

解禁時間（テレビ、ラジオ、インターネット）：2020年8月27日（木）午前3時
 （新聞）：2020年8月27日（木）付朝刊

2020年8月20日

報道関係者各位

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学

チオ硫酸（硫黄化合物）を細菌の体内に取り込む運び屋タンパク質 YeeE の構造を解明 ～システインの発酵生産向上に期待～

発表のポイント

- 細菌の生体膜にある機能未知のタンパク質 YeeE がチオ硫酸を特異的に取り込むことを発見
- YeeE は分子内で擬似 222 回転対称性をもつ新規の砂時計のような構造であることを解明
- YeeE の高機能化によってシステインなどの高付加価値化合物の発酵生産への応用に期待

【概要】

奈良先端科学技術大学院大学（学長：横矢直和）先端科学技術研究科バイオサイエンス領域構造生命科学研究室の塚崎智也教授、田中良樹助教、吉海江国仁研究員、竹内梓（博士前期課程 2 年）、市川宗巖助教らは、ストレス微生物科学研究室の高木博史教授、構造生物学研究室の箱嶋敏雄教授、味の素—ジェネティカ・リサーチ・インスティテュート社（在モスクワ）の野中源主任研究員、東京大学定量生命科学研究所の森智行助教等との共同研究により、細菌がアミノ酸合成に利用するチオ硫酸という化合物を体内に取り込む際に、運び屋となる膜タンパク質（YeeE）の構造を世界で初めて解明しました。さらに、取り込みの仕組みについて新しい分子メカニズムを提唱しました。チオ硫酸は、細菌の体内でシステインなど高付加価値のアミノ酸の合成に使われるので、発酵生産への応用が期待されます。

細菌には硫黄源としてチオ硫酸を取り込む機構があります。今回は、チオ硫酸の取り込みに特化した膜タンパク質 YeeE を同定しました。このタンパク質は生体膜の中にあり、詳細構造は不明だったため、X 線結晶構造解析という手法によって、輸送のときの結合状態である YeeE とチオ硫酸イオン複合体について、その結晶構造を 2.5 Å 分解能という高分解能で決定しました。

その結果、YeeE は、これまでのタンパク質には例がない折りたたみ構造をしており、細胞の内側と外側にくぼみをもつ砂時計型の構造をとっていました。また、複合体の結晶構造は、細胞外側のくぼみにチオ硫酸が結合している状態であり、この状態はチオ硫酸を輸送する初期の段階を示していると考えています。さらに、X 線結晶構造解析の電子マップ、分子動力学計算によるシミュレーションなどによって、推定輸送経路に沿ってチオ硫酸が、保存されたシステイン残基と過渡的に相互作用しながら取り込まれていくモデルを提唱しました。この YeeE の詳細構造の情報は、細菌によるシステイン発酵生産研究の基盤を提供するもので、今後の展開が期待されます。

システインには活性酸素を減らす抗酸化能があることから、医薬品や化粧品、食品などの工業原料としても広く用いられています。近年、微生物による発酵生産が工業化されており、さらなる生産性の向上が望まれています。

この研究成果は、米国東部時間（夏時間）の 2020 年 8 月 26 日（水）午後 2 時【**プレス解禁日時：日本時間 2020 年 8 月 27 日（木）午前 3 時**】付で、Science Advances（サイエンス・アドバンシス）に掲載されます。

【ご連絡事項】

- (1) 本件につきましては、奈良先端科学技術大学院大学から奈良県文化教育記者クラブをメインとし、学研都市記者クラブ、大阪科学・大学記者クラブへ同時にご連絡しております。
- (2) 取材希望がございましたら、恐れ入りますが下記までご連絡願います。
- (3) プレスリリースに関する問い合わせ先
 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域 構造生命科学研究室
 教授 塚崎智也 TEL：0743-72-5551 E-mail：ttsukaza[at]bs.naist.jp

【解説】

(研究の背景)

