

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03186

研究課題名(和文) MFS型多剤排出輸送体の多剤認識と輸送機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of multidrug recognition and transport mechanisms of MFS-type multidrug efflux transporters

研究代表者

田辺 幹雄 (Mikio, Tanabe)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任准教授

研究者番号：00716871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：MFS型薬剤排出輸送体の多剤認識と薬剤の取り込みのメカニズムを明らかにするため、MdfAやその他MFS型輸送体に着目し構造解析を通じ薬剤輸送機構の解明を目標とした。MdfAに関してはクライオ電顕単粒子解析法を用いて、これまで明らかになっていなかった新たに2つの構造状態を4オングストロームを超える分解能で決定した。薬剤輸送サイクルにおける内開きと外開きの構造をつなぐOcclude状態との中間構造を明らかにできた。黄色ブドウ球菌由来のNorAとその阻害剤の共構造を解析を目指した。期間内に構造解析まで至らなかったが、構造モデルを用いて阻害剤の結合サイトをシミュレーションを行い結合様式を推定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生化学とX線結晶構造解析の手法を用いてMdfAの薬剤排出メカニズムの解明を試みてきたが、異なる骨格の薬剤認識とその輸送機構、また薬剤取り込み口については期間内中には明らかにできなかった。しかし抗体とクロスリンクの架橋実験、クライオ電顕単粒子解析を行うことにより複数の構造を捉えることが可能になった。またNorAの阻害剤に関する研究は盛んに行われているものの、これまで構造レベルでその結合領域を検討できたことはなかった。MFS輸送体の薬剤排出の結合、輸送メカニズムを明らかにすることは、細菌内において細胞質内に侵入した薬剤の代謝排出メカニズムをより深く研究する基盤を作ることに貢献したと考えている。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of multidrug recognition and drug uptake by the major facilitator superfamily (MFS)-type multidrug efflux transporters, we directed our attention towards MdfA and its analogous MFS-type multidrug resistance (MDR) transporters found in pathogenic bacteria.

We successfully identified two novel structural states of MdfA-Fab fragment complex, achieving a resolution of greater than 4 angstrom by employing cryo-EM single-particle analysis. We firmly believe that we have successfully determined the intermediate structure situated between the occluded state and the outward-open states. Furthermore we aim to determine the co-structure of NorA and its inhibitor from *S. aureus*. While we were unable to conclude the structural analysis during the duration of the allocated funding, we managed to estimate the binding mode of the inhibitor by employing molecular dynamics (MD) simulations utilizing the alphafold 2 algorithm.

研究分野：生化学

キーワード：薬剤排出 構造解析 MFS輸送体 膜輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌が薬剤耐性を引き起こす主要な要因の一つは、細胞膜上に存在する多くの多剤排出(MDR)輸送体により、投与された薬剤が菌外に排出されてしまうことにある。これら多剤排出輸送体は機能と構造の特徴から5つのグループに大別できる。グラム陰性菌においては内膜、外膜にそれぞれMDR輸送体が発現し、細胞質に入った薬剤もペリプラズム領域を経て細胞外に排出される。細胞質に侵入した抗菌剤をペリプラズム領域に汲み出すのに主要な役割を担うのは内膜に存在するMFS型のMDR輸送体(以下MFS-MDR輸送体)である。MFS-MDR輸送体は主にH⁺の濃度勾配を利用して薬剤を対向輸送するタンパク質で、一般的にN末側の6本の膜貫通ヘリックス束、C末側の6本束が一つの纏まりとなって働き、輸送する分子に対する入り口を細胞質に対して内向き/外向きに大きく構造を繰り返し変化させ、基質を輸送する。我々のグループでは大腸菌由来のMdfAをモデルに輸送機構の解明を目指しMdfAの外開き構造を明らかにした(Nagaratinam et al. 2017, 2018)。我々のグループよりも先んじて決定された最初のMdfAの構造は内向き構造であったため(Heng et al. 2015)、分子動力学(MD)シミュレーションのデータを組み合わせ、内向き/外開きの両構造を比較すると、その結果1番目の膜ヘリックスに存在する34番のアスパラギン酸(D34)のプロトン化が外開き 内向きへの構造に重要であることを示し、その過程で5番目の膜ヘリックスの捩れを伴う構造変化が起きることが分かった。

