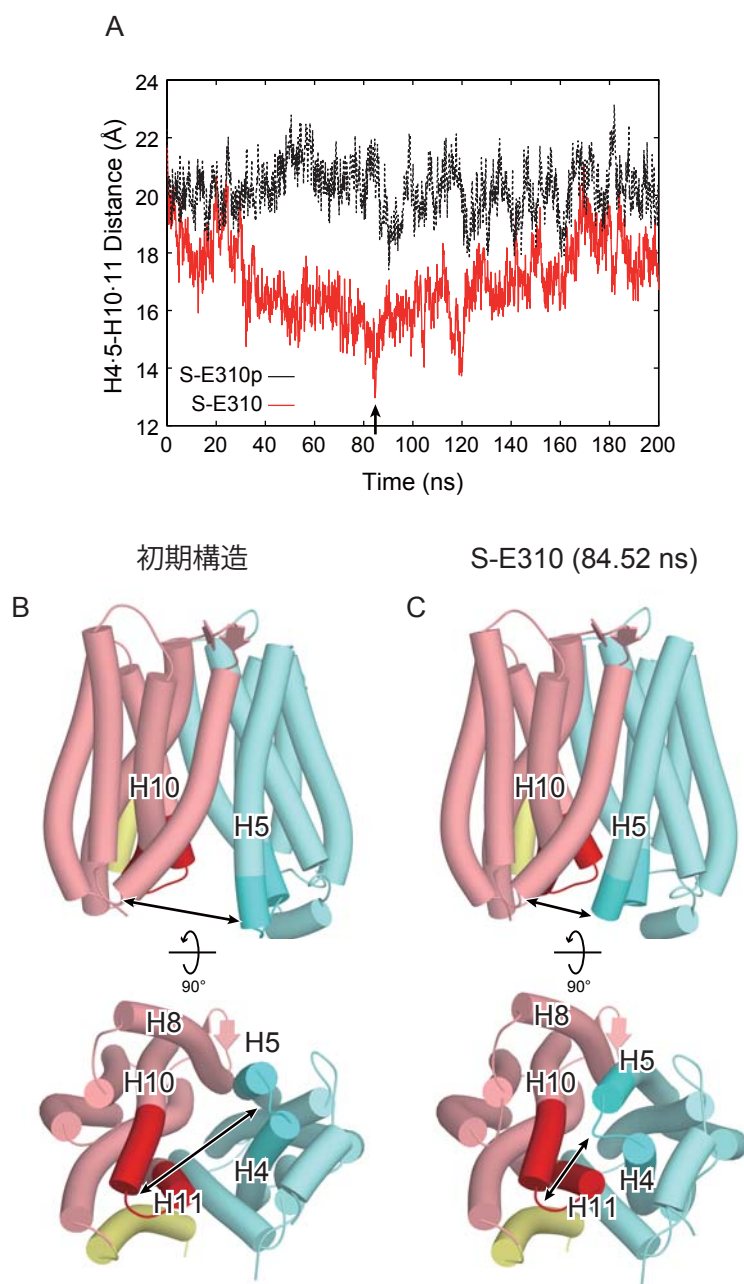


図 2-2 基質非存在下条件での MD シミュレーションにおける H4-5 と H10-11 間の距離

A; プロトン化状態のシミュレーション (S-E310p) を黒線, 脱プロトン化状態のシミュレーション (S-E310) を赤線で示した. 矢印は H4-5 と H10-11 の距離が最も接近した時点 (84.52 ns) を表す.

B-C; S-E310 の GkPOT 構造を示した. N 端バンドルをピンク色, C 端バンドルを水色, 付随ヘリックスを黄色で示し, H4-5 (141-156 残基) を赤色, H10-11 間 (420-440 残基) を濃い水色で示した.

B; MD シミュレーションの初期構造, C; 84.52 ns 時点の S-E310 の構造

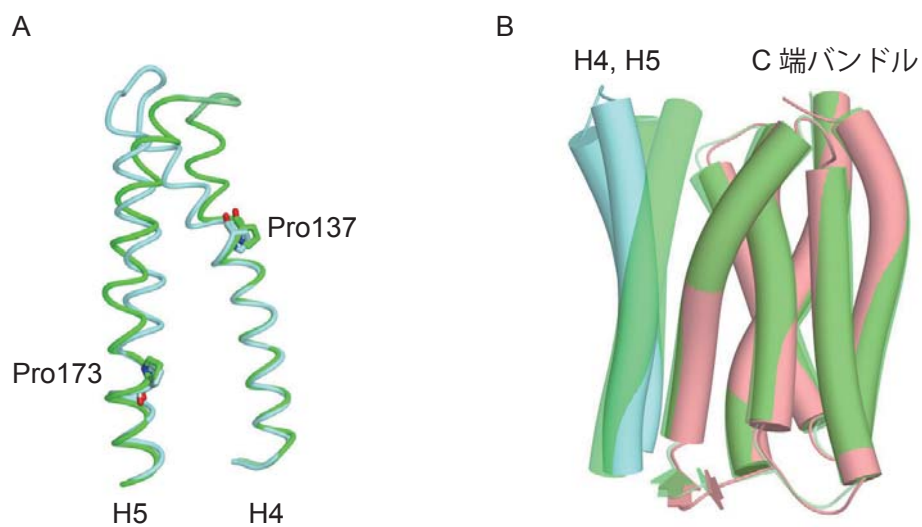


図 2-3 初期構造と S-E310 (84.52 ns) の構造比較

初期構造の H4, H5 を水色, C 端バンドルをピンク色で示し, S-E310 の構造を緑色で示した.

A; H4, H5 について重ね合わせを行った. 2つの Pro 残基を基点に構造が変化している.

B; C 端バンドルについて重ね合わせを行った. H4, H5 が C 端バンドル方向に傾いている.