硫黄（元素記号 S）は、無機硫黄化合物・有機硫黄化合物として地球上に存在しています。硫黄は様々な化合物に取り込まれ、形を変えながら地球の大気・土壌・水中・生態内を循環しています。細菌や植物は環境中に存在する無機硫黄化合物を取り込み、アミノ酸の一種であるシステインやメチオニンなど有機硫黄化合物に変換し利用します。これは、地球上の硫黄循環の一端を担っています。

モデル生物である大腸菌では、ABC 輸送体と総称される膜の運び屋の一種である、CysUWA 複合体というタンパク質が硫酸イオンとチオ硫酸イオンを細胞質内に取り込むことが示されていました（図 1 左・中央）。今回の研究により、大腸菌を用いた遺伝学的な解析と YeeE とチオ硫酸の結合実験から、機能未知とされていた膜タンパク質 YeeE がチオ硫酸の取り込みに関連しているということが新たに判明しました（図 1 右）。

これまで *yeeE* の遺伝子の機能が分からなかったことから、YeeE の解析はほとんど行われておらず、YeeE/YedE ファミリーに分類されるタンパク質の構造情報もない状況でしたが、私たちの研究グループは YeeE によるチオ硫酸イオンの取り込み機構を理解するために、YeeE の X 線結晶構造解析と構造情報に基づく構造生物学的解析を行いました。

(解析の方法と結果)

本研究では、*Spirochaeta thermzophila* という細菌の膜タンパク質 YeeE を純化して、輸送基質であるチオ硫酸と共に結晶化させました。

その後、YeeE の結晶を用いた X 線回折データは大型放射光施設 SPring-8*1 で収集しました。最終的に X 線結晶構造解析によって、2.5 Å 分解能*2 という高精度のデータから YeeE の結晶構造を明らかにしました。

本研究により決定された YeeE の構造は完全に新規のフォールド（折りたたまれた構造）*3 をとっていました（動画 1、図 2）。YeeE には 1 つのループと 3 本のアルファヘリックス構造が 4 回繰り返した構造があり、それらが分子内で擬似 222 対称性という回転対称（擬似 222 回転対称*4）のパターンで配置する特徴があります（図 3）。それぞれの繰り返し構造に存在する計 4 つのループ LA、LB、LC、LD が YeeE の中心部に向かって位置し、これらのループを取り囲むようにアルファヘリックス（タンパク質の右巻きらせん構造）が配置しています。

この配置により、YeeE は細胞内側と外側にくぼみをもつ砂時計型の構造体をとっています（図 4）。チオ硫酸イオンは細胞外側に存在する正電荷のくぼみにシステイン残基と水素結合し位置していません（図 2）。この位置をポジション I とします。ループで形成される中心部には生物種間で保存性の高い 3 つのシステイン残基（C293、C91、C22）が連続して配置していて（動画 1、図 2）、これらのシステイン残基は YeeE によるチオ硫酸輸送活性にかかわる重要な働きをしています。

このような結晶構造によりチオ硫酸イオンが位置するポジション I から 3 つのシステイン残基を介して基質が細胞内に取り込まれると考えました。

また、X 線結晶構造解析の電子密度マップから、YeeE の基質経路と予測されている領域でシステイン残基近傍にチオ硫酸が留まりそうなポジション II、ポジション III を見出しました。（図 4）。さらに、分子動力学計算*5 という手法で調べたところ、YeeE が大きな構造変化をしなくても、チオ硫酸イオンがポジション II、III に安定して存在することが分かりました。

ここでの構造生物学的解析をまとめ、「YeeE は保存された砂時計型の構造を持ち、3つのシステイン残基の各チオール基 (-SH 基) とチオ硫酸の硫黄原子との間で一時的に結合しながらチオ硫酸イオンを細胞内へ運ぶ輸送体 (トランスポーター) である」というモデルを提唱しました (図 4)。興味深いことは、YeeE が中心部の最小限の構造変化でチオ硫酸の輸送を可能にできるという点で、チオ硫酸取り込みに特化して進化した洗練された構造体のようにみられます。

【今後の展開】

今回の成果は、チオ硫酸を特異的に輸送するタンパク質として YeeE を同定し、YeeE の詳細構造を X 線結晶構造解析により初めて明らかにしたことです。この新規フォールドの発見により研究が遅れていた YeeE/YedE ファミリーと総称されるタンパク質の詳細な分子メカニズムの解析が可能となるだけでなく、輸送体などが関わる輸送の分子機構に対する理解が深まることで、タンパク質構造予測技術の向上などの構造生物学に関する基盤研究の発展に資することができます。

