

## ヒドラジドトランスポーター基質結合タンパク質の構造解析 Structural analysis of the substrate binding protein of a hydrazide transporter

島村香穂, 秋山友了, 横山和広, 竹野谷美穂子, 伊藤晋作, 佐々木康幸, 矢嶋俊介\*

東京農業大学 バイオサイエンス学科

〒156-8502 世田谷区桜丘 1-1-1

Kaho SHIMAMURA, Tomonori AKIYAMA, Kazuhiro YOKOYAMA, Mihoko TAKENOYA,  
Shinsaku ITO, Yasuyuki SASAKI and Shunsuke YAJIMA\*

Department of Bioscience,

Tokyo University of Agriculture,

1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

### 1 はじめに

ヒドラジン誘導体のうち、acylhydrazide は一般式  $R^1R^2NN(R^3)C(=O)R^4$  で表され、ヒドラジン( $H_2NNH_2$ )とカルボン酸( $RC(=O)O$ )が脱水縮合した構造を持つ化合物である。抗結核薬のイソニアジドなど合成物として多くが知られる一方で、天然にもマッシュルーム *Agaricus bisporus* から Agaritin が単離されるなど 200 種類ほどが知られている。

近年、人工 hydrazide である 4-hydroxybenzoic acid 1-phenylethylidene hydrazide (HBPH) を唯一の炭素源とした培地を用いて生育可能な菌のスクリーニングが行われた。その結果、*Microbacterium hydrocarbonoxydans* が単離され、HBPH を 4-hydroxybenzoate と acetophenonhydrazone に加水分解する Hydrazidase が同定された [1]。分解物のうち、4-hydroxybenzoate がさらに炭素源として代謝される。

*M. hydrocarbonoxydans* は、*Actinobacteria* 門 *Actinobacteria* 綱 *Micrococcales* 目 *Microbacteriaceae* 科 *Microbacterium* 属に分類されるグラム陽性細菌である。*M. hydrocarbonoxydans* のゲノム解析の結果、hydrazidase 遺伝子の前後にはセンサー型転写因子と4つの構成因子からなる ABC トランスポーターがコードされた operon が存在していた。HBPH は天然基質ではないことから、どのように HBPH を取り込んでいるのか、本菌におけるこの ABC トランスポーターの機能解明を行っている。

ABC トランスポーターとは、ATP 加水分解のエネルギーを用いて物質を輸送する膜タンパク質であり、1970 年代の細菌の栄養素取り込みに関する研究から始まった。ABC トランスポーターは膜タンパク質の最大の family の1つである。微生物の ABC トランスポーターは、その菌の栄養素取り込みはもちろん、病原性や薬剤耐性を理解するという面で非常に興味深い分野である。一般に基質結合サブユニット (Substrate binding subunit: SBS または Substrate binding protein: SBP)、2 つの膜貫通サブユニット

(Transmembrane subunit: TMS)、2 つのヌクレオチド結合サブユニット (Nucleotide binding subunit: NBS) を共通の構造としてもつ。そのうち、NBS が有する ATPase 活性により得られるエネルギーを用いて細胞内外の物質の輸送を行う。

今回、人工化合物 HBPH の SBP による認識機構を解明するため、その X 線結晶構造解析を行った。

### 2 実験

*M. hydrocarbonoxydans* 由来 SBP (Mh-SBP) を pET28b(+) に組み込み大腸菌 Rosetta2(DE3) を用いて目的蛋白質を大量に発現させた。このコンストラクトでは N 末に 6 x His-tag がついており  $Ni^{2+}$  カラムにより精製を行った。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により 20°C で結晶を得た。Mh-SBP は、そのアミノ酸配列から di-/oligo-peptide transporter SBP とアノテーションされるが、既知構造を元にした分子置換法では解が得られなかったことから、selenomethionine 置換蛋白質を調製し結晶を得た。基質結合複合体は、得られた結晶を基質を含んだリザーバー溶液にソーキングすることにより得た。

### 3 結果および考察

基質の HBPH は溶解度が低く結晶化に向かなかったことから、別の基質として 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (HBH) を用いた。HBH 複合体構造は BL-1A において波長 0.9785 Å にて回折データを収集し、SAD 法により初期位相を得た。その後 BL-1A にて native データを取得し、構造の精密化を行った結果、分解能 2.2 Å、 $R_{work}/R_{free}=0.209/0.230$  の最終構造を得た (PDB entry: 6LU3)。パラベン複合体構造は BL-5A にて、分解能 2.8 Å、 $R_{work}/R_{free}=0.207/0.247$  の最終構造を得た (PDB entry: 6LU4) [2]。

