

アミノ酸トランスポーターの構造/機能相関

姫路工業大学理学部教授

平 田 肇

アミノ酸トランスポーターの構造／機能相関

1 研究の背景と目的

細胞膜には各種のイオンあるいは糖、アミノ酸、アミンなど、さらには新たに合成されたタンパク質などを輸送する物質輸送システムが装備されている。これらは輸送される物質の違いばかりでなく、イオンチャンネルとトランスポーターのように機能的な差異があることが知られているにもかかわらず、これらの物質輸送システムを担うタンパク質の多くは基本構造として12回の膜貫通ドメインを単位（場合によっては1/2単位～ダイマーを含む）とした膜タンパク質であることが近年の遺伝子クローニング情報の集積から推定されるに至っている。また、これらの構造はバクテリアなどの原核生物から真核生物まですべての生物の物質輸送システムに共通して見いだされる構造であり、それぞれの機能ドメインは異なっているにもかかわらず、 K^+ チャンネルや Na^+ チャンネルなどのイオンチャンネルから比較的大きな有機分子を輸送するトランスポーターまでを含む物質輸送システムにとって共通の基本構造であると考えられている。一方、トランスポーターの多くは H^+ や Na^+ などの電気化学的ポテンシャルを輸送の駆動力として用いており、これら1価陽イオンの輸送と有機分子の輸送が担体分子の中で共役しているものと考えられている。

一方、糖やアミノ酸の輸送系に関する研究は国内外で古くから行われており、糖の輸送系ではKabackらによる大腸菌の乳糖輸送系の研究をはじめとして、WilsonとTsuchiyaらによるサルモネラ菌メリビオース輸送系、KasaharaとHinkleらによる赤血球グルコース輸送系などの研究が行われ、また、アミノ酸輸送系では安楽らによる大腸菌プロリン輸送系、浦谷らによる分枝鎖アミノ酸輸送系、および申請者らによる好熱菌アラニン輸送系などの研究が1970年代から行われてきており、これらの物質輸送システムが Na^+ あるいは H^+ との共輸送で行われることなどが明らかにされている。しかし、これらの中で細胞膜から生理的活性を有したままで輸送担体タンパク質の精製に成功した例は少なく、大腸菌の乳糖輸送タンパク質が1981年にKabackらのグループにより単離されたのを始めとして、Kasaharaらにより赤血球グルコース輸送タンパク質が、そしてアミノ酸輸送担体としては初めて申請者らにより中等度好熱菌PS3細胞膜からアラニントランスポーター（ACP）が精製されたにすぎない。その他のトランスポーターについては主に発現クローニングなどの遺伝子操作技術によってタンパク質の同定や性質などが調べられているにすぎず、生理的な条件下でのタンパク質の構造と機能の連関についてはいくつかの仮定を前提とせざるを得ない。

これらの糖やアミノ酸のトランスポーターの一次構造については主に遺伝子クローニング・シーケンシングによって決定されており、いずれも12～14本の膜貫通ドメインを有することが推測されている。しかし、このタンパク質の機能的側面である基質結合部位や共役イオンの結合部位等については部位特異的

変異導入等によって推定されているにすぎず、結晶化とX線解析等による高次構造の決定が必要であるが、現段階ではどの研究グループも成功していない。その点で本研究の対象である好熱菌のアラニン輸送担体は様々な物理化学的処理に耐性であることから注目を集めている。さらに、100℃以上もの超高温下で生息する超好熱菌は種々のアミノ酸を栄養素として生育できることが知られているが、これらのアミノ酸トランスポーターについては未だ全く解析がなされておらず、PS3のタンパク質よりさらに安定であることが期待される。本研究ではこれらイオンチャンネルやトランスポーターを含む物質輸送システムの構造的な共通性と機能的相異性がどのように相関しているかを明らかにすることを目的とした。

2 研究方法・研究内容

1) 好熱菌PS3のアラニントランスポーターの大量発現系の確立

タンパク質の高次構造の解明を目的とし、結晶化やX線解析などの物理化学的解析を行うために必要な大量の精製タンパク質を得ることができる系を大腸菌発現系を用いて構築することを試みた。ACPをコードする遺伝子、*acp*遺伝子が大腸菌のプラスミドベクターであるpMALc2に組み込み、マルトース結合タンパク質 (MBP) をコードする遺伝子 (*malE*) との融合遺伝子、*malE-acp*を作成した。この*malE-acp*を含むプラスミド (pAC6268) を種々の大腸菌のタンパク質発現ホストに導入し、MBP-ACP融合タンパク質を最も大量に発現する条件を検索した。