一方で、YeeE によるチオ硫酸の取り込みは、細胞内のシステイン合成における重要な経路の一つです。環境に優しい細菌によるシステインの発酵生産の能力を向上させるためには、硫黄源を取り込むシステムの一つである YeeE を介した経路の強化が有用なアプローチです。今回明らかにした YeeE の構造と輸送メカニズムをもとに、チオ硫酸を取り込む能力が著しく高まった「スーパーアクティブ YeeE」を創製することで、システインの生産性向上が可能になります。

また、微生物の増殖に硫黄源は必須ですが、一般に用いられる硫酸に比べ、チオ硫酸には増殖に必要な ATP や NADPH などのエネルギー源を細胞内で節約できるメリットがあります。したがって、チオ硫酸を「スーパーアクティブ YeeE」によって効率よく取り込む微生物を育種することで、システイン以外のアミノ酸や有機酸、バイオ燃料や医薬品原料などの高付加価値化合物の生産性を高め、製造コストを下げることが期待できます。

【用語等解説】

- *1 **SPring-8** : 兵庫県佐用町に位置する世界最大級の大型放射光施設。強い X 線を用いた実験が可能。
- *2 **分解能** : 対象物をどの程度まで識別できるかという能力。本稿での高い分解能とは、その値 (単位は Å) がより低いものを指し、それだけ細部まで識別可能になる。
- *3 **フォールド (折りたたまれた構造)** : タンパク質はアミノ酸が連結したポリペプチドで構成されており、多くの場合ポリペプチドがフォールドして (折りたたまれて) ある特定の構造体を形成し機能する。
- *4 **擬似 222 回転対称** : 同一ではない部分構造が三方向の直交する軸に対して、ほぼ 180 度の回転対称性をもった位置関係であること。
- *5 **分子動力学計算** : 分子動力学 (Molecular Dynamics) を用いて、タンパク質などの生体分子の挙動を計算する研究手法。MD シミュレーション。

【掲載論文】

論文タイトル : Crystal structure of a YeeE/YedE family protein engaged in thiosulfate uptake
(チオ硫酸の取り込みに関わる YeeE/YedE ファミリータンパク質の結晶構造)

書誌情報 : Yoshiki Tanaka, Kunihiro Yoshikawa, Azusa Takeuchi, Muneyoshi Ichikawa, Tomoyuki Mori, Sayaka Uchino, Yasunori Sugano, Toshio Hakoshima, Hiroshi Takagi, Gen Nonaka and Tomoya Tsukazaki

(田中 良樹、吉海江 国仁、竹内 梓、市川 宗巖、森 智行、内野 清香、菅野 泰功、箱嶋 敏雄、高木 博史、野中 源、塚崎 智也)

