

# 植物 MATE ファミリーの構造基盤

岩木 薫大

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 構造生命科学研究室

(塚崎 智也 教授)

令和 2 年 1 月 20 日提出

<p>所属 (主指導教員)</p>	<p>構造生命科学  (塚崎智也 教授)</p>		
<p>氏名</p>	<p>岩木薫大</p>	<p>提出</p>	<p>令和1年12月12日</p>
<p>題名</p>	<p>植物 MATE ファミリーの構造基盤</p>		
<p>MATE (<u>M</u>ultidrug <u>A</u>nd <u>T</u>oxic compound <u>E</u>xtrusion)タンパク質は膜貫通型の輸送体であり、多剤耐性菌の原因遺伝子として発見された。原核生物では NorM と DinF という2つのサブグループに分類され、どちらも様々な有機カチオン性の薬剤や毒物といった生体異物をプロトンやナトリウムイオンの濃度勾配を用いて細胞外へと排出する。2010年に初めてコレラ菌由来の MATE タンパク質の立体構造が報告されて以来、様々な原核生物由来の MATE タンパク質の立体構造が報告されている。結晶構造解析により、MATEは6回膜貫通領域が重複した12回膜貫通領域を持つ膜タンパク質であり、2つの6回膜貫通領域の間で形成されたV字型構造には中央部に縦20 Å x 横20 Å x 高さ10Åほどの大きさの空洞があることがわかった。この空洞内に基質または駆動力であるカチオンの結合部位が存在している。また、阻害剤である環状ペプチドとの複合体構造も報告されており、原核生物における MATE ファミリーの構造生物学的知見は着実に蓄積している。一方で、真核生物においては2015年の段階で1つも立体構造が報告されていなかった。そのため、植物由来の MATE に対する同定や機能解析は多数報告されていたものの、立体構造情報を用いた解析は困難な状況であった。</p> <p>植物では MATE ファミリーをより広範囲の生理機能に応用している。植物において MATE ファミリーの担っている機能は、2次代謝物の蓄積、老化の制御、酸性土壌への適応、鉄イオンの恒常性維持、生体異物の排出、ホルモン伝達などが報告されている。これらの機能の多様化は植物特異的に MATE の遺伝子数が増加していることが一因であると考えられる。また、一部の MATE タンパク質では基質の高い選択性が報告されている。発現場所は形質膜だけでなく、液胞膜、ゴルジ膜、小胞膜が報告されており、根や葉での組織特異的な発現も確認されている。輸送する基質も機能に応じて多様化しており、アルカロイド、フラボノイド、クエン酸、サリチル酸などである。特に、クエン酸は原核生物由来の MATE タンパク質で提唱されている“有機カチオン性”という基質の枠組みから外れている。これらのことから、植物において MATE ファミリーが新しい基質認識機構を獲得している可能性が考えられる。しかし、真核生物由来の MATE タンパク質の立</p>			

体構造不足や植物における多様化が原因となり、基質認識の変化についてアミノ酸レベルでの議論は困難であった。そこで、X線結晶構造解析により植物由来の複数の MATE タンパク質の立体構造を明らかにし、構造基盤を構築することを目的とした。まず、植物および原核生物由来の MATE のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った。その結果、植物由来の MATE は NorM 型と DinF 型の 2 つに分類されることがわかった。また、原核生物由来の MATE タンパク質の立体構造情報を用いて空洞の表面電荷計算を行ったところ、NorM はマイナスチャージ、DinF はポジティブチャージおよび弱いマイナスチャージを示し、空洞の荷電性には偏りがあることが示唆された。植物において NorM 型や DinF 型として配列保存性があるように、荷電性の偏りが植物にも保存されており、植物はその荷電性の偏りを利用して基質選択性を獲得したのではないかと考えた。

次に、様々な植物由来の MATE タンパク質を精製・結晶化した。その結果、*Camelina sativa* (ナガミノアマナズナ) 由来の MATE タンパク質 (CasMATE) の結晶を得ることができ、X線回折実験の結果、2.3 Å 分解能で結晶構造を決定することができた。CasMATE は 6 回膜貫通が重複した 12 回膜貫通領域で構成されており、V 字構造の中央に基質およびカチオンの結合部位と考えられる空洞が存在していた。表面電荷を空洞に対してマッピングしたところ、空洞は強くマイナスにチャージしていることがわかった。この強いマイナスチャージは原核生物の NorM と同様の性質であり、空洞の荷電性に関して原核生物と植物との間の保存性が示された。このことから、原核生物由来の MATE において見られた空洞の荷電性の偏りが植物においても存在している可能性が示唆された。

基質との親和性に空洞の荷電性が関与していると考えた場合、基質と空洞の電荷的適合性を調べるためには輸送基質の同定されている MATE の立体構造が必要となる。そこで、系統樹上で CasMATE と異なるグループに属し、明確な機能が報告されている MATE としてニコチンを輸送する MATE タンパク質の構造解析に取り組んだ。

ニコチンを輸送する MATE タンパク質のうち、*Nicotiana tabacum* (タバコ) 由来の MATE タンパク質 (NitMATE) の精製・結晶化に成功した。X線結晶構造解析の結果、3.2 Å 分解能で結晶構造を決定することができた。NitMATE の結晶構造では CasMATE ではディスオーダーしていた N 末端領域がモデリングでき、TMH (Trans Membrane Helix)<sub>2</sub> の構造変化により空洞体積が減少していることがわかった。NitMATE は NorM 型だと考えられるが、駆動力であるカチオンの結合部位のアミノ酸が 1 つ変異しており、原核生物とは異なったカチオンの結合様式を獲得している可能性が示唆された。また、空洞の荷電性を調べたところ、CasMATE よりも弱いマイナスチャージであることがわかった。これは塩基性有機化合物であるニコチンに対応していると考えられる。

本研究により、植物における MATE ファミリーの新たな分類を見いだすことができた。また、真核生物由来の MATE タンパク質の立体構造情報の基礎が固まり、更に、植物における MATE ファミリーの基質の多様性に関して構造生物学的観点から新たな道筋を開くことができた。

# 論文目録

所属 (主指導教員)	構造生命科学 (塚崎智也 教授)		
氏名	岩木薫大	提出	令和1年12月12日
学位論文の主たる部分を公表した論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ) “Crystal Structure of a Plant Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family Protein” Tanaka Y <sup>†</sup> , <b>Iwaki S<sup>†</sup></b> , and Tsukazaki T. (2017) <i>Structure</i> 25.9: 1455-1460. (†:同等貢献)			
参考論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)			

## 略語一覽

ADA	N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid
AOX	Alcohol oxidase
β-ME	2-mercaptoethanol
Br-NRF	6-bromo-1-ethyl-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3- carboxylic acid
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CHS	Cholesterol Hydrogen Succinate
Cy3G	Cyanidin 3-O-beta-D-glucopyranoside
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltoside
DMSO	Dimethyl sulfoxide
E3'G	Epicatechin 3'-O- glucoside
FSEC	Fluorescence-detection Size-Exclusion Chromatography
GFP	Green Fluorescent Protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
KAMO	Katappashikara Atsumeta data wo Manual yorimoikanjide Okaeshisuru
LCP	Lipidic Cubic Phase
LMNG	Lauryl Maltose Neopentyl Glycol
MWCO	Molecular Weight Cut Off
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PEG	Polyethylene glycol
PEG500DME	Poly(ethylene glycol) dimethyl ether 500
SDS-PAGE	Sodium laurylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Size-Exclusion Chromatography
SHIKA	Spot wo Hirotte Ichiwo Kimeru Application
TEV	Tobacco Etch Virus
TM	Tetraphenylphosphonium
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
YNB	Yeast Nitrogen base

# 目次

略語一覧.....	- 5 -
目次.....	- 6 -
第 1 章 序論.....	- 8 -
1.1 MATE ファミリーとは.....	- 8 -
1.2 MATE タンパク質のトポロジーおよび保存性.....	- 10 -
1.3 MATE タンパク質の立体構造知見.....	- 12 -
1.3.1 基本構造およびカチオン結合部位.....	- 12 -
1.3.2 基質結合部位.....	- 15 -
1.3.3 輸送モデル.....	- 16 -
1.4 植物における MATE の同定とその機能.....	- 19 -
1.5 植物における基質の構造と輸送の選択性.....	- 21 -
1.6 ニコチントランスポーター.....	- 23 -
1.7 本研究の目的.....	- 24 -
第 2 章 材料と方法.....	- 25 -
2.1 <i>CasMATE</i> の構造解析.....	- 25 -
2.1.1 蛍光ゲルろ過法を用いた <i>CasMATE</i> 変異体の評価.....	- 25 -
2.1.2 <i>CasMATE</i> 変異体の精製.....	- 27 -
2.1.3 <i>CasMATE</i> 変異体の結晶化.....	- 28 -
2.1.4 X 線回析実験およびデータ処理.....	- 28 -
2.1.5 <i>CasMATE</i> のモデル構築および構造精密化.....	- 29 -
2.1.6 系統樹解析.....	- 29 -
2.2 ニコチントランスポーターの構造解析.....	- 32 -
2.2.1 <i>Pichia pastoris</i> を用いた発現系の構築.....	- 32 -
2.2.2 <i>NtMATE2</i> の精製.....	- 32 -
2.2.3 <i>NtMATE2</i> の結晶化.....	- 33 -
2.2.4 X 線回析実験およびデータ処理.....	- 34 -
2.2.5 <i>NtMATE2</i> のモデル構築および構造精密化.....	- 34 -
第 3 章 結果と考察.....	- 35 -
3.1 <i>CasMATE</i> タンパク質の構造解析.....	- 35 -
3.1.1 <i>CasMATE</i> 変異体の FSEC による物性評価.....	- 35 -
3.1.2 <i>CasMATE</i> 変異体の精製.....	- 37 -

3.1.3	CasMATE 変異体の結晶化.....	- 38 -
3.1.4	大型放射光施設での X 線回折実験およびデータ処理.....	- 39 -
3.1.5	モデル構築および構造精密化 .....	- 39 -
3.1.6	CasMATE の全体構造およびカチオン結合部位.....	- 42 -
3.1.7	CasMATE と他の MATE タンパク質との構造比較.....	- 44 -
3.1.8	基質結合部位の比較 .....	- 46 -
3.1.9	系統樹解析による分類 .....	- 49 -
3.1.10	基質認識モデル .....	- 51 -
3.2	ニコチントランスポーターの構造解析.....	- 53 -
3.2.1	FSEC による発現量および単分散性の評価.....	- 53 -
3.2.2	NtMATE2 の精製.....	- 55 -
3.2.3	NtMATE2 の結晶化.....	- 56 -
3.2.4	X 線回折実験およびデータ処理 .....	- 56 -
3.2.5	モデル構築およびおよび構造精密化 .....	- 56 -
3.2.6	NtMATE2 の全体構造およびカチオン結合部位.....	- 59 -
3.2.7	NtMATE2 の基質結合部位.....	- 61 -
3.2.8	NtMATE2 のニコチン結合部位予測および輸送モデル .....	- 62 -
第 4 章	総括.....	- 66 -
4.1	本研究のまとめ.....	- 66 -
4.2	植物 MATE ファミリーの研究における今後の課題 .....	- 66 -
	参考文献.....	- 68 -
	謝辞.....	- 72 -

# 第1章 序論

## 1.1 MATE ファミリーとは

細胞膜は細胞が外界と区切られ生命活動をする上で最も大事な器官であると同時に物質の輸送を妨げる障壁ともなる。膜に局在しているトランスポーターは無機・有機化合物の流入・流出を手助けすることで細胞の生命活動を支えている。一方で、細胞にとって毒となるような物質は薬剤トランスポーターによって排出される。薬剤トランスポーターは原核生物からヒトまで幅広く保存されている膜タンパク質である。薬剤トランスポーターが過剰発現した細菌や癌細胞は薬剤に対して耐性を持つ。これはスーパー耐性菌や抗癌剤抵抗性癌細胞の出現につながるため大きな社会問題となっている。薬剤トランスポーターは ABC (ATP-binding cassette) , MFS (Major Facilitator Superfamily) , SMR (Small Multidrug Resistance) , RND (Resistance Nodulation cell Division) , MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) , PACE (Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux) , CDF (Cation Diffuion Facilitator) の7ファミリーが報告されている (Slipski *et al.*, *J. Membr. Biol* 2018) 。MFS ファミリーは12回膜貫通領域を持ち、全ての生物種に存在すると考えられている。基質は多種多様であり、糖、薬物、2次代謝物、オリゴサッカライド、アミノ酸、オキシアニオンなどがある

(Marger *et al.*, *Trends Biochemical Sci* 1993) 。1本目の膜貫通ヘリックス(TM)に強く保存されたアスパラギン酸とグルタミン酸があり、これらが基質の認識に重要であると言われている (Adler *et al.*, *Biochemistry* 2004) 。MATEは1998年に腸炎ビブリオ菌から *norM*、ホモログとして大腸菌から *ydhE* 遺伝子が単離された (Morita *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 1998) 。NorMは2次構造予測により12回膜貫通領域を持つと予測され、遺伝子重複によって形成された痕跡や薬剤輸送の機能から MFS (Major Facilitator Superfamily) ファミリーに属すると考えられていた。しかし、MFS ファミリーに保存されている TM1 の特徴的なアミノ酸が保存されていないことや、同時期に同じような配列パターンを持つトランスポーターが続々と発見されたことから、それまでに分類されていなかったものも含めて、新規に MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) ファミリーとして確立された (Brown *et al.*, *Mol Micr* 1999) 。

NorMやNorMのホモログを用いた機能解析により、MATEファミリーは多様な薬剤を  $\text{Na}^+$ もしくは  $\text{H}^+$ の濃度勾配を駆動力として対向輸送する多剤排出輸送体であるとわかった (Kuroda *et al.*, *BBA* 2009) 。原核生物における MATE ファミリーの基質は有機カチオン性化合物である norfloxacin のような Fluoroquinolone 系薬剤であると考えられたが、kanamycin や streptomycin などの非 Fluoroquinolone 系薬剤にも活性を示すことから、基質の分子構造に関連性を見出すことは困難である (図 1-1 a) 。また、ヒト由来の MATE はアニオン性薬物や両親媒性薬物を輸送することが報告されており (図



1-1 b) (Tanihara *et al.*, *Biochemical pharmacology* 2007) , MATE の基質認識のメカニズムは確立されていない。

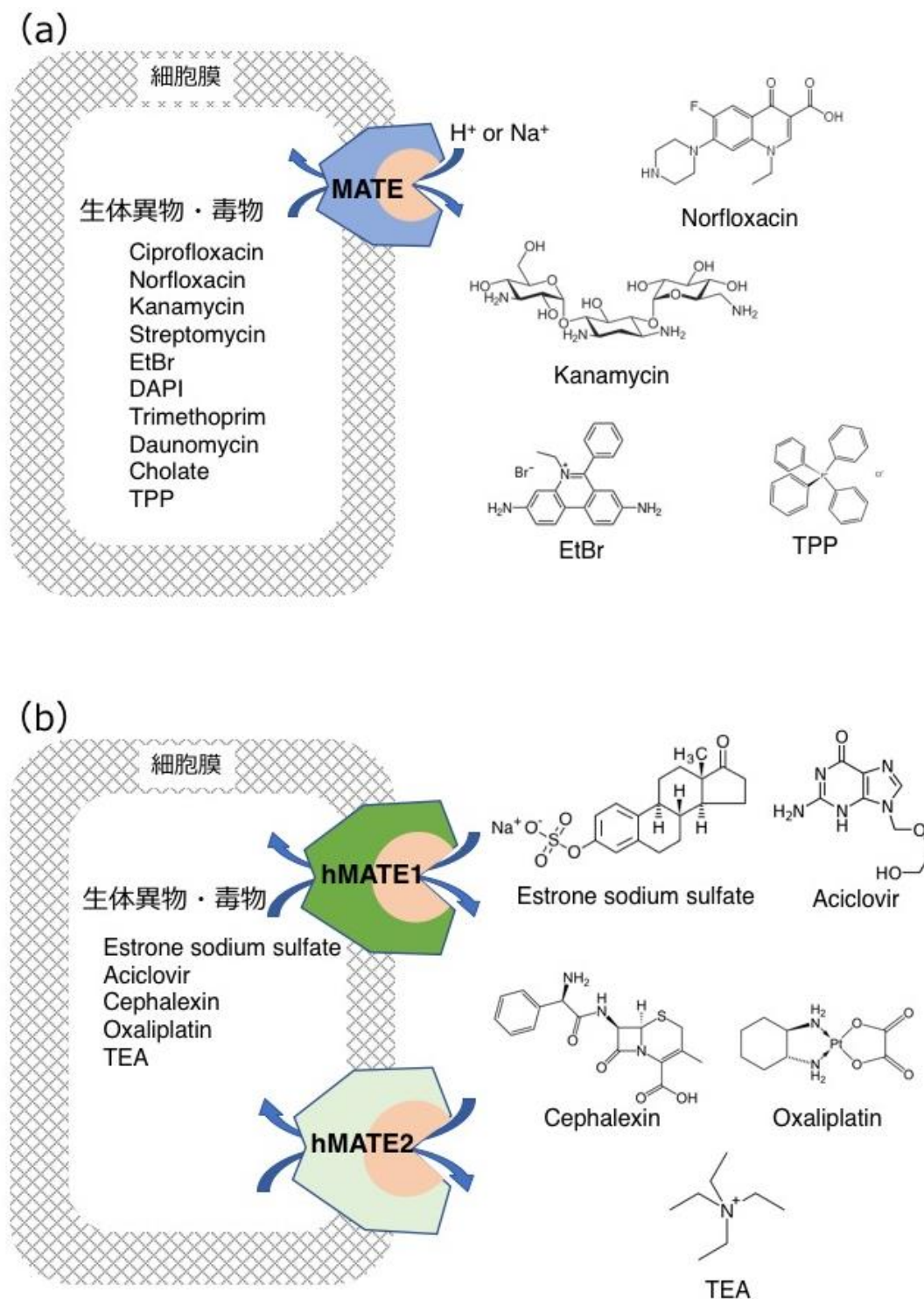


図 1-1. MATE ファミリーの基質

原核生物と動物において MATE タンパク質は細胞膜に局在し、細胞毒性を示す多くの薬剤を細胞外へと排出する。駆動力はプロトンもしくはナトリウムイオンである。

(a) 原核生物 (b) ヒト由来の MATE の基質の例を示している。

## 1.2 MATE タンパク質のトポロジーおよび保存性

MATE ファミリーは 6 回膜貫通領域が重複した 12 回膜貫通構造を形成している膜タンパク質で構成されている (図 1-2 a) . 450~550 ほどのアミノ酸で構成されており, 全ての生物に保存されていると考えられている (Omote *et al.*, *TiPS* 2006) . 原核生物, 古細菌, 真核生物由来の MATE タンパク質のアミノ酸配列を用いた系統樹解析により MATE ファミリーは大きく 3 つのグループに分けられている (図 1-2 b) . NorM グループ, DinF (DNA-damage-inducible protein F) グループ, そして eukaryoteic MATE (eMATE) グループである (Omote *et al.*, *TiPS* 2006) . MATE ファミリーは大腸菌では 3 遺伝子, ヒトでは 2 遺伝子保存されている. 一方で, シロイヌナズナでは 56 遺伝子, イネでは 45 遺伝子, タルウマゴヤシでは 70 遺伝子が保存されている. このように MATE ファミリーは原核生物と古細菌, 植物を除いた真核生物ではゲノム中に数遺伝子しか保存されていないが, 植物では遺伝子数が増加している. NorM と DinF はどちらも多剤耐性を示すが, アミノ酸配列の相同性は 20 % 以下である. NorM では保存性の高いアミノ酸が TM7~12 に, DinF では TM1~6 に存在する (Lu Min *Channels* 2016) . それぞれの保存性の高いアミノ酸が駆動力であるカチオンの結合に重要であると考えられている. また, 植物における MATE ファミリーの系統樹解析も行われており (Li *et al.*, *JBC* 2002, Shitan *et al.*, *Plos One* 2014, Takanashi *Plant Biotechnology* 2014, Wang *et al.*, *Plant J* 2017, Upadhyay *et al.*, *J. Exp. Bot* 2019) , 植物の中での MATE ファミリーの分類が行われている. しかし, 原核生物由来の MATE ファミリーと植物由来の MATE ファミリーの分類を比較した報告はなく, MATE ファミリーとしての統合的な知見となっていない.

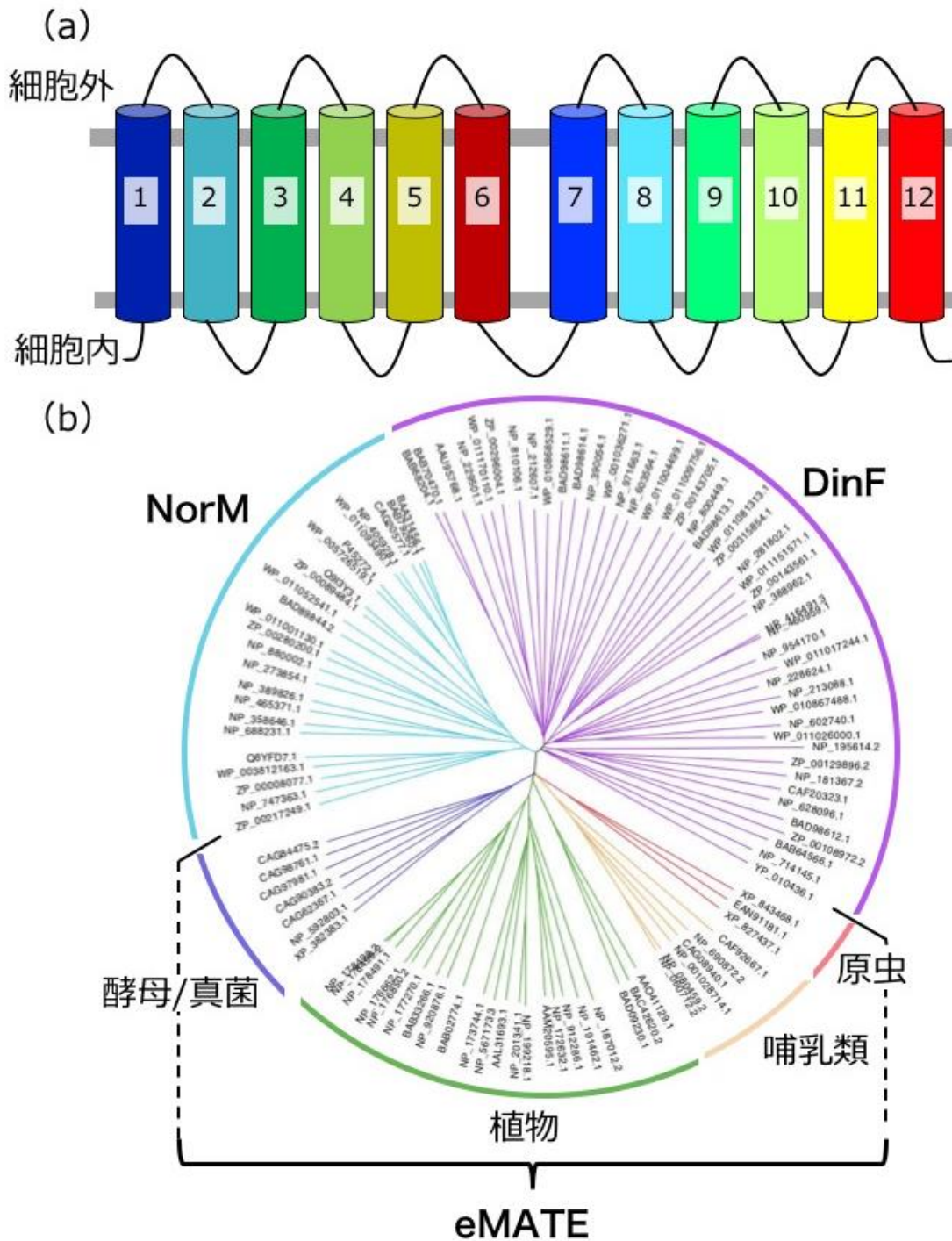


図 1-2. トポロジーおよび原核生物および真核生物のアミノ酸配列を用いた系統樹

(a) MATE タンパク質のトポロジーモデル. MATE タンパク質は 6 回膜貫通領域が重複した 12 回膜貫通構造をしている. 1~6 までの膜貫通領域と 7~12 の膜貫通領域において重複が見られる

(b) 原核生物は NorM と DinF に分けられる. eMATE には酵母/真菌, 植物, 哺乳類, 原虫が含まれている. Omote *et al.*, 2006 に使用されている配列を引用および修正し, 系統樹を作成した.

## 1.3 MATE タンパク質の立体構造知見

### 1.3.1 基本構造およびカチオン結合部位

MATE タンパク質のアミノ酸の 1 次配列の保存性解析により, 12 本の膜貫通ヘリックス (TM) のうち, TM1 と TM7 の中心部, TM1-TM2 ループと TM7-TM8 ループ, TM2-TM3 ループと TM8-TM9 ループ, TM4-TM5 ループと TM10-TM11 ループ間に共通性が見られ, TM1 から TM6, TM7 から TM12 までを区切りとした 6 回膜貫通領域の重複によって形成されていると予測されていた. 2010 年に報告された初の MATE タンパク質: NorM (PDB ID 3MKT) の構造では (He *et al.*, *Nature* 2010), MATE タンパク質は 6 回膜貫通領域が重複した 12 回膜貫通構造をしており, それぞれの 6 回膜貫通領域には空洞が存在していることが明らかとなった (図 1-3). N 末端側の 6 回膜貫通領域は N ロープ, C 末端側の 6 回膜貫通領域は C ロープと呼称されている. その後, DinF (PDB ID 3W4T) の立体構造も決定され (図 1-3) (Tanaka *et al.*, *Nature* 2013), 原核生物由来の MATE ファミリーの構造基盤構築が進められた. 現在までに重複を考慮すると, NorM は 2 種類, DinF は 5 種類の立体構造が報告されている. 最高分解能は DinF が 2.1 Å で報告されているが, NorM では 3.0 Å を超える高分解能構造は報告されていない (He *et al.*, *Nature* 2010, Lu *et al.*, *PNAS* 2013, Tanaka *et al.* *Nature* 2013, Lu *et al.*, *NSMB* 2013, Radchenko *et al.*, *Nat Commun* 2015, Mousa *et al.*, *Nature Microbiol* 2016, Kusakizako *et al.*, *Structure* 2019, Zakrzewska *et al.* *PNAS* 2019). すべての結晶構造解析において MATE タンパク質は単量体として構造決定されており, MATE タンパク質は単量体で機能すると考えられる.