また、このプラスミドを大腸菌のアラニングリシン輸送能欠損株 (RM1株) に導入し、¹⁴C-グリシンを用いてその輸送能を測定したところ、輸送活性の回復が観察されたので、このMBP-ACP融合タンパク質の輸送活性について、RM1株に*acp*遺伝子を発現させたRM1 (pAC5629) とその諸性質を比較した。

2) 好冷菌のアラニントランスポーターホモログ遺伝子のクローニング

南極の海洋から採取された好冷菌の一種である*Alteromonas haloplanktis*よりACPのホモログタンパク質をコードしている遺伝子のクローニングを試みた。これまでに、同じ*Alteromonas haloplanktis*の常温細菌からACPのホモログであるアラニン、グリシン輸送担体タンパク質、DagAタンパク質をコードする遺伝子がMacLeodらによってすでにクローニングされているが、同種といっても生育温度が大きく違うためその遺伝子上でもかなり違いが生じている可能性がある。これらのアラニン輸送体タンパク質とACPを直接比較することによって、温度というパラメーターがタンパク質に与える影響の一端をうかがえることが期待される。ACPのホモログタンパク質であることが知られている*Alteromonas haloplanktis* (常温性) と大腸菌のORF476の3種の細菌のトランスポーターのアミノ酸配列上、最も保存されていると推定される配列を用いて遺伝子プライマーを設計し、*Alteromonas haloplanktis* (低温性) のゲノムに対しPCRで目的遺伝子配列を増幅させた。

3) 超好熱菌のアラニントランスポーター遺伝子のクローニング

(株) 海洋バイオテクノロジー研究所の帆秋らにより鹿児島県種子島の海底熱泉より採取、単離された *Thermococcus* 属 KS-1 株のゲノム DNA から発現クローニング法によりアラニントランスポーター遺伝子のクローニングを試みた。すなわち、pBR322 をベクターとして用い、Sau3AI で部分消化した KS-1 ゲノム DNA をライゲーションキット Ver2 (Takara) を用いてつなげ、Novagene Blue に形質導入することにより KS-1 ゲノム DNA ライブラリーを作成した。この KS-1 ゲノム DNA ライブラリーを RM-1 株に形質導入し、一定数のクローンを含むサブプールにわけ、37℃ で約 12 時間培養後、それぞれのプールについてグリシンの取り込み活性を測定した。活性のあったプールの菌体からプラスミドを精製し、RM-1 株に形質導入し、グリシンの取り込み活性を測定する。グリシンの取り込み能の回復がプラスミドを形質導入したことによるものであると確認されれば、このプラスミドを形質導入した RM-1 株をさらに少ないクローンずつのプールにわけ、活性を測定し、同様の操作を繰り返すことによって、最終的に、目的プラスミドのクローニングを目指した。

3 研究結果

1) 好熱菌 PS3 のアラニントランスポーターの大量発現系の確立

① MBP-ACP 融合タンパク質の輸送活性

大腸菌 RM1 株に pAC6268 を導入したところ、この株 (RM1 (pAC6268)) は isopropyl- β -thio-galactoside (IPTG) の誘導なしに MBP-ACP 融合タンパク質を発現することが抗 ACP 抗体および抗 MBP 抗体を用いたウエスタンブロットで確認された。この MBP-ACP 融合タンパク質の発現は低濃度の IPTG (5 μ M) の誘導で若干増強されたが、高濃度の IPTG では菌の生育が強く抑制され、この株においては MBP-ACP 融合タンパク質の大量の発現が細胞毒性を与えることが考えられた。しかし、低濃度 IPTG による誘導後の RM1 (pAC6268) について 14C-グリシンを用いてその輸送活性調べたところ輸送活性の回復が見られた。このことは MBP-ACP 融合タンパク質が融合状態のまま輸送活性を保持していることを意味する。また大腸菌 RM1 株に *acp* 遺伝子を発現させた RM1 (pAC5629) と RM1 (pAC6268) についてその生化学的諸性質を比較したところ、輸送の K_m 値や基質特異性はほぼ同じであることが示され、MBP が融合していることが ACP の基本的な機能にあまり影響を及ぼしていないことが予想された。しかし、輸送の至適温度について検討を行ったところ、RM1 (pAC5629) では 45℃ と好熱菌本来の耐熱性を反映したが、RM1 (pAC6268) においては至適温度は 35℃ となり、MBP-ACP 融合タンパク質では耐熱性が失われていることが示された。このことは MBP-ACP 融合タンパク質においては ACP の基本的な機能には影響はないものの、温度感受性を支配するような高次構造に若干変化を生じていることが予想される。