【本研究内容についてコメント出来る方】

大阪大学生物工学国際交流センター

教授 本田 孝祐

E-mail: honda[at]icb.osaka-u.ac.jp <https://researchmap.jp/read0070175>

【本プレスリリースに関するお問い合わせ先】

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域構造生命科学研究室

教授 塚崎 智也 E-mail : ttsukaza[at]bs.naist.jp TEL : 0743-72-5551

硫黄化合物の取り込み

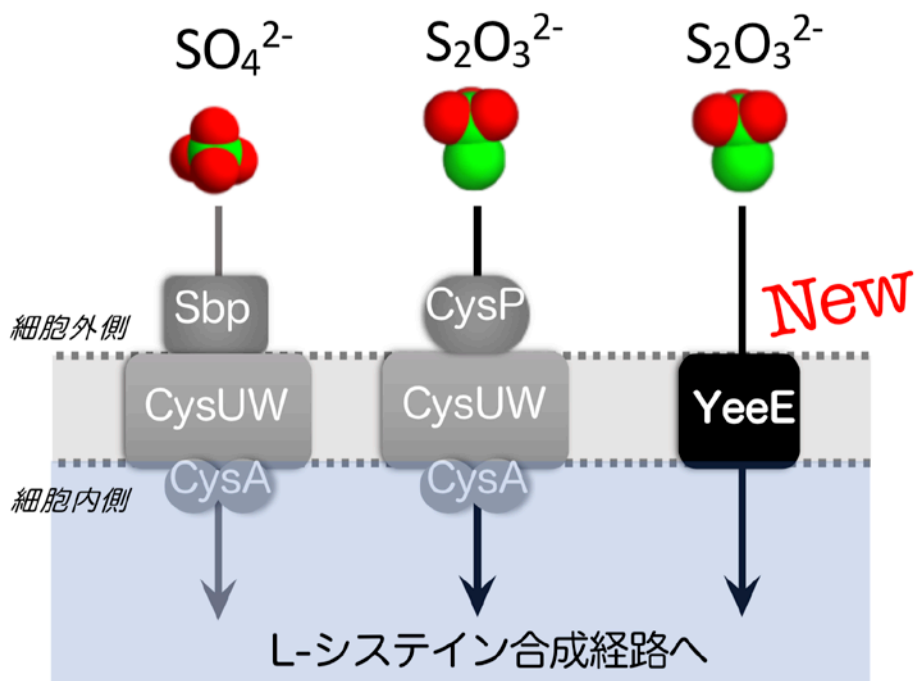


図 1： 硫黄化合物取り込みの模式図。硫酸イオン SO_4^{2-} およびチオ硫酸イオン $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ は専用の経路を通り、細胞内へ運ばれ、システイン合成に利用される。本研究で YeeE がチオ硫酸イオンの取り込みに関与することが分かった。