2. 研究の目的

MdfAにおいては我々の発表後さらに3つのグループにより構造が決定されたが、いずれも薬剤の結合ポケットが細胞質側を向いた”内向き”の構造であった。そのため薬剤排出の輸送サイクルにおいては現在においても少なくとも5つの状態があるといわれる構造の2状態しか決定されていないことになる。それに加えMdfAがどのように異なる骨格を持つ薬剤分子を認識して細菌外に排出するのか、またどのように薬剤を取り込むかは未だに明らかでない。そこで本申請の目標は1)MdfAの変異体や抗体を利用し、輸送サイクルにおいて異なる状態のMdfAの構造を明らかにすること、また分子動力学(MD)シミュレーションを駆使しMdfAの多剤認識と薬剤の取り込み分子機構に迫ることを目標とした。またこの輸送体の共通性と特異性に着目し2)MdfAと類似性を持つ病原性細菌のMFS型MDR輸送体に着目し、構造解析を通じ薬剤輸送機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

<実験手法> 具体的な実験手法を以下のように示す。

1) 目的遺伝子 MFS 型 MDR 輸送体の発現と精製 MDR輸送体のタンパク質のC末領域に指標として傾向タンパク質GFPを付加し、輸送体とGFPとの融合タンパク質として大腸菌に発現させた。この系では膜タンパク質がフォールドした時のみにGFPによる蛍光が観察されるため、この手法を利用してゲル濾過カラム(FSEC)などを行い、精製タンパク質の発現、精製条件の検討を行った。

2) MDR 輸送体の立体構造を認識する抗体の取得 MdfAの立体構造を認識する抗体が4種類得られており(Jaenecke et al. 2018)、うち一つはX線結晶構造解析を用いた外開き構造の決定に用いた。しかし他の抗体はMdfAのどの状態を認識するのか明らかになっていない。そこでこれらの抗体を再評価し、どんな構造状態を認識しているかクライオ電顕の単粒子解析により確認した。またS. aureus由来のMFS型MDRであるNorAの立体構造を認識する抗体を得るためのELISA等を用いたスクリーニングを起している。NorAはNorA-GFPの状態では

安定性が高いが、TEV プロテアーゼ処理後に GFP を切り離すと安定性が低くなってしまふ。そのため開発過程にある NorA の阻害剤を入れることでより安定性が高い精製タンパク質が得られたため、これを抗体の取得に用いた。

3) MFS 型 MDR と抗体との共結晶化、クライオ電顕を用いた単粒子解析 MdfA や MFS-MDR 輸送体と抗体、薬剤との共結晶スクリーニングを中心に行った。得られた結晶は KEK 施設内の放射光施設 PF で回折実験を行った。KEK に導入された 200kV のクライオ電顕を用いて単粒子解析法による解析を試みた。得られた画像データは relion ソフトウェアのパッケージを用いて解析を行った。MdfA や MFS-MDR 輸送体は分子量が 50kDa 前後であるが、抗体を利用する事で分子サイズを“かさ上げ”することができ、界面活性剤をマスクすることで、ターゲットタンパク質の部分の構造がより明確に見ることが可能になる。また研究協力者である東京大学寺田グループにより、MD シミュレーションによる解析が現在進行形で進んでいる。

4. 研究成果

テーマ 1) MdfA の多剤認識と薬剤の取り込み分子機構に迫る。

これまで得られている MdfA の構造は Outward-open(外開き)と内向き(Open か Occlude なのは議論が分かれるところ)の中間に限られていた。さらなる輸送機構の解明のため、これまで得られた抗体を用いて新たな構造状態を得られないかを検討した。精製した MdfA を Fab フラグメントとインキュベートし、ゲル濾過カラムを用いて MdfA-Fab の複合体を得た。クライオ電顕を用いての単粒子解析用のサンプルを調整し、得られたデータを解析すると、多くの抗体が解離していることがわかった。また分解能も 10 程度にとどまった(下図左パネル)。原因として