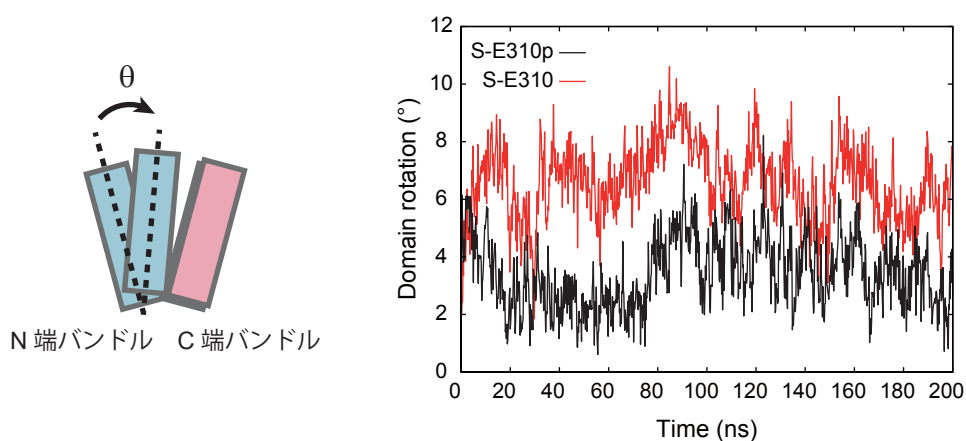


図 2-4 基質非存在下条件での MD シミュレーションにおける N 端バンドルの回転角度

C 端バンドルを基準とした N 端バンドルの回転角度を表示した. プロトン化状態のシミュレーション (S-E310p) を黒線, 脱プロトン化状態のシミュレーション (S-E310) を赤線で示した.

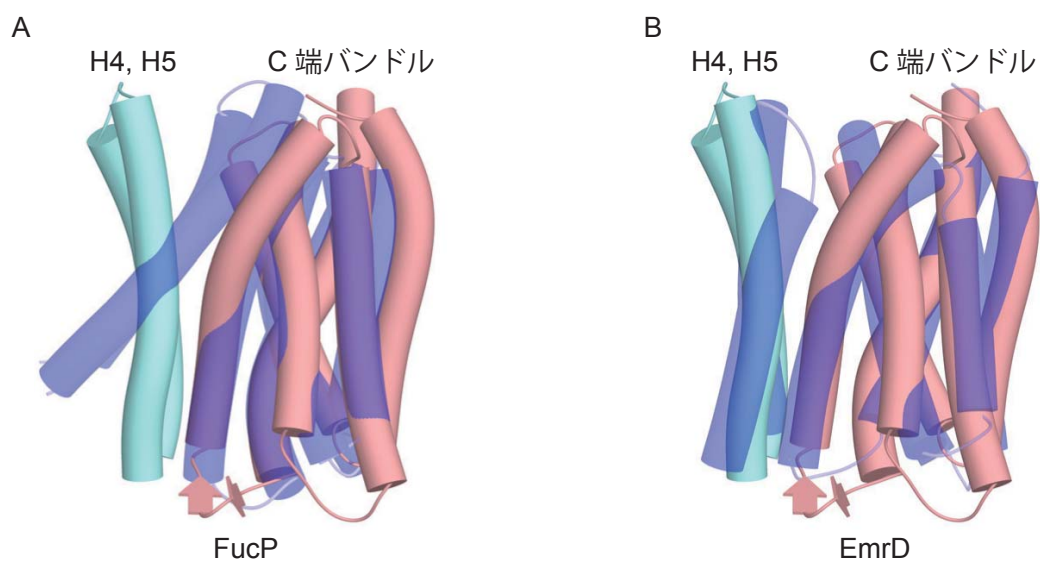


図 2-5 初期構造と FucP (Outward-open 状態), EmrD (Occluded 状態) の構造比較

初期構造の H4, H5 を水色, C 端バンドルをピンク色で示し, FucP, EmrD の構造を青色で示した.

A, B; 共に C 端バンドルについて重ね合わせを行った. どちらの構造も S-E310 だと同様に H4, H5 が C 端バンドル方向に傾いている.

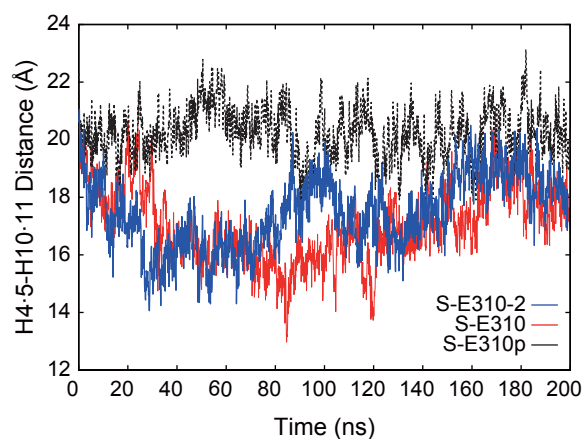


図 2-6 基質非存在下条件での MD シミュレーションにおける H4-5 と H10-11 間の距離 (2)

プロトン化状態のシミュレーション (S-E310p) を黒線, 1 回目の脱プロトン化状態のシミュレーション (S-E310) を赤線, 2 回目の脱プロトン化状態のシミュレーション (S-E310-2) を青線で示した.