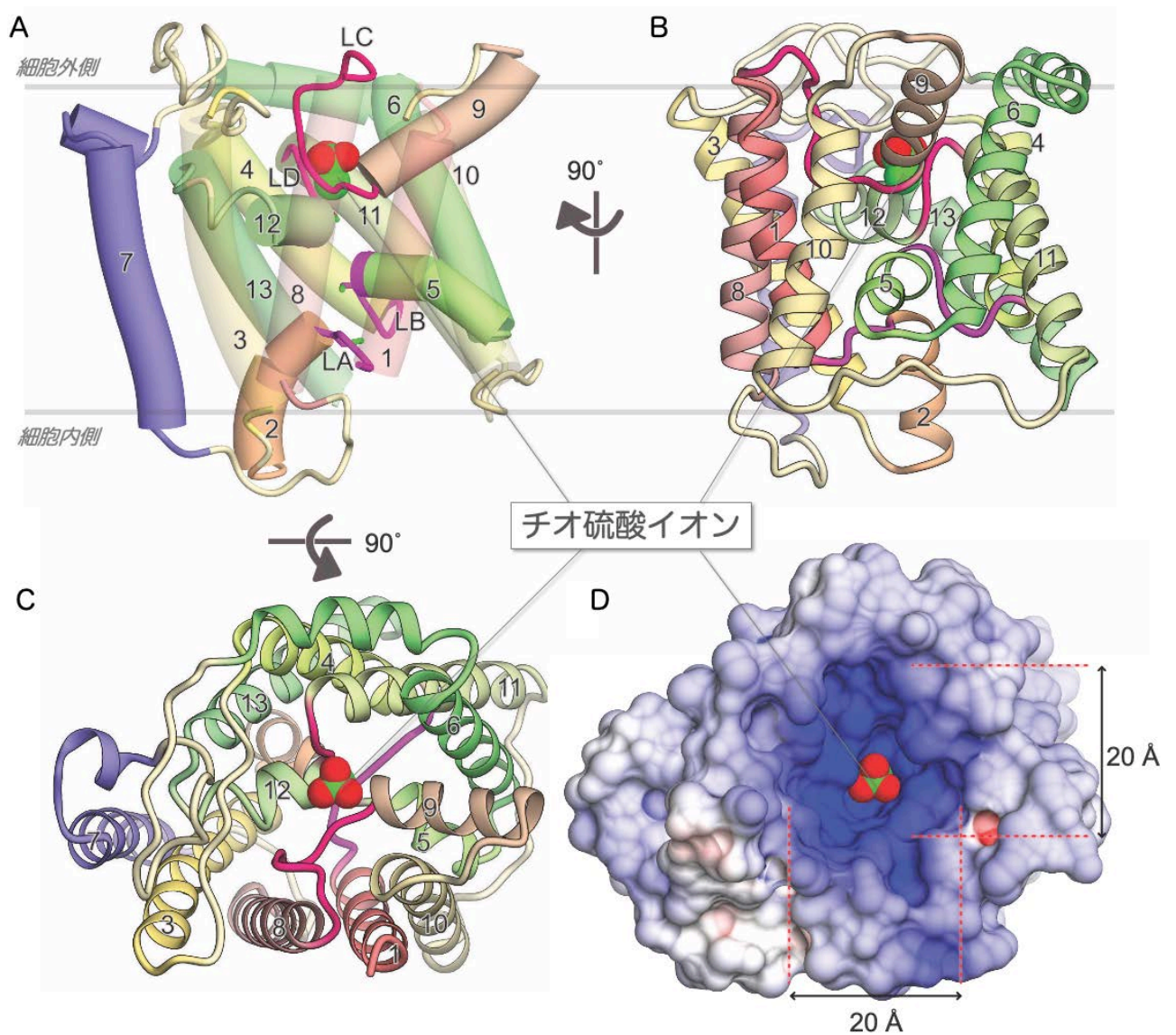


図 2： YeeE の構造モデル図。アルファヘリックス（右巻きらせん構造）の番号を数字で表した。中心部に存在するループを LA～LD で示し、チオ硫酸イオンを赤色と緑色の空間充填モデルで示している。(A) はアルファヘリックスをシリンダー表示、(B)、(C) はリボン表示した。(D) は細胞外側から見たタンパク質の表面表示モデル (C と同一視点) であり、くぼみは正に帯電している (青：正電荷、赤：負電荷) ことを示す。