は、サンプルのグリッド調整中特にグリッド作成の際に生じる氷の生成により、Fab 抗体が MdfA から解離してしまうことを推定し、またその結果、三次元のマップを取得する際、高分解能の解析のために必要な粒子数が不足している可能性を考慮した。そこでクライオグリッド作成の際にもより安定な MdfA-Fab 複合体の取得のため、MdfA-Fab を精製後にさらにグルタルアルデヒドを使って架橋し、より安定性の高い MdfA-Fab を用いてグリッドを作成した結果、現在 2 つの Fab で 4 を超える分解能でマップを得られることができた(右図、右パネル)。得られた構造は外向きの構造であるものの、我々がこれまで提唱してきた (Nagarathiam et al.

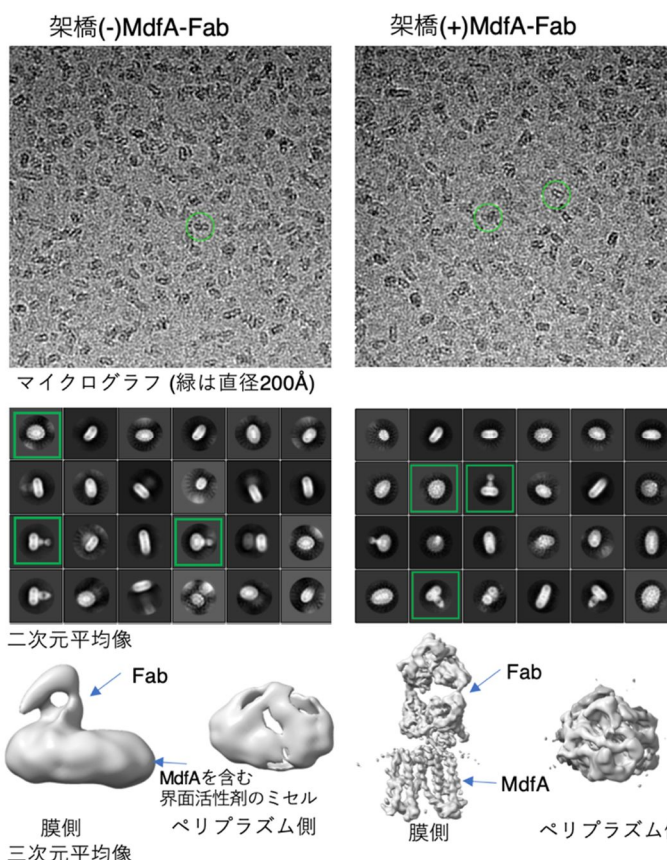
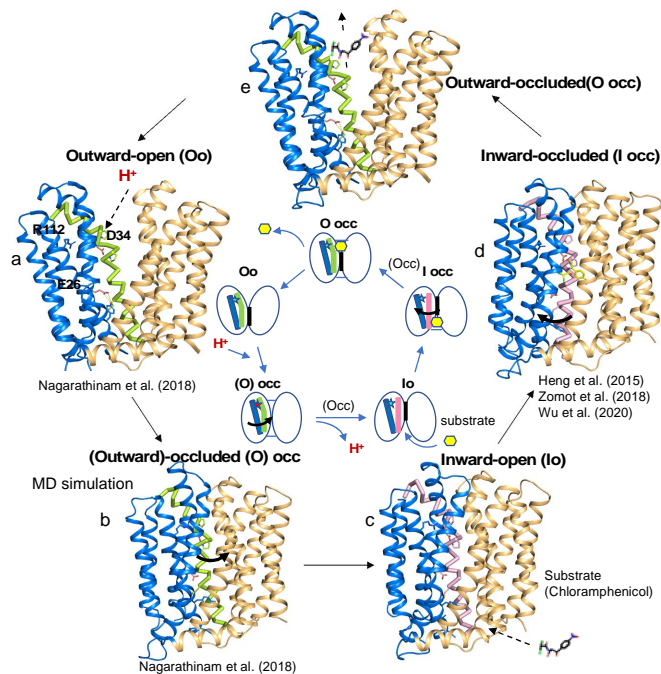