NorM, DinF それぞれの立体構造および保存性解析から, 輸送活性に重要なアミノ酸が同定された. *Vibrio cholerae* 由来の NorM では E255, F288, D371, *Pyrococcus furiosus* 由来の DinF では D41, D184 が輸送に必要であると考えられている (図 1-3) (Lu Min *Channels* 2016). それぞれの保存性の高いアミノ酸はクラスターを形成しており, そのクラスターを破壊する変異体では輸送活性が下がった事から, 駆動力として用いるカチオンをクラスターでトラップしていると考えられている (Kusakizako *et al.*, *Structure* 2019).

6 回膜貫通領域の重複によって形成されている場合, N ロープと C ロープの立体構造に類似性がみられる可能性が高い. NorM タンパク質 (PDB ID 3MKT) では, 細胞外側から見てみると 180°回転の擬似 2 回対称が確認される (図 1-4 a). 各ローブを重ね合わせると全てのヘリックスの配向性が一致することから, 重複によって形成されたことが強く示唆された (図 1-4 b) (He *et al.*, *Nature* 2010). その後に報告された MATE タンパク質の構造はいずれもローブ間の構造的な相同性が確認されており, MATE ファミリーは 6 回膜貫通領域の重複によって 12 回膜貫通領域を獲得したと考えられている.

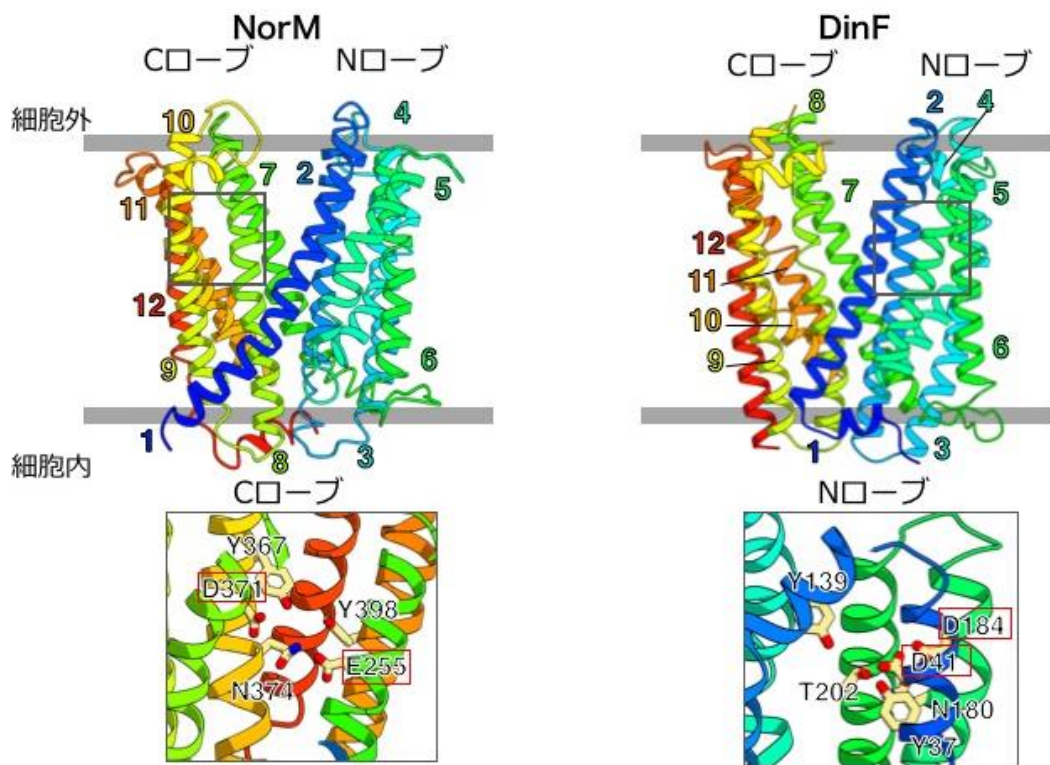


図 1-3. NorM および DinF の全体構造およびカチオン結合部位

TM1-TM6 を N ロープ, TM7-TM12 を C ロープと呼称している.

NorM (PDB ID: 3MKT) および DinF (PDB ID: 3W4T) の全体構造およびそれぞれのアミノ酸クラスターを示している. NorM は C ロープに, DinF は N ロープにクラスターが形成されている.



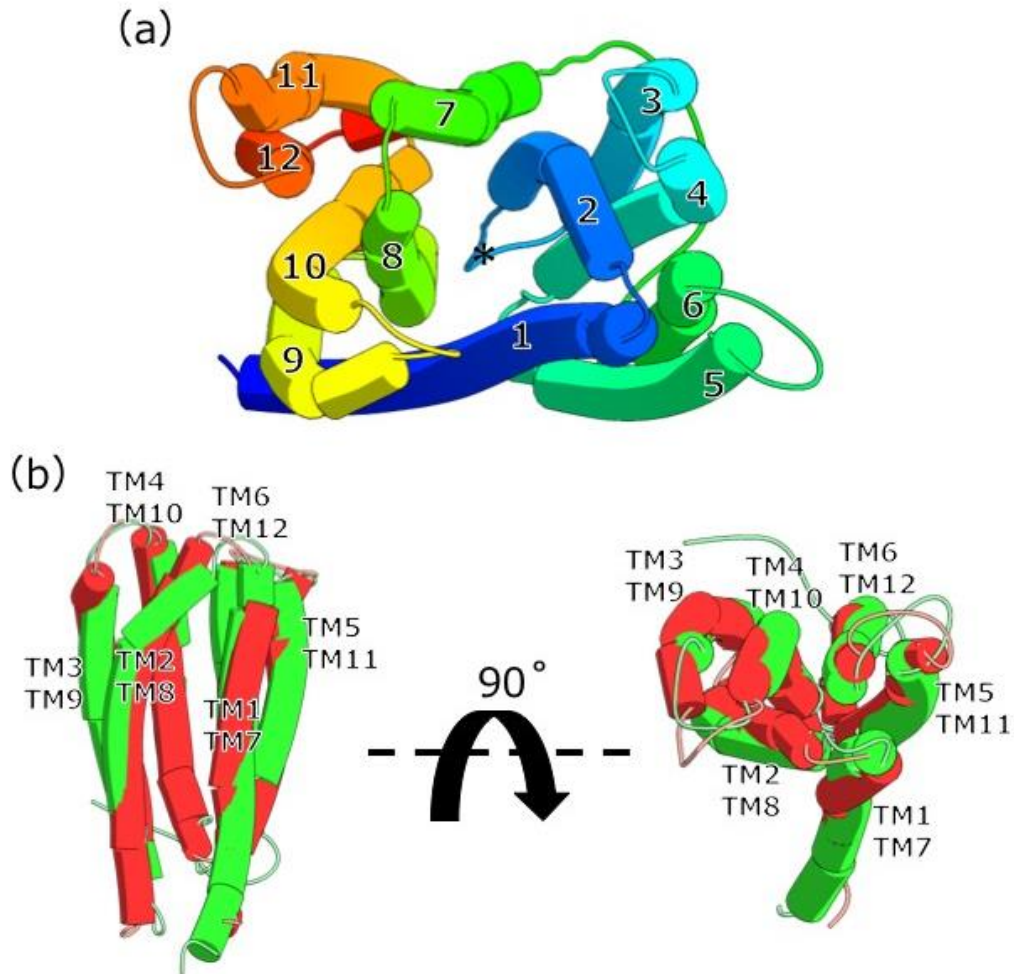


図 1-4. MATE の対称性および重複性

(a) NorM (PDB ID: 3MKT) を細胞外側から見た状態を示している。\*を通る対称軸の周りに  $180^\circ$  回転した擬似の対称が存在する。

(b) NorM を TM1~TM6 (グリーン) と TM7~TM12 (レッド) で分割し重ね合わせている。二乗平均偏差:RMSD = 2.642307 Å. RMSD は対応する原子のずれの2乗を平均して平方根を求めたものである。全てのヘリックスが重なっていることから、ローブ間の構造的な相同性が高いことがわかる。

### 1.3.2 基質結合部位

古細菌である *Pyrococcus furiosus* (Pf) 由来の MATE タンパク質構造を明らかにした報告では、輸送する基質が N ロープの空洞に結合した状態で立体構造が得られており、ローブに存在する空洞が基質輸送および認識に重要であることが示唆された

(Tanaka *et al.*, *Nature* 2013) (図 1-5 左). 一方で *Neisseria gonorrhoeae* 由来の MATE タンパク質 NorM-Ng や (Lu *et al.*, *PNAS* 2013) (図 1-5 右), *Bacillus halodurans* 由来の MATE タンパク質 DinF-BH (Lu *et al.*, *NSMB* 2013) など、基質が空洞ではなく V 字の上部分に結合した構造も報告されているが、分解能が低いため基質との相互作用について議論することはできない. これまでに報告されている基質が結合している構造は全て外開き状態 (outward-facing) であることから、基質輸送の後期過程を表していると考えられる.

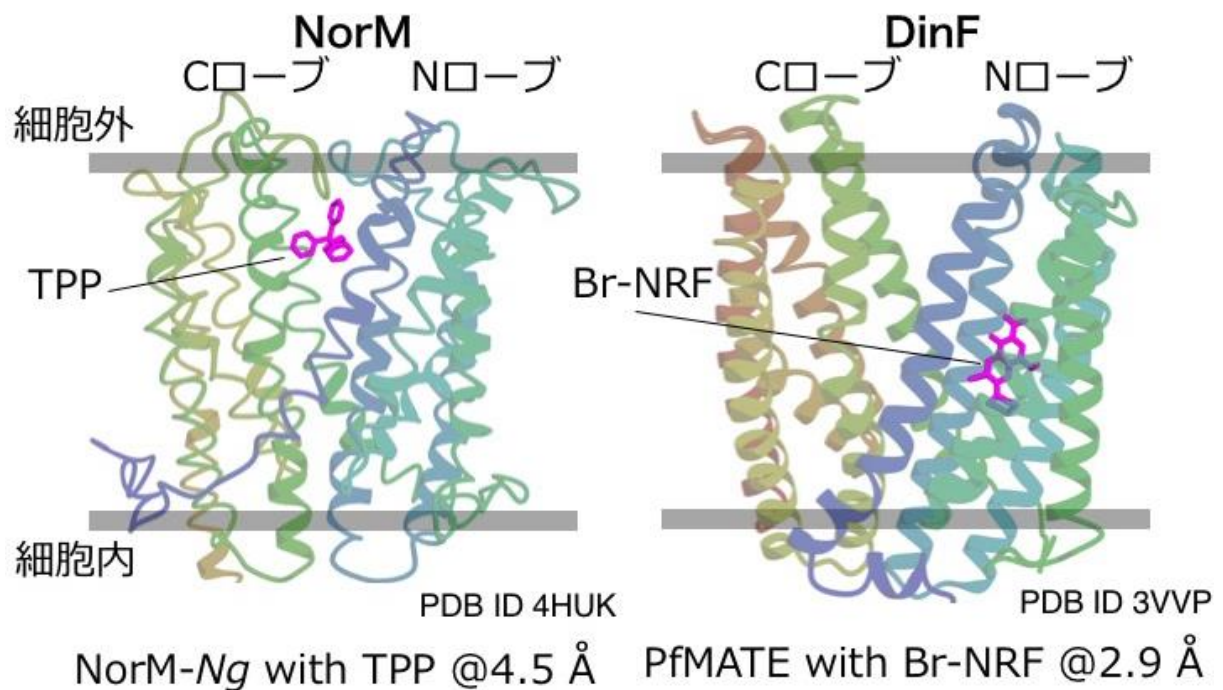


図 1-5. 基質の結合した状態の MATE 構造

4桁の英数字はその立体構造を指す PDB ID である. 両構造とも基質はパープルで示している. DinF タイプである PfMATE では N ロープの内側に Br-NRF が結合した状態で構造が決定されている. 一方で NorM タイプである NorM-Ng ではローブの間に挟まったような形で TPP が結合している.

Br-NRF: 6-bromo-1-ethyl-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3- carboxylic acid  
TPP: Triphenyl phosphatate

### 1.3.3 輸送モデル

2019年のZakrzewskaらによる報告以外の全てのMATEタンパク質の構造ではMATEタンパク質はNローブとCローブによってV字の形をしており、これは内開き状態 (inward-facing) で基質と結合し構造変化して外開きになった状態 (outward-facing state) であると考えられている。内開きと外開きを繰り返す構造変化による基質の輸送はMFSファミリーで確認されており、rocker switch model と言われている (Wisedchaisri *et al.*, *Nat. Commun* 2014)。

MATEタンパク質の基質輸送モデルは多くの論文でrocker switch modelが提唱されている (図 1-6) (Tanaka *et al.*, *Nature* 2013, Lu Min *Channels* 2016)。MATEタンパク質の基質輸送モデルではプロトンやナトリウムイオンの濃度勾配を用いて、基質を待ち構えているinward facing状態と基質を解離するoutward facing状態を繰り返すことで対向輸送を行うと考えられている。ジスルフィド結合を用いた機能解析ではinward-facingとoutward-facing間の構造変化について、単にN,Cローブが傾くのではなく、TM1の折れ曲がりと共にすることで構造変化を成し遂げていることが示唆されている (Radchenko *et al.*, *JBC* 2016)。報告されているMATEタンパク質の立体構造は全て12回膜貫通構造かつV字型をしているが、2つのローブが形成するV字の角度にはばらつきがある。また、同一タンパク質においてTM1のStraight状態とBent状態の構造が報告されており、屈曲を生じさせないようにした変異体では輸送活性が見られないことから、TM1の屈曲が輸送メカニズムに重要であると考えられている (Tanaka *et al.* *Nature* 2013, Kusakizako T *et al.*, *Structure* 2019)。2013年に結晶構造の報告されたPfMATEのInward facing状態の立体構造が報告され (図 1-7 a) (Zakrzewska *et al.* *PNAS* 2019)、Straight-Bent-Inward状態それぞれにおけるNローブのカチオン結合部位の比較が可能となった (図 1-7 b)。StraightおよびBent状態ではカチオン結合部位には水分子がそれぞれ2分子、1分子ずつ配位しており、水分子を介しての水素結合が形成されていた。一方Inward状態ではカチオン結合部位のアミノ酸が近接しており水分子が配位する隙間はなかった。このことから、カチオンの結合状態によりカチオン結合部位のアミノ酸同士の相互作用が変化し、立体構造変化を引き起こしている可能性が示唆された。NorMグループ、DinFグループについては得られた構造情報をもとに輸送モデルが提唱・検証されており輸送メカニズムの解明へと進展しているが、真核生物由来のMATEタンパク質に対して同様のモデルが適応できるかどうかは配列相同性や機能的相違の観点から疑問が残る。



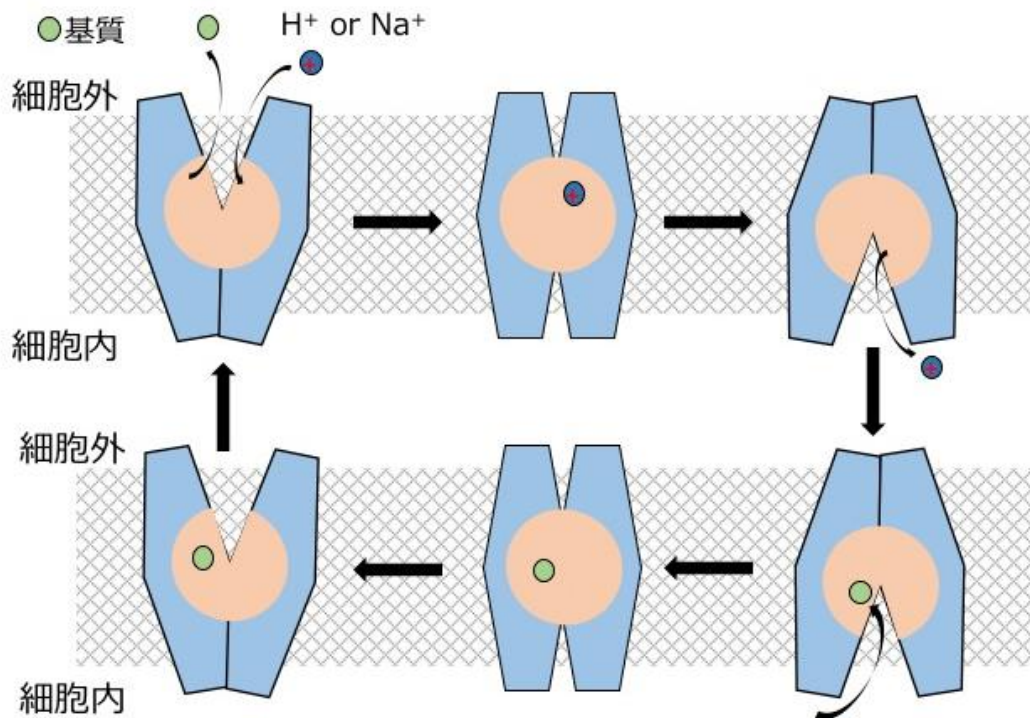


図 1-6. rocker switch model の概略図

2つのドメインが構造変化を連続的に起こすことによって基質の対向輸送を行う。inward 状態の基質フリー状態を始点とする。inward 状態の際に基質が内部の空洞へと結合し、outward 状態へと移行する。outward 状態では基質と駆動力であるカチオンの入れ替えが起こる。カチオンの結合により inward 状態への構造変化が生じる。カチオンが細胞内へと放出されることで基質が結合可能となり、始点へと戻る。

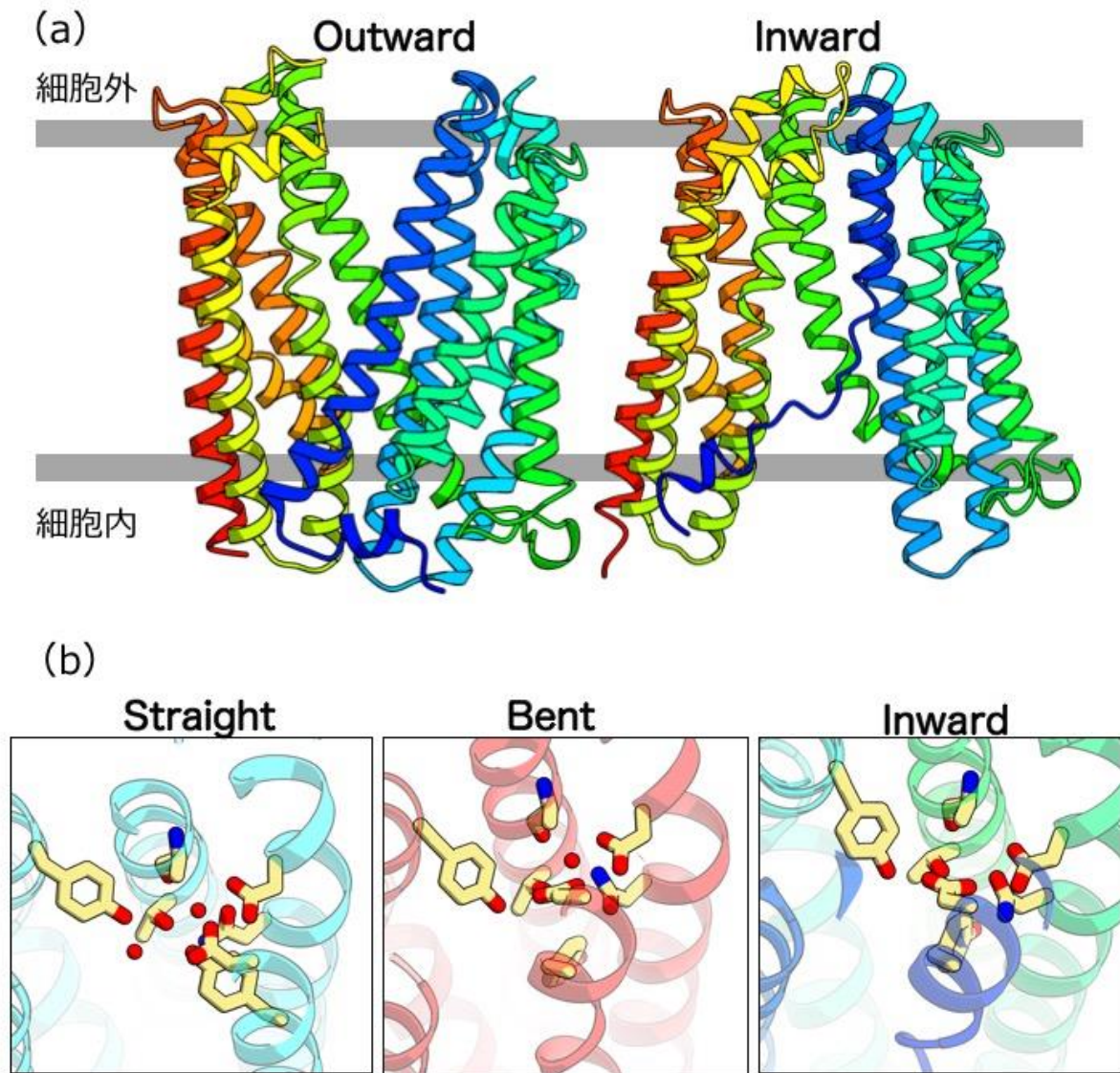


図 1-7. PfMATE の Outward と Inward 状態の比較

(a) Outward 状態 (PDB ID 3VVN) と Inward 状態 (6FHZ) を表示している. TM1 (ブルー) と TM7 (グリーン) が大きく構造変化している.

(b) それぞれの状態における N ロープのカチオン結合部位を比較している. 赤い丸は水分子を示している. Straight 状態では 2 分子, Bent 状態では 1 分子の水分子が配位している.

## 1.4 植物における MATE の同定とその機能

植物において MATE ファミリータンパク質は 2001 年に初めてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から AtALF5 遺伝子が同定された (Diener *et al.*, *Plant Cell* 201) . AtALF5 は生体異物の排出が主な機能であると報告されており, 植物 MATE ファミリーのタンパク質も原核生物由来の MATE ファミリータンパク質と同様の機能を果たすと考えられたが, その後に続々と同定された植物由来 MATE タンパク質の機能解析により, 植物では MATE ファミリーの機能が多様化していることがわかってきた (Takanashi *et al.*, *Plant Biotechnology* 2014 , Upadhyay *et al.*, *J. Exp. Bot* 2019) . バクテリアやヒトではゲノムに保存されている MATE の数は 2~3 程度だが, 植物は他の生物種よりも MATE ホモログの数が多く, モデル植物であるシロイヌナズナには 58 もの MATE 遺伝子が保存されている. 現在までに報告されている機能は, 生体異物の排出, アルカロイドの蓄積, フラボノイドの蓄積, 鉄の転流, アルミニウムイオンの無毒化, 植物ホルモンの伝達, 老化の制御などがある. 発現場所は花, 果実, 種子, 葉, 根, 茎など多様化しており, 局在場所も形質膜, 液胞膜, ゴルジ体膜, 小胞膜などが報告されている (図 1-8 a, b) . このように植物において MATE ファミリーは多様な器官で発現, 局在し, 植物の生理機能に関っている.

