

氏 名	TRAN NGUYEN THAO		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	理 学		
学位授与番号	博乙第	4 5 7 1	号
学位授与の日付	2 0 2 5 年 9 月 2 5 日		
学位授与の要件	博士の論文提出者 (学位規則第 4 条第 2 項該当)		
学位論文の題目	Structural insights into a citrate transporter that mediates aluminum tolerance (アルミニウム耐性に関わるクエン酸輸送体の構造的知見)		
論文審査委員	教授 菅 倫寛	教授 沈 建仁	准教授 秋田 総理
学位論文内容の要旨			
Soil acidification affects over one-third of the world's arable land, primarily due to natural processes and anthropogenic activities such as excessive nitrogen-based fertilization and intensive agriculture. In acidic soils, aluminum exists in an ionized form of Al^{3+}, which inhibits root growth and poses a serious threat to crop productivity. Barley (<i>Hordeum vulgare</i>, Hv), one of the most Al^{3+}-sensitive crops, mitigates this toxicity by secreting citrate from its roots to chelate Al^{3+}. This secretion is mediated by HvAACT1, a member of the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. Despite its functional importance, the structural basis of citrate transport by HvAACT1 remains poorly understood. This thesis aims to elucidate the crystal structure of HvAACT1 and provide structural insights into its mechanism of citrate transport. This study reports the optimization of the HvAACT1 protein construct and the crystallization conditions of the resulting variant, HvAACT1_{cryst}, which yielded X-ray diffraction data at a resolution of 3.2 Å. Functional assays confirmed that HvAACT1_{cryst} retains citrate export activity. The crystal structure reveals that HvAACT1_{cryst} adopts an outward-facing conformation, characterized by an open extracellular gate and a closed intracellular gate. The putative citrate binding site is formed by three conserved basic residues in the C-terminal domain, which is distinct from the binding sites observed in other MATE transporters. The N-terminal domain harbors two potential proton binding sites, one of which corresponds to the conserved Asp pair found in the DinF subfamily. Structural coupling between the distinct substrate- and proton-binding sites appears to be mediated by an extended hydrogen-bonding network in the extracellular half of the N-terminal domain, resembling that of DinF transporters. These structural proposals were verified through citrate efflux assays of HvAACT1 mutants and supported by molecular dynamics simulations. Furthermore, phylogenetic analysis indicates that citrate-transporting MATE proteins are evolutionarily related to the DinF MATE subfamily and have uniquely evolved in the plant kingdom to transport negatively charged substrates. In conclusion, the structural insights into HvAACT1-mediated citrate transport presented in this thesis provide a molecular basis for aluminum tolerance in crops and shed light on the evolutionary diversification of substrate specificity within the MATE transporter family.			

論文審査結果の要旨

土壌の酸性化は、世界中の作物生産に深刻な影帯を及ぼす広範な問題であり、酸性土壌は耕作可能な土地のおよそ30~40%を占めると言われている。酸性土壌ではアルミニウムがイオン化し、植物の根に吸着してその成長を阻害する。オオムギはイネやコムギと比べて酸性土壌での生育が難しいものの、特定の品種ではアルミニウム耐性があり、アルミニウムイオンを感知するとクエン酸を根から放出してアルミニウムと結合させて無毒化して生育阻害を回避している。このクエン酸の放出はMATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion) ファミリーに属するAACT1 (Al-Activated Citrate Transporter1) と呼ばれるアルミニウム活性型クエン酸輸送体タンパク質が関与することがわかっているものの、AACT1を含めてクエン酸などのアニオン性物質を輸送するMATEファミリーの立体構造は明らかにされておらず、クエン酸放出の分子メカニズムは不明であった。本学位論文では、AACT1タンパク質の立体構造をX線結晶構造解析で解明し、得られた立体構造に基づいて生化学実験と分子動力学計算を実施して機能を検証し、生体膜を隔てたクエン酸輸送の分子機構を明らかにした。

申請者は本学位論文においていくつかの重要な成果を得た。X線結晶構造解析を用いて、AACT1タンパク質の立体構造を解明し、AACT1タンパク質が細胞の外側に向かってV字型に大きく開いており、その中央に正電荷と負電荷が対極して分布する大きなくぼみが形成されることを発見した。このくぼみの正電荷を帯びた領域はアニオン性のクエン酸を引き寄せて結合することを、生化学実験と分子動力学計算により見出した。さらに、このくぼみの負電荷を帯びた領域は水素イオンを結合することを示した。この水素イオン結合サイトの存在は原核生物MATEのDinFサブファミリーと類似していた。また進化系統解析から、クエン酸輸送体は、ヒトをはじめとする真核生物特有のeMATEサブファミリーよりも、原核生物のDinFサブファミリーに近縁であることが示された。このことは植物のクエン酸輸送体がeMATEサブファミリーとは異なる進化的起源をもつことを意味する。以上本学位論文では、植物クエン酸輸送体の進化的起源と、クエン酸輸送の分子機構に関する新しい知見を得た。学位論文審査会では研究成果の発表を適切に行い、質疑に対する応答も十分であった。したがって、学位審査委員会は、Tran Nguyen Thao氏が学位にふさわしい専門知識と研究能力をもつと評価した。