

論文の内容の要旨

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)

氏名： 道喜 慎太郎

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となる。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 **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(図 1).

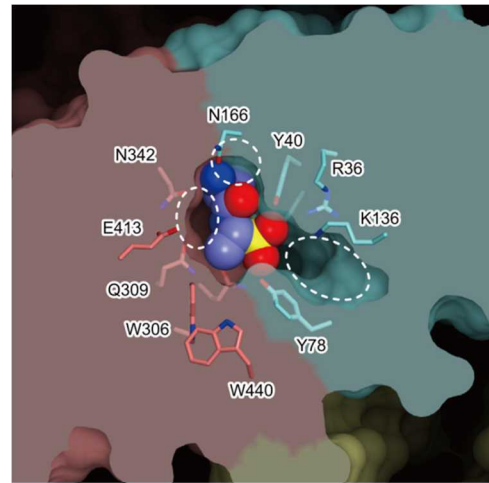


図 1 GkPOT と *alafosfalin* との複合体構造

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, 輸送体にプロトンと基質の両方が結合した場合, もしくはどちらも結合していない場合に構造変化が起こり, プロトンと基質が片方だけ輸送体に結合した場合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, これまでの研究では, 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

図 2 は POT の輸送メカニズムを示している. 輸送体タンパク質は、輸送体にプロトンと基質の両方が結合した場合、もしくはどちらも結合していない場合に構造変化が起こり、プロトンと基質が片方だけ輸送体に結合した場合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、これまでの研究では、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

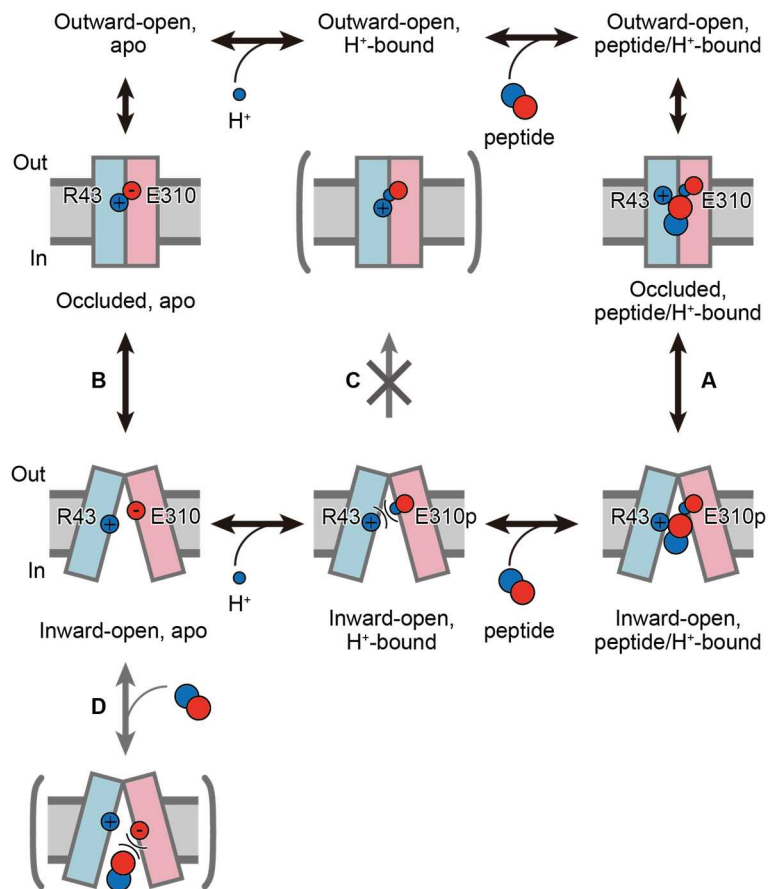


図 2 GkPOT の共輸送モデル

オンにより、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(図 2)。