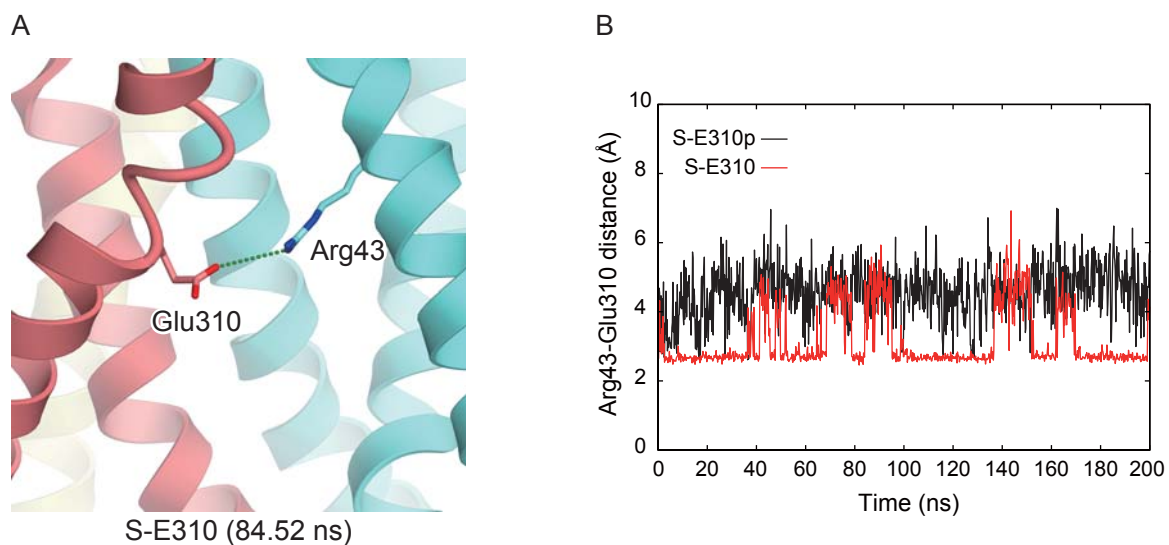


図 2-7 Arg43 残基と Glu310 残基の相互作用

A; S-E310 (84.52 ns) の構造では, Arg43 残基と Glu310 残基は塩橋を形成していた.

B; 基質非存在下条件での MD シミュレーションにおける Arg43 残基と Glu310 残基間の距離  
 プロトン化状態のシミュレーション (S-E310p) を黒線, 脱プロトン化状態のシミュレーション  
 (S-E310) を赤線で示した.

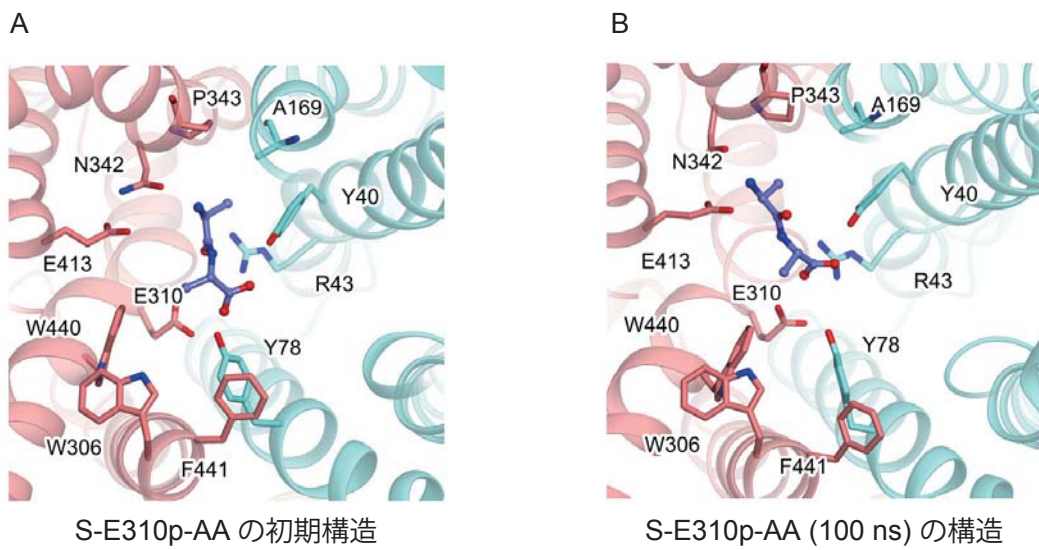


図 2-8 Ala-Ala 複合体状態での MD シミュレーション

N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色, Ala-Ala を紫色で示した.