Mh-SBP は di-/oligo-peptide SBP と同様に、三角形様の全体構造をとっており、N-lobe と C-lobe の2つのドメインの間のクレフトに基質が結合していた。すでに明らかにしている、基質が結合していない

Mh-SBP と構造を重ね合わせたところ、二つの lobe がクレフトを閉じるように、構造変化をしていた (図 1)。これも既知の di-/oligo-peptide SBP と同様の結果であった。

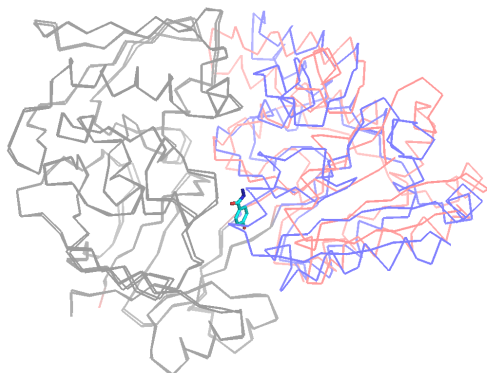


図 1 : SBP の構造重ね合わせ。赤 ; 基質結合無し、青 ; 基質結合あり。基質の HBH を水色の stick model で表示した。

次に、基質結合様式に注目した。その結果、HBH の酸素原子、窒素原子は SBP との結合に用いられていた (図 2)。この結合様式は、*M. hydroxycarbonoxydans* が HBPH を代謝する最初の酵素として単離された Hydrazidase における HBH の基質結合様式とほぼ一致していた。特に 4-hydroxyl 基は Hydrazidase の研究から基質特異性に関わることが明らかとなっている。このことから、*M. hydrocarbonoxydans* では、SBP が捉えた基質がトランスポーターで菌体内に取り込まれ、Hydrazidase により分解されることを支持する結果となった。

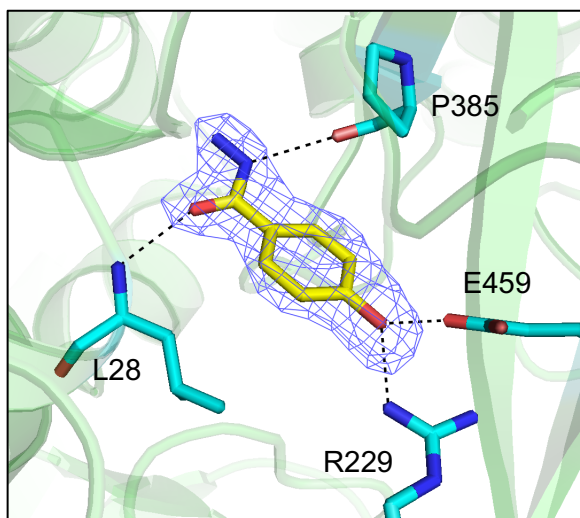


図 2 : Mh-SBP における HBH の結合様式。電子密度は Fo-Fc omit map を  $3\sigma$  で表示した。HBH は黄色の stick model で表示した。

ここで HBPH は合成基質であり、本トランスポーターの天然基質はまだ知られていない。Hydrazidase が 4-hydroxybenzoate を分解物として生成することから、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)より、その誘導体を検索した。その結果、alkylparaben が植物から単離されたという文献も踏まえ、propylparaben と Mh-SBP の複合体構造を取得した。得られた構造から、propylparaben の結合様式は、HBH と同様であり、4-hydroxyl の OH 基をはじめ、側鎖の酸素原子が水素結合に関わっていた。このことから、Mh-SBP の天然基質として、alkylparaben の可能性が示唆された。

#### 4 まとめ

*M. hydrocarbonoxydans* の SBP と人工基質複合体、および基質として想定される化合物との複合体構造の解析により、未知であった天然基質の候補を見出すことに成功した。

#### 謝辞

PF ビームラインスタッフの皆様に感謝致します。

#### 参考文献

- [1] K. Oinuma *et al.*, *J. Bacteriol.* **197**, 1115 (2015).
- [2] K. Shimamura *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **525**, 720 (2020).

\* yshun@nodai.ac.jp