図 MdfA-Fab のクライオ電子顕微鏡単粒子解析 - (上)クライオ電顕で撮影した電顕マイクログラフ (中) 2次元平均像。(下左) 3次元平均像 3.9 Åまで改善された3次元マップ (左)架橋前の MdfA-Fab サンプル、(右)架橋操作を行った MdfA-Fab

2018, Drew et al. 2021) 5 番目の膜貫通ヘリックス(TM5)の箇所が大きく構造変化を起こしており、過去に明らかになった構造とは異なる新たな構造状態を得られたと考えている。現在モデル構築が進行中である。

テーマ 2) 病原性細菌の MFS 型 MDR 輸送体の構造解析を通じ薬剤輸送機構の解明を目指す。また MdfA 以外にも MFS-MDR の構造解析に取り組んだ。これまで S.aureus 由来の NorA は薬剤耐性に影響を及ぼすタンパクとして研究がされてきたが、精製タンパク質を得ることが非常に困難であった。2022 年に NorA-Fab の複合体構造(Brawley et al. 2022)が決定されるまで、精製タンパク質を用いて行われた解析はほぼ皆無であった。我々も NorA の安定な精製タンパク質の取得に苦労していたが共

同研究者より NorA の阻害剤の供与を受け、その共構造を解析すると同時に本研究に用いることとした。これまで NorA 単独では安定的なタンパク質を生成できなかったが、阻害剤存在下では、下に示すように、ゲル濾過カラムを用いた最終精製でも凝集や沈澱することなく精製できた。現在この試料をリポソームに再構成し、抗体作成のための予備実験を行い(Jaenecke et al. 2018)、マウスへの免疫、ハイブリドーマの調整に向けて準備している。また NorA とその阻害



剤の共構造を解析は期間内に構造解析まで至らなかったが、構造モデルを用いて阻害剤の結合サイトをシミュレーションを行い、その結合様式を推定できた。現在引き続きシミュレーションによって同定できたアミノ酸に変異を導入し阻害剤の結合が低下するかどうかを試みている。

また、これまで発表された MFS 型の MDR の構造を総括しより包括的に薬剤輸送に関する機構を提唱し、またシンポーターとの比較も含めた review 雑誌を執筆した(Drew et al, 2021)。本 review 誌は広く引用され発表から 1 年近くで 100 件近くが引用されている(Google Scholar による)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Drew D, North R, Nagarathiam K. Tanabe M	4. 巻 121
2. 論文標題 Structures and General transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Reviews	6. 最初と最後の頁 5289-5335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.chemrev.0c00983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 田辺幹雄	4. 巻 56-06(予定)
2. 論文標題 MFS 型多剤排出トランスポーターMdfA の薬剤 輸送に伴う構造変化のメカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.56.6_509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 田辺幹雄
2. 発表標題 抗菌薬標的タンパク質の生化学-はじめに
3. 学会等名 日本細菌学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mikio Tanabe
2. 発表標題 Structural and Molecular Dynamical Approaches to understand MFS-type Multidrug Resistance Transporters
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Multi-drug efflux systems（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikio Tanabe
2. 発表標題 Structural and molecular dynamical approaches to understand mysterious mechanistic aspects of a H ⁺ /multidrug transporter
3. 学会等名 HALOmem International Meeting Membrane Protein & Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikio Tanabe
2. 発表標題 病原細菌 MFS 型薬剤排出トランスポーターの輸送メカニズムの考察
3. 学会等名 第22回タンパク質科学学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikio Tanabe
2. 発表標題 Exploring multiple conformational states of a bacterial MFS-type multidrug efflux transporter in the membrane environment
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Multi-drug efflux systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	野村 紀通 (Nomura Norimichi) (10314246)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	樹下 成信 (Juge Narinobu) (60646917)	岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関