A: 初期構造の基質結合部位

B: 100 ns 時点での S-E310p-AA の基質結合部位

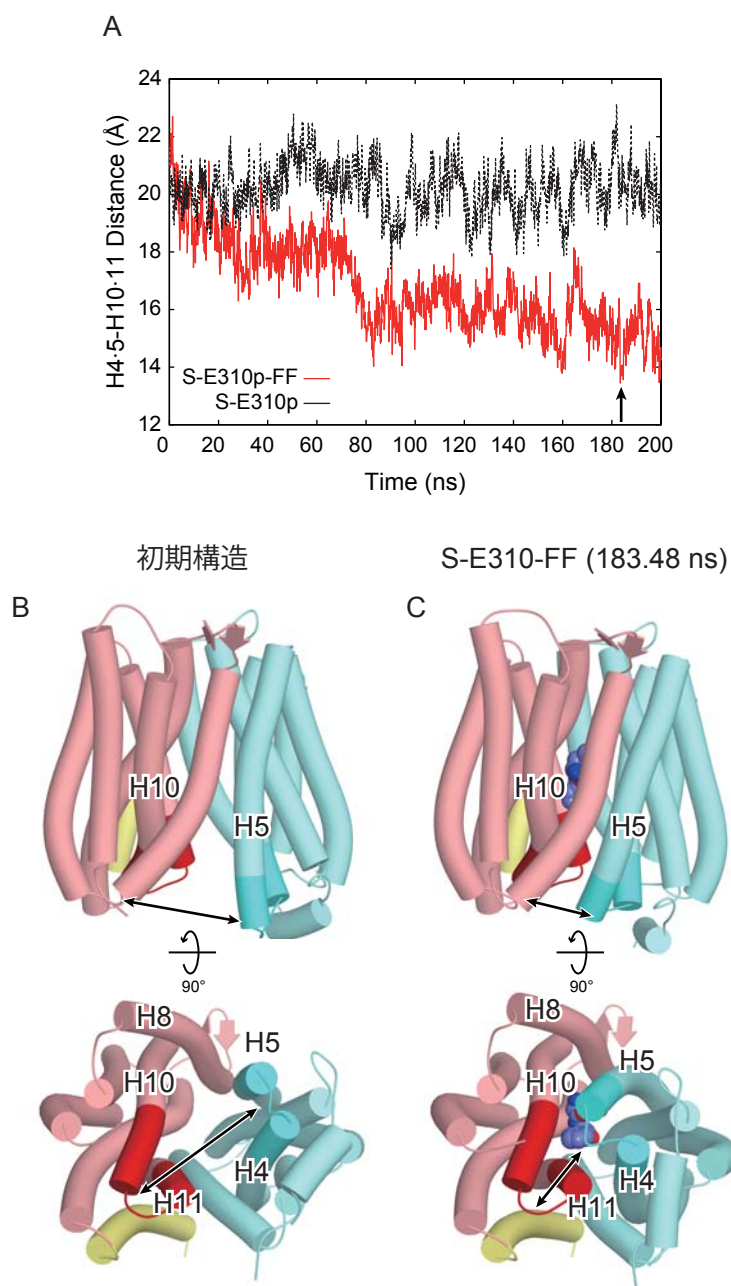


図 2-9 基質存在下条件での MD シミュレーションにおける H4-5 と H10-11 間の距離

A; プロトン化状態のシミュレーション (S-E310p) を黒線, Phe-Phe 複合体状態のシミュレーション (S-E310p-FF) を赤線で示した. 矢印は H4-5 と H10-11 の距離が最も接近した時点 (183.48 ns) を表す.

B-C; S-E310p-FF の GkPOT 構造を示した. N 端バンドルをピンク色, C 端バンドルを水色, 付随ヘリックスを黄色で示し, H4-5 (141-156 残基) を赤色, H10-11 間 (420-440 残基) を濃い水色で示した.

B; MD シミュレーションの初期構造, C; 183.48 ns 時点の S-E310p-FF の構造

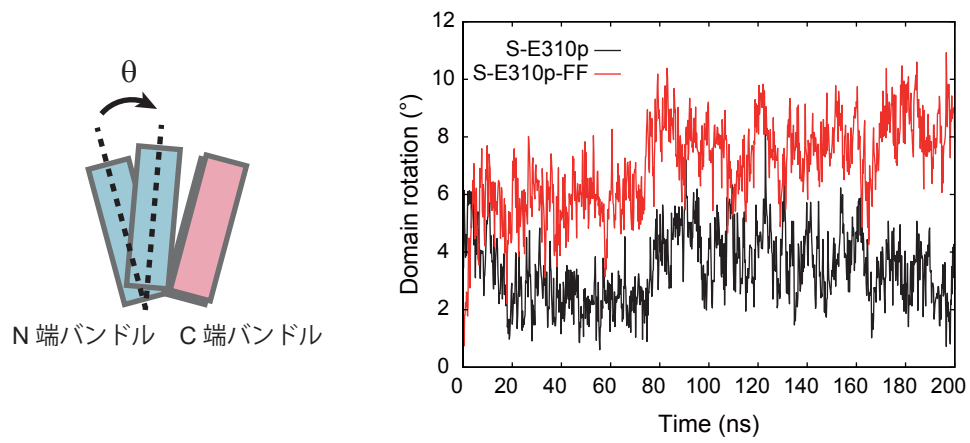


図 2-10 基質存在下条件での MD シミュレーションにおける N 端バンドルの回転角度

C 端バンドルを基準とした N 端バンドルの回転角度を表示した。プロトン化状態のシミュレーション (S-E310p) を黒線, Phe-Phe 複合体状態のシミュレーション (S-E310p-FF) を赤線で示した。