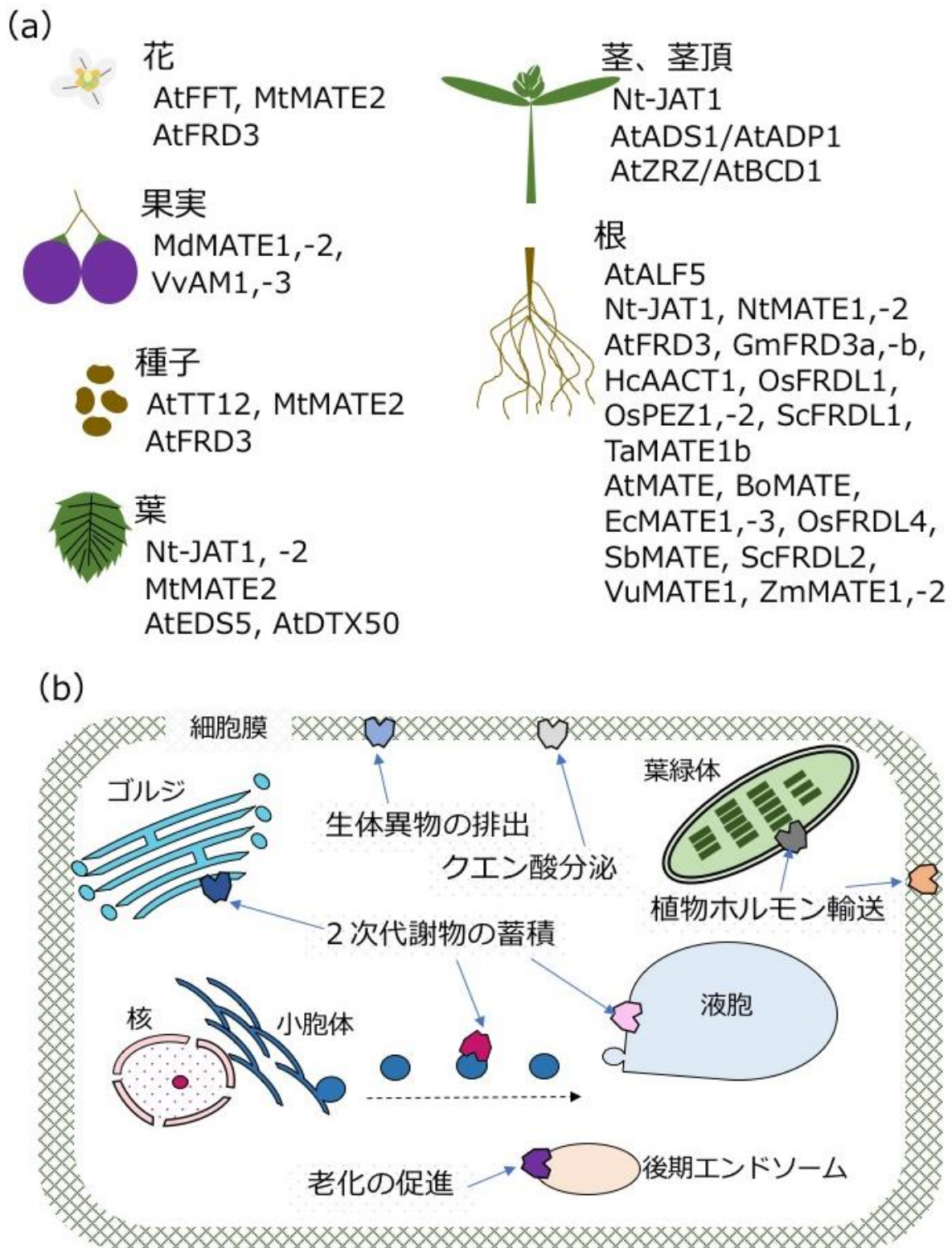


図 1-8. 植物由来の MATE の発現場所および細胞内局在

(a) 器官ごとの分類. 特定の器官のみで発現している MATE や、様々な器官で発現している MATE が存在する.

(b) 細胞内における MATE の局在. 植物では液胞膜や葉緑体膜, ゴルジ体膜, 小胞膜, 後期エンドソーム膜での局在が確認されている.



## 1.5 植物における基質の構造と輸送の選択性

現在までに報告されている植物 MATE タンパク質それぞれの機能における基質は、ニコチンのようなアルカロイド、アントシアニンなどのフラボノイド、アブシシン酸、サリチル酸、クエン酸などであり、化学的性質だけでなく構造的特徴も類似性が低い。また、原核生物やヒトにおいては単一の MATE が複数の薬剤や毒物を輸送していたのに対して、植物においては MATE タンパク質が基質の選択を行なっているという報告もある。例えば、ニコチントランスポーターとしてタバコ (*Nicotiana tabacum*) から同定された Nt-JAT1 はニコチンだけでなく、anabesine や berberine, Hyoscyamine のような他のアルカロイドも輸送することができるが、quercetin や kaempferol のようなフラボノイドは輸送できない (Morita *et al.*, *PNAS* 2009) 。また、シロイヌナズナから単離された AtTT12 は、フラボノイドである Cyanidin 3-O-glucoside (Cy3G) と Epicatechin 3'-O-glucoside (E3'G) を輸送できるが、E3'G に対する親和性や輸送速度が Cy3G よりも高い (Zhao *et al.*, *Plant Cell* 2009) (図 1-9) 。さらに、オオムギ (*Hordeum vulgare*) から単離された HvAACT1 はリンゴ酸よりもクエン酸への親和性が高い (Furukawa *et al.*, *Plant Cell Physiol* 2007) 。バクテリアにおいて有機カチオン性の広範な基質を輸送することで多剤耐性に寄与している MATE であるが、緩い選択性を示した Nt-JAT1 や高い選択性を示した AtTT12 や HvAATC1 のような MATE が植物では報告されている。遺伝子数の増加に伴い、多剤排出だけでなく様々な生理機能を担うようになった MATE ファミリーであるが、基質の認識や輸送メカニズムについては不明な点が多い。

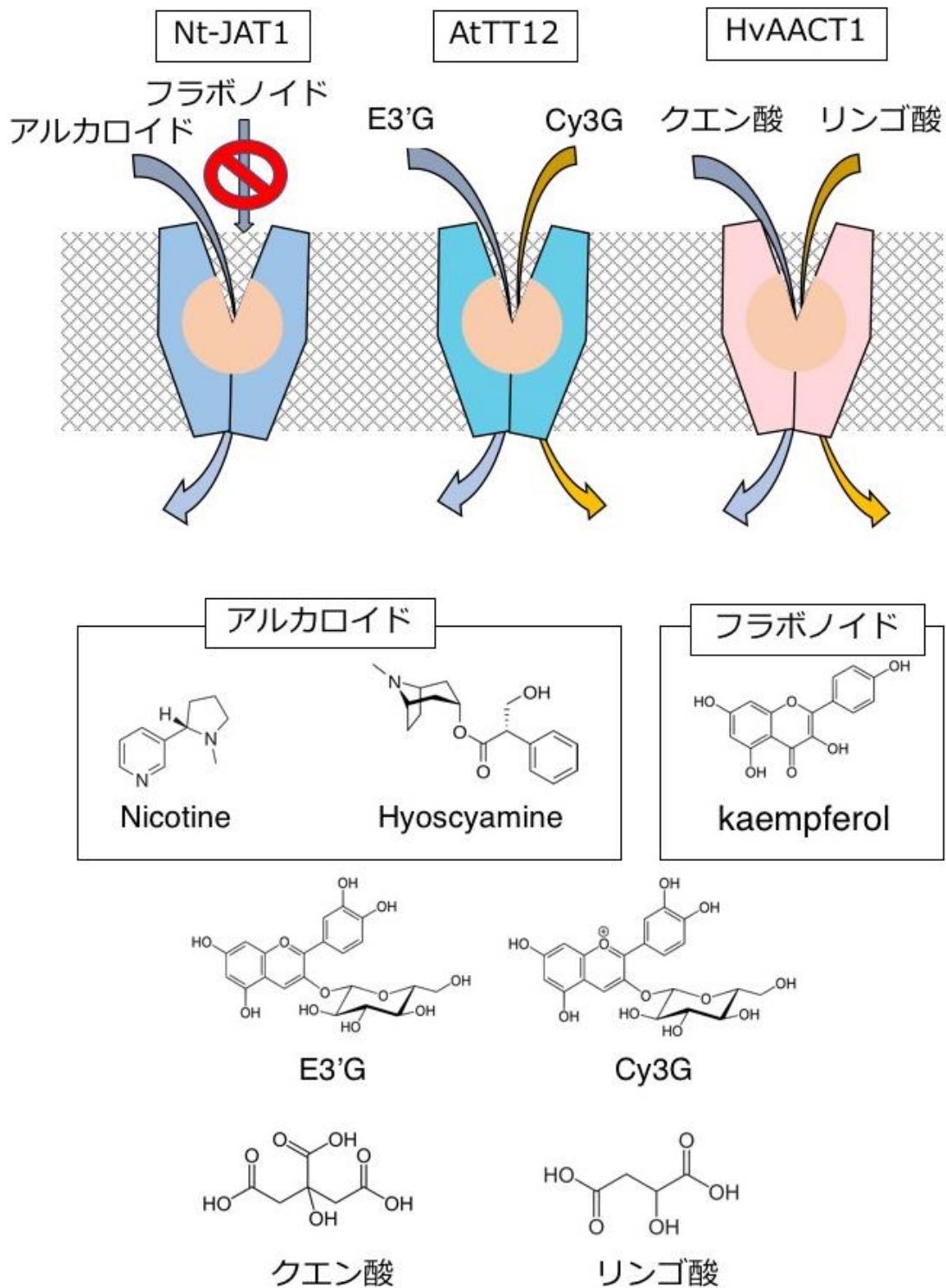


図 1-9. 植物において基質の選択性が報告されている MATE タンパク質 AtTT12 と HvAACT1 において黄色の矢印は輸送活性が青色の矢印に比べて低いことを示している. 輸送する基質の化学構造を下に記している.

## 1.6 ニコチントランスポーター

ニコチンは含窒素塩基性有機化合物であり、このような特徴をもつ化合物はアルカロイドと言われている。アルカロイドは様々な場面で私たちの生活に関わっており、医療現場で使用されるモルヒネや、コーヒーに含まれるカフェインなどが挙げられる。多くのアルカロイドは薬理作用を示し、時には細胞毒性を示す。ニコチンは食害応答によるジャスモン酸シグナルによって根で産生され、導管を輸送されて葉へと蓄積される。ニコチンは細胞質毒性を示すため、合成されたニコチンは液胞へと隔離される。同様に、葉においても液胞に隔離されている。液胞膜へ局在しニコチンの液胞への隔離を担っているのが MATE タンパク質である (図 1-10)。葉においては Nt-JAT1, Nt-JAT2 が同定されており、根においては NtMATE1, NtMATE2 が同定されている。Nt-JAT1 は 1.5 でも述べたようにアルカロイドに対して選択性を示しており、Nt-JAT2 も同様にアルカロイドに対する選択性を示している (Shitan *et al.*, *PLoS One* 2014)。NtMATE1, NtMATE2 はニコチンや他のアルカロイドに対する輸送活性が確認されている (Shoji *et al.*, *Plant Physiol* 2009)。ニコチントランスポーターのように基質の同定されている MATE タンパク質の立体構造を明らかにすることで、基質の認識機構について議論が可能となる。

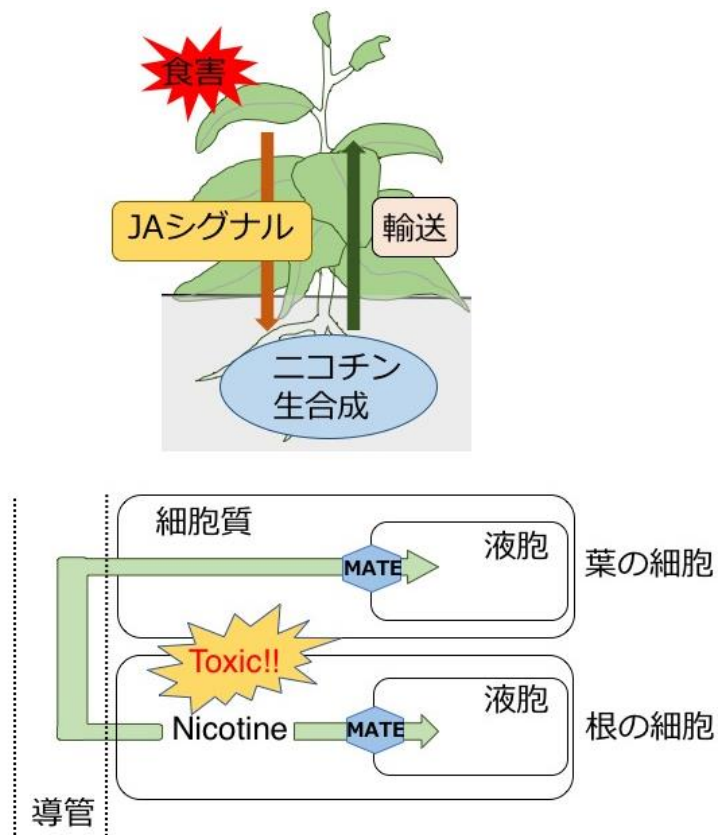


図 1-10. タバコにおけるニコチン合成および輸送の経路

傷害ホルモンであるジャスモン酸によってニコチン合成遺伝子の転写因子が発現し、根端で合成されたニコチンは導管を通過して地上部へと運ばれ全葉に蓄積する。

## 1.7 本研究の目的

MATE ファミリーはバクテリアやアーキア、動物では薬剤や生体異物の排出が主な機能として考えられているが (Omote *et al.*, *TiPS*. 2006) , 植物ではアルカロイドのような有用物質の蓄積や、成長過程でのオーキシン濃度調節, オートファジーと拮抗した老化経路の制御など, 多様な機能に関わっている (Takanashi *et al.*, *Plant Biotechnology* 2014, Upadhyay *et al.*, *J. Exp. Bot* 2019) . 原核生物では 1 つの MATE タンパク質が広範な基質を輸送していたのに対して (Kuroda *et al.*, *BBA* 2009) , 植物では広範な基質を輸送できる MATE タンパク質も存在するが (Li *et al.* 2002) , 基質選択性を獲得している MATE タンパク質が報告されている (Furukawa J *et al.*, *Plant Cell Physiol* 2007) . 遺伝子数の増加, 基質の選択性の獲得という点を考慮すると, 植物 MATE ファミリーは基質認識や輸送機構において原核生物由来の MATE ファミリーとは異なったメカニズムを獲得している可能性がある.

原核生物では MATE タンパク質の立体構造が複数明らかにされており, 基質認識や輸送機構について原子レベルでの議論が行われてきたが (Lu Min *Channels* 2016, Kusakizako *et al.*, *BBA* 2019) , 植物における MATE ファミリーの基質の選択性や, 原核生物由来の MATE と植物由来の MATE ではアミノ酸配列の相同性が低いという要因もあり, 基質との相互作用部位や基質の選択性の要因を調べることは困難であった.

2001 年に初めて植物由来の MATE が同定されて以降, 多種多様な植物から MATE が同定されている (Takanashi *et al.*, *Plant Biotechnology* 2014) . シロイヌナズナにおいても未だ機能未知な MATE が残っており, 今後も解析が続いていくと考えられる. 今までに報告された MATE タンパク質の再解析や新たな植物由来の MATE タンパク質のアミノ酸レベルでの解析を行うことができる基盤を作るためにも, 植物由来の MATE タンパク質の立体構造が必要である.

本研究ではまず植物由来の MATE タンパク質の結晶構造を決定することで, 植物における MATE タンパク質の構造基盤の構築を進めた. また, ニコチンを輸送する MATE タンパク質の結晶構造を決定し, 輸送する基質によって基質結合部位の性質がどのように異なるのかを調べることで, 基質の選択メカニズムへの知見を蓄積した.



## 第2章 材料と方法

### 2.1 CasMATE の構造解析

#### 2.1.1 蛍光ゲルろ過法を用いた CasMATE 変異体の評価

田中良樹 博士が作成した4種類の (Cas: *Camellina sativa*) CasMATE デリレーション変異体 (8-461, 8-468, 15-461, 15-468) の界面活性剤中での単分散性を評価した。それぞれの変異体は M-CasMATE 変異体-EFPGENLYFQGQFSKGE-GFP-H<sub>8</sub> を発現するように設計されている (図 2-1)。それぞれの変異体を CasMATE<sub>8-461</sub>, CasMATE<sub>8-468</sub>, CasMATE<sub>15-461</sub>, CasMATE<sub>15-468</sub> と呼称する。FSEC 法 (Fluorescent Size-Exclusion Chromatography) は Kawate らの方法 (Kawate T *et al.*, *Structure* 2006) を改変して行った。それぞれの CasMATE 変異体を保持している *Pichia pastoris* SMD1163 株を 2 mL の BMGY 培地で 30°C, 180 rpm (TITEC BR23FP-MR) で 24 時間培養した。培養液 30 µL を 3 mL の BMMY 培地に植え継ぎ 20°C, 180 rpm (TITEC BR23FP-MR) で 72 時間培養した。以下の操作は全て 4°C もしくは氷上で行った。得られた培養物を遠心

(ARO15-24 ローター, 3,000 rpm, 5 分間) することで菌体を回収した。菌体を 500 µL の懸濁バッファー (300 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7.0, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 5 mM β-ME) に懸濁した後, 0.5 mm ガラスビーズを用いて 1 時間 vortex で破碎した。菌体破碎液を遠心 (ARO15-24 ローター, 6,000 rpm, 30 分間) し, 上清を回収し, 小型超遠心機 CS100FNX (HITACH) を用いて超遠心 (S55A2 ローター, 45,000 rpm, 30 分間) することで膜画分を回収した。得られた膜画分を 100 µL の可溶化バッファー1 (1% (w/v) DDM, 300 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7.0, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 5 mM β-ME) に懸濁し, 攪拌しながら 1 時間可溶化した。可溶化サンプルを超遠心 (S55A2 ローター, 45,000 rpm, 15 分間) し, 上清を回収した。液体クロマトグラフィシステム Prominence (島津製作所) を用いて平衡化バッファー1 (0.15% (w/v) DDM, 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% glycerol) で平衡化した Superdex 200 increase 5/150 GL カラム (GE Healthcare) に, 10 µL のサンプルをアプライした。蛍光検出機 RF-20A xs (島津製作所) は励起波長 480 nm, 検出波長 512 nm に設定して測定を行った。

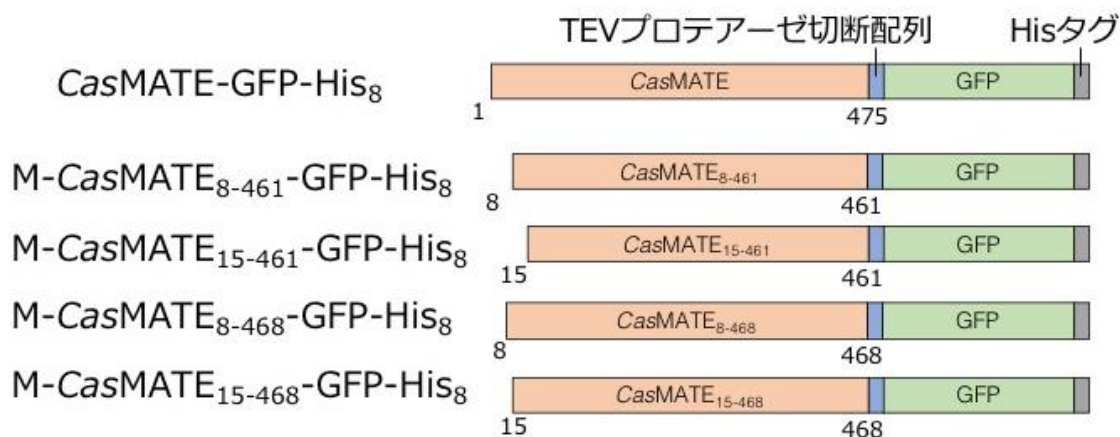


図 2-1. CasMATE 変異体のコンストラクト

CasMATE の N, C 末端共に 7 もしくは 14 アミノ酸をデリベーションし、共通して CasMATE の C 末端側に TEV protease の切断配列, GFP, His<sub>8</sub> が付加されるように設計している。

Pre BMGY/BMMY (1000 mL)		10 x YNB	
乾燥酵母エキス	10 g	Yeast Nitrogen Base	13.4 g
ペプトン	20 g	H <sub>2</sub> O	up to 100 mL
H <sub>2</sub> O	700 mL		

	BMGY (mL)	BMMY (mL)
Pre BMGY/BMMY	700	700
1M K-phosphate (pH 6.0)	100	100
10 x YNB	100	100
10 % グリセロール	100	0
5 % MeOH	0	100
0.2 mg/mL ビオチン	2	2
DMSO	0	30
4 % ヒスチジン	0	10

表 2-1. BMGY および BMMY 培地組成

## 2.1.2 CasMATE 変異体の精製

CasMATE 変異体発現 *Pichia pastoris* SMD1163 株を 10 mL の BMGY 培地で 30°C, 180 rpm (TITEC BR23FP-MR) で 24 時間前培養した. その後, 遠心 (ARO15-24 ローター, 2, 500 rpm, 5 分間) し, 菌体を回収した. 菌体全量を 1 L の BMMY 培地に植え継ぎ 20 °C, 120 rpm (New Brunswick Innova 44/44R) で培養を始め, 24 時間ごとに 10% メタノールを 50 mL 加えて 72 時間培養した. 以下の操作は全て, 4°C もしくは氷上で行った. 得られた培養液を大型遠心機 CR22 (HITACHI) を用いて遠心 (R9A2 ローター, 5, 000 rpm, 30 分間) することで菌体を回収した. 菌体をテフロンホモジナイザーを用いて 100 mL の懸濁バッファー (300 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7.0, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 5 mM  $\beta$ -ME) に均一に懸濁した後, マクロフルイダイザー-M-110EH

(Microfluidics) を用いて菌体を 5 回破碎した (22, 000 psi). 菌体破碎液を遠心 (18, 000 g, 30 分間) し, 上清を回収し, 超遠心機 Optima L-70 (Beckman coulter) を用いて超遠心 (45Ti ローター, 40, 000 rpm, 2 時間) することで, 膜画分を回収した. 得られた膜画分を 40 mL の可溶化バッファー2 (5% (w/v) DDM, 300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.0, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 5 mM  $\beta$ -ME) に懸濁し, 攪拌しながら 1 時間可溶化した. 可溶化サンプルを超遠心 (S50A ローター, 45, 000 rpm, 30 分間) し, 上清を回収した. 上清を平衡化バッファー2 (0.03% (w/v) LMNG, 300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.0, 5% glycerol, 5 mM  $\beta$ -ME, 0.003% CHS, 20 mM Imidazole pH 8.0) で平衡化した 5 mL の TALON (Qiagen) と混合し, 1 時間穏やかにローテートした. TALON を回収し 30 mL の洗浄バッファー1 (0.03% (w/v) LMNG, 300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.0, 5% glycerol, 5 mM  $\beta$ -ME, 0.003% CHS, 25 mM Imidazole pH 8.0) で洗浄し, 更に 30 mL の洗浄バッファー2 (0.03% (w/v) LMNG, 300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.0, 5% glycerol, 5 mM  $\beta$ -ME, 0.003% CHS, 40 mM Imidazole pH 8.0) で洗浄した. 続いて 25 mL の溶出バッファー (0.03% (w/v) LMNG, 300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.0, 5% glycerol, 5 mM  $\beta$ -ME, 0.003% CHS, 200 mM Imidazole pH 8.0) で 5 回に分けてタンパク質を溶出した. 溶出したタンパク質を Amicon Ultra-15 (50, 000 MWCO) (Millipore) を用いて限外濾過法により濃縮し, 希釈バッファー (0.03% (w/v) LMNG, 300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.0, 5% glycerol, 5 mM  $\beta$ -ME, 0.003% CHS) で 10 倍希釈を行った. 濃縮, 希釈を 3 サイクル行い, 限外濾過したサンプルに対して, 重量比 5:1 となるように His<sub>6</sub> タグ付き TEV プロテアーゼ (当研究室ストック) を添加し, 一晚ローテートし GFP-His<sub>8</sub> タグの切断処理を行った. 切断処理後のサンプルは, 希釈バッファーで平衡化した TALON と混合し, その素通り画分を回収した. 素通り画分を, Amicon Ultra-15 (50, 000 MWCO) (Millipore) を用いて限外濾過法により濃縮した. 濃縮サンプルを超遠心 (S55A2 ローター, 45, 000 rpm, 30 分間) し, 上清を回収し, ゲル濾過サンプルとした. 液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer

10S (GE Healthcare) を用いて平衡化バッファー3 (0.03% (w/v) LMNG, 300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.0, 1% glycerol, 5 mM  $\beta$ -ME, 0.003% CHS) で平衡化した Superdex 200 increase 10/300 GL24 mL カラム (GE Healthcare) にゲル濾過サンプルをアプライし、ピーク画分を回収した。各精製ステップのサンプルはCBB染色による SDS-PAGE 法により精製純度を確認した。

### 2.1.3 CasMATE 変異体の結晶化

精製試料を Amicon Ultra-0.5 (50, 000 MWCO) (Millipore) で 14 mg/mL の濃度まで限外濾過法により濃縮した。タンパク質濃度は Nanodrop (Thermo scientific) を用いて波長 280 nm の紫外線吸光度 Abs 280 nm の値を測定し, ExPASy Proteomics Server 上の ProtParam tool により, Abs 280 nm の値を CasMATE タンパク質のモル吸光係数を 93570 L/mol\*cm で補正して見積もった。培養量 1 L からの最終収量は 1~2 mg であった。得られた精製試料を LCP 法により結晶化した。LCP 法は熊崎らの手法(熊崎 *et al.*, 日本結晶学会誌 2014) を改良して用いた。CasMATE 変異体とモノオレインを重量比 2 : 3 となるようにそれぞれ別個のガスタイトシリンジ (ARI) に加え, 空気が入らないように混合し, CasMATE 変異体をモノオレインに再構成した。サンドウィッチ法の場合, 30~100 nL の再構成した CasMATE 変異体を Crystal Gryphon (ARI) ロボットを用いて Laminex Glass Base (Molecular Dimension) に分注し, その上に 800~1200 nL のリザーバーを添加した後, 74 x 110 ガラスプレート (MATSUNAMI) を被せた。また, 40~100 nL の再構成したタンパク質を Crystal Gryphon (ARI) ロボットを用いて MRC Under Oil Crystallization Plate (Hampton Research) に分注し, その上に 3000 nL のリザーバーを添加した後, シール (greiner bio-one) でプレートを密封する手法も用いた。リザーバーとして使用したスクリーニングキットは MemGold:96 条件, MemStart/MemSys:96 条件, MemMeso:96 条件 (Molecular Dimension), Emesys:288 条件, MPDscreen kit:96 条件, である。プレートは全て 20 °C で静置し, 結晶形成を促した。得られた結晶について, 沈殿剤濃度, 緩衝液の pH, 塩濃度を変化させ, 結晶化条件の最適化を行った。

Rb イオンとの共結晶化では RbCl を終濃度 50 mM でサンプルと混ぜ 4°C で一晩静置した後, 小型超遠心機 CS100FNX (HITACH) を用いて超遠心 (S55A2 ローター, 45, 000 rpm, 30 分間) を行い, 上清を結晶化に用いた。

### 2.1.4 X 線回折実験およびデータ処理

結晶をマイクロループ (MiTeGen) で回収し, 直ちに液体窒素によって凍結した。X 線回折データは, 大型放射光施設 SPring-8 BL32XU において収集した。回折 X 線の検出は, Eiger ピクセルアレイ検出器 (DECTRIS) を用いて行った。結晶のセンタリング

は SHIKA ソフトを用いて Diffraction scan によって得られたイメージからスポットを拾うことで決定した. 全てのデータ収集は窒素ガスによるクライオストリーム条件下 (100 K) で行った. 一つの結晶から十分なデータが収集できなかったため, 複数の結晶から, 縦 10  $\mu\text{m}$  x 横 10  $\mu\text{m}$  のビームを用いて, 波長 1.000 Å, カメラ長 300 mm, 振動角 0.2°, 露光時間 0.2 秒, で 10° に渡って回折データを収集した. 得られた回折データを KAMO ソフトウェア (Yamashita *et al.*, *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* 2018) で統合し, 指数付けとブラベ格子・格子定数の決定を行い, さらにスケーリング後, 各指数に対する回折強度を算出した.