動画 1 : <https://www.naist.jp/pressrelease/files/YeeE2.mp4>



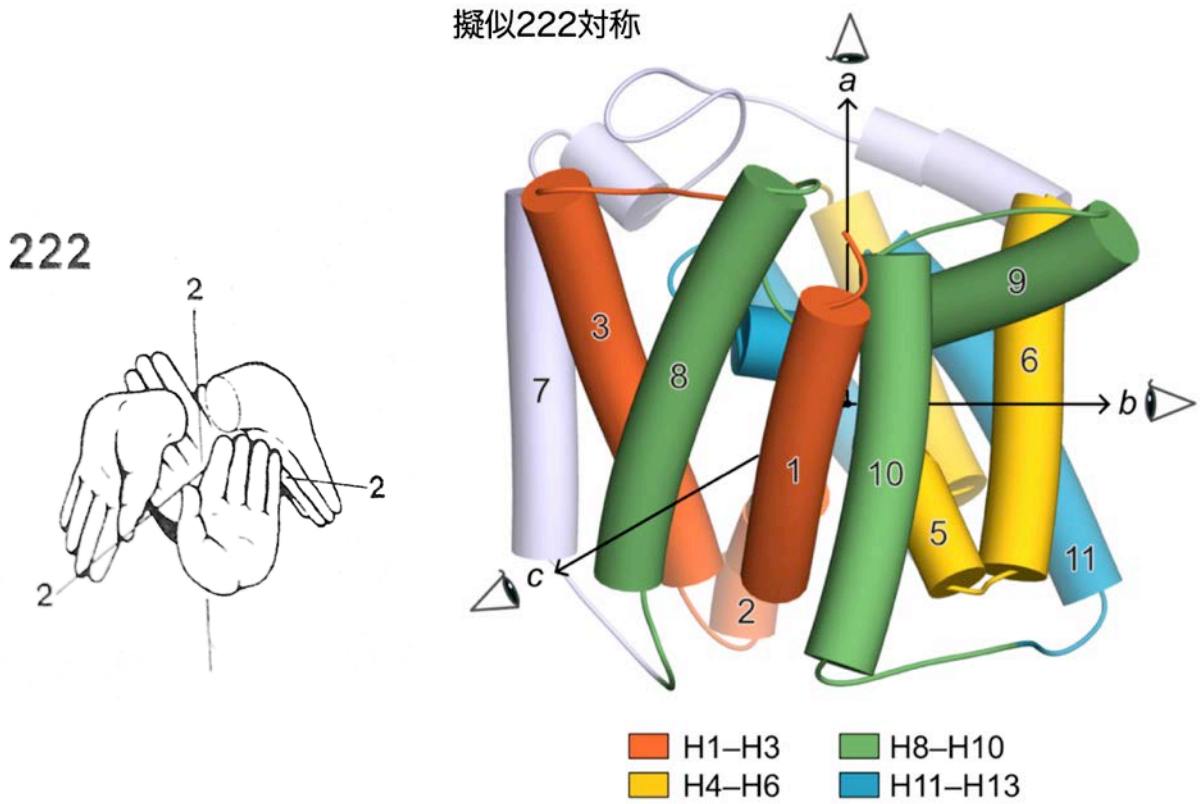


図 3: YeeE の擬似 222 対称。左図: 完全な 222 対称のモデル『ブドウ生命系のための X 線解説入門』(化学同人) から引用。表示した対称軸を中心に 180 度回転させると「手」がぴったりと重なる。右図: YeeE のアルファヘリックスはシリンダー表示し、その番号を表示した。色分けした YeeE の 4 つの部位 (H1~H3、H4~H6、H8~H10、H11~H13) が擬似対称構造となっている。表示した 3 つの直行した軸 *a*、*b*、*c* が対称軸で、各軸を中心に 180 度回転させることでそれぞれの部位が重なる擬似 2 回対称がある。

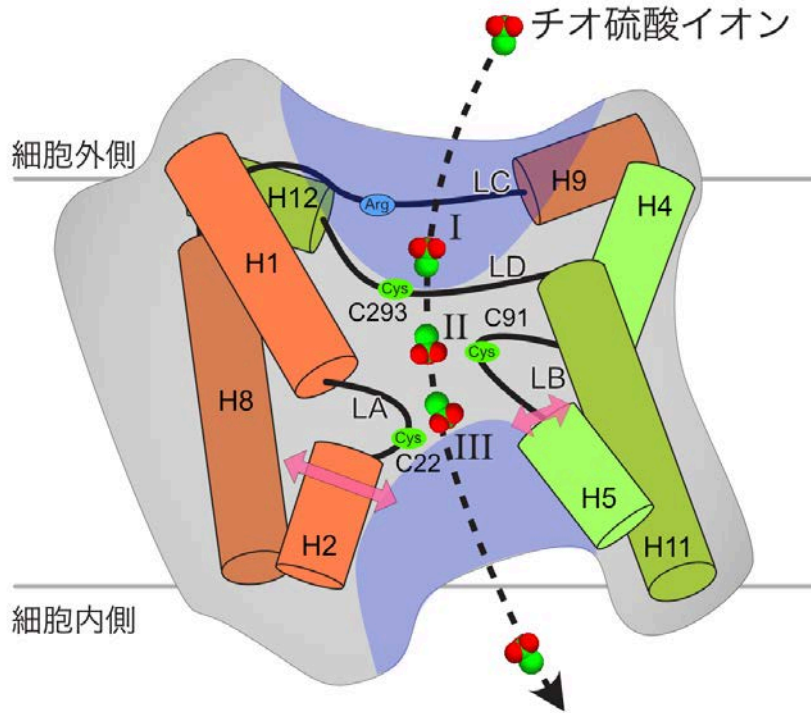


図 4 : YeeE によるチオ硫酸の取り込みモデル。YeeE の断面図を示す。LA、LB、LC、LD のループとその近傍のアルファヘリックスを強調して描写した。LC に保存されたアルギニン (Arg) と LA、LB、LD に存在する 3 つの保存されたシステイン (Cys) を図示した。チオ硫酸イオンは、まずポジション I の位置で認識され、保存されたシステイン残基付近を矢印に沿ってポジション II、III を経由し、膜を通過し細胞内に放出される。