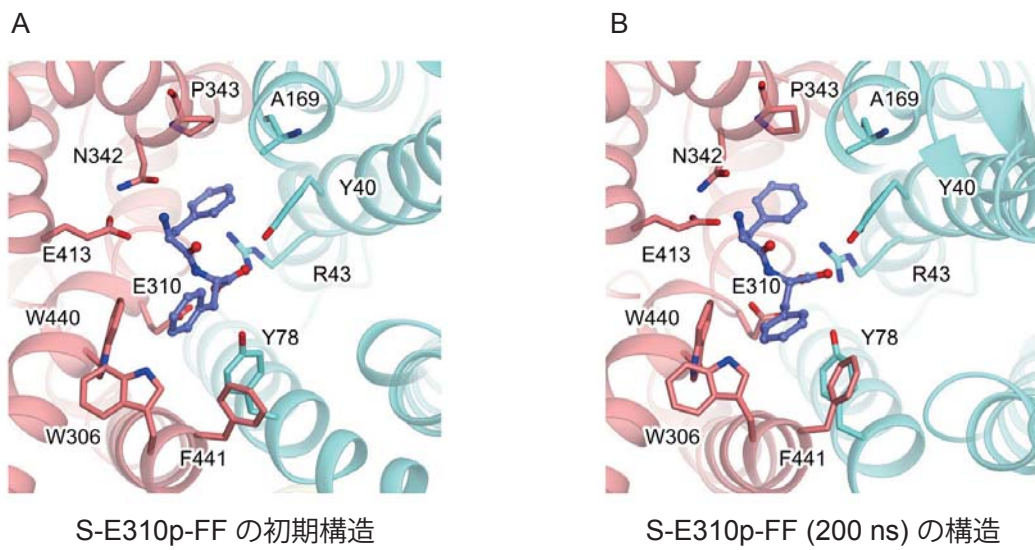


図 2-11 Phe-Phe 複合体状態での MD シミュレーション

N 端バンドルを水色，C 端バンドルをピンク色，Phe-Phe を紫色で示した．

A; 初期構造の基質結合部位

B; 200 ns 時点での S-E310p-FF の基質結合部位

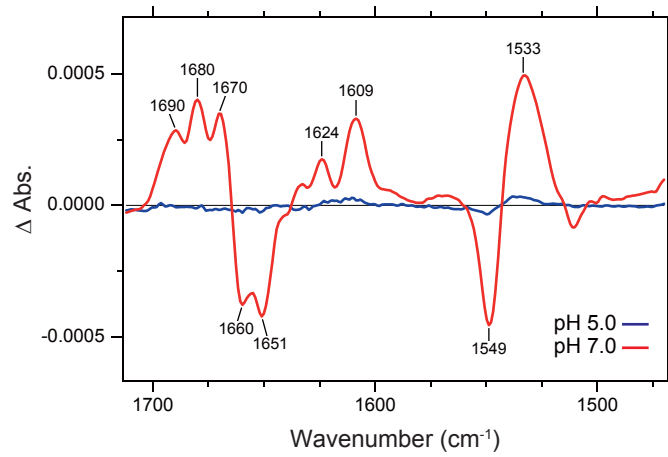


図 2-12 ATR-FTIR による基質存在条件と非存在条件の差スペクトル

基質ペプチド (2 mM Ala-Ala) 存在条件特有のシグナルをプラス方向に，非存在条件特有のシグナルをマイナス方向になるように示した．pH 5.0 の結果を青線，pH 7.0 の結果を赤線で示した．

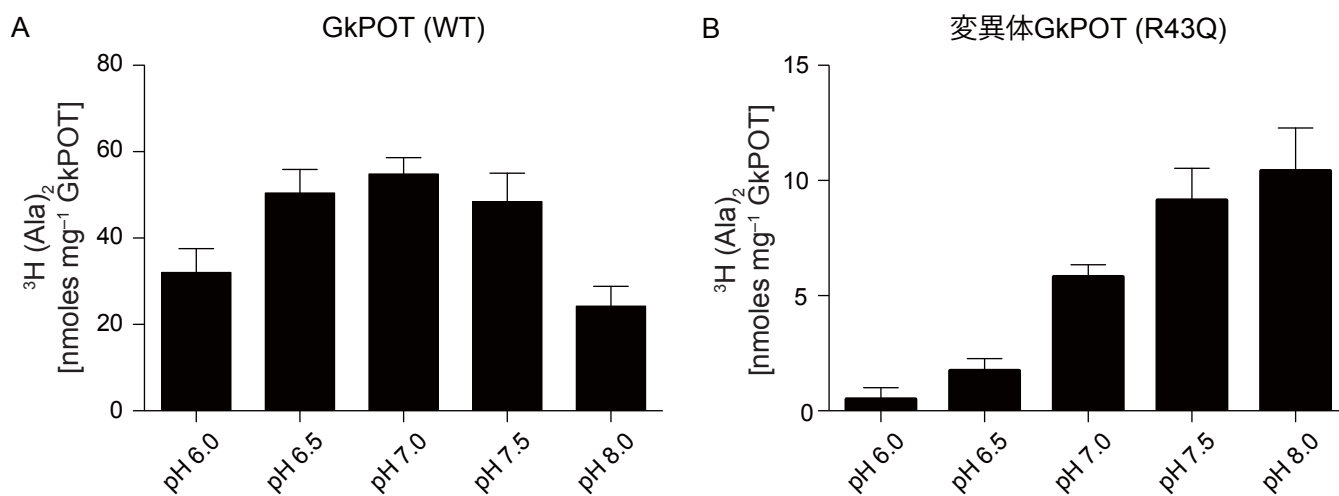


図 2-13 プロトン駆動による輸送活性の pH プロファイル

A; GkPOT(WT) を用いたプロトン駆動による輸送活性測定.

B; 変異体 GkPOT (R43Q) を用いたプロトン駆動による輸送活性測定.

プロテオリポソームの内部と外部の pH を同じにして、様々 pH 条件下について測定した.

