

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19337

研究課題名（和文）多剤排出タンパク質複合体の阻害剤開発に向けた基質との網羅的な構造活性相関解析

研究課題名（英文）Comprehensive structure-activity relationship analysis with substrates for the development of inhibitors of multidrug efflux complexes.

研究代表者

山下 栄樹（Yamashita, Eiki）

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：00294132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：グラム陰性菌の多剤耐性化には、種類の抗菌剤を認識し菌体外に排出するRND型多剤排出タンパク質複合体が深く関与している。本研究では、RND型多剤排出タンパク質複合体の阻害剤開発に向けた構造活性相関情報を蓄積するために、グラム陰性菌である緑膿菌で発現しているRND型多剤排出タンパク質複合体MexAB-OprMのトランスポーター部であるMexBと基質との相互作用解析及びX線結晶構造解析を進め、各解析を網羅的に行うための基礎的な条件を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グラム陰性菌の多剤耐性に関わる排出タンパク質複合体の機能を阻害する分子が開発できれば、治療効果が弱まったが承認されている抗菌剤が再び治療に活用でき、また、投薬量を減らすことができる可能性がある。これにより、抗菌薬の過剰投与による環境汚染や新たな耐性菌の発生リスクも抑えられる。本研究で確立した方法を用いれば、多剤排出タンパク質複合体の相関構造解析を効率的に進め、多剤耐性菌の問題解決に繋がると考えている。

研究成果の概要（英文）：The multidrug resistance of Gram-negative bacteria is closely related to the RND-type multidrug efflux complexes, which recognize and efflux a variety of antimicrobial agents from the bacteria. In this study, to accumulate structure-activity relationship information for the development of inhibitors targeting RND-type multidrug efflux complexes, we conducted interaction analysis and X-ray crystallographic analysis to examine the detailed interaction between the transporter MexB of the RND-type multidrug efflux complex MexAB-OprM expressed in *Pseudomonas aeruginosa* and its substrates, and established the fundamental conditions necessary for a comprehensive analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物 相互作用解析 薬剤排出タンパク質複合体

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、世界中では年間約 70 万人が薬剤耐性菌感染症で亡くなっている。このまま手を打たないと、2050 年には年間死者数が 1000 万人に上り、現在のガンによる死者数 (約 820 万人) を上回り、100 兆ドルにも上る経済的損失が推定されている。薬剤耐性菌問題を克服することは、世界的な重要課題の 1 つである (O' Neill, *Review on Antimicrobial Resistance*, 2016)。複数の抗菌剤に耐性を持つグラム陰性耐性菌では、菌体の内膜-マトリックス-外膜に跨り存在する RND 型多剤排出タンパク質複合体が、種々の抗菌剤を認識し菌体外に排出することにより、菌体の多剤耐性化に深く関与している (Pool, *Clin. Microbiol. Infect.* 2004)。この RND 型多剤排出タンパク質複合体は、3 種類のタンパク質 (薬剤認識・排出エネルギー獲得を行い内膜に存在するトランスポーター、薬剤を菌体外に放出し外膜に存在するチャンネルタンパク質、これら 2 種類の膜タンパク質を繋ぎ膜間に存在するアダプタータンパク質) から構成されており、複合体を形成することにより抗菌剤を菌体外に排出する機能が生じる。この複合体がグラム陰性菌の多剤耐性化に深く関わっているため、特に薬剤認識・排出エネルギー獲得を行うトランスポーターをターゲットとした阻害剤開発が行われてきている。研究代表者が 2002 年に大腸菌由来の RND 型多剤排出トランスポーター (AcrB) の構造を解明 (Murakami, *Nature* 2002) して以降、構造情報を基にした阻害剤開発も行われているが未だに有効な阻害剤が得られていない。基質である抗菌剤と結合した状態での RND 型多剤排出トランスポーターの構造もいくつか明らかにされていたが、各基質との結合能について定量的な情報が不足しており、阻害剤開発には困難である。

