

# 論文内容の要旨

申請者氏名 岩木 薫大

細胞膜を越えた物質輸送は細胞にとって必須であり、細胞膜には多種多様な輸送体が局在している。MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) ファミリーは全ての生物に保存されていると考えられており、細胞膜に局在して様々な物質の輸送を行っている。MATE は原核生物やヒトでは多剤排出輸送体として機能している。一方、植物では生体異物の排出、2 次代謝物の蓄積、酸性土壌への適応、老化の促進、植物ホルモンの輸送などの機能が報告されており、他の生物種とは異なった進化を遂げ多様化している。植物における MATE タンパク質の機能・局在・基質の同定は 20 年以上続けられており、様々な植物で MATE の解析が成されてきた。しかしながら、基質の認識メカニズムや輸送による構造変化などを分子レベルで解析した報告はされておらず、植物 MATE タンパク質の詳細構造の情報が必要であった。本研究では植物由来の MATE タンパク質の結晶構造解析により、植物 MATE ファミリーの構造基盤を明らかとすべく研究を進めた。

*Camelina sativa* 由来の CasMATE タンパク質を Lipidic Cubic Phase 法を用いて結晶化を行い、2.9 Å および 2.3 Å 分解能で結晶構造を決定した。2.3 Å 分解能は真核生物由来の MATE タンパク質の結晶構造としては最高分解能である。CasMATE は 12 回膜貫通構造を形成しており、MATE ファミリーに特徴的な構造を示していた。原核生物由来の MATE タンパク質である NorM と類似したカチオン結合部位が観察され、輸送機構の共通性が示唆された。また、CasMATE の空洞構造の表面は強く負に帯電しており、基質との結合に関与すると推察した。原核生物と植物由来の MATE タンパク質のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行い、原核生物において示されている MATE ファミリーの分類と同様に、植物においても大きく 2 つに分類できることを示した。

さらに MATE タンパク質の基質の認識について知見を得るため、ニコチンを輸送する MATE タンパク質の結晶構造解析を行った。MATE ファミリーに属するニコチントランスポーターの発現スクリーニング、精製、結晶化を行い、NtMATE2 の結晶構造を 3.2 Å で決定した。NtMATE2 の結晶構造では CasMATE ではモデリングできなかった末端領域のモデリングに成功した。変異体解析により末端領域が水溶液中での安定性に寄与していることを示した。NtMATE2 の基質結合部位と予想される空洞を構成しているアミノ酸からニコチンとの結合部位を予測した。ニコチンの認識様式としてカチオン- $\pi$  結合すると仮定し、その結合が可能な候補アミノ酸を見出した。

本研究により、2 つの植物由来の MATE タンパク質の結晶構造を解明することで、植物由来の MATE タンパク質の構造基盤を構築した。

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 岩木 薫大

生体にとって生体膜を越えた物質輸送は必須の生命現象である。物質輸送を担う輸送体の詳細な解析は、生命活動を理解する上で欠かせない。MATE ファミリーは多剤排出機能を担っており、耐性菌の一因となっていることから原核生物での MATE タンパク質の結晶構造解析が精力的に進められてきた。一方で真核生物由来の MATE タンパク質の結晶構造解析は遅れをとっており、植物を含む真核生物由来の MATE タンパク質の詳細な解析が妨げられていた。本論文で植物由来の MATE タンパク質の構造的基盤を構築すべく、2つの植物由来 MATE タンパク質の結晶構造を示した。植物での MATE ファミリーの多様化を考える上で重要な情報となった。

*CasMATE* タンパク質の結晶構造は現時点で PDB に登録されている真核生物由来の MATE タンパク質の最高分解能構造であり、精密な機能解析に極めて有用な情報となる。本構造解析では *CasMATE* の空洞構造の表面電荷に着目し、基質の親和性と表面電荷との関連性について深く考察した。また、系統樹解析を用いた分類と立体構造を組み合わせ、空洞の表面電荷の偏りが原核生物由来の MATE ファミリーに存在することを見出し、植物由来の MATE ファミリーでは新たな分類を提唱した。

植物における MATE ファミリーは遺伝子数の増加に伴い機能が多様化しており、*CasMATE* の結晶構造のみからでは理解が妨げられる。そこで、本論文では2次代謝物の蓄積に関わる MATE タンパク質であるニコチントランスポーター(NtMATE2)の結晶構造解析を達成した。NtMATE2 は *CasMATE* と比べて末端領域のアルファヘリックス構造が長くなっていた。また、この末端領域が水溶液中での構造安定性に寄与していることを変異体解析で示すなど、NtMATE2 タンパク質の構築基盤を構築した。ニコチンの結合部位として重要な、空洞表面に位置するアミノ酸を推定した。この情報は今後ニコチンと相互作用するアミノ酸を同定するために有用である。さらに本論文ではカチオン- $\pi$ 結合に着目し、ニコチンの結合様式を考察した。系統樹解析の結果を利用することで、本 NtMATE2 の結晶構造は2次代謝物を輸送する MATE タンパク質を理解する上で欠かせない状況を提供したといえる。

以上のように、本論文は植物における MATE ファミリーの高分解能結晶構造を2つ決定し、基質の認識について詳細な議論を可能とした。植物 MATE ファミリーの構造基盤を構築した本論文の内容は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[ 図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他（ ）]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】