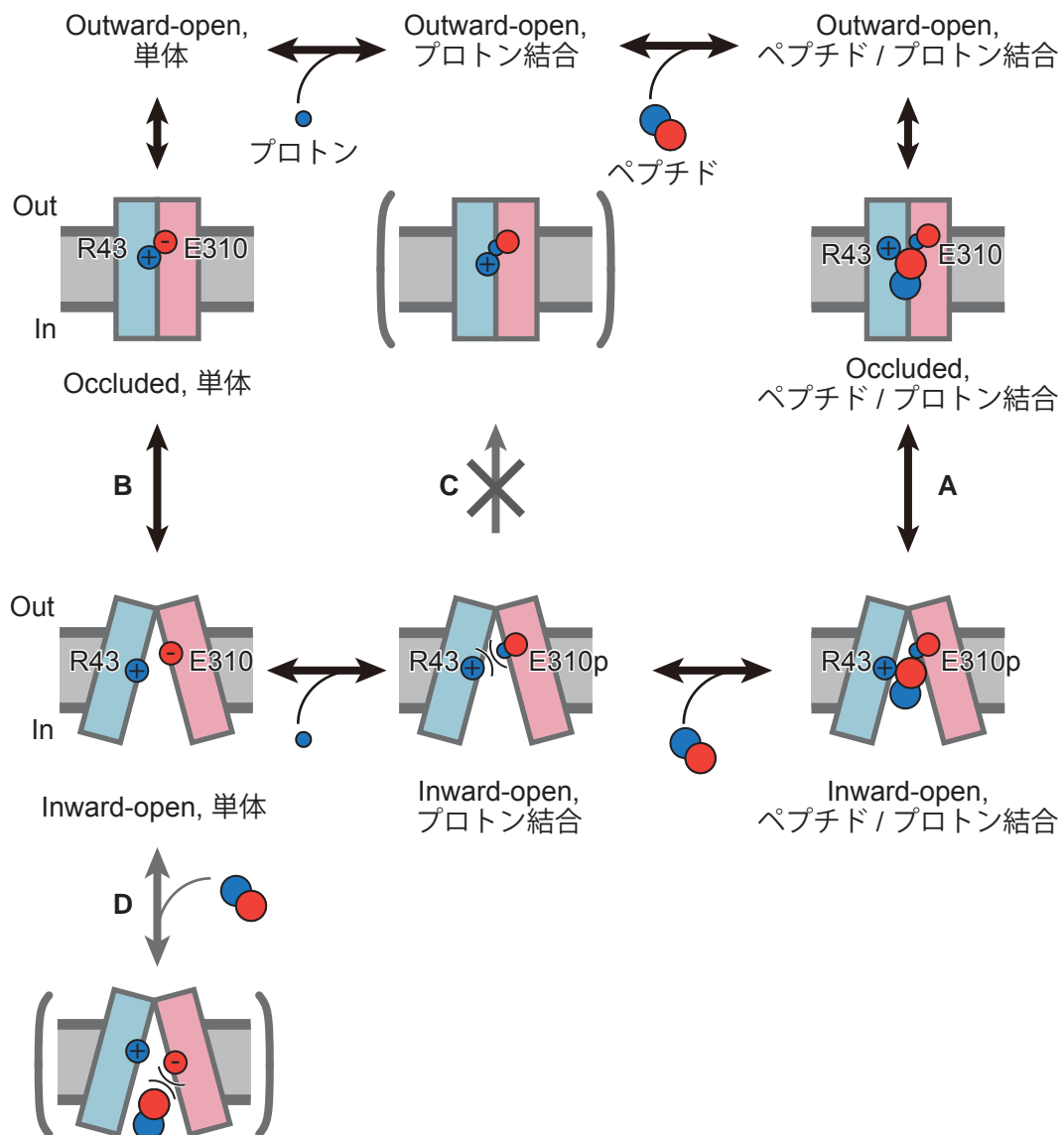


図 2-14 POT の共輸送メカニズムモデル

- A: プロトン化状態の Glu310 残基に Arg43 残基と基質ペプチドが結合した状態
  - B: 脱プロトン化状態の Glu310 残基と Arg43 残基が塩橋を形成した状態
  - A, B 状態では Occluded 状態と Inward-open 状態間の構造変化が可能である。
  - C: プロトン化状態の Glu310 残基は Arg43 残基と塩橋を形成できない。
  - D: 脱プロトン化状態の Glu310 残基にはペプチドの C 端カルボキシル基は結合できない。
- N 端バンドルを水色, C 端バンドルをピンク色, 脂質二重膜を灰色で表し, 正電荷を青色, 負電荷を赤色で示した。

表 2-1

シミュレーション名	初期構造	E310	基質	時間 (ns)	構造変化
S-E310p	GkPOT (SO <sub>4</sub> 型)	P	-	200	N. D.
S-E310	GkPOT (SO <sub>4</sub> 型)	D	-	200 x 2	Pre-Occluded
S-E310p-AA	GkPOT (SO <sub>4</sub> 型)	P	Ala-Ala	100	N. D.
S-E310p-FF	GkPOT (SO <sub>4</sub> 型)	P	Phe-Phe	200	Pre-Occluded

P: プロトン化状態, D: 脱プロトン化状態



## 参考文献

1. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 1998;280(5360):69-77. Epub 1998/04/29.
2. Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, H. M. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *nature*. 1985;318:618-24.
3. White SH. Biophysical dissection of membrane proteins. *nature*. 2009;459(7245):344-6. Epub 2009/05/22.
4. Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI, Saier MH, Jr. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *The FEBS journal*. 2012;279(11):2022-35. Epub 2012/03/31.
5. Yan N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in biochemical sciences*. 2013;38(3):151-9. Epub 2013/02/14.
6. Guan L, Kaback HR. Lessons from lactose permease. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2006;35:67-91. Epub 2006/05/13.
7. Mirza O, Guan L, Verner G, Iwata S, Kaback HR. Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H<sup>+</sup> symport in LacY. *The EMBO journal*. 2006;25(6):1177-83. Epub 2006/03/10.
8. Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*. 2003;301(5633):610-5. Epub 2003/08/02.
9. Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*. 2003;301(5633):616-20. Epub 2003/08/02.
10. Yin Y, He X, Szewczyk P, Nguyen T, Chang G. Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science*. 2006;312(5774):741-4. Epub 2006/05/06.
11. Dang S, Sun L, Huang Y, Lu F, Liu Y, Gong H, et al. Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *nature*. 2010;467(7316):734-8. Epub 2010/09/30.
12. Newstead S, Drew D, Cameron AD, Postis VL, Xia X, Fowler PW, et al. Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *The EMBO journal*. 2011;30(2):417-26. Epub 2010/12/07.