2. 研究の目的

複数の抗菌剤に耐性を持つグラム陰性耐性菌に作用する抗菌剤を開発するには、抗菌剤を菌体外に排出する RND 型多剤排出タンパク質複合体の機能を阻害し、抗菌剤を菌体内に蓄積させることが重要と考えられる。RND 型多剤排出タンパク質複合体の阻害剤開発には、基質である抗菌剤との結合状態を詳細に視覚的に捉えるとともに、各基質との定量的な結合能の情報についても必要不可欠である。本研究では、RND 型多剤排出タンパク質複合体の中で薬剤認識を担うトランスポーターと様々な基質との相互作用の定量化及び視覚化を目指し、物理化学的手法による熱力学パラメーターの決定と基質結合型の構造解析を網羅的に行い、RND 型多剤排出トランスポーターと様々な基質との構造活性相関情報を蓄積することを目的とした。

3. 研究の方法

RND 型多剤排出トランスポーターと様々な基質との構造活性相関情報を蓄積するために、(1) トランスポーターと基質との相互作用の定量的なデータの蓄積、(2) トランスポーターの基質結合型の高分解能での立体構造情報の取得に取り組んだ。RND 型多剤排出トランスポーターの試料として、研究代表者が機能する現場で形成する RND 型多剤排出タンパク質複合体の構造解析に成功した緑膿菌由来の MexAB-OprM 複合体 (Tsutsumi, *Nat. Commun.* 2019) のトランスポーター部である MexB を用いることとした。

(1) トランスポーター MexB と基質との相互作用解析

① 様々な基質との相互作用解析のための試料調製

大腸菌の大量発現系を用いて MexB を発現させ、菌体を破碎後、超遠心機を用いて菌体膜を回収した。回収した菌体膜を界面活性剤である n-Dodecyl-beta-D-maltoside (DDM) を用いて可溶化を行い、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いて MexB の精製を行った。界面活性剤を DDM から 7-cyclohexyl-1-heptyl-β-D-maltoside (CY7) に置換するために各クロマトグラフィーの平衡化バッファーに CY7 を加えた。精製された MexB 試料は CY7 存在下の溶液に溶けており、CY7 は MexB の基質でもあるため、抗菌剤との相互作用測定を阻害することも考えられ、CY7 の非存在下の溶液で MexB を安定に保つための試料調製も行った。CY7 よって可溶化している MexB をポリマータイプの両親媒性分子であるアンフィポールに置き換えることにより、CY7 の非存在下の MexB の試料を調整した。

② 様々な基質との相互作用解析

基質とトランスポーター分子量比が 3 桁近くあるため、分子量比に関係なく熱力学的なパラメーターから相互作用の検出が行える等温滴定型熱量測定法 (ITC) や示差走査熱量測定法 (DSC) を用いて、基質との結合親和性を定量的に求めることを試みた。4 種類の抗菌剤 (ミノサイクリン (MINO)、ノボビオシン (NB)、エリスロマイシン (EM)、リファンピシン (RFP)) と 1 種類の阻害剤 (ピリドピリミジン誘導体 (ABI-PP)) について、測定を行った。

(2) 基質結合型トランスポーター MexB の高分解能構造解析

① 結晶化条件の探索

基質との詳細な結合を観測するためには、精緻な構造が得られる結晶構造解析が適し

ている。MexB の結晶構造は報告されていた (Sennhauser, *J. Mol. Biol.* 2009) が、構造が得られた結晶化条件が酸性領域 (pH 4.5) であったため、抗菌剤がチャージを持ち、抗菌剤結合型 MexB の結晶構造を得るのが困難であった。そのため、中性付近での結晶化条件の検索を行った。