### 2.1.5 CasMATE のモデル構築および構造精密化

得られた回折データセットを用い PHASER (McCoy *et al.*, *Journal of applied crystallography* 2007) にて PfMATE (PDB ID 3W4T) で分子置換を行い, 初期位相を計算した. COOT (Emsley *et al.* *Acta Crystallographica Section D* 2010) および PHENIX (Adams *et al.* *Acta Crystallographica Section D* 2010) を用いて精密化およびモデル構築を行った.

### 2.1.6 系統樹解析

植物および原核生物由来の MATE タンパク質のアミノ酸配列 (表 2) を用いて系統樹解析を行った. MEGA7 (Kumer S *et al.*, 2016) を用い最尤法により分類を行った. 系統樹への色付や編集は FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) を用いた.

表 2-2. 系統樹解析に用いたアミノ酸配列一覧

	Organism	NCBI Reference Sequence
Ab-AbeM	Acinetobacter baumannii	WP_000073361.1
Bm-NorMI	Brucella melitensis	WP_004682927.1
Cd-CdeA	Clostridioides difficile	WP_009902537.1
Ec-YdhE	escherichia coli	P37340.2
Hi-HmrM	Haemophilus influenzae	WP_014550864.1
Nm-NorM	Neisseria meningitidis	WP_002246103.1
Pa-PmpM	Pseudomonas aeruginosa	WP_003112388.1
Se-MdtK	Salmonella enterica	WP_001175077.1
Sa-MepA	Staphylococcus aureus	WP_000651060.1
Vc-Vcma	Vibrio cholerae	WP_000555132.1
Vc-VcrM	Vibrio cholerae	AEJ09656.1

Vc-VcmB	Vibrio cholerae	EMP94624.1
Vc-VcmN	Vibrio cholerae	WP_001882792.1
Vp-NorM	Vibrio parahaemolyticus	BAA31456.1
Vc-VmrA	Vibrio cholerae	WP_000981941.1
Cas-MATE	Camelina sativa	XP_010514235.1
At-ALF5	Arabidopsis thaliana	NP_566730.1
At-DTX1	Arabidopsis thaliana	NP_178496.2
Nt-JAT1	Nicotiana tabacum	NP_001313041.1
At-DTX50	Arabidopsis thaliana	NP_200018.1
At-ZRZ/BCD1	Arabidopsis thaliana	NP_564731.1
At-ADS1/AtADP1	Arabidopsis thaliana	NP_194643.1
Os-MATE2	Oryza sativa	AGL95788.1
Md-MATE1	Malus domestica	ADO22709.1
Md-MATE2	Malus domestica	NP_001280841.1
Mt-MATE1	Medicago truncatula	ACX37118.1
At-TT12	Arabidopsis thaliana	NP_191462.1
Nt-MATE1	Nicotiana tabacum	NP_001312472.1
Os-PEZ1	Oryza sativa	XP_015632220.1
Os-PEZ2	Oryza sativa	XP_015632479.1
At-FFT	Arabidopsis thaliana	NP_194294.2
Vv-AM1	Vitis vinifera	NP_001290007.1
Vv-AM3	Vitis vinifera	NP_001268037.1
Mt-MATE2	Medicago truncatula	XP_003592215.2
Sl-MTP77	Solanum lycopersicum	NP_001234424.1
Nt-JAT2	Nicotiana tabacum	NP_001312201.1
Lj-MATE1	Lotus japonicus	BAN59993.1
Gm-FRD3a	Glycine max	NP_001236057.1
Ec-MATE1	Eucalyptus camaldulensis	BAM68465.1
At-FRD3	Arabidopsis thaliana	NP_187461.1
At-MATE	Arabidopsis thaliana	NP_974000.1
Ec-MATE3	Eucalyptus camaldulensis	BAM68467.1
Sc-FRDL2	Secale cereale	BAJ61742.1
Zm-MATE1	Zea mays	ACM47309.1

Sb-MATE	<i>Sorghum bicolor</i>	ABS89149.1
Os-FRDL4	<i>Oryza sativa</i>	BAL41687.1
Os-FRDL1	<i>Oryza sativa</i>	XP_015632890.1
Sc-FRDL1	<i>Secale cereale</i>	ACI46129.1
3MKT	<i>Vibrio cholerae</i>	3MKT_A
3VVN	<i>Pyrococcus furiosus</i>	3VVN_A
4Z3N	<i>Escherichia coli</i>	4Z3N_A
4LZ6/5C6N	<i>Bacillus halodurans</i>	5C6N_A
4HUK/5C6P	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	4HUK_A

## 2.2 ニコチントランスポーターの構造解析

### 2.2.1 *Pichia pastoris* を用いた発現系の構築

現在までに MATE ファミリーに属するニコチントランスポーターとして NtMATE1,2 (Shoji *et al.*, *Plant Physiol* 2009) , Nt-JAT1 (Morita *et al.*, *PNAS* 2009) , Nt-JAT2 (Shitan *et al.*, *Plos One* 2014) の 4 つの MATE が報告されている. *Pichia pastoris* SMD1163 株を宿主生物とし, 上記 4 つの MATE を MATE-EFPGENLYFQGQFSKGE-GFP-H<sub>8</sub> の形で発現する発現系を構築した. *Pichia pastoris* でのタンパク質発現用ベクターである pPIC9K のマルチクローニングサイトに TEV プロテアーゼ認識配列, GFP, His<sub>8</sub> タグが発現するように設計された pPIC9K-GFP-His に Gibson assembly 法 (Gibson *et al.*, *Nature method* 2009) を用いてクローニングを行った. Deletion mutant の作製では, 部位特異的変異導入法と同様に該当領域のデリベーションを行った.

上記で作成したプラスミドベクターを Gene Pulser Xcell エレクトロポレーションシステム (BIO-RAD) を用いて, *Pichia pastoris* 用プロトコル (C=25  $\mu$ F, PC=200  $\Omega$ , V=2.0kV) で *Pichia pastoris* SMD1163 株に導入した. エレクトロポレーション後は MD プレートで 2 日間培養し, その後 G418 硫酸塩を 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ g/mL 溶解させた YPD プレートで段階的に選抜を行った. 単一プラスミドではなく, ゲノムへのインサクションにより pPIC9K は導入されるため, 導入されたコピー数により G418 硫酸塩への耐性度合いが異なる. 発現量の良い形質転換体を得るため, G418 硫酸塩が 200  $\mu$ g/mL 含まれているプレートから得られたコロニーを用いて 2.1.1 で述べた FSEC 法を用いて単分散性の評価および培養条件の検討を行った.

### 2.2.2 NtMATE2 の精製

NtMATE2 発現株を 10 mL の BMGY 培地で 30°C, 180 rpm (TITEC BR23FP-MR) にて 24 時間前培養した. その後, 遠心 (ARO15-24 ローター, 2, 500 rpm, 5 分間) し, 菌体を回収した. 菌体全量を 1 L の BMMY 培地に植え継ぎ 20°C, 120 rpm (New Brunswick Innova 44/44R) で培養を始め, 24 時間ごとに 10%メタノールを 50 mL 加えて 72 時間培養した. 以下の操作は全て, 4°Cもしくは氷上で行った. 得られた培養液を大型遠心機 CR22 (HITACHI) を用いて遠心 (R9A2 ローター, 5, 000 rpm, 30 分間) することで菌体を回収した. 菌体をテフロンホモジナイザーを用いて 100 mL の懸濁バッファー (300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 10% glycerol) に均一に懸濁した後, マクロフルイダイザー M-110EH (Microfluidics) を用いて菌体を 5 回破碎した (22, 000 psi) . 菌体破碎液を遠心 (18, 000 g, 30 分間) し, 上清を回収し, 超遠心機 Optima L-70 (Beckman coulter) を用いて超遠心 (45Ti ローター, 40, 000 rpm, 3 時間) することで, 膜画分を回収した. 得られた膜画分を 40 mL の可溶化バッファー 2 (5% (w/v)



DDM, 300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 10% glycerol) に懸濁し, 攪拌しながら 1 時間可溶化した. 可溶化サンプルを超遠心 (S50A ローター, 45, 000 rpm, 30 分間) し, 上清を回収した. 上清を平衡化バッファー2 (0.05% (w/v) DDM, 300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 10% glycerol) で平衡化した 5 mL の TALON (Qiagen) と混合し, 1 時間穏やかにローテートした. TALON を回収し 30 mL の洗浄バッファー1 (0.05% (w/v) DDM, 300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 10% glycerol) で洗浄し, 更に 30 mL の洗浄バッファー2 (0.05% (w/v) DDM, 300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 10% glycerol, 10 mM Imidazole pH 8.0) で洗浄した. 続いて 5 mL の溶出バッファー (0.05% (w/v) DDM, 300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 10% glycerol, 200 mM Imidazole pH 8.0) で 5 回に分けて計 25 mL 溶出した. 溶出サンプルを Amicon Ultra-15 (50, 000 MWCO) (Millipore) を用いて限外濾過法により 500  $\mu$ L まで濃縮し, 超遠心した (45,000 rpm 30 分間). 上清をゲルろ過サンプルとし, 液体クロマトグラフィーシステム AKTA pure (GE Healthcare), ゲルろ過バッファー (0.05% (w/v) DDM, 300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 1% glycerol) および Superdex 200 increase 10/300 GL 24 mL カラムを用いてゲルろ過分析を行った. ピーク画分を回収し, 重量比 5:1 となるように His<sub>6</sub> タグ付き TEV プロテアーゼ (当研究室ストック) を添加し, 一晚ローテートすることで GFP-His<sub>6</sub> タグの切断処理を行った. 切断処理後のサンプルは, 洗浄バッファー1 で平衡化した TALON と混合し 1 時間ローテートした後, 素通り画分を回収した. 素通り画分を, Amicon Ultra-15 (50, 000 MWCO) (Millipore) を用いて限外濾過法により濃縮した. 濃縮サンプルを超遠心 (S55A2 ローター, 45, 000 rpm, 30 分間) し, 上清を回収し, ゲルろ過サンプルとした. AKTA pure (GE Healthcare), ゲルろ過バッファーおよび Superdex 200 increase 10/300 GL 24 mL カラムを用いてゲルろ過分析を行い, ピーク画分を回収した. 各精製ステップのサンプルは CBB 染色による SDS-PAGE 法により精製純度を確認した.

### 2.2.3 NtMATE2 の結晶化

精製試料を Amicon Ultra-0.5 (50, 000 MWCO) (Millipore) で 10.0 ~ 13.5 mg/mL の濃度まで限外濾過法により濃縮した. タンパク質濃度は Nanodrop (Thermo scientific) を用いて波長 280 nm の紫外線吸光度 Abs 280 nm の値を測定し, ExPASy Proteomics Server 上の ProtParam tool により Abs 280 nm の値を NtMATE2 のモル吸光係数 100310 L/mol\*cm で補正して見積もった. 得られた精製試料を LCP 法により結晶化した. LCP 法は熊崎らの手法 (熊崎 *et al.*, 日本結晶学会誌 2014) を改良して用いた. 精製試料とモノオレインを重量比 2 : 3 となるように混合し, Crystal Gryphon (ARI) ロボットを用いて Laminex Glass Base (Molecular Dimension) に分注し, その上に 800~1200 nL のリザーバーを添加した後, 74 x 110 ガラスプレート (MATSUNAMI) を被せた. リザ

ーバーとして使用した結晶化スクリーニングキットは MemGold, MemStart/MemSys, MemMeso, MemGoldMeso, MemGold2, MemTrans, PGAscreen, MIDAS*plus* (Molecular Dimension), Emesys, MPD screen である. Emesys のみ 288 条件, その他のキットは 96 条件が含まれている. ガラスプレートの被覆後, プレートは全て 20 °C で静置し, 結晶形成を促した. 得られた結晶について, 沈殿剤濃度, 緩衝液の pH, 塩濃度を変化させ, 結晶化条件の最適化を行った.

#### 2.2.4 X 線回折実験およびデータ処理

結晶をマイクロループ (MiTeGen) で回収し, 直ちに液体窒素によって凍結した. X 線回折データは, 大型放射光施設 SPring-8 BL32XU において収集した. 回折 X 線の検出は, Eiger ピクセルアレイ検出器 (DECTRIS) を用いて行った. 結晶のセンタリングは SHIKA ソフトを用いて Diffraction scan によって得られたイメージからスポットを拾うことで決定した. 全てのデータ収集は窒素ガスによるクライオストリーム条件下 (100 K) で行った. 一つの結晶から十分なデータが収集できなかったため, 複数の結晶から, 縦 10  $\mu\text{m}$  x 横 15  $\mu\text{m}$  のビームを用いて, 波長 1.0 Å, カメラ長 300 mm, 振動角 0.1 ~ 0.2 °, 露光時間 0.1 秒, で 5 ~ 10 ° に渡って回折データを収集した. 得られた回折データを KAMO ソフトウェア (Yamashita *et al.*, *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* 2018) で統合し, 指数付けとブラベ格子・格子定数の決定を行い, さらにスケーリング後, 各指数に対する回折強度を算出した.

#### 2.2.5 NtMATE2 のモデル構築および構造精密化

得られた回折データセットに対して PHASER (McCoy *et al.*, *Journal of applied crystallography* 2007) を用いて CasMATE (PDB ID 5YCK) を鋳型として分子置換を行い, 初期位相を計算した. COOT (Emsley *et al.*, *Acta Crystallographica Section D* 2010) および PHENIX (Adams *et al.*, *Acta Crystallographica Section D* 2010) を用いて精密化およびモデル構築を行った.

## 第3章 結果と考察

### 3.1 CasMATE タンパク質の構造解析

#### -序-

多剤排出因子として同定された MATE ファミリーは、植物において発生や防御機構など生理的に重要な機能を果たしている。ニコチンやモルヒネなどのアルカロイドやアントシアニンなどのフラボノイドの液胞への蓄積、アルミニウムイオン毒性への防御機構であるクエン酸分泌、オートファジー関連タンパク質を利用した老化の促進など、原核生物や動物で報告されている MATE ファミリーの機能よりも多様化している。多種多様な植物から MATE が同定され解析されているが、輸送する基質や基質認識機構については不明な点が多い。精製タンパク質を用いた生化学的な解析や、変異体を用いて相互作用解析などには立体構造が不可欠である。しかし、植物での多様化を考慮すると原核生物由来の MATE タンパク質構造を用いた議論は困難である。そこで本研究では、植物由来の MATE タンパク質の高分解結晶構造解析を進めた。植物由来の MATE タンパク質の高分解能構造は今後の新たな MATE タンパク質の構造生物学的研究や MATE タンパク質を用いた機能解析に寄与する。

#### 3.1.1 CasMATE 変異体の FSEC による物性評価

田中良樹 博士が単離した各 CasMATE 変異体 (8-461, 8-468, 15-461, 15-468) 発現 SMD1163 株を用いて FSEC による界面活性剤中での単分散性評価を行った。結晶化に影響を与える要因として結晶化パッキングを阻害するディスオーダー領域がある。CasMATE の結晶の質を向上させるため、末端領域に存在するディスオーダー領域のデリーション変異体が作成された。デリーションは DISOPRED3 の予測結果および原核生物由来の MATE の構造解析に基づいて行われた (図 3-1 a)。CasMATE 変異体が結晶化に適しているかどうかの評価は FSEC のクロマトグラムの形状から判断した。目的のサンプルからのピークが単一であると、結晶化に適していると考えられている (Kawate *et al.*, *Structure* 2006)。

CasMATE 変異体の FSEC クロマトグラムを見てみると、どの変異体も BMMY 3 mL 培養では CasMATE 変異体を発現していることがわかった (図 3-1 b)。一方で、1.3 mL あたりに検出されている void ピーク (凝集体ピーク) が 1.6 mL あたりの目的のピークと同程度高く検出されているため、極めて安定というわけではないと考えられる。発現量に関しては CasMATE<sub>8-468</sub> および CasMATE<sub>15-468</sub> が高い値を示していた。CasMATE<sub>8-461</sub> および CasMATE<sub>8-468</sub> は発現量が良いとは言えないものの目的のピークは検出できていることから、CasMATE 変異体の発現はできていると考えられた。

上記の結果から、4変異体いずれも *CasMATE* 変異体を発現していることがわかった。発現量の違いはあるが現段階ではどの変異体も結晶化に使用できる可能性があるため、4変異体すべてを1L培養に移した。

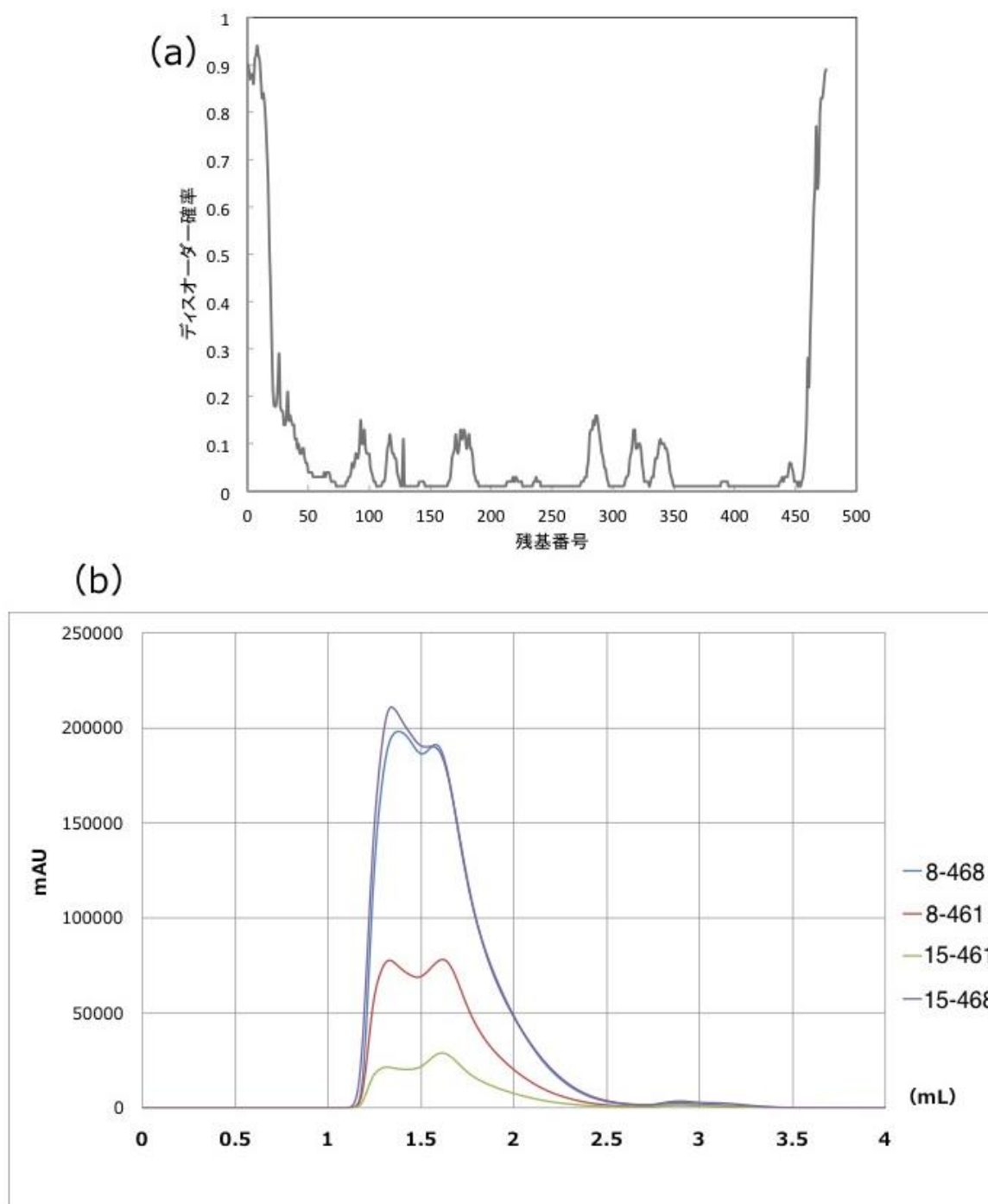


図 3-1. *CasMATE* の発現コンストラクト検討

(a) DISOPRED3 による *CasMATE* の disorder 領域予測. 両末端ともに高いディソオーダー確率を示している。

(b) *CasMATE* の各変異体の FSEC クロマトグラム. 1.3 mL あたりのピークは void ピークであり, 1.6 mL あたりのピークが *CasMATE* 変異体と GFP の融合タンパク質由来

のピークである。Superdex 200 increase 5/150 GL 3 mL カラムを使用した。490 nm の励起波長を使用し、512 nm の蛍光波長を検出している。

### 3.1.2 CasMATE 変異体の精製

3.1.1 の FSEC の結果から、4 種の変異体全てを 1 L の精製過程へ用いた。BMMY 培地 1 L で 20°C で 72 時間培養した各変異体 CasMATE を発現させた *Pichia pastoris* をマイクロフルイダイザーで破碎し、細胞膜を界面活性剤により可溶化した後、Co アフィニティカラム、TEV による His タグ付き GFP の切除、ゲルろ過カラムにより精製を試みた。その過程で CasMATE<sub>8-461</sub> および CasMATE<sub>15-461</sub> 変異体は TEV 処理前の濃縮の段階で沈殿を形成してしまった。おそらく C 末端の 14 アミノ酸のデリベーションによる不安定化が原因だと考えられる。CasMATE<sub>8-468</sub> および CasMATE<sub>15-468</sub> は最終ゲルろ過まで行うことができた。収量は最も収量の高かったもので 1 L の BMMY 培地から約 1.7 mg であった。例として CasMATE<sub>15-468</sub> のゲルろ過カラムクロマトグラフィーのクロマトグラムと SDS-PAGE 法による分析の結果を示す (図 3-2)。

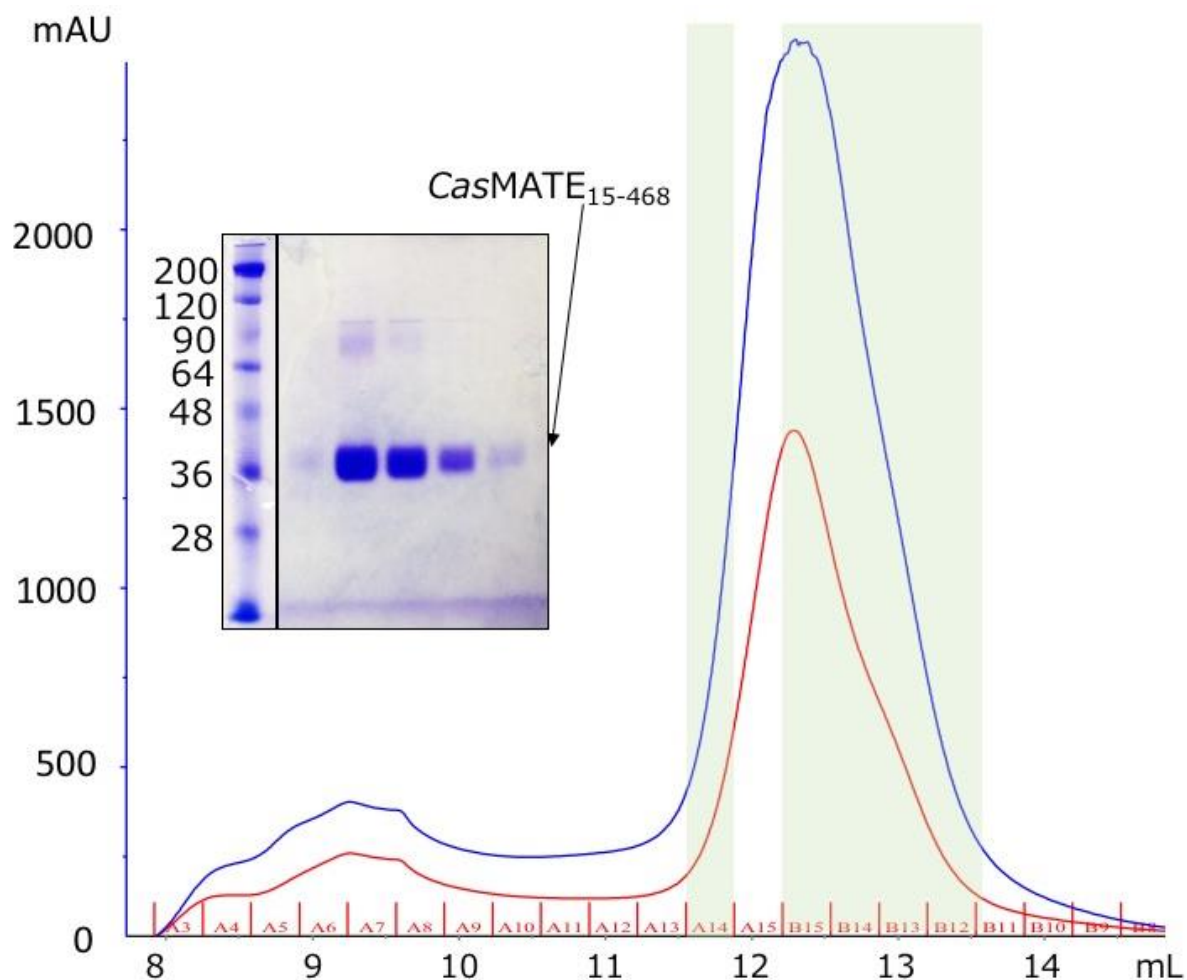


図 3-2. CasMATE<sub>15-468</sub> のゲルろ過精製の結果とメインピークの SDS-PAGE 結果

ゲルろ過分析では Superdex 200 increase 10/300 GL 24 mL カラムおよび平衡化バッファ 3 (0.03% (w/v) LMNG, 300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.0, 1% glycerol, 5 mM  $\beta$ -ME, 0.003% CHS) を使用した. SDS-PAGE ではサンプルの熱処理は行っていない. クロマトグラムのうち SDS-PAGE に使用した画分を緑で示している.