13. Sun L, Zeng X, Yan C, Sun X, Gong X, Rao Y, et al. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *nature*. 2012;490(7420):361-6. Epub 2012/10/19.
14. Iancu CV, Zamoon J, Woo SB, Aleshin A, Choe JY. Crystal structure of a glucose/H<sup>+</sup> symporter and its mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(44):17862-7. Epub 2013/10/16.
15. Jiang D, Zhao Y, Wang X, Fan J, Heng J, Liu X, et al. Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(36):14664-9. Epub 2013/08/21.
16. Pedersen BP, Kumar H, Waight AB, Risenmay AJ, Roe-Zurz Z, Chau BH, et al. Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter. *nature*. 2013;496(7446):533-6. Epub 2013/04/02.
17. Yan H, Huang W, Yan C, Gong X, Jiang S, Zhao Y, et al. Structure and mechanism of a nitrate transporter. *Cell reports*. 2013;3(3):716-23. Epub 2013/03/26.
18. Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, et al. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *nature*. 2014;510(7503):121-5. Epub 2014/05/23.
19. Ethayathulla AS, Yousef MS, Amin A, Leblanc G, Kaback HR, Guan L. Structure-based mechanism for Na<sup>(+)</sup>/melibiose symport by MelB. *Nature communications*. 2014;5:3009. Epub 2014/01/07.
20. Forrest LR, Kramer R, Ziegler C. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(2):167-88. Epub 2010/10/30.
21. Adibi SA, Mercer DW. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *The Journal of clinical investigation*. 1973;52(7):1586-94. Epub 1973/07/01.
22. Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, et al. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *nature*. 1994;368(6471):563-6. Epub 1994/04/07.
23. Liang R, Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang-Feng TL, et al. Human intestinal H<sup>+</sup>/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(12):6456-63. Epub 1995/03/24.



24. Fei YJ, Sugawara M, Liu JC, Li HW, Ganapathy V, Ganapathy ME, et al. cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1492(1):145-54. Epub 2000/09/27.
25. Paulsen IT, Skurray RA. The Pot Family of Transport Proteins. *Trends in biochemical sciences*. 1994;19(10):404-.
26. Steiner HY, Naider F, Becker JM. The PTR family: a new group of peptide transporters. *Molecular Microbiology*. 1995;16(5):825-34. Epub 1995/06/01.
27. Daniel H, Spanier B, Kottra G, Weitz D. From bacteria to man: archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology*. 2006;21:93-102. Epub 2006/03/28.
28. Ganapathy V, Leibach FH. Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. Studies with L-carnosine and glycyl-L-proline. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(23):14189-92. Epub 1983/12/10.
29. Daniel H, Kottra G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2004;447(5):610-8. Epub 2003/08/09.
30. Covitz KM, Amidon GL, Sadee W. Membrane topology of the human dipeptide transporter, hPEPT1, determined by epitope insertions. *Biochemistry*. 1998;37(43):15214-21. Epub 1998/10/28.
31. Brandsch M. Drug transport via the intestinal peptide transporter PepT1. *Current opinion in pharmacology*. 2013;13(6):881-7. Epub 2013/09/07.
32. Faria TN, Timoszyk JK, Stouch TR, Vig BS, Landowski CP, Amidon GL, et al. A novel high-throughput pepT1 transporter assay differentiates between substrates and antagonists. *Molecular pharmaceutics*. 2004;1(1):67-76. Epub 2005/04/19.
33. Smith DE, Clemencon B, Hediger MA. Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(2-3):323-36. Epub 2013/03/20.
34. Tamai I, Nakanishi T, Hayashi K, Terao T, Sai Y, Shiraga T, et al. The predominant contribution of oligopeptide transporter PepT1 to intestinal absorption of beta-lactam antibiotics in the rat small intestine. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1997;49(8):796-801. Epub 1997/08/01.
35. Wenzel U, Thwaites DT, Daniel H. Stereoselective uptake of beta-lactam antibiotics by the intestinal peptide transporter. *British journal of pharmacology*.

1995;116(7):3021-7. Epub 1995/12/01.

36. Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH. Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;246(2):470-5. Epub 1998/06/04.

37. Meredith D, Price RA. Molecular modeling of PepT1--towards a structure. *The Journal of membrane biology*. 2006;213(2):79-88. Epub 2007/04/10.

38. Solcan N, Kwok J, Fowler PW, Cameron AD, Drew D, Iwata S, et al. Alternating access mechanism in the POT family of oligopeptide transporters. *The EMBO journal*. 2012;31(16):3411-21. Epub 2012/06/05.

39. Kawate T, Gouaux E. Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure*. 2006;14(4):673-81. Epub 2006/04/18.

40. Cherezov V. Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies. *Current opinion in structural biology*. 2011;21(4):559-66. Epub 2011/07/22.

41. Kabsch W. Xds. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2010;66(Pt 2):125-32. Epub 2010/02/04.

42. Schneider TR, Sheldrick GM. Substructure solution with SHELXD. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2002;58(Pt 10 Pt 2):1772-9. Epub 2002/09/28.

43. Higuchi Y, Okamoto T, Fujimoto K, Misaki S. Location of active sites of NiFe hydrogenase determined by the combination of multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous-diffraction methods. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 1994;50(Pt 5):781-5. Epub 1994/09/01.

44. Abrahams JP, Leslie AG. Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 1996;52(Pt 1):30-42. Epub 1996/01/01.

45. Vagin A, Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2010;66(Pt 1):22-5. Epub 2010/01/09.

46. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2004;60(Pt 12 Pt 1):2126-32. Epub 2004/12/02.

47. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al.

PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2010;66(Pt 2):213-21. Epub 2010/02/04.

48. Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, Klebe G, et al. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic acids research*. 2007;35(Web Server issue):W522-5. Epub 2007/05/10.

49. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(18):10037-41. Epub 2001/08/23.

50. Hooft RW, Sander C, Vriend G. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. *Computer applications in the biosciences : CABIOS*. 1997;13(4):425-30. Epub 1997/08/01.

51. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins*. 2003;50(3):437-50. Epub 2003/01/31.

52. Harder D, Stolz J, Casagrande F, Obrdlik P, Weitz D, Fotiadis D, et al. DtpB (YhiP) and DtpA (TppB, YdgR) are prototypical proton-dependent peptide transporters of *Escherichia coli*. *The FEBS journal*. 2008;275(13):3290-8. Epub 2008/05/20.