② 中性付近の結晶構造解析

中性付近で得られた結晶から放射光ビームライン SPring-8 BL44XU を利用して X 線回折強度データ収集を行った。得られた回折強度データを基に、酸性領域 (pH 4.5) の MexB の結晶構造 (PDB ID : 2V50) をサーチモデルとした分子置換によって初期位相を決定し、モデル修正及び構造精密化を行った。

4. 研究成果

(1) トランスポーター MexB と基質との相互作用解析

① 様々な基質との相互作用解析のための試料調製

界面活性剤 CY7 存在下の精製では、ゲル濾過クロマトグラフィーや SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) の結果から高純度の MexB 標品 (CY7/MexB) が得られ (図 1)、収量は 1L 培養辺り約 1.3mg であった。この精製標品に両親媒性分子アンフィポールを加えることにより、CY7 非存在下でも安定な MexB 標品 (Apo1/MexB) を得ることに成功した。収量は 1L 培養辺り約 0.8mg で CY7/MexB の半分だった。CY7/MexB 及び Apo1/MexB の動的光散乱法により粒子径分布の分散度を確認したところ、それぞれ 17.0%、17.2% と非常に良好な精製標品であった。

② 様々な基質との相互作用解析

ITC において、界面活性剤 CY7 の影響を確認するために CY7/MexB をサンプルとして、阻害剤 ABI-PP をリガンドとして滴定測定を行ったが、熱量変化は見られなかった (図 2)。サンプルを Apo1/MexB に変えて、滴定測定を行ったところ、熱量変化が観測でき (図 3)、その結果 ABI-PP との解離定数 $K_d = 3.35 \pm 0.417 \mu\text{M}$ と得られた。溶液中に CY7 が存在すると ITC では熱量変化が見られないことが分かったので、抗菌剤との ITC では Apo1/MexB を用いることとした。MINO をリガンドとして滴定測定を行った結果、 $K_d = 129 \pm 82.9 \mu\text{M}$ であった。しかし、NB あるいは EM をリガンドとしたときは、熱量変化が見られず解離定数を求めることができなかった。このことから、NB や EM は MINO より非常に弱い相互作用であると考えられた。

DSC を行い、抗菌剤非存在下及び存在下での MexB の変性中点温度 (T_m) を比較し、抗菌剤との相互作用の有無について調べた。CY7/MexB の DSC を行ったところ、 T_m は $54.04 \text{ }^\circ\text{C}$ であった。ITC により解離定数が得られた ABI-PP 存在下で CY7/MexB の DSC を行ったところ、 T_m は $59.69 \text{ }^\circ\text{C}$ と上昇した (図 4、表 1)。DSC では、界面活性剤 CY7 の存在下でも T_m の変化を確認できたことから、DSC には収量が多い CY7/MexB を用いることとした。MINO 存在下で CY7/MexB の DSC を行ったところ、 T_m は $55.17 \text{ }^\circ\text{C}$ と僅かに上昇した (図 4、表 1)。ITC では熱量変化を観測できなかった NB や EM についても DSC では T_m の変化が観測でき、どちらの T_m も抗菌剤非存在下より低い値を示した (図 4、表 1)。また、RFP 存在下についても低い値を示した (図 4、表 1)。MexB が排出しない kitasamycin (KM) 存在下での T_m は、抗菌剤非存在下とほぼ同じ値を示した (図 4、表 1)。非常に弱い相互作用だと考えられる抗菌剤でも、 T_m 変化を観測できたので、MexB の相互作用解析において DSC が有用であることが分かった。ITC によって K_d が得られた ABI-PP と MINO については、ABI-PP の方が MINO より親和性が強く、親和性が強いほど、MexB の T_m が上がる傾向にあった。ITC で K_d が得られなかった抗菌剤については、 T_m の変化で MexB との相互作用を確認できたが、測定条件において、CY7/MexB の濃度を $3 \mu\text{M}$ 、抗菌剤あるいは抗菌剤あ