### 3.1.3 CasMATE 変異体の結晶化

精製した CasMATE<sub>8-468</sub> および CasMATE<sub>15-468</sub> を用いて, LCP 法による結晶化を行った. 13 mg/mL に濃縮したタンパク質溶液とモノオレインを重量比 2:3 で調製し, 室温で 10 分間再構成した. 672 条件のリザーバーで結晶化スクリーニングを行った結果, CasMATE<sub>8-468</sub> の結晶は得ることができなかったが, 複数の条件から CasMATE<sub>15-468</sub> の結晶を得ることができた (図 3-3 a, b, c). 結晶の大きさは縦 40  $\mu$ m x 横 30  $\mu$ m x 高さ 5  $\mu$ m ほどの盤状結晶が多く観察された.

CasMATE<sub>15-468</sub> と Rb イオンとの共結晶化では CasMATE<sub>15-468</sub> 単体での結晶よりも大きな結晶を得ることができた (図 3-3 e).

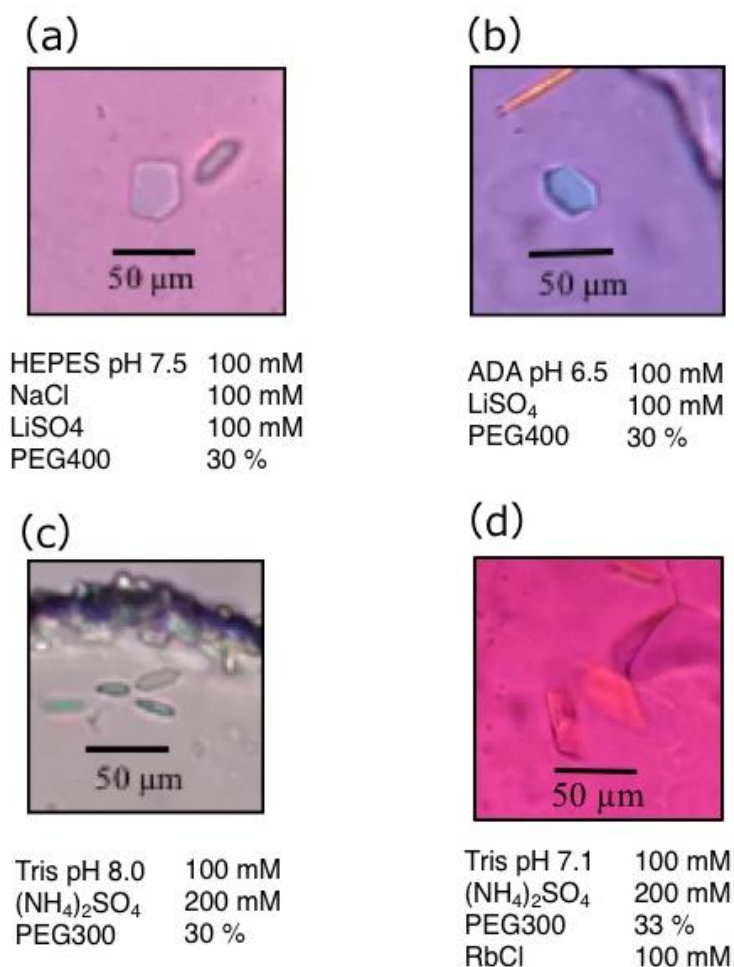


図 3-3. CasMATE<sub>15-468</sub> の結晶

(a) ~ (c) は *CasMATE*<sub>15-468</sub> のみの結晶であり、(d) は *CasMATE*<sub>15-468</sub> と RbCl の共結晶化によって得られた。(a) ~ (d)の結晶はいずれも結晶化実験から 1 週間以内に出現していた。

### 3.1.4 大型放射光施設での X 線回折実験およびデータ処理

得られた結晶に対して SPring-8 BL32XU において 2.1.4 で述べた測定条件で X 線回折実験を行った結果、*CasMATE*<sub>15-468</sub> の結晶から 3 Å を超える回折点を得られた (図 3-4 a, b)。一つの結晶から得られた回折像のデータを KAMO ソフトウェア (Yamashita *et al.*, *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* 2018) で処理し、空間群の推定を行った。多数の結晶に対して同様の操作を行ったところ、空間群 *P* 2 2 2 を示したものが最も多かったため、*P* 2 2 2 を示した回折像をその後の処理に用いた。KAMO ソフトウェアで *P* 2 2 2 を示した回折像データを統合しスケーリングを行った結果、分解能 2.8 Å の回折データセットを得ることができた (表 4)。空間群は *P* 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub>, 格子長は  $a = 60.71, b = 69.89, c = 117.6$  (Å),  $\alpha = \beta = \gamma = 90$  (°) であった。

Rb イオンとの共結晶では 2.3 Å を超える回折点を得られ (図 3-4 c, d), 複数の結晶から回折像データを収集した。KAMO ソフトウェアを用いて処理したところ、空間群は *P* 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub>, 格子長  $a = 60.63, b = 69.27, c = 117.00$  (Å),  $\alpha = \beta = \gamma = 90$  (°) であった。

### 3.1.5 モデル構築および構造精密化

得られた回折データセットに対して分子置換法により位相決定を行った。*CasMATE*<sub>15-468</sub> のデータセットに対しては PfMATE (PDB ID 3W4T) を用いた。この際、空間群 *P* 2 2 2 だと位相が決まらなかったため、*P* 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> を指定して計算を行ったところ、解が得られた。*CasMATE*<sub>15-468</sub> + Rb イオンの結晶から得られたデータセットに対しては *CasMATE*<sub>15-468</sub> の構造データを用いた。こちらも同様に *P* 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> で位相計算を行った。初期位相を決定後、COOT (Emsley *et al.* *Acta Crystallographica Section D* 2010) および PHENIX (Adams *et al.* *Acta Crystallographica Section D* 2010) を用いて精密化を行い、それぞれ、*CasMATE*<sub>15-468</sub>:  $R_{\text{work}} = 23.8, R_{\text{free}} = 29.8$  (%), *CasMATE*<sub>15-468</sub> + Rb イオン:  $R_{\text{work}} = 22.3, R_{\text{free}} = 25.4$  (%) まで精密化することができた。(表 3-1)

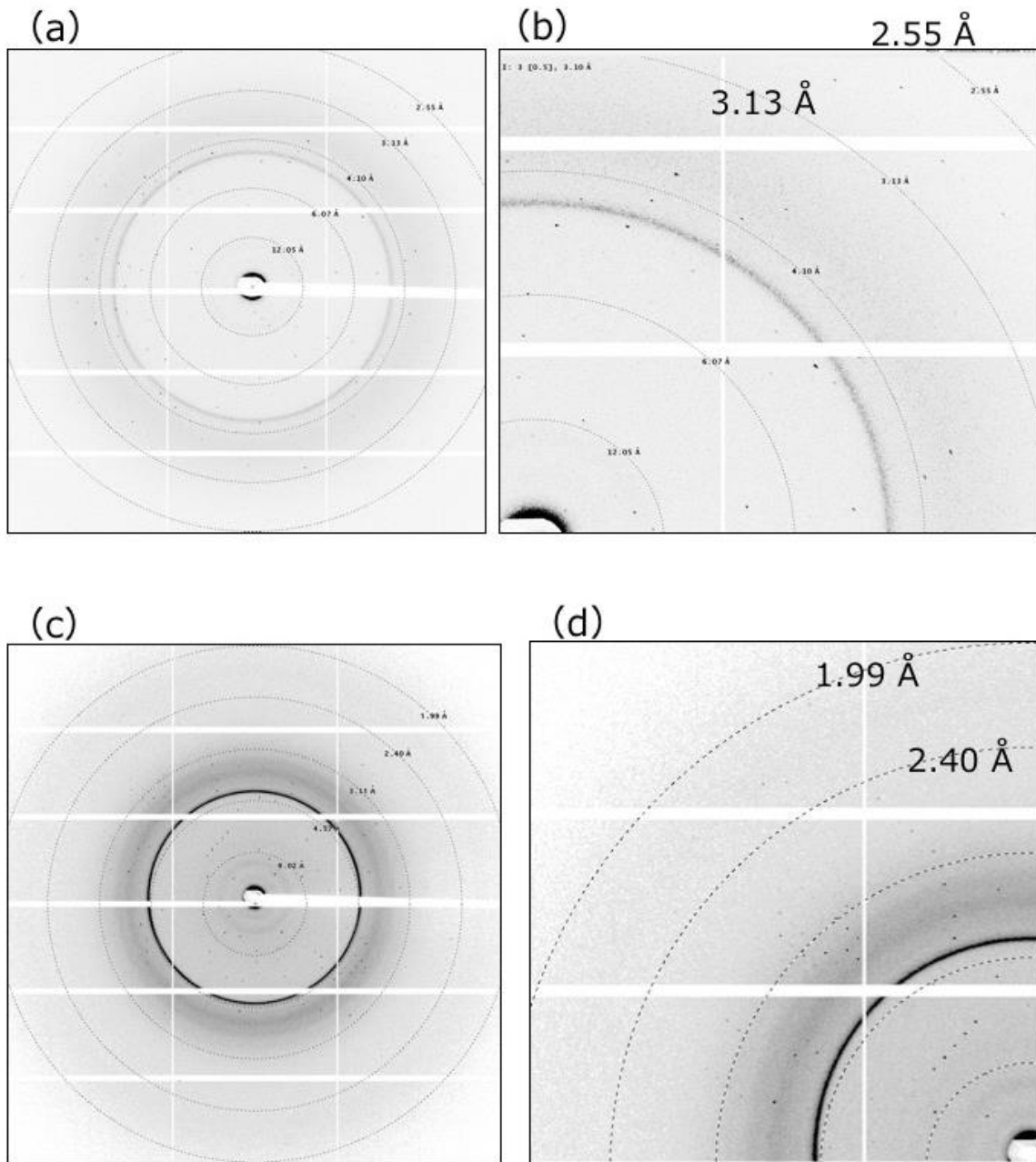


図 3-4. *CasMATE*<sub>15-468</sub> の結晶由来の回折点

Adxv ソフトウェアにより回折点を表示している。(a) (b) は *CasMATE*<sub>15-468</sub> 単結晶, (c) (d) は RbCl との共結晶由来の回折点である。(b) の拡大図では 2.8 Å あたりまで回折点が観察された。(d) の拡大図では 2.4 Å を超えるあたりまで回折点が確認できた。



表 3-1. CasMATE<sub>15-468</sub> 単量体および RbCl との複合体結晶由来の回折データセット  
および構造精密化の統計値

	CasMATE <sub>15-468</sub>	CasMATE <sub>15-488</sub> + RbCl
<b>Data collection</b>		
Synchrotron beam line	BL32XU (SPring-8, Japan)	BL32XU (SPring-8, Japan)
Wavelength (Å)	1	1
Resolution range (Å)	45.8 - 2.90 (3.00 - 2.90)	45.6-2.3 (2.35 - 2.30)
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit cell		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	60.71, 69.89, 117.6	60.65, 69.25, 116.99
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Total reflections	59,319 (5,886)	274945 (44715)
Unique reflections	11,158 (1,114)	21982 (3514)
Redundancy	5.3 (5.3)	12.5 (12.7)
Completeness (%)	95.1 (92.9)	97.2 (97.5)
Mean <i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	3.99 (1.32)	6.48 (1.42)
R <sub>meas</sub>	0.509 (1.90)	0.418 (2.54)
R <sub>merge</sub>	0.466 (1.73)	0.403 (2.451)
CC1/2	0.983 (0.334)	0.987 (0.554)
<b>Refinement</b>		
Reflections used in refinement	11,036 (1,056)	21912 (2128)
Reflections used for R-free	1,107 (106)	1999 (195)
<i>R</i> -work	0.238 (0.275)	0.2227 (0.269)
<i>R</i> -free	0.298 (0.309)	0.2536 (0.320)
Number of atoms	3,477	3614
macromolecules	3,442	3453
lipid	25	77
solvent	10	84
Protein residues	448	450
Model geometry		
RMS(bonds)	0.003	0.002
RMS(angles)	0.56	0.45
Ramachandran analysis (%)		
favored	98.4	98.66
allowed	1.35	1.12
outliers	0.22	0.22
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )		
macromolecules	35.9	30.94
lipid	41.3	46.77
solvent	16	34.96

Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.  $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ , where  $\langle I(hkl) \rangle$  is the mean  $I(hkl)$  over symmetry-equivalent reflections.  $R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} \{N(hkl)/[N(hkl)-1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ .

### 3.1.6 CasMATE の全体構造およびカチオン結合部位

CasMATE は 6 回膜貫通構造が重複した 12 回膜貫通構造をしていた (図 3-5 a) . N 末端側の 6 回膜貫通を N ロープ, C 末端側を C ロープと呼ぶ. 2 つのローブによって V 字型構造を形成しており, これは原核生物由来の MATE タンパク質の結晶構造と同様のコンフォメーションであった. このことから CasMATE の結晶構造は原核生物由来の MATE タンパク質の結晶構造と同様に”外開き”状態であると考えられる. また, CasMATE の結晶構造では N ロープと C ロープにより中央部に空洞を形成していた.

MATE は 6 回膜貫通領域の遺伝子重複によって 12 回膜貫通領域を形成しているため, N ロープと C ロープの立体構造は類似している (図 3-5 b) . しかし, それぞれのローブの空洞に面したアミノ酸に着目してみると, 異なった種類のアミノ酸が露出していることがわかる (図 3-5 b) . C ロープ側には親水性や極性アミノ酸が多く, N ロープ側には非極性アミノ酸が多い. この特徴から, 駆動力であるカチオンが結合するのは C ロープ側の親水性領域ではないかと考えられる.

CasMATE におけるカチオンの結合部位を調べるため, *Vibrio cholerae* 由来の NorM のカチオン結合部位と CasMATE の比較を行なったところ, CasMATE において NorM-Vc のカチオン結合部位と極めて類似したアミノ酸群を確認した (図 3-5 c) . CasMATE における E265, Y300, D383 が NorM-Vc の E255, F288, D371 に対応していると考えられる. このことから CasMATE は NorM-Vc と同様のカチオン結合様式を保持している可能性が示唆された.

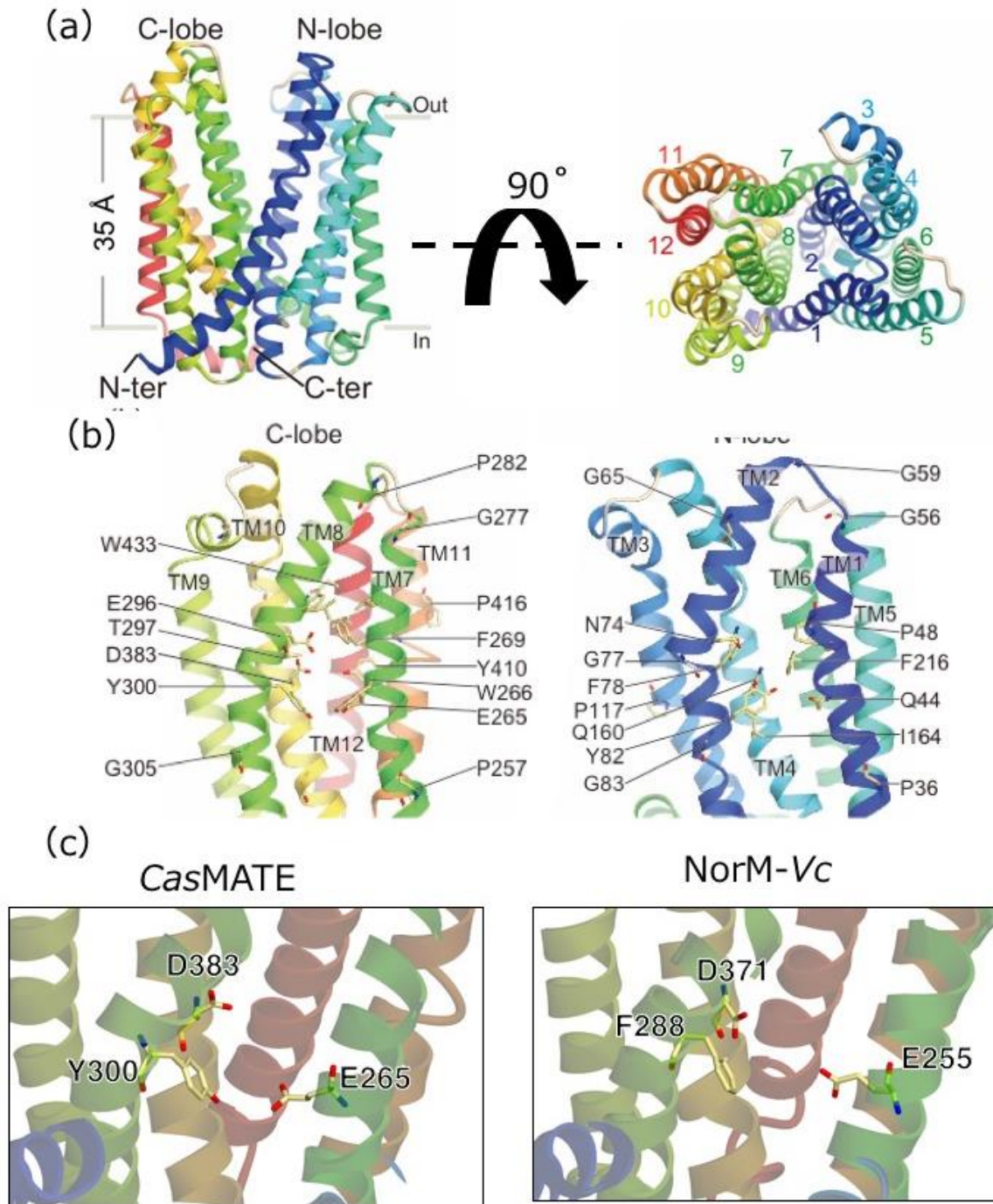


図 3-5 *CasMATE*<sub>15-468</sub> (PDB ID 5XJJ) の全体構造およびローブ比較

(a) 細胞膜側からの視点と、細胞外側からの視点から見た *CasMATE*. TM1 から TM12 へ、ブルー、グリーン、イエロー、レッドでグラデーションをかけて表示している。

(b) それぞれのローブにおいて内部の空洞に面している極性アミノ酸および芳香族アミノ酸、グリシン、プロリンを表示した。

(c) *CasMATE* と *NorM-Vc* を重ね合わせ、*NorM-Vc* の 3 アミノ酸 (E265, F288, D371) に対応するアミノ酸を *CasMATE* にて表示している。

### 3.1.7 CasMATE と他の MATE タンパク質との構造比較

原核生物由来の MATE タンパク質では TM1 の屈曲が rocker switch model において重要な働きをすると考えられている (Tanaka *et al.*, *Nature* 2013) . TM1 の屈曲に関与しているのはプロリンであり, このプロリンの保存性は MATE ファミリーの中で高い (Kusakizako *et al.*, *BBA* 2019) . CasMATE の TM1 に着目してみると, PfMATE の straight 状態と bent 状態の中間に位置している (図 3-6 a) . CasMATE の TM1 は 2 箇所屈曲しており, どちらもプロリン (P36, P48) による屈曲である. PfMATE の TM1 の屈曲も 2 箇所あるが, C 末端側の屈曲はプロリンによるものではない. しかし, TM1 の屈曲という現象はどちらの MATE タンパク質でも確認されていることから, 原核生物と真核生物で共通したメカニズムであると考えられる.

一方で, TM7 に着目してみると, PfMATE は straight と bent 状態で TM7 に変化は無いが, CasMATE では PfMATE の TM7 よりも空洞側に少し屈曲していた (図 3-6 b) . この屈曲は TM7 の G255 を支点として生じていた. MATE は 6 回膜貫通領域の重複によって形成されているため, TM1 と TM7 は配列的, 構造的に相同性がある. TM7 には P257 が G255 のすぐそばにあるが P257 は屈曲に関与していなかった. また, TM1 で見られた 2 箇所の屈曲は見られず, P48 に対応したプロリンやヘリックスの屈曲の要因となるグリシンも TM7 には見られなかった. 一方で, 2017 年に報告されたシロイヌナズナ由来の AtDTX14 の結晶構造と比較してみると, TM7 と TM8 の屈曲率が異なっていることがわかる (図 3-6 c) . AtDTX14 では TM7 が PfMATE の TM1 のように 2 箇所で大きく屈曲しており, CasMATE よりも C ローブの空洞を狭めるように構造変化していた (図 3-6 d) . AtDTX14 は pH 5.0-5.3 の条件で結晶化されておりプロトネーションによる構造変化が CasMATE よりも大きいと考えられる. inward-facing への構造変化には pH による駆動力と脂質が必要であるとの報告もあり (Zakrzewska *et al.* *PNAS* 2019) , AtDTX14 は Rocker switch model を考慮すると, CasMATE の構造状態の後に AtDTX14 の構造状態へ変化し, inward facing 状態へと移行して行くと考えられる.

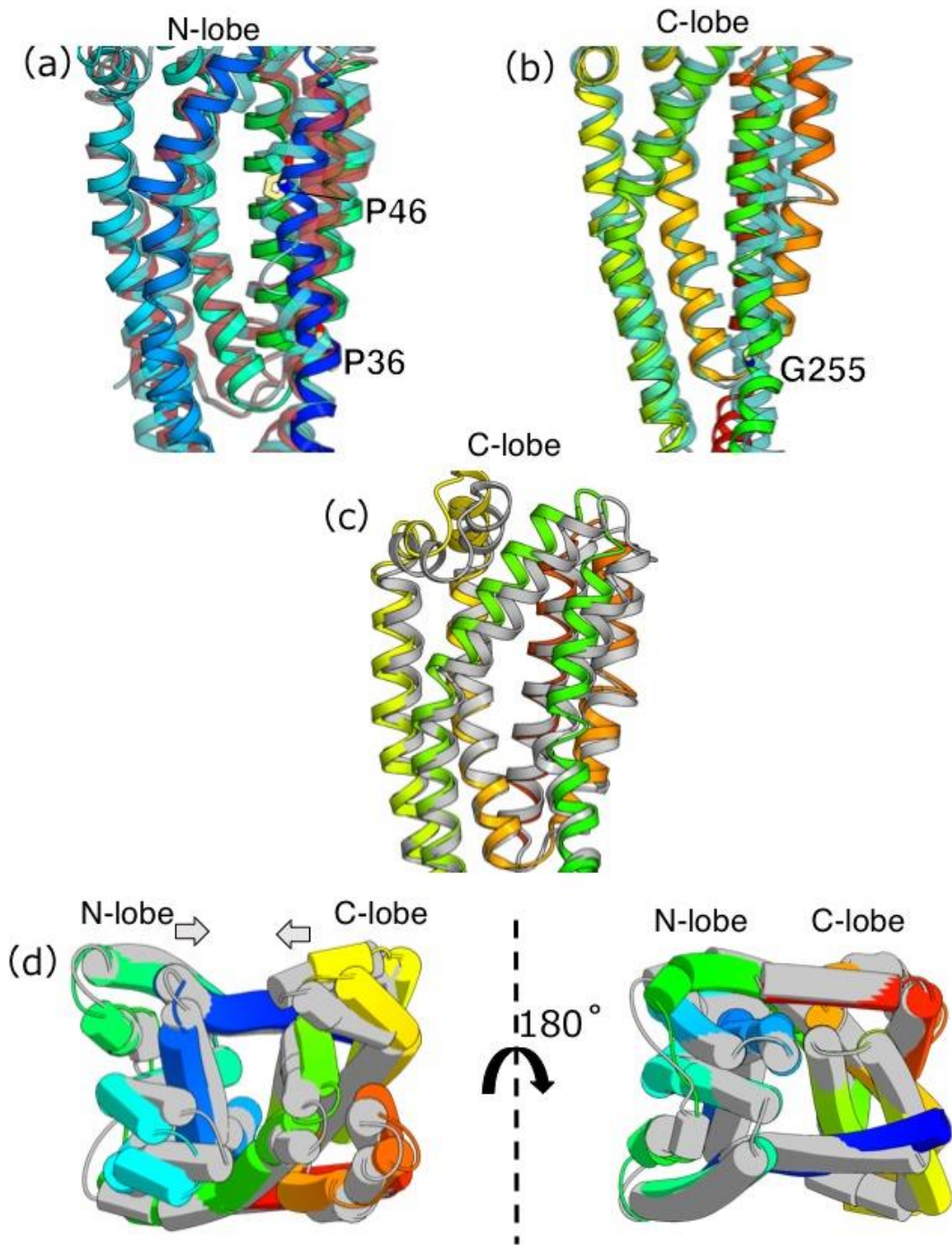


図 3-6. *CasMATE* と他の MATE タンパク質との重ね合わせ

*CasMATE* の配色は図 3-5 a と同じである。

(a) シアン: PfMATE (bent) , レッド: PfMATE (straight) . PfMATE と *CasMATE* それぞれの N ロープを重ね合わせている. *CasMATE* の TM1 は straight と bent の間に位置している. プロリンの位置で TM1 が屈曲している.