② MBP-ACP 融合タンパク質の大量発現系の構築

上に述べたように、RM1 (pAC6268) で発現した MBP-ACP 融合タンパク質は輸送活

性を示したものの、発現量は抗ACP抗体を用いたウエスタンブロットでやっと確認できる程度でその発現量は非常に低い。そこで大量発現系を構築するために宿主大腸菌をかえてその発現量を比較した。TB1、NovaBlue、TG1、PR745、JM109などの大腸菌宿主にpAC6268を導入してその発現量を比較したところ、TB1 (pAC6268)でのMBP-ACP融合タンパク質の発現量が最も多く、Coomassie染色ではっきりと確認することができたので、以後この株を用いてさらに大量にMBP-ACP融合タンパク質を得られる条件を検索した。培養温度や培地組成などの培養条件や、発現誘導を行うIPTG添加の時期や濃度について様々な検討を行った結果、大腸菌膜画分タンパク質の約20%に及ぶタンパク質量の発現を得る条件を得た。しかし、この大量に発現した融合タンパク質をリボソームに再構成し、その輸送活性を測定したところ十分な輸送活性は示されなかった。大腸菌膜画分を収集しスクロース密度勾配遠心を行った時に、MBP-ACP融合タンパク質は通常よりやや重い画分に存在することなどから、TB1株で大量に発現したMBP-ACP融合タンパク質は封入体構造をとっているなど、何らかの不活性な構造になっているために活性をほとんど失っているものと考えられる。なお、この発現タンパク質についてその一次構造をプロテインシーケンサーで解析したところ、ACPのアミノ酸配列は完全に保持されており、単なる遺伝子翻訳のミスではないことが示されている。したがって、現在この発現したタンパク質について、輸送活性を回復させるための再構成条件について検討中である。

2) 好冷菌のアラニントランスポーターホモログ遺伝子のクローニング

ACPとそのホモログタンパク質について特異的な配列に対して設計したプライマーを用いて、低温性の*Alteromonas haloplanktis*ゲノムに対しPCRを行ったところ、PCR産物に増幅されると予想された塩基サイズのものが確認されたので、これをクローニングベクター、pT7 Blue T-vectorにライゲーションし、そのPCR産物についてシーケンスを行いその全塩基配列を決定した。すると、この増幅されたPCR産物の中にACPとホモロジーの高い配列が存在することが分かった。現在この配列を用いてゲノムに対するサザンブロッティングを行い、この配列の全長を含む配列を取得し、その全塩基配列を決定しているところである。

3) 超好熱菌のアラニントランスポーター遺伝子のクローニング

①活性を追跡するスクリーニングを行うための検定実験

目的とするアラニン、グリシン輸送体遺伝子がどの程度サブプールに存在すればその活性が検出されるかを予め検定することは、本研究の必須のプロセスである。そこでpBR322、100ngに対して大腸菌アラニン、グリシン輸送体遺伝子*E. dagA*を含むプラスミドpYN5108を0.01ng, 0.1ng, 1ng, 10ng混合し、このプラスミド混合溶液をRM1株に形質導入してグリシン取り込み活性を測定した。その結果、形質導入する時点で1000個に1個の*E. dagA*遺伝子があればそのグリシン取り込み活性を検出できることが分かった。

②スクリーニング

クローン数約100のプールを41のプールに分け、それぞれRM1に形質導入したのちに活性測定し、4千個のクローンをスクリーニングした結果、4つのプールで高いグリシン取り込み活性が検出された。これらのプールからプラスミドを抽出し、再びRM1株に形質導入して、同様にグリシン輸送活性を測定したところ、予想されたほどの高い活性は得られなかったが2つのプールで若干高めの活性が得られ、今後この操作を繰り返すことによって目的とする遺伝子のクローニングが可能である。

