

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18770086

研究課題名（和文） テトラサイクリン排出タンパク質の結晶化

研究課題名（英文） Crystallization of tetracycline efflux protein

研究代表者

中島 良介(NAKASHIMA RYOSUKE)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20379100

研究成果の概要：本タンパク質は非常に不安定で、従来結晶化に適した標品を得るのが困難であったが、酸性条件下で精製することにより安定な標品が得られることを見いだした。また、基質を認識・結合するが輸送能を失った G141C 変異体は、LacY の C154G 変異体同様に結晶化にとって有用であることが予想される。これらの変異体・条件を用いてさらなる精製条件を検討した結果、ドデシルシュークロース、ノニルチオマルトシドを用いた場合に最も良好な標品が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	360,000	3,960,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：膜タンパク質、結晶化、構造解析、立体構造、薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の結晶化は大変難しく、水溶性タンパク質に比較してその成功例は格段に少ない。それでも申請当時、ビタミン b12 輸送体 BtuCD をはじめ、アミノ酸(ロイシン)輸送体など膜輸送体の構造に関する複数の報告があった。薬剤排出タンパク質では、我々の研究室で結晶構造解析に成功し 2002 年に Nature 誌に報告した大腸菌多剤排出タンパク質 AcrB、及び同じく多剤の排出タンパク質 EmrE が報告された。そこで多剤認識と単剤認識の両者の構造比較から異物認識機構を完全に解明する事を目標とし、すでに成

果の上がっている多剤排出タンパク質に対して、特定の化合物に特異的な単剤排出タンパク質の構造解析に焦点を絞った本研究を申請した。

2. 研究の目的

細菌の持つ膜輸送体の中で最も早く発見され、研究の進んでいるテトラサイクリン特異的排出タンパク質 TetA を研究の素材とした。多くの研究者が薬剤排出タンパク質の結晶化に取り組んでいる中で、我々の研究室では世界に先駆けて AcrB タンパクの結晶化及び構造解析に成功した。この AcrB タンパク

での経験を TetA タンパクに応用することで、迅速に TetA 結晶を作成できると考え、構造解析が可能な良質な結晶の作成を目指す。

3. 研究の方法

(1) 大量精製条件の検討

膜タンパク質の結晶化において、その安定化に用いる界面活性剤の選択は、数あるファクターのうち最も重要なものの一つである。本研究では主に、用いる界面活性剤の種類について詳細に精製条件を検討する。

(2) 結晶化条件の検討

十分な濃度、安定性を確保できた TetA 標品を用いて、スパースマトリクス法により結晶化条件をスクリーニングする。また、ベシクルフュージョン法やバイセル結晶化法等、現在までのところ成功例はバクテリオロドプシンに限られているものの、新しく開発された膜たんぱく質結晶化法も適用する。さらに、*P. denitrificans* 由来のチトクロム c 酸化酵素で有効であったモノクローナル抗体を利用した結晶化も検討する。

(3) 基質複合体の結晶化

多剤排出タンパク質 AcrB における経験から、基質結合型結晶の作製には困難が予想される。これは排出タンパク質が発現調節因子のような結合タンパク質ではなく、輸送体であるために基質を弱くしか結合（認識）しないことに起因している。AcrB タンパクの場合、疎水性の高い基質が界面活性剤ミセルに溶け込むため結晶化に影響した。長鎖脂肪酸輸送体 FadL の場合は同様の理由で長鎖脂肪酸結合型結晶の調製を断念している。その点、テトラサイクリンは水に対する溶解度が高く、TetA タンパクの基質結合型結晶が得られる可能性は高いと期待している。基質結合型の結晶構造解析による基質認識機構の解明および輸送機構の解明に貢献したい。

4. 研究成果

(1) 市販されており入手可能な数十種類の界面活性剤を用いた TetA タンパクの可溶加効率、安定性に関する検討を一通り行った結果、脂質ライクな界面活性剤を用いた場合に TetA タンパクは比較的長期間安定であった。この標品を用いた結晶化条件のスクリーニングを行っている。ただし、研究にはヒスチジンタグ融合 TetA タンパクを用いているためアフィニティー精製後の標品は高濃度のイミダゾールを含んでいる。最終的に結晶化に用いる標品を調整するに当たり、イオン強度を低く抑えると標品の安定性を欠いてしまうことも分かった。タグを融合しないワイ

ルドタイプタンパクの精製も検討しているが、精製にかかる時間を短く抑えることの重要性との関係から、今後もタグ融合タンパクを用いた検討を続けるものとした。

アフィニティー精製に酸性溶出 (pH4~5) を用いてイミダゾール緩衝液を含まない条件で標品を調製すると、中性付近では TetA タンパクの安定性を欠いた界面活性剤であっても 20mg/ml 程度までの濃縮が可能なことを見出した (タンパク質濃度も結晶化に重要なファクターの一つである)。これらの標品をゲルろ過を用いて評価した (図 1)。

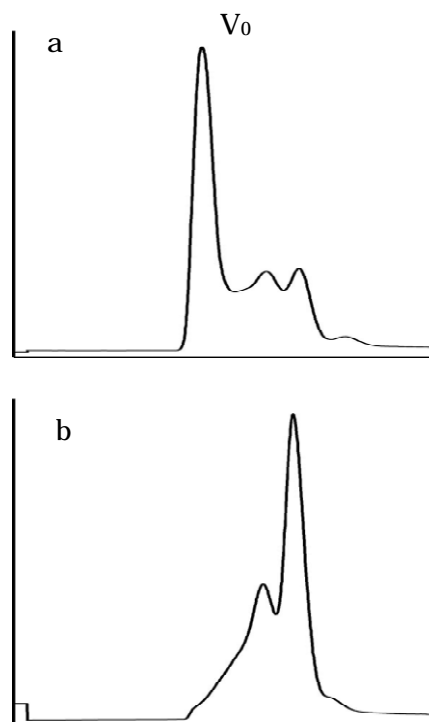


図 1. ゲルろ過による精製標品の評価
a. 界面活性剤にデシルシュークロースを用いた場合。タンパクの大部分はボイドボリュームに溶出した。b. ドデシルシュークロースを用いた場合、多くはモノマーの分子量サイズに溶出した。

これらの標品は高濃度のイミダゾール緩衝液を含まないため pH のスクリーニングに障害がないが、同時に結晶化に向けた十分に良好な標品とはいえないことも分かった。引き続き他の界面活性剤を含めて精製条件を検討する。

(2) テトラサイクリン排出タンパク質・TetA(B)と同じ MFS 型に属するトランスポーターであるラクトース輸送体 LacY (排出ではなく、取り込みを担う膜輸送体) では C154G という変異体を用いることによって初めて結晶化、及び構造解析に成功した。この変異

ポーター研究 2009、12、61-66、2008、査読無

[学会発表](計 2件)

豊島近、小川治夫、津田岳夫、村上聡、中島良介、膜輸送体作動メカニズムの結晶学的解明、第12回 SPring-8 シンポジウム、2008年10月30日-11月1日、東京

村上聡、中島良介、松本崇、近藤洋平、津田岳夫、小川治夫、豊島近、膜輸送体作動メカニズムの結晶学的解明、第11回 SPring-8 シンポジウム、2007年10月29-30日、兵庫

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 良介 (NAKASHIMA RYOSUKE)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20379100

(2)研究分担者

(3)連携研究者