(b) シアン: PfMATE (bent) . PfMATE と *CasMATE* それぞれの C ロープを重ね合わせている. *CasMATE* の TM7 が空洞側に少しシフトしている.



(c) グレー: AtDTX14. AtDTX14 と *CasMATE* の C ロープを重ね合わせている. TM7 と TM8 の細胞外側が重なり合っておらず, 構造変化していることがわかる.

(d) グレー: AtDTX14. AtDTX14 と *CasMATE* の重ね合わせ. 細胞外側からの視点(左) と細胞内側からの視点(右). 空洞を閉じるような構造変化をしている. 細胞内側も微小ながら構造変化している.

### 3.1.8 基質結合部位の比較

N ロープと C ロープによって形成されている空洞はおよそ縦 22 x 横 13 x 高さ 22 Å であり, 表面電荷を計算したところ, 強く負に帯電していることがわかった (図 3-7 a, b). 空洞表面にアスパラギン酸やグルタミン酸などの負電荷をもつアミノ酸が露出していることが要因であった. 空洞の表面電荷に寄与しているアミノ酸は N74, E89, Q160, R168, E265, E270, E296, D383, N390, R394, N406, Q443 であり, それらのアミノ酸のうち, 植物と原核生物どちらにも保存性が見られたのは E265, D383, R394 のみであった (図 3-8). これらは *NorM* において駆動力であるカチオンの結合部位として考えられており (He *et al.*, *Nature* 2010, Lu *et al.*, *PNAS* 2013), 植物においても *NorM* と同様の駆動メカニズムが保存されていることが示唆された. E265, D383, R394 以外のアミノ酸の保存性はばらついており (図 3-8), これは他の *MATE* タンパク質では内部表面に露出しているアミノ酸が異なる可能性を示唆している. また, *AtFRD3* や *Pf-DinF* (*PfMATE*) など E265, D383, R394 が保存されていない *MATE* も存在しており, これらは *NorM* とは異なったカチオン結合サイトを持っていると考えられる. *DinF* では保存されている 2 つのアスパラギン酸 D41, D184 (図 3-8) がカチオン結合サイトだと言われており (Tanaka *et al.*, *Nature* 2013), この 2 つは *AtFRD3* においても保存されていたことから, *DinF* と *AtFRD3* は共通したカチオン結合メカニズムを保持している可能性が考えられる.

*MATE* タンパク質において内部の空洞は基質の結合部位だと考えられており, *PfMATE* では実際に空洞に基質が結合した状態の立体構造が報告されている (Tanaka Y *et al.*, *Nature* 2013). *CasMATE* の機能解析は報告されていないが *CasMATE* と 80% の相同性を持つ *AtDTX1* はカドミウムやセシウムといった重金属イオンを排出することが報告されており (Li *et al.*, *JBC* 2002), *CasMATE* の強いマイナスチャージは重金属イオンに対応した結果なのではないかと考えられる.

原核生物由来の *MATE* タンパク質に関して内部空洞の表面電荷を調べたところ, *NorM* と *DinF* グループでは表面電荷に偏りがあることがわかった (図 3-7 c). *NorM* グループは強く負に帯電しており, *DinF* グループは強く正に, もしくは弱く負に帯電していた. *CasMATE* は *NorM* と同様の電荷的性質を示しており, *NorM* において保存されているアミノ酸 (E265, D383, R394) が確認されたことから, *NorM* 由来の *MATE*

ではないかと考えられる. 原核生物ではNorMとDinFでは共通の基質を輸送することが報告されているが (Kuroda *et al.*, *BBA* 2009), 表面電荷の違いにより基質への親和性が異なることが予想される. NorMとDinFは多剤耐性因子として同定されているが, colibactin 前駆体を輸送する MATE タンパク質である ClbM のように (Mousa *et al.*, *Nat Microbiol* 2016), 生体由来の特定の基質を輸送しているのかもしれない.

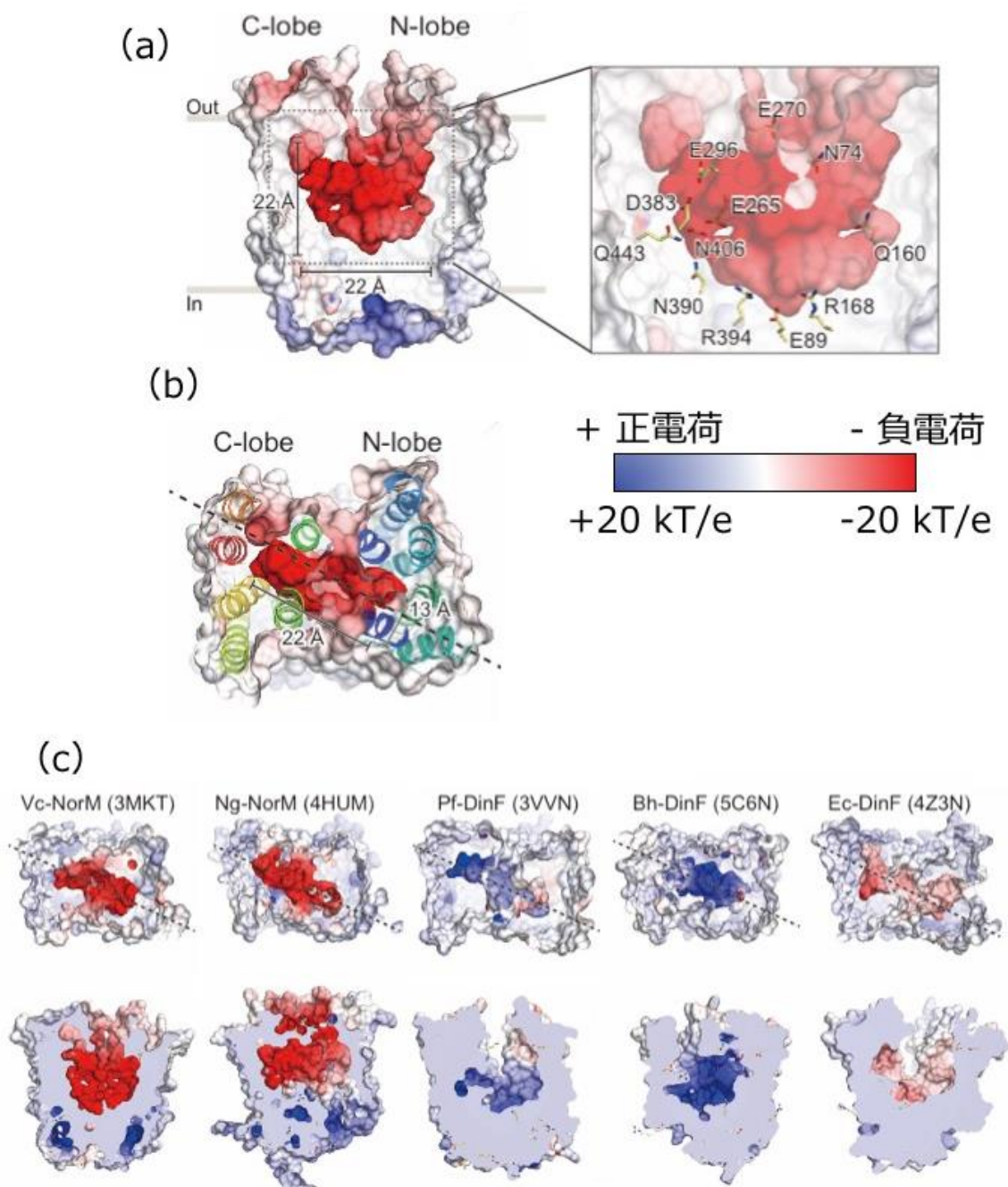


図 3-7. CasMATE (PDB ID 5XJJ) の表面電荷マッピングおよび比較

- (a) 空洞のおおよその大きさと表面電荷に寄与しているアミノ酸を表示した.
- (b) (a) の断面図は点線の切断により作成した.

(c) 原核生物由来の MATE の表面電荷の比較. 左 2 つの NorM 型は負電荷を, 右 3 つの DinF 型は正電荷もしくは弱い負電荷を示した.

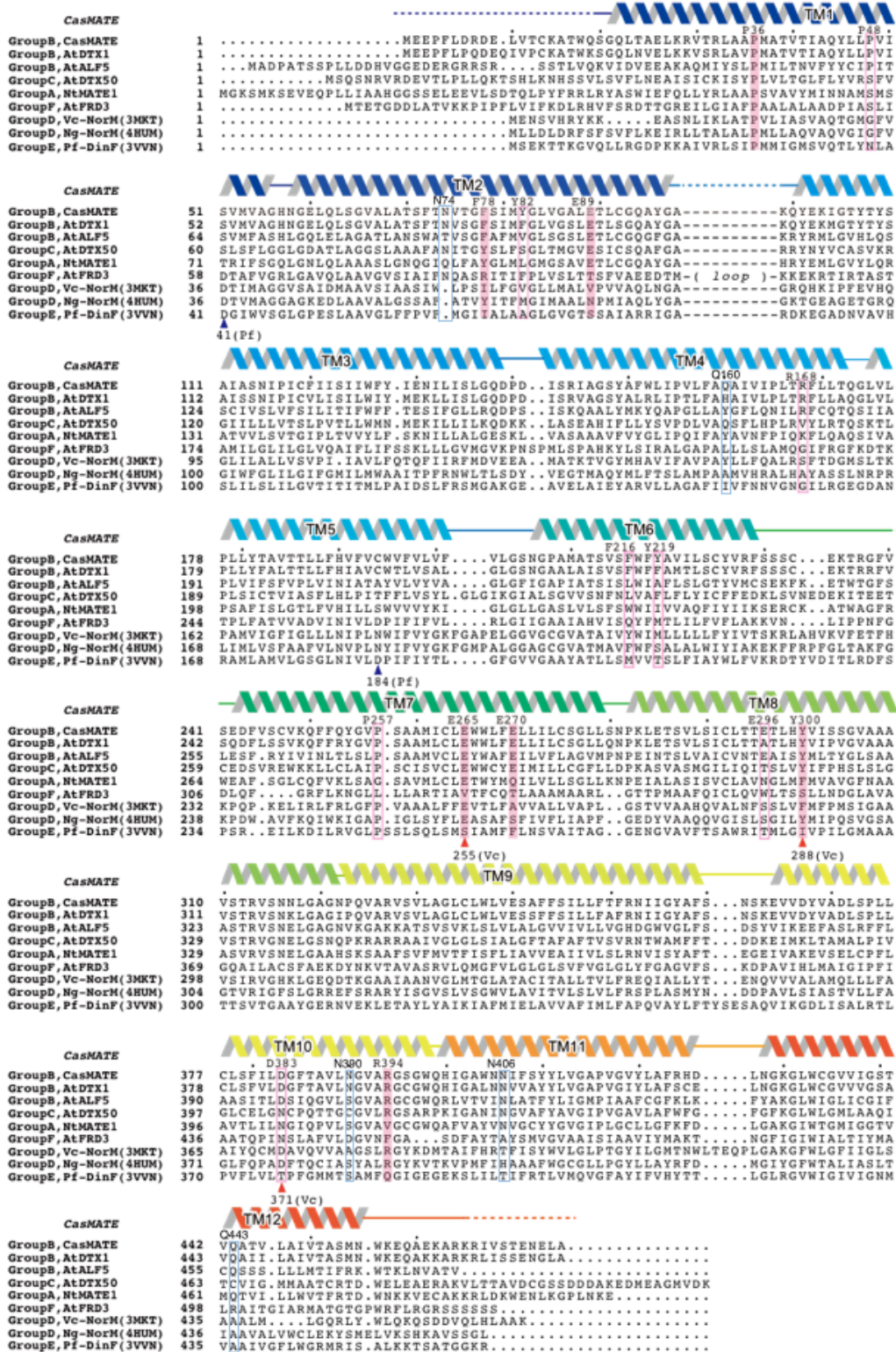


図 3-8. 植物由来および立体構造の報告されている MATE のアラインメント



NorM において保存されているアミノ酸を赤三角で、DinF において保存されているアミノ酸を青三角で示している。本文中で述べたアミノ酸のうち Group 分類に関しては 3.1.9 を参照。

### 3.1.9 系統樹解析による分類

MATE ファミリーに関する系統樹解析において 2006 年の報告では、NorM, DinF, eMATE の 3 つに分類されている (Omote *et al.*, *TiPS* 2006) 。2014 年の植物における MATE ファミリーの系統樹解析では、機能ごとにサブグループを形成することが報告された (Takanashi *et al.*, *Plant Physiol* 2014) 。これにより植物において MATE ファミリーはそれぞれの機能における基質に対応した立体構造を獲得している可能性が考えられた。MATE ファミリーは植物において原核生物とは異なった性質を獲得しているが、進化の観点から、アミノ酸配列や立体構造には共通した特徴が保存されている可能性が高い。そこで、植物における MATE ファミリーの配列保存性やグループ分けを原核生物由来の MATE と関連づけて行おうと考えた。機能の報告されている原核生物由来の MATE および植物由来の MATE、立体構造の報告されている MATE のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った。

原核生物由来の MATE は NorM と DinF の 2 グループに分類された (図 3-9) 。一方で植物由来の MATE は 4 グループに分類された。4 グループは Group A:2 次代謝物の蓄積, Group B:生体異物の排出, Group C:植物ホルモン輸送, Group F:クエン酸輸送を担う MATE タンパク質が主に分類されている。それぞれの Group 間の相同性は A-B:29-45, A-C:20-28, A-D:15-22, A-E:7-19, A-F:10-18, B-C:25-29, B-D:15-22, B-E:12-17, B-F:12-16, C-D:10-20, C-E:9-18, C-F:8-16, D-E:13-22, D-F:9-20, E-F:13-22 %であった (表 3-2) 。Group A,B,C は NorM と、Group F は DinF と配列類似性が見られた。系統樹作成に用いたアラインメントの一部を見てみると、NorM において強く保存されているアミノ酸が group A,B,C に保存されており、DinF において強く保存されているアミノ酸が group F に保存されていた (図 3-8) 。このことは、植物において原核生物由来の MATE の分類 (NorM 型と DinF 型) が保存されていることを示しており、基本的な輸送メカニズムは共通している可能性が示唆された。また、空洞の表面電荷に関して、NorM と CasMATE の空洞の表面電荷が一致していたことから、DinF の表面電荷が Group F の MATE と一致している可能性が考えられる。一方で、Group F において見られた CEM (citrate exuding motif) と呼ばれる TM2 と TM3 の間のループ領域 (Upadhyay *et al.*, *J. Exp. Bot* 2019) は原核生物由来の DinF 型: Group E には見られず (図 3-8) 、植物において特異的であった。植物由来の MATE はアミノ酸長が原核生物由来の MATE に比べて長くなっている傾向にあり (図 3-8) 、特に Group F は植物由来の MATE タンパク質の中でもアミノ酸長が長い。12 回膜貫通構造は共通しているが、

Group F のループ領域や Group A, C の末端領域の増加は新たな機能や相互作用領域の可能性もある. 実際に, 植物において老化現象に関わる MATE タンパク質である AtABS3 は ATG8-interacting motif (AIM) を介して ATG8 (Autophagy related protein 8) と相互作用することが報告されている (Jia *et al.*, *Nat Plants* 2019). 末端領域や AIM, CEM などの植物 MATE タンパク質に特異的な特徴を明らかにするためには, さらなる植物 MATE タンパク質の構造解析が必要である.

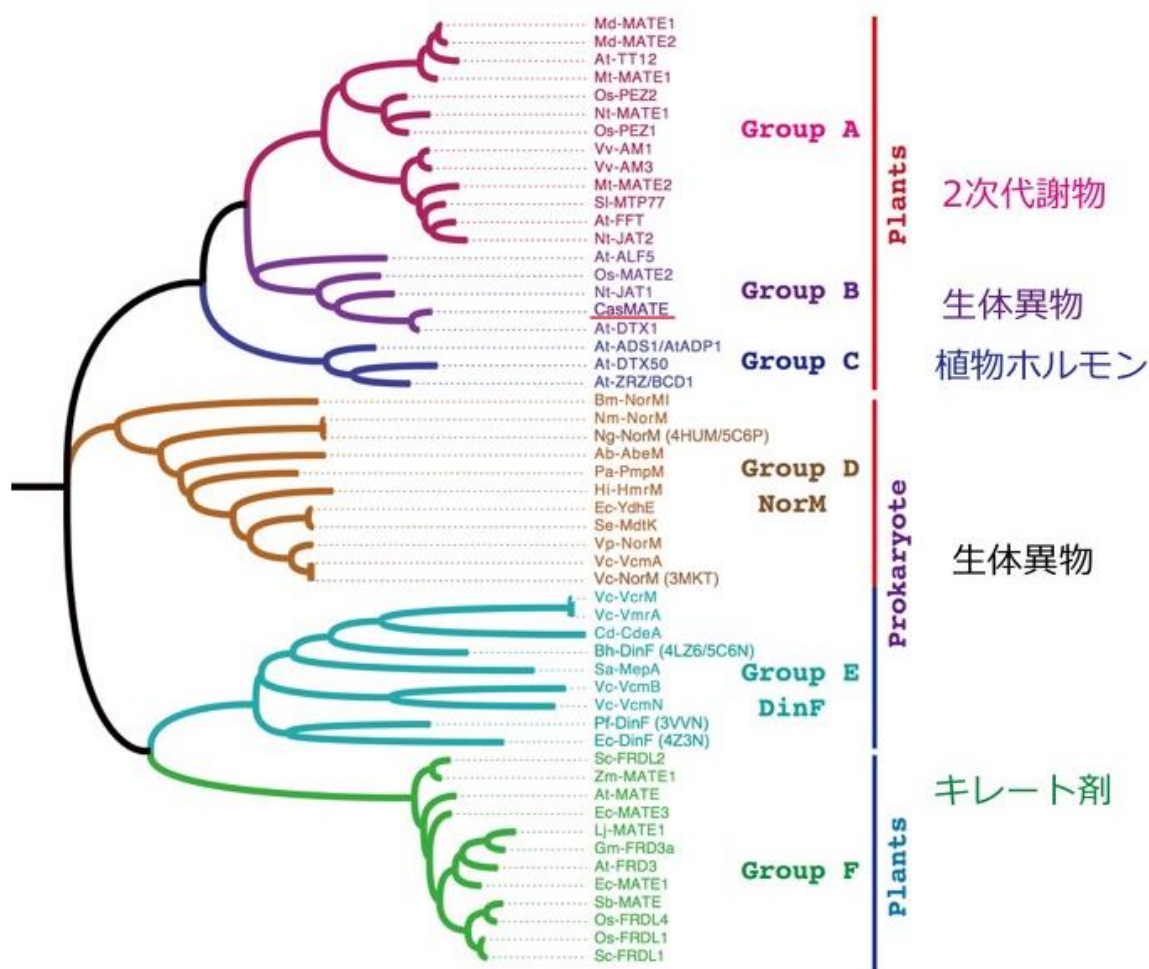


図 3-9. 原核生物および植物由来の MATE のアミノ酸配列を用いた系統樹解析  
機能の報告されている植物由来および原核生物由来, 立体構造の報告されている MATE のアミノ酸配列 (表 2-2) を用いて, MEGA7 により最尤法を用いて系統樹を作成した. 原核生物は2つ, 植物は少なくとも4つのグループに分かれた. 植物においてはそれぞれのグループが別の機能を担う傾向にある.

Group	A	B	C	D	E	F
A		29-45	20-28	15-22	7-19	10-18
B	29-45		25-29	15-22	12-17	12-16
C	20-28	25-29		10-20	9-18	8-16
D	15-22	15-22	10-20		13-22	9-20
E	7-19	12-17	9-18	13-22		13-22
F	10-18	12-16	8-16	9-20	13-22	

単位 %

表 3-2. Group 間の配列相同性の一覧表

### 3.1.10 基質認識モデル

*CasMATE* の立体構造および表面電荷比較, 系統樹解析の結果から植物にも原核生物由来の *MATE* タンパク質に見られた内部空洞の表面電荷の多様性が保存されている可能性がある. *DinF*に見られた空洞の正電荷は原核生物由来の *MATE* タンパク質の基質の条件である有機カチオン性という化学的性質と適合しているように見えないが, **Group F** の基質であるクエン酸には適合している. また, *CasMATE* の機能解析は報告されていないが *CasMATE* と 80% の相同性を持つ *AtDTX1* はカドミウムやセシウムといった重金属イオンを排出することが報告されており, *CasMATE* の強いマイナスチャージはこういった重金属イオンに対応したのではないかと考えられる. 表面電荷の多様性および基質の化学的性質の背景から, 植物において *MATE* ファミリーは内部空洞の表面電荷を利用して基質へのバリエーションを獲得したという以下のモデルを提案する (図 3-10). しかし, 配列の保存性や原核生物での表面電荷の偏りは確認されたものの, 植物において実際に表面電荷の多様化は確認できていない. また, 基質との相互作用は輸送メカニズムを明らかにする上で必須だが, *CasMATE* は植物体における具体的な基質が未だ同定されていないため基質との複合体構造解析が困難であった. そのため基質の報告されている *MATE* に対して構造解析を行う必要がある. 中でも基質への選択性が確認されているニコチントランスポーターのような *MATE* の構造解析が植物における *MATE* ファミリーの多様性を解明する上で重要である.

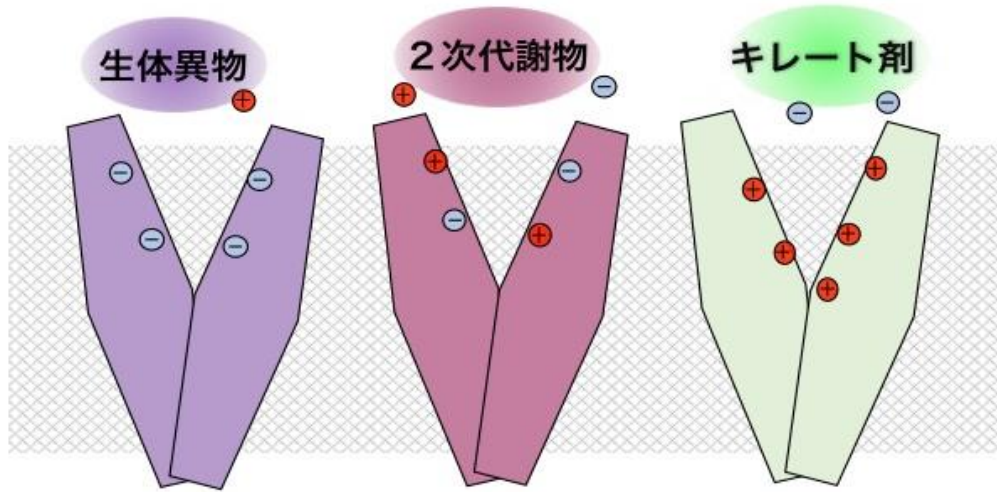


図 3-10. 植物 MATE ファミリーにおける基質認識モデル

基質の電荷的性質に合わせて MATE の基質結合部位の電荷的性質が変化している。生体異物は重金属イオンや毒物を、2 次代謝物はアルカロイドやフラボノイドを指しており、キレート剤はクエン酸のことを指している。

## 3.2 ニコチントランスポーターの構造解析

-序-

CasMATEの結晶構造解析により世界で初めて真核生物由来のMATEタンパク質の立体構造を決定し、植物におけるMATEタンパク質の構造基盤の構築を進めた。しかし、植物におけるMATEファミリーの多様化を鑑みると、1つの立体構造だけでは不十分である。また、基質の認識機構を明らかにするためには、基質の同定されているMATEタンパク質に取り組む必要がある。

ニコチンを輸送するMATEタンパク質はグループA、Bに属しており液胞膜に局在してニコチンを液胞内へ輸送している。グループAのMATEタンパク質の立体構造が決定できれば2次代謝物の輸送に関わるMATEタンパク質の構造基盤となる。また、基質が同定されているため、基質との相互作用について議論が可能となる。本研究ではニコチントランスポーターの結晶構造解析を進めた。

### 3.2.1 FSECによる発現量および単分散性の評価

ニコチントランスポーターとして同定されている Nt-JAT1, Nt-JAT2, NtMATE1, NtMATE2 の結晶構造解析に向けて FSEC 法による評価を行った。

G418 硫酸塩による選抜の結果、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の YPD プレートから形質転換体を得られた。次に、FSEC により発現量および培養条件の検討を行った。Nt-JAT1 および Nt-JAT2 は目的とするピークは 1.6 mL 付近に得られているものの、1.3 mL あたりの void ピークも同様に見られており (図 3-11 a) , 発現量も少ないことから大量培養を行っても結晶化に十分な量を精製することができないと判断した。一方で NtMATE1 および NtMATE2 は 20° で 72 時間培養の条件において発現量およびピーク形状ともに良好な結果を示していた (図 3-11 b) 。NtMATE1 と NtMATE2 はアミノ酸配列で 93% の相同性を示しており、同じ機能を果たすと報告されている (Shoji T *et al.*, *Plant Physiol* 2009) 。発現量は NtMATE2 の方が良い結果であったため、NtMATE2 を 1 L 培養系に用いた。