4 研究結果の考察および今後の展望

1) 本研究は生体膜におけるイオンや有機物質の輸送を担う膜タンパク質の構造と機能の連関を解明することを目指し、好熱菌のアラニントランスポーターを例にとり、そのX線結晶解析のために必要なタンパク質の大量取得を試みた。

ACP遺伝子の発現には様々な方法が考えられたが、本研究で行った融合タンパク質として発現させる方法が最も確実で、かつ精製も簡単であることが判った。2) その中で本研究ではマルトース結合タンパク質 (MBP) 遺伝子との融合遺伝子作成によりMBP-ACP融合タンパク質を全膜タンパク質の20%を越える量で発現させる条件が設定できた。しかも興味あることに、このMBP-ACP融合タンパク質はそのものでACP機能をもつことが示された。このことはこの融合タンパク質のうち、可溶性タンパク質であるMBP部分と膜タンパク質であるACP部分が互いに独立したタンパク質として存在しており、機能的な干渉をしないことを示唆する。これまでMBP遺伝子を効果的に用いた発現系はいくつか報告されているが、いずれも可溶性タンパク質の発現に用いるのがほとんどで、これらの場合にはMBP部分を切り離すことが必要であるとされている。本研究のように膜タンパク質の発現に用いられた例は少なく、しかも融合した状態で機能を持つことが示された例はこれまでに知られていない。

3) しかしながら、MBP-ACP融合タンパク質をリボソームに再構成した時にその比活性が非常に低くなっていることが示され、この融合タンパク質の機能はやはり部分的な障害を受けていることが想像された。今後これらの点を解決することが必要である。

4) これまでにACPのホモログとしては *Alteromonas haloplanktis* のDagAと大腸菌ORF476しか知られておらず、そのために機能部位の推定が困難である。本研究では好冷性細菌や超好熱菌などからACPのホモログ遺伝子のクローニングを試みた。現在までにこれらの遺伝子がクローニングされる見通しがついたので、これらを用いて機能部位の特定、それをもとに部位特異的変異導入やキメラタンパク質作成などによって本研究の目標へ近づくことが可能である。

5 生活や産業への貢献および波及効果

1) 本研究の進展により、物質輸送システムの共通の高次構造を明らかにすることが可能となり、生体膜を介する輸送現象を分子レベルから原子レベルまで統一的に説明することが可能となる。

2) さらに、これらの異常によって引き起こされる疾患(シスチン尿症、Hartnup病、メチオニン吸収不全症など)や神経伝達物質再吸収機構、がん細胞の生理、あるいはうつ病などの精神疾患の病態などについて分子レベルでの解明が可能になる。

3) これまで膜タンパク質の大量発現、結晶化はその不安定さのために非常に困難とされており、本研究の対象である好熱菌アラニントランスポーターの大量発現、結晶化は実現の可能性が高く、他の膜タンパク質にも適用可能な一般的な方法論を確立することができる。

4) 好熱菌アラニントランスポーターに限って見れば、これは基質としてアラニン、グリシンをはじめ中性アミノ酸に対し幅広い基質特異性を有しており、また、 Na^+ イオンを共役イオンとして要求する。これらの性質とタンパク質の安定性からこれらアミノ酸の効果的なバイオセンサーとして利用可能である。さらに、超好熱菌のタンパク質はより安定であることが期待されるので、その安定性を付与する構造上の要因が解明されれば様々な安定な膜タンパク質の開発が可能である。

6 発表論文

1. Shinomiya, H., Hagi, A., Fukuzumi M., Mizobuchi, M., Hirata, H. and Utsumi, S.: Complete Primary Structure and Phosphorylation Site of the 65 kDa Macrophage Protein Phosphorylated by Stimulation with Bacterial Lipopolysaccharide. J. Immunol. 154 3471-3478 (1995).
2. Murai, N., Kamata, H., Nagashima, Y., Yagisawa, H. and Hirata, H.: A novel insertion sequence (IS)-like element of the thermophilic bacterium PS3 promotes expression of the alanine carrier protein-encoding gene. Gene 163 103-107 (1995).