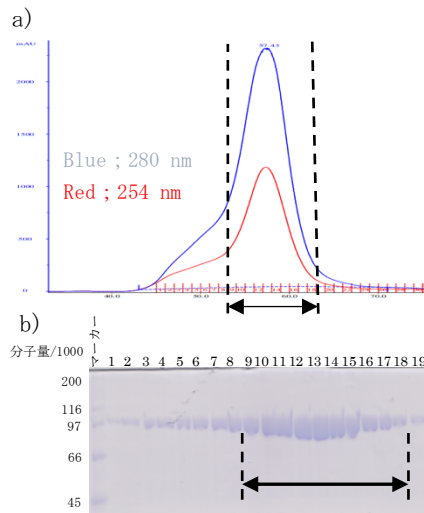


図 1 CY7 存在下の MexB 精製標品
a) ゲル濾過クロマトグラフィー溶出チャート、b) SDS-PAGE、矢印の領域が精製標品

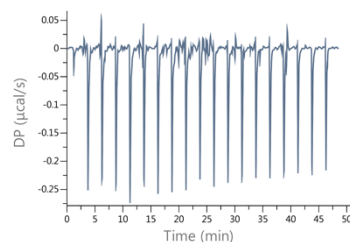


図 2 CY7/MexB と ABI-PP の ITC 生データ

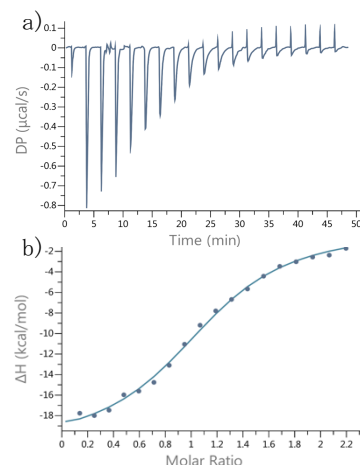


図 3 Apo1/MexB と ABI-PP の ITC データ
a) 生データ、b) 解析データ

る。ITC によって K_d が得られた ABI-PP と MINO については、ABI-PP の方が MINO より親和性が強く、親和性が強いほど、MexB の T_m が上がる傾向にあった。ITC で K_d が得られなかった抗菌剤については、 T_m の変化で MexB との相互作用を確認できたが、測定条件において、CY7/MexB の濃度を $3 \mu\text{M}$ 、抗菌剤あるいは抗菌剤あ

るいは阻害剤の濃度を 1 mM と一定の条件でしか測定できなかったので、 T_m の低下と親和性の強さの関係を明確にできなかった。

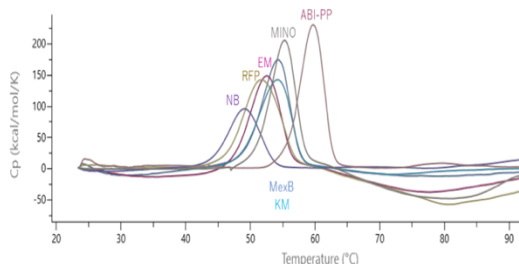


図4 DSCの測定結果

表1 DSCの測定から得られた T_m 値

Sample	T_m (°C)	ΔH (kcal/mole)
MexB	54.19	980
MexB-ABI-PP	59.63	1160
MexB-MINO	55.17	1020
MexB-NB	48.94	580
MexB-EM	52.43	932
MexB-RFP	51.65	999
MexB-KM (Negative)	54.02	879