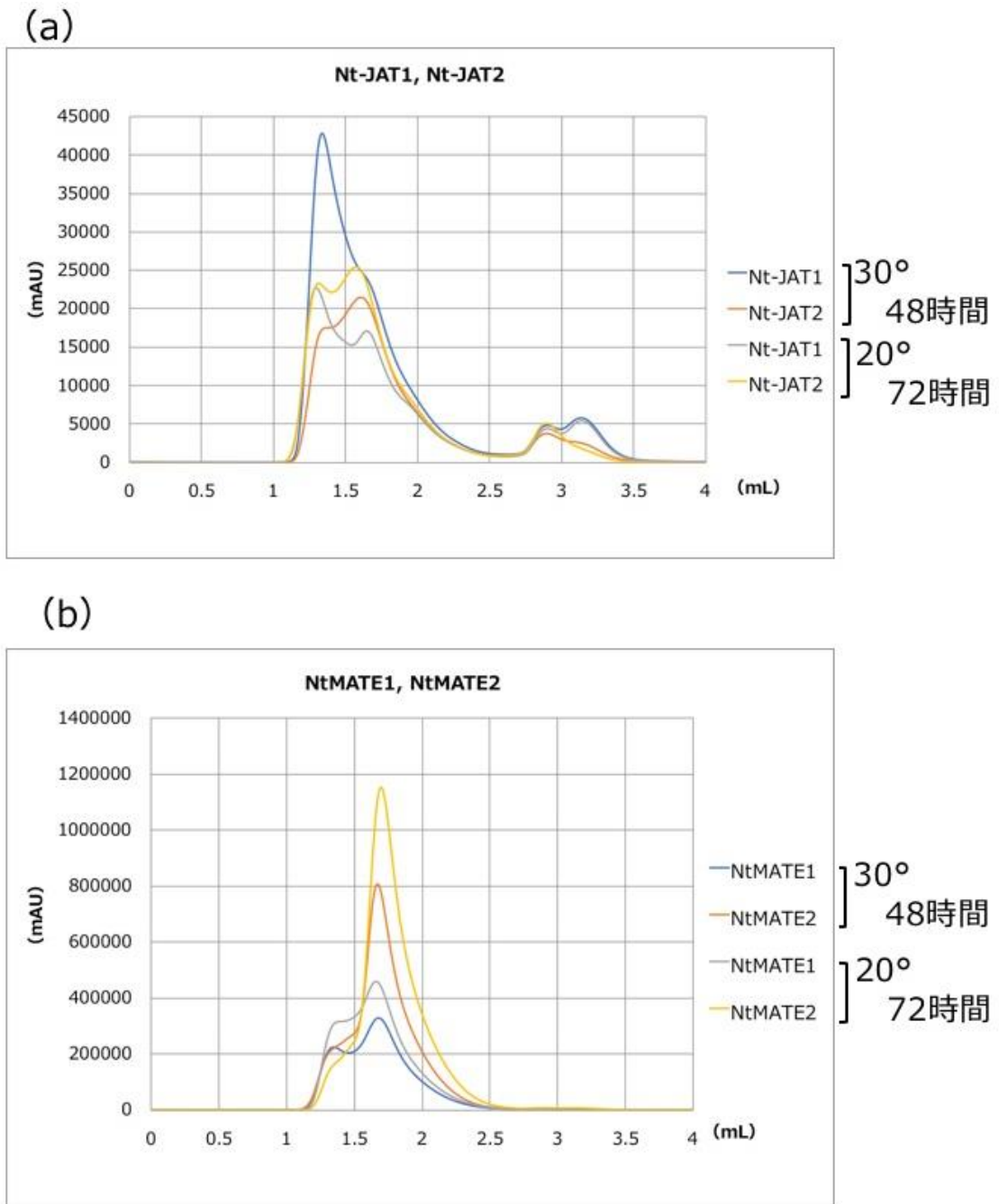


図 3-11. ニコチントランスポーターの FSEC 解析

発現量の違いにより (a) Nt-JAT1, Nt-JAT2 と (b) NtMATE1, NtMATE2 に分けた。両クロマトグラムとも右に示しているタンパク質名のうち上段 2 つが 30 ° 48 時間培養, 下段 2 つが 20 ° 72 時間培養である。1.3 mL 付近のピークが void ピークであり, 1.6 mL あたりのピークがニコチントランスポーターと GFP の融合タンパク質由来のピークである。Superdex 200 increase 5/150 GL 3 mL カラムを使用, 励起波長 490 nm, 蛍光波長 512 nm を検出している。

### 3.2.2 NtMATE2 の精製

3.2.1 の FSEC の結果から、NtMATE2 発現 *Pichia pastoris* SMD1163 株を 1 L の精製過程へ用いた。BMGY 培地で前培養した NtMATE2-GFP-His<sub>8</sub> 発現 *Pichia pasotris* を BMMY 培地 1 L へ植え継ぎ、20°C で 72 時間培養した。その後、マイクロフルイダイザーで破碎し、細胞膜を DDM により可溶化した後、Co アフィニティカラム、TEV プロテアーゼによる GFP-His<sub>8</sub> の切り離し、ゲルろ過カラムにより精製した (図 3-12)。ピークは単一であったが SDS-PAGE では複数バンドが得られた。バンドの形状や位置から、SDS sample buffer 条件下ではオリゴマー化していると考えられる。BMMY 培地 1 L あたり 1~2 mg の NtMATE2 を精製することができた。

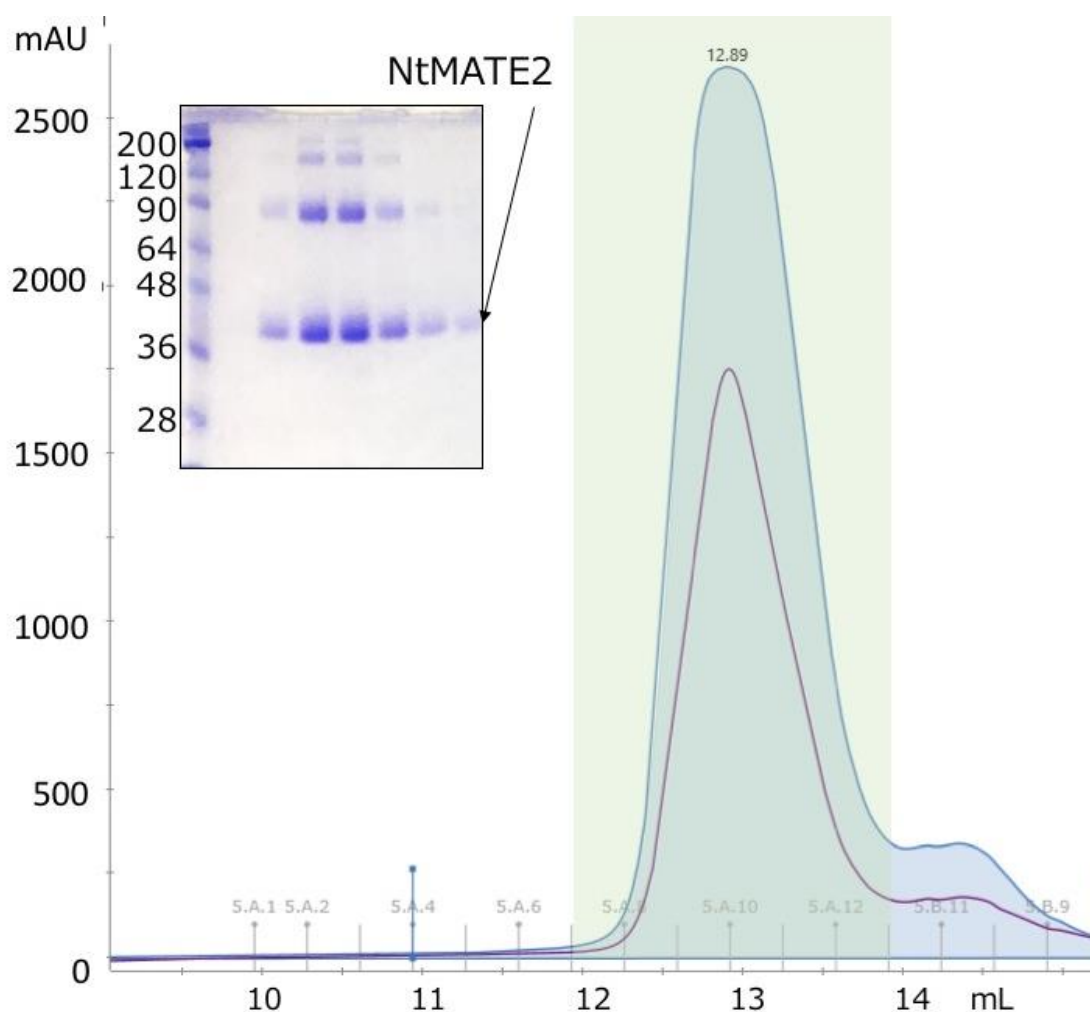


図 3-12. NtMATE2 のゲルろ過精製およびピーク画分の SDS-PAGE

ゲルろ過分析には Superdex200increase 10/300 GL 24 mL カラムおよびゲルろ過 buffer (0.05% (w/v) DDM, 300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 1% glycerol) を用いた。SDS-PAGE ではサンプルの熱処理は行っていない。クロマトグラムのうち SDS-PAGE に使用した画分を緑で示している。

### 3.2.3 NtMATE2 の結晶化

精製した NtMATE2 を 13.5 mg/mL まで濃縮し LCP 法による結晶化を行った。672 条件の初期スクリーニングを行ったところ、1 ~ 3 日以内に 30% PEG500 DME, 100 mM NH<sub>4</sub>-citrate, 100 mM Tris pH 8.0 の条件において微結晶を得ることができた (図 3-13 a)。この条件をさらに細かく検討したところ、より大きな結晶を得ることができた (図 3-13 b)。

### 3.2.4 X 線回折実験およびデータ処理

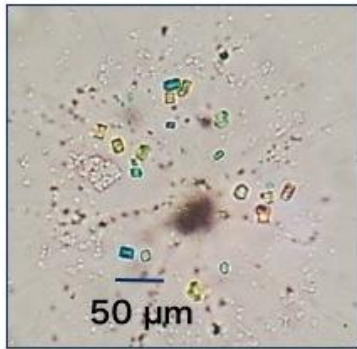
得られた結晶に対して SPring-8 BL32XU において 2.2.4 で述べた測定条件で X 線回折実験を行った結果、NtMATE2 の結晶から 4 Å を超える回折点を得られた (図 3-13 c, d)。一つの結晶から得られた回折像のデータを KAMO ソフトウェアで処理し、空間群の推定を行った。多数の結晶に対して同様の操作を行ったところ、空間群  $P222$  を示した回折データセットが最も多かったため、 $P222$  を示した回折データセットをその後の処理に用いた。KAMO ソフトウェアで  $P222$  を示した回折データセットを統合しスケーリングを行った結果、3.4 Å ほどの回折データセットを得ることができた (表 5)。空間は群  $P2_12_12_1$ 、格子長は  $a = 60.92$ ,  $b = 89.48$ ,  $c = 228.54$  (Å),  $\alpha = \beta = \gamma = 90$  (°) であった。

### 3.2.5 モデル構築およびおよび構造精密化

得られた回折データセットに対して分子置換法により位相決定を行った。鋳型データは CasMATE<sub>15-468</sub> の高分解能データ (PDB ID =5YCK) を用いた。初期位相を決定後、COOT Emsley *et al.* *Acta Crystallographica Section D* 2010) および PHENIX (Adams *et al.* *Acta Crystallographica Section D* 2010) を用いて精密化を行い、それぞれ  $R_{\text{work}} = 29.45$ ,  $R_{\text{free}} = 38.51$  (%) まで精密化することができた。(表 3-3)

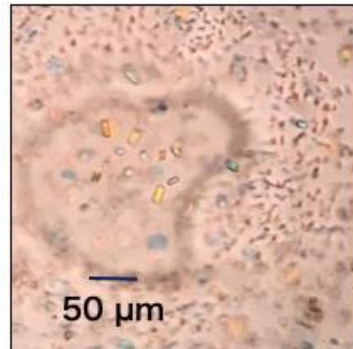


(a)



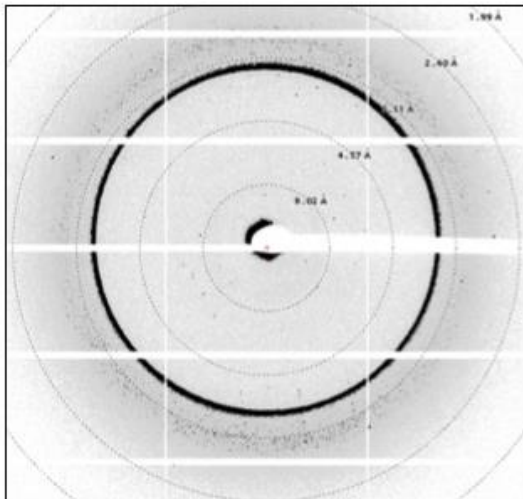
PEG500DME 30 %  
 NH4-citrate 100 mM  
 Tris pH 8 100 mM

(b)



PEG500DME 35 %  
 NH4-citrate 100 mM  
 Tris pH 8.3 100 mM

(c)



(d)

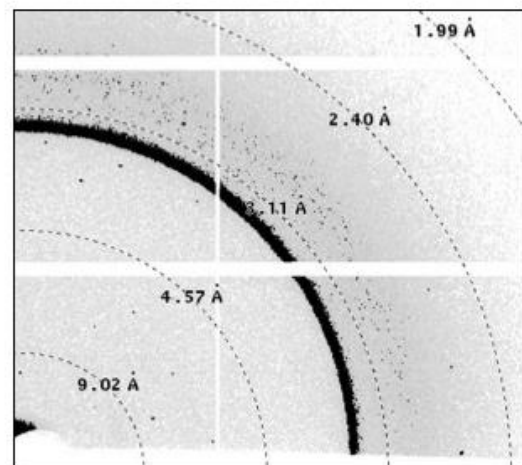


図 3-13. NtMATE2 の結晶および回折点

(a) (b)  $10 \sim 20 \mu\text{m}^3$  ほどの立柱状の微結晶が多く見られた。

(c) (d) NtMATE2 の回折点および拡大図.  $3.5 \text{ \AA}$  あたりまで回折点が出ている。

表 3-3. NtMATE2 の回折データセットおよび構造精密化の統計値

NtMATE2	
<b>Data collection</b>	
Synchrotron beam line	BL32XU (SPring-8, Japan)
Wavelength (Å)	1
Resolution range (Å)	49.21-3.2 (3.38-3.20)
Space group	$P 2_1 2_1 2_1$
Unit cell	
$a, b, c$ (Å)	60.86, 89.82, 229.10
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.00, 90.00, 90.00
Total reflections	438049(67624)
Unique reflections	21411 (2057)
Redundancy	20.7(19.8)
Completeness (%)	99.67(99.95)
Mean $I/\sigma(I)$	7.21(0.93)
Rmeas	0.706(2,878)
CC1/2	0.992(0.605)
<b>Refinement</b>	
Reflections used in refinement	21411 (2057)
Reflections used for R-free	1997 (138)
$R$ -work	0.2810 (0.3531)
$R$ -free	0.3575 (0.4368)
Number of atoms	
macromolecules	6929
lipid	0
solvent	0
Protein residues	470, 475
Model geometry	
RMS(bonds)	0.0102
RMS(angles)	1.31
Ramachandran analysis (%)	
favored	84.74
allowed	12.12
outliers	3.14
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )	
macromolecules	68.253
lipid	0
solvent	0

Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ , where  $\langle I(hkl) \rangle$  is the mean  $I(hkl)$  over symmetry-equivalent reflections.  $R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \{N(hkl)/[N(hkl)-1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ .

### 3.2.6 NtMATE2 の全体構造およびカチオン結合部位

NtMATE2 は CasMATE と同様に 6 回膜貫通領域が重複した 12 回膜貫通構造を形成しており、外開き状態であった (図 3-14 左) . NtMATE2 のアミノ酸全長配列は CasMATE よりも 25 アミノ酸多く、結晶構造では CasMATE では disorder していた末端領域が確認できた. N 末端では CasMATE よりも長い TM1 を形成しており、TM1 から N 末端へはコイル状態を形成していた. コイル状態は N 末端から 34 番目のアミノ酸まで続いている. N 末端を 30, 39 アミノ酸デリーションした変異体は FSEC によるピーク形状が著しく悪化するが、19 アミノ酸のデリーションではピーク形状に影響は無い (図 3-15) . このことから、コイル状態の 20 番目以降のアミノ酸が NtMATE2 の安定化に寄与していると考えられる. 一方 C 末端側は TM12 の終わりから新たにヘリックス構造を形成している. このヘリックスは NtMATE2 に沿うように配位していた. C 末端側では 7, 12 アミノ酸のデリーションを検討した. 7 アミノ酸のデリーションではピークの強度に影響が見られた. 12 アミノ酸のデリーションではピーク形状が著しく悪化した. 以上のことから、NtMATE2 の末端領域は単なる延長ではなく、水溶液中において安定化に影響を与えていることがわかった. 原核生物由来の MATE タンパク質は末端領域が NtMATE2 ほど長くないことから、NtMATE2 の末端領域は rocker switch model を行う上では重要ではないと考えられる. NtMATE2 は糖鎖修飾部位が無い. 一方で N 末端領域にはリン酸化修飾されるアミノ酸であるセリン、スレオニン、チロシンが複数個存在している. これらのアミノ酸のリン酸化により他のタンパク質との相互作用を行なっている可能性も考えられる.

NtMATE2 はグループ A に属しており、3.1.8 の結果から NorM タイプのカチオン結合部位を持っていると考えられる. NtMATE2 の C ロープに着目してみると、NorM で強く保存されているグルタミン酸 (E285) が確認された. 一方で、アスパラギン酸は保存されておらず、代わりにアスパラギン (N403) とグルタミン (Q406) が確認された. また、E285 周辺には先程の 2 つのアミノ酸に加え、S410, Y430, T460 がクラスターを形成していた. 駆動力に重要なグルタミン酸が保存されていたことから、NtMATE2 は NorM 由来であると考えられる. 一方で NorM において保存性の高いアスパラギン酸が保存されていなかったことから、駆動力のカチオンの結合にはアスパラギン酸は必ずしも必要ではなく、カチオンをトラップできるクラスターの形成が重要である可能性が示唆された.

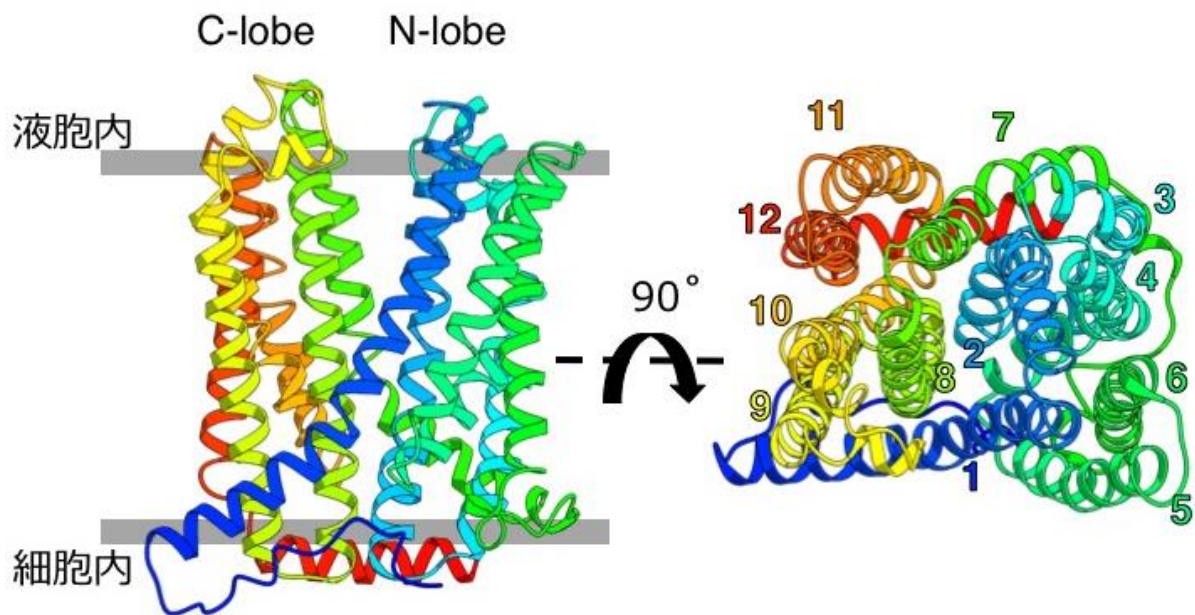


図 3-14. NtMATE2 の全体構造とカチオン結合部位

N末端がブルー, C末端がレッドになるように虹色勾配で着色している. Cローブの四角で囲った領域を右に示している. 右図はNローブ側からの視点で見たCローブのアミノ酸クラスターを示している.

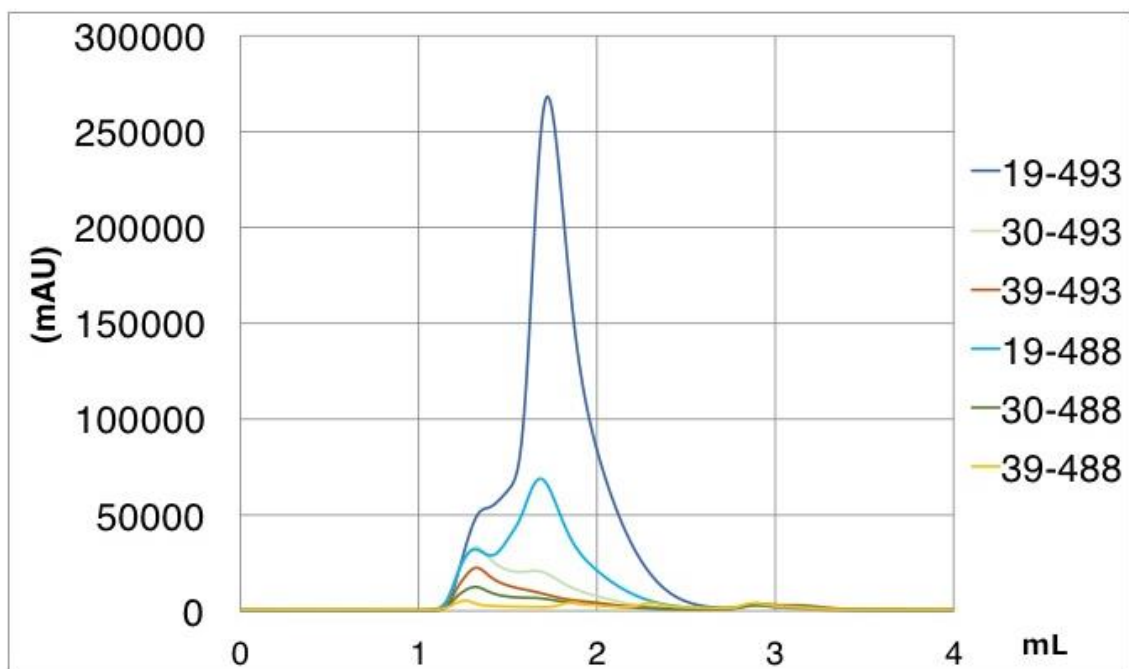


図 3-15. NtMATE2 のデリーション変異体の FSEC クロマトグラム

上部の数字は 500 アミノ酸の NtMATE2 のうち, どの領域を発現させているかを示している. 19-493 の場合は N 末端を 19 アミノ酸, C 末端を 7 アミノ酸デリーションしている.

### 3.2.7 NtMATE2 の基質結合部位

NtMATE2 では *CasMATE* と比べて空洞への入口が狭まっており、空洞の体積も減少していた (図 3-16) . 内部空洞の表面電荷を *CasMATE* と比較したところ負に帯電してはいるが, *CasMATE* ほど強い表面電荷は見られなかった (図 3-16) . これはニコチンの化学的性質に対応した結果なのではないかと考えられる . NtMATE2 は *hyoscyamine* と *scopolamine* (図 3-17) への輸送活性も報告されている (Shoji *et al.*, *Plant Physiol.* 2008) . これらのアルカロイドは類似した立体構造を持つが、輸送量は異なっていた . ニコチンとの結合部位や *hyoscyamine* と *scopolamine* への輸送活性の違いを生み出しているアミノ酸を同定するためにも、構造情報を用いた機能解析が必要である .

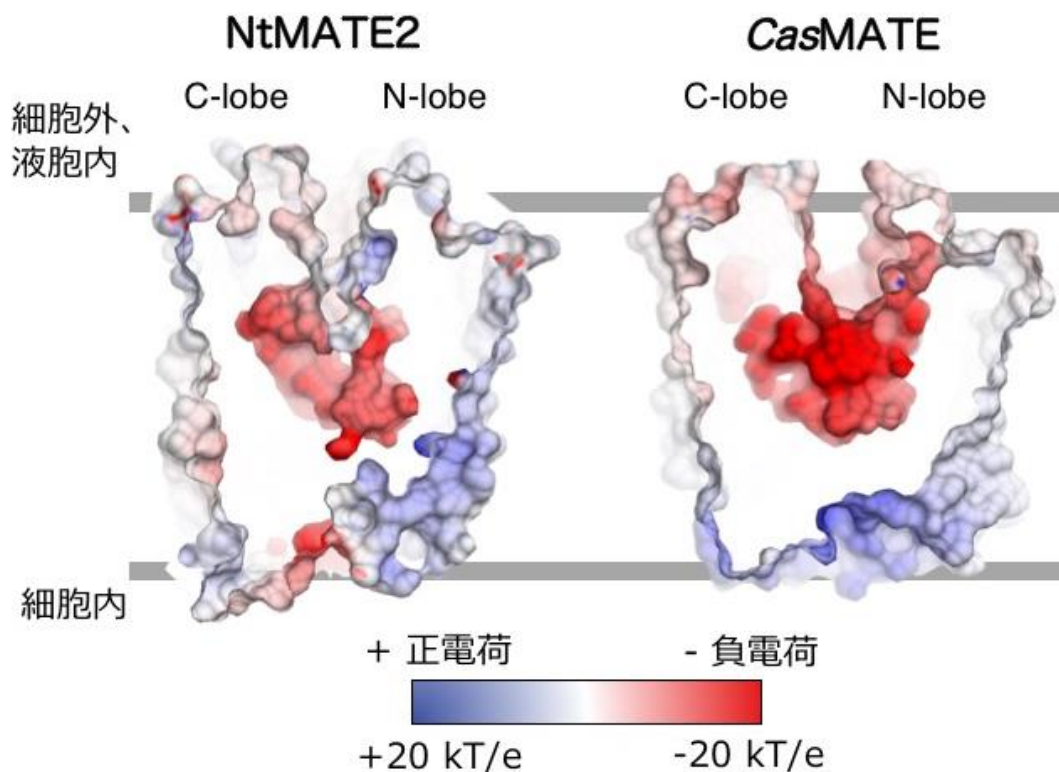


図 3-16. 基質結合部位の表面電荷

NtMATE2, *CasMATE* の分子表面モデルを作成後、表面電荷をマッピングした . 2 つの切断面は 2 次構造の重ね合わせを行なった後に作成した .