53. Neumann J, Bruch M, Gebauer S, Brandsch M. Transport of the phosphonodipeptide alafosfalin by the H<sup>+</sup>/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2 in intestinal and renal epithelial cells. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2004;271(10):2012-7. Epub 2004/05/07.

54. Weitz D, Harder D, Casagrande F, Fotiadis D, Obrdlik P, Kelety B, et al. Functional and structural characterization of a prokaryotic peptide transporter with features similar to mammalian PEPT1. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(5):2832-9. Epub 2006/12/13.

55. Xu L, Haworth IS, Kulkarni AA, Bolger MB, Davies DL. Mutagenesis and cysteine scanning of transmembrane domain 10 of the human dipeptide transporter. *Pharmaceutical research*. 2009;26(10):2358-66. Epub 2009/08/18.

56. Fang G, Konings WN, Poolman B. Kinetics and substrate specificity of membrane-reconstituted peptide transporter DtpT of *Lactococcus lactis*. *Journal of bacteriology*. 2000;182(9):2530-5. Epub 2000/04/13.

57. Lyons JA, Parker JL, Solcan N, Brinth A, Li D, Shah ST, et al. Structural

basis for polyspecificity in the POT family of proton-coupled oligopeptide transporters. *EMBO reports*. 2014;15(8):886-93. Epub 2014/06/12.

58. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry*. 2005;26(16):1781-802. Epub 2005/10/14.

59. Doki S, Kato HE, Solcan N, Iwaki M, Koyama M, Hattori M, et al. Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(28):11343-8. Epub 2013/06/27.

60. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*. 1996;14(1):33-8, 27-8. Epub 1996/02/01.

61. Mackerell AD, Jr., Feig M, Brooks CL, 3rd. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *Journal of computational chemistry*. 2004;25(11):1400-15. Epub 2004/06/09.

## 外部発表

### 【発表論文】

Doki S.,\* Kato HE.,\* Solcan N.,\* Iwaki M., Koyama M., Hattori M., Iwase N., Tsukazaki T., Sugita Y., Kandori H., Newstead S., Ishitani R., Nureki O.  
Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 11343-11348, (2013)

(\*; These authors are equally contributed.)

### 【発表】

1. (口頭発表+ポスター) ○道喜慎太郎, 加藤英明, 石谷隆一郎, Newstead Simon, 濡木理, "オリゴペプチド輸送体の構造基盤の解明", 第35回日本分子生物学会(口頭発表; 1W7III-6, ポスター発表; 1P-0061) 2012年12月
2. (口頭発表+ポスター) ○道喜慎太郎, 加藤英明, 石谷隆一郎, Newstead Simon, 濡木理, "オリゴペプチド輸送体の構造基盤の解明", 第13回日本蛋白質学会 若手奨励賞シンポジウム(口頭発表; 2SA-8, ポスター発表; 2P-017) 2013年6月
3. (ポスター) ○道喜慎太郎, "オリゴペプチド輸送体の構造基盤の解明", 第53回生命科学夏の学校, 2013年8月
4. (ポスター) ○道喜慎太郎, 加藤英明, Solcan Nicolae, 岩城雅代, 光山倫央, 服部素之, 塚崎智也, 杉田有治, 神取秀樹, Newstead Simon, 石谷隆一郎, 濡木理, "Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT", 第36回日本分子生物学会(ポスター発表; P1-0061) 2013年12月

## 謝辞

本研究は、指導教官である濡木理博士の指導・支援の下で行われたものです。修士から当研究室を希望し、結晶構造学の基礎中の基礎でさえも分かっていなかった私を寛容に受け入れて頂き、今まで助言や支援などをして下さった濡木博士には、心より感謝の念を抱いております。

また、本研究の遂行にあたって、研究の方向性や回折データの解析手法、論文や申請書の執筆方法など様々場面において、厳しくもしっかりとした指導をして下さった石谷隆一郎博士に、心より感謝致します。研究室に配属当初、自身の研究が忙しい中、X線結晶構造解析の基礎となるタンパク質の発現や精製、結晶化の方法などを指導して頂いた樋口高志博士に、深く感謝致します。また、LCP法やプロテオリポソームを用いた機能解析、論文の作製について多大な助言を頂いた加藤英明博士にこの場を借りて御礼申し上げます。実験手法や研究方針についての助言だけでなく、研究外の活動でも助言や指導を頂いた西増弘志博士、西澤知宏博士に感謝致します。実験手法について様々な助言を頂いた塚崎智也博士に感謝致します。

また、第一章の研究において、プロテオリポソームの機能解析を行って下さったOxford大学のNicolae Solcan博士、Simon Newstead博士、第二章の研究において、MDシミュレーションを行って下さった光山倫央博士、理化学研究所の杉田有治博士、ATR-FTIR測定を行って頂いた名古屋工業大学の神取秀樹博士、岩城雅代博士に感謝申し上げます。

放射光施設SPring-8におけるX線回折実験は、平田邦夫博士をはじめ、多くのビームラインスタッフの皆様にご協力により行われたものです。特に、SPring-8 BL32XU stationの平田邦夫博士には様々な助言を頂きました。皆様にこの場を借りて御礼申し上げます。

そして、濡木研究室の皆様には、研究だけでなく研究室外の活動においても御支援、ご指導を頂きました。感謝申し上げます。秘書の山崎利枝子さんには、生活面において多大な支援を頂きました。感謝致します。特に、同学年であり、東工大時代からの友人である加藤一希博士には、多大なる刺激と時々の安らぎを頂きました。本当に感謝申し上げます。

最後に、私の研究生活を支援してくださった家族に心より深く感謝致します。