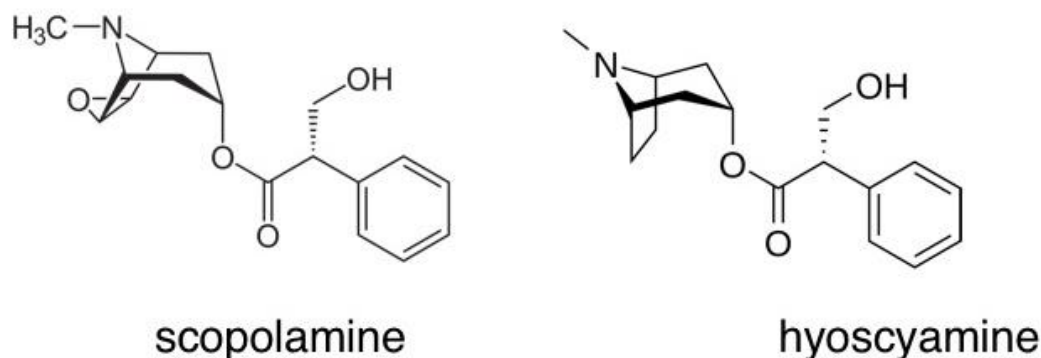


図 3-17. scopolamin と hyoscyamine の化学構造

### 3.2.8 NtMATE2 のニコチン結合部位予測および輸送モデル

ニコチンとタンパク質との複合体構造は 12 構造が報告されている。複合体構造では FAD やポルフィリンを介した結合を除けば、ニコチンとの結合は芳香族アミノ酸側鎖とのカチオン- $\pi$ 相互作用により形成されている (図 3-18)。ニコチンの 5 員環に含まれている窒素はカチオン化しており、このカチオンと芳香族アミノ酸の側鎖がカチオン- $\pi$ 結合を形成している。

NtMATE2 においてニコチンとのカチオン- $\pi$ 結合が形成される可能性を考え、空洞に面している芳香族アミノ酸を調べた。その結果、10 個の芳香族アミノ酸 (Y61, Y98, Y180, F184, W236, Y288, F289, F320, Y430, W453) が見つかった (図 3-19)。これらの芳香族アミノ酸の保存性を調べたところ、ニコチントランスポーター (Nt-JAT1, Nt-JAT2, NtMATE1,2) のみにおいて保存性の高いアミノ酸は確認されなかった。一方で、NtMATE2 の属している group A において保存性の高いアミノ酸として Y61, Y180, F184, Y288 が確認された。Y288 は group A で完全に保存されていた。Y180, F184 は group A の半数ほどで保存されていた。Y61 は NtMATE1,2 および OsPEZ1,2 でのみ確認された。

次に、ニコチンの 6 員環構造を介したカチオン- $\pi$ 結合の可能性を調べた。リジンやアルギニンの側鎖がカチオンとしてニコチンの 6 員環とカチオン- $\pi$ 結合する可能性を考え、空洞に面しているリジン、アルギニンを調べたところ、R72, K188 が見つかった (図 3-19)。この 2 つのアミノ酸の保存性を調べたところ、K188 は K または R として group A, B に保存されており、R72 は NtMATE1,2 でのみ確認された。

N ローブには Y61, Y180, F184, W236, Y288 といった芳香族アミノ酸が隣接しており、少し離れて K188 や R72 が存在している。ニコチンの結合様式の仮説としては、1; カチオン部位が芳香族アミノ酸と相互作用する、2; 6 員環部位が塩基性アミノ酸と相互作用する、3; カチオン部位で芳香族アミノ酸と相互作用し、かつ 6 員環部位と塩基性アミノ酸と相互作用する、といった 3 通りが考えられる。複数の結合様式が可能で

あるため、ニコチン以外のアルカロイドに対しても輸送活性を示したのだと考えられる (Shoji *et al.*, *Plant Physiol.* 2008) .

NtMATE2 の結晶構造はニコチンが含まれていないため、ニコチンが結合した際の芳香族アミノ酸の側鎖の配向は不明である. しかし、それぞれのアミノ酸に対して変異体解析を行うことで、ニコチンの認識に関わるアミノ酸を同定できると考えられる. また、基質が結合するのは Inward 状態の時であるため、NtMATE2 の Inward 状態の結晶構造が決定できれば、より詳細な基質との相互作用の議論が可能となるだろう.

NtMATE2 は液胞膜に局在しており、液胞内部は pH5.0-5.5 と酸性状態で維持されている. そのため膜を隔てて pH に差が生じており、 $\Delta$ pH を駆動力とした輸送が予想される. NtMATE2 によるニコチンの輸送では、以下のカチオン- $\pi$ 結合とプロトン駆動力による輸送モデルを提唱する (図 3-20) . 細胞内でニコチンと Inward 状態の NtMATE2 がカチオン- $\pi$ 結合を形成し、ニコチンの結合により構造変化が生じる. Outward 状態ではプロトンによるカチオン- $\pi$ 結合が形成され、ニコチンは追い出される. プロトンの結合によりカチオン結合部位が構造変化し、Inward 状態へと戻る. 植物やヒトでは  $\Delta$ pH が存在しない組織があるが、そのような場所ではプロトンではなくナトリウムイオンの濃度勾配を使用しているのではないかと考えられる.

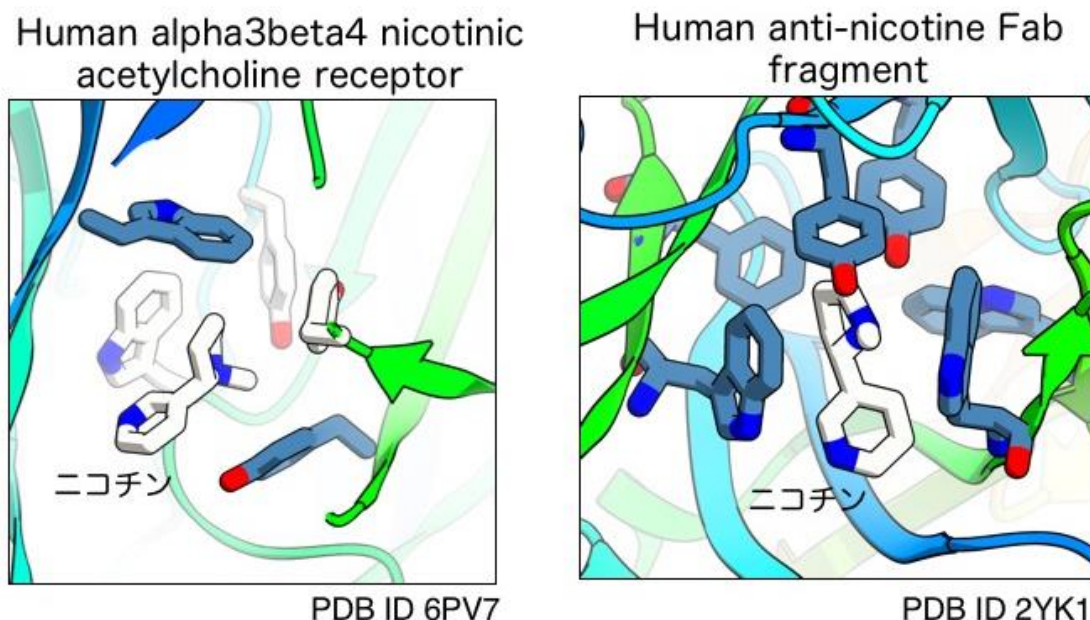


図 3-18 ニコチンとタンパク質との結合例

ニコチンはトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンといった芳香族アミノ酸とカチオン- $\pi$ 相互作用により結合している.



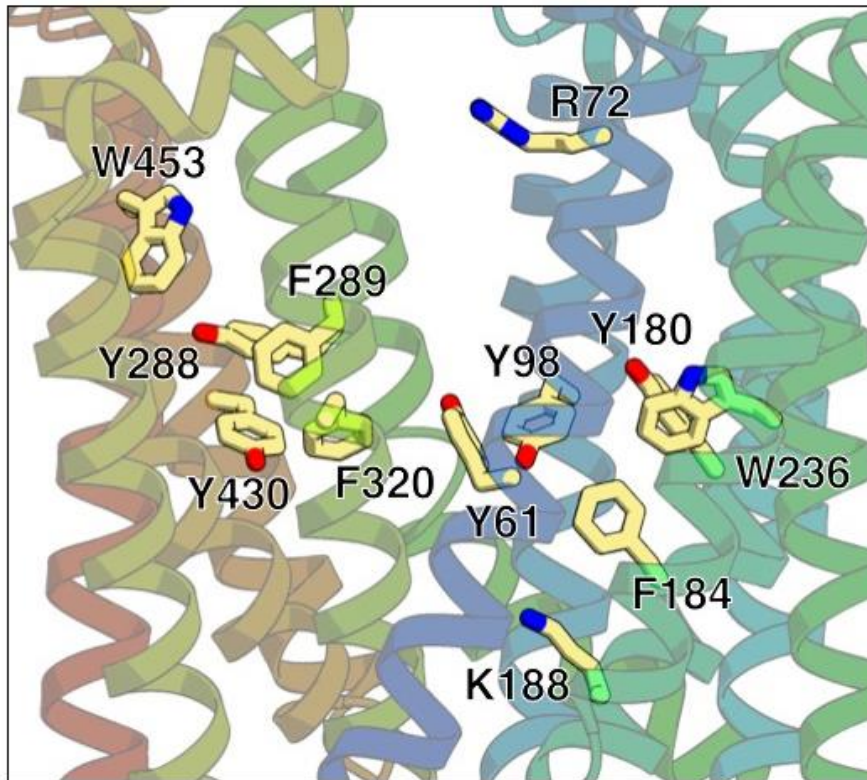


図 3-19 NtMATE2 のニコチンとの結合部位候補

NtMATE2 の空洞構造に面している 10 個の芳香族アミノ酸および 2 つの塩基性アミノ酸を示している。

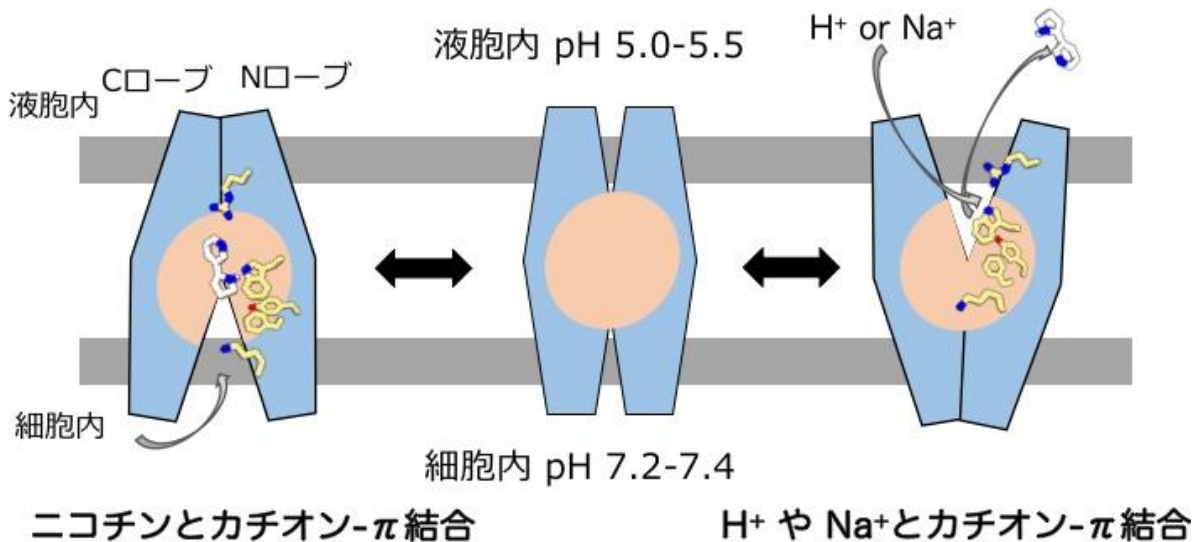


図 3-20 NtMATE2 におけるニコチン輸送モデル

NtMATE2 は液胞膜に局在しており、膜を挟んでプロトンの濃度勾配が形成されている。Inward 状態の NtMATE2 は細胞内でニコチンとカチオン- $\pi$  結合を形成し、ニコチンとの結合によって構造変化が誘起される。液胞内へと開いた Outward 状態の際にプロトンとのカチオン- $\pi$  結合によりニコチンが NtMATE2 から追い出される。プロトン

との結合により構造変化が誘起され, Inward 状態へと移行する. プロトンが細胞内へと拡散し, 再びニコチンが結合する.

## 第4章 総括

### 4.1 本研究のまとめ

これまで原核生物由来および哺乳類由来の MATE タンパク質では、変異導入による輸送活性の解析や立体構造に基づいた輸送メカニズムの解明が進められていた。一方、植物では機能の多様化や立体構造情報の不足が原因となり MATE タンパク質の分子レベルでの解析は遅れていた。

本研究では CasMATE タンパク質の高分解能結晶構造を決定し、植物由来の MATE タンパク質の構造生物学的知見の構築を進めた。また、系統樹解析により MATE ファミリーにおける植物と原核生物との配列保存性を見出した。CasMATE タンパク質の結晶構造と系統樹解析、原核生物由来の MATE タンパク質構造との比較により、植物における MATE タンパク質の基質認識機構に基質結合部位の表面電荷の関与を提唱した。更に、ニコチントランスポーターである NtMATE2 の結晶構造を決定し、MATE タンパク質の基質認識メカニズムを解明するための基盤を構築した。これにより、NtMATE2 タンパク質の立体構造を用いたアミノ酸レベルでの基質認識部位の解析が可能となった。

本研究により植物由来の MATE タンパク質の立体構造が 2 つ明らかとなった。MATE タンパク質が続々と植物から同定されている現状を鑑みると、これらの立体構造は植物における MATE ファミリーの研究に大いに貢献できると考えられる。

### 4.2 植物 MATE ファミリーの研究における今後の課題

MATE ファミリーの研究は 2000 年前後から始まり、原核生物や哺乳類、植物など様々な生物由来の MATE が同定され機能が報告されてきた (Omote *et al.*, *TiPS* 2006, Kuroda *et al.*, *BBA* 2009, Takanashi *et al.*, *Plant Physiol* 2014)。植物での MATE の研究においては、輸送する基質や生理的機能の同定は行われているが、基質との結合解離定数測定や相互作用解析など生化学的な報告は乏しい。MATE タンパク質は鍵と鍵穴のような相手の決まった結合様式ではなく、幅広い基質を輸送できてしまうため、変異を入れたところで大きく活性が変化するとは考えにくい。多様な基質に対応できてしまう MATE タンパク質の生化学的な解析をするためには、複数の変異導入により結合部位の表面電荷を変化させる手法が有効であると考えられる。そのために、立体構造情報は必須である。

本研究によりグループ A, B 由来の MATE タンパク質の立体構造が明らかとなった。それにより、グループ A, B の MATE タンパク質に関しては、ホモロジーモデリングによる個々の MATE タンパク質の予測モデル構築が可能となった。一方で、グループ F に属する MATE タンパク質はグループ A, B とのアミノ酸配列相同性が 20 % 以下であ

り, TM2 と TM3 の間に 30 アミノ酸ほどのループ構造を新たに獲得している (図 3-8). そのため, モデリングは困難であると予想される. また, 3.1.8 においてグループ F の MATE タンパク質が DinF と同様の正に帯電した基質結合部位を持っている可能性を示唆した. 本研究では植物における MATE ファミリーの多様化の要因の一つとして基質結合部位の表面電荷を挙げている (図 3-10). 表面電荷の偏りや配列保存性といった本研究で得られた知見を, 基質認識機構への解明へとつなげるためにもグループ F 由来の MATE タンパク質の立体構造が必要である.

植物や動物由来の MATE タンパク質は原核生物由来の MATE タンパク質と比べてアミノ酸数が増加している傾向にある. hMATE1 における 13 本目の TM や, グループ F で確認されている TM2 と TM3 の間のループ構造 (図 3-8), N, C 末端の 10~20 アミノ酸ほどの disorder 領域など機能が明確でない領域が確認されている. 一方で, AtABS3 は特定の相互作用領域を介して ATG8 と相互作用することが確認されている (Jia *et al.*, *Nat Plants* 2019). この報告により, MATE タンパク質が他のタンパク質と相互作用して機能を果たす例が示された. 未だ機能未知な領域であっても, 他のタンパク質との相互作用部位や輸送する基質の濃度を検知するドメインなどの可能性もある. そのようなドメイン領域や相互作用部位を同定する際には本研究の成果が貢献できるであろう.

MATE ファミリーの構造生物学は原核生物において多数の結晶構造が報告されたことや構造情報を基にした機能解析が進んでいることから, 基盤が構築され成熟過程へと移行していると考えられる. しかし, 植物由来の MATE ファミリーには未知の機能や高次構造が存在する可能性が高い. 今後はそれらを包括的に解明するためにも, 多様な MATE タンパク質の構造解析が必要となってくるだろう.

## 参考文献

- Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66.2**, 213-221 (2010).
- Adler, J., Lewinson, O. & Bibi, E. Role of a conserved membrane- embedded acidic residue in the multidrug transporter MdfA. *Biochemistry* **43**, 518–525 (2004).
- Brown, M. H., Ian, T. P., & Skurray, R. A. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular microbiology* **31.1**, 394-395 (1991).
- Decottignies, A., *et al.* ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *Journal of Biological Chemistry* **273.20**, 12612-12622 (1998).
- Diener, A. C., Roberto, A. G., & Fink, G. R. Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *The Plant Cell* **13.7**, 1625-1638 (2001).
- Emsley, P. *et al.* Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66.4**, 486-501 (2010).
- Furukawa, J. *et al.* An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant and Cell Physiology* **48.8**, 1081-1091 (2007).
- Gasteiger, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *THE PROTEOMICS PROTOCOLS HANDBOOK. Humana press*, 571-607 (2005).
- Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **6.5**, 343-345 (2009).
- Gomez, C. *et al.* Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H<sup>+</sup>-dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant physiology* **150.1**, 402-415 (2009).
- Hattori, M., Ryan E. H., & Gouaux, E. A fluorescence-detection size-exclusion chromatography-based thermostability assay for membrane protein precrystallization screening. *Structure* **20.8**, 1293-1299 (2012).
- He, X. *et al.* Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature* **467.7318**, 991-994 (2010).
- Hvorup, R. N. *et al.* The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *European Journal of Biochemistry* **270.5**, 799-813 (2003).
- Jia, M. *et al.* Noncanonical ATG8–ABS3 interaction controls senescence in plants. *Nature Plants* **5.2**, 212 (2019).
- Jones, D. T., & Cozzetto, D. DISOPRED3: precise disordered region predictions with

- annotated protein-binding activity. *Bioinformatics* **31.6**, 857-863 (2015).
- Kawate, T., & Gouaux, E. Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure* **14.4**, 673-681 (2006).
  - Kusakizako, T. *et al.* Structural Basis of H<sup>+</sup>-Dependent Conformational Change in a Bacterial MATE Transporter. *Structure* **27.2**, 293-301 (2019).
  - Kusakizako, T., Miyauchi, H., Ishitani, R. & Nureki, O. Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. in press (2019).
  - 
  - 熊崎薫, 濡木理, & 石谷隆一郎. 脂質キュービック相法を用いた膜タンパク質の結晶化. *日本結晶学会誌* **56.4**, 230-235 (2014).
  - Kuroda, T., & Tsuchiya, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **1794.5**, 763-768 (2009).
  - Landau, E. M., & Rosenbusch, J. P. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93.25**, 14532-14535 (1996).
  - Li, L. *et al.* Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *Journal of Biological Chemistry* **277.7**, 5360-5368 (2002).
  - Lu, M. *et al.* Structures of a Na<sup>+</sup>-coupled, substrate-bound MATE multidrug transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110.6**, 2099-2104 (2013).
  - Lu, M. *et al.* Structural insights into H<sup>+</sup>-coupled multidrug extrusion by a MATE transporter. *Nature structural & molecular biology* **20.11**, 1310-1317 (2013).
  - Lu, Min. Structures of multidrug and toxic compound extrusion transporters and their mechanistic implications." *Channels* **10.2**, 88-100 (2016).
  - Marger, M. D., & Saier, M. H. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport." *Trends in biochemical sciences* **18.1**, 13-20 (1993).
  - McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* **40.4**, 658-674 (2007).
  - Meyer, A., Eskandari, S., Grallath, S., & Rentsch, D. AtGAT1, a high affinity transporter for gamma-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **281.11**, 7197-2042006 (2006.)

- Miyauchi, H. *et al.* Structural basis for xenobiotic extrusion by eukaryotic MATE transporter. *Nature communications* **8.1**, 1633 (2017).
- Morita, Y. *et al.* NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42.7**, 1778-1782 (1998).
- Morita, M. *et al.* Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106.7**, 2447-2452 (2009).
- Mousa, J. J. *et al.* MATE transport of the E. coli-derived genotoxin colibactin. *Nature Microbiology* **1**, 15009 (2016).
- Omote, H. *et al.* The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends in Pharmacological Sciences* **27.11**, 587-593 (2006).
- Putman, M., van Veen, H. W. & Konings, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and molecular biology reviews* **64.4**, 672-693 (2000).
- Radchenko, M. *et al.* Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nature communications* **6**, 7995 (2015).
- Radchenko, M., Rongxin N. & Lu, M. Disulfide Cross-linking of a Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporter Impacts Multidrug Efflux. *Journal of Biological Chemistry* **291.18**, 9818-9826 (2016).
- Shitan, N., Sugiyama, A., & Yazaki K. Functional analysis of jasmonic acid-responsive secondary metabolite transporters. *Methods Mol Biol.* **1011**, 241-250 (2013).
- Shitan, N. *et al.* Involvement of the leaf-specific multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in *Nicotiana tabacum*. *PLoS One* **9.9**, e108789 (2014).
- Shoji, T. *et al.* Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant physiology* **149.2**, 708-718 (2009).
- Slabinski, L. *et al.* XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics* **23.24**, 3403-3405 (2007).
- Slipski, C. J., Zhanel, G. G., & Bay, D. C. Biocide selective TolC-independent efflux pumps in Enterobacteriaceae. *The Journal of membrane biology* **251.1**, 15-33 (2018).
- Takanashi, K., Nobukazu, S., & Yazaki, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. *Plant Biotechnology* **31.5**, 417-430 (2014).



- Tanaka, Y. *et al.* Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* **496**, 247–251 (2013).
- Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O., & Inui, K. I. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H<sup>+</sup>-organic cation antiporters. *Biochemical pharmacology* **74.2**, 359-371 (2007).
- Upadhyay, N. *et al.* The multitasking abilities of MATE transporters in plants. *J. Exp. Bot.* **70**, 4643–4656 (2019).
- Wang, J. *et al.* Diverse functions of multidrug and toxin extrusion (MATE) transporters in citric acid efflux and metal homeostasis in *Medicago truncatula*. *Plant J* **90**, 79–95 (2017).
- Wisedchaisri, G. *et al.* Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein Xyle. *Nat. Commun.* **5**, 1–11 (2014).
- Yamashita, K., Hirata, K., & Yamamoto, M. KAMO: towards automated data processing for microcrystals. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, **74.5**, 441-449 (2018).
- Zhao, J. & Dixon, R. A. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21.8**, 2323-2340 (2009).
- Zakrzewska, S. *et al.* Inward-facing conformation of a multidrug resistance MATE family transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **16.25**, 12275-12284 (2019).
-

## 謝辞

本研究は、指導教官である塚崎智也教授のご指導と温かい激励の基で行われたものです。5年間の素晴らしい潤沢した環境で実験をさせていただき厚く御礼申し上げます。また、全ての実験過程においてアドバイスおよび指導を行ってくださった田中良樹助教に心から感謝申し上げます。同様に研究のアドバイスを下さった市川宗巖助教に感謝申し上げます。春山隆充博士研究員には実験手法の指導をいただき感謝致します。古川新 博士および菅野泰功 博士には配属当初から3年間に多くのご指導を頂き、感謝申し上げます。吉海江国仁さん、小林久美さん、秘書の阿部香代さん、鈴木千裕さんには研究面のみならず生活面においてもご協力を頂き感謝致します。また、共に構造生命科学研究室で研究してきた同期の谷口勝英に感謝致します。

奈良先端科学技術大学院大学の箱嶋敏雄教授、末次志郎教授にはアドバイザーとして本研究に的確な指示・指摘をいただき、感謝申し上げます。庄司翼准教授、神戸薬科大学 土反伸和教授には NtMATE2 の解析手法でアドバイスをいただき、感謝申し上げます。SPring-8 BL32XU ビームラインの使用にあたっては、平田邦生博士、河野能顕博士、山下恵太郎博士（現 東京大学）に大変お世話になりました。感謝申し上げます。

本研究は奈良先端科学技術大学院大学支援財団による教育研究活動に対する支援を受けています。助成をいただけたことで円滑に研究を進めることができました。感謝申し上げます。

最後になりましたが、生活面、精神面において支えてくださった家族に厚く感謝致します。