(2) 基質結合型トランスポーターMexBの高分解能構造解析

① 結晶化条件の探索

中性付近で結晶化条件の探索を行ったところ、pH 6.5 と pH 8.0 で結晶が得られた (図5)。

② 中性付近の結晶構造解析

回折強度データ収集をそれぞれの結晶について行ったところ、pH 6.5 で得られた結晶は、空間群が $P2_12_12_1$ 、格子定数が $a = 130.7 \text{ \AA}$, $b = 156.9 \text{ \AA}$, $c = 257.2 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90.0^\circ$ 、で、多重度が 3.9, $I/\sigma(I)$ が 20.3, Completeness が 97.8%, R_{merge} が 7.2% の回折強度データを 2.23 \AA 分解能で、pH 8.0 で得られた結晶は、空間群が $C2$ 、格子定数が $a = 207.0 \text{ \AA}$, $b = 168.9 \text{ \AA}$, $c = 172.2 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90.0^\circ$, $\beta = 102.2^\circ$, $\gamma = 90.0^\circ$ で、多重度が 4.2, $I/\sigma(I)$ が 24.1, Completeness が 98.8%, R_{merge} が 6.0% の回折強度データを 2.30 \AA 分解能で、収集することに成功した。得られた回折強度データを用いて精密化をそれぞれ行ったところ、pH 6.5 の結晶では、 R_{work} が 21.0%, R_{free} が 23.6%, pH 8.0 では、 R_{work} が 21.4%, R_{free} が 23.8% で構造を決定することに成功した。両結晶構造 (pH6.5MexB構造、pH8.0MexB構造) で共通な構造として、結晶の非対称単位中に1つの3量体が存在し、3量体内の各単量体の構造については、既報の結晶構造 (pH4.5MexB構造) と同様にそれぞれが特徴的な非対称な構造 (取込型、結合型、排出型) を持っていた (図6)。さらに、結合型構造の結合サイトには精製に用いた界面活性剤 CY7 の電子密度があった (図6)。3つの異なる pH から得られている結晶構造について、非対称な各単量体の構造比較を行ったところ、結合型、排出型は RMSD が 1.0 \AA 以下と pH によって構造の差異はほとんどなかったが、取込型については pH6.5 だけが、他2つの構造に対して差異が大きかった (表2)。大きな差異があった取込型の構造を重ねると、結合サイトの入口に存在する一つのドメインの位置が大きく異なっており、pH6.5 では入口が他の2つに比べて広く開いていた (図7)。

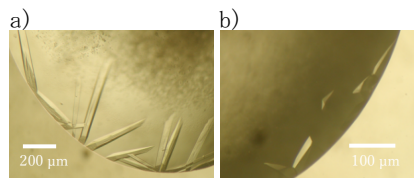


図5 中性付近の MexB 結晶
結晶化条件: a) 0.1M MES (pH 6.5), 0.2M Magnesium acetate, 7% (w/v) PEG3350; b) 0.1M HEPES (pH 8.0), 0.1M KCl, 9% (w/v) PEG4000

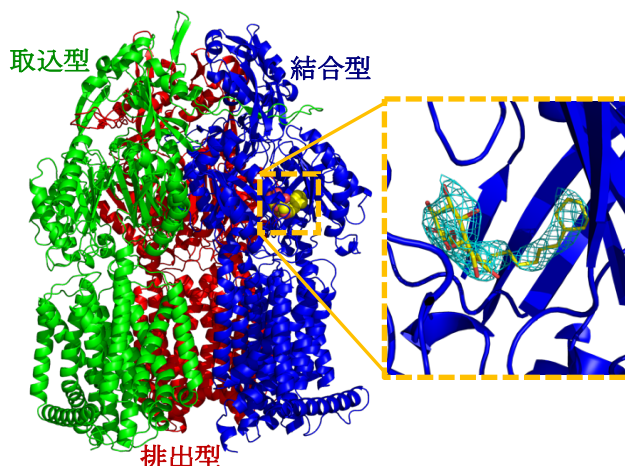


図6 pH6.5MexB構造

pH8.0MexB構造も、本図と同様に3量体で非対称な構造 (取込型、結合型、排出型) で、結合型には CY7 が結合していた。

非対称な構造 (取込型、結合型、排出型) を持っていた (図6)。さらに、結合型構造の結合サイトには精製に用いた界面活性剤 CY7 の電子密度があった (図6)。3つの異なる pH から得られている結晶構造について、非対称な各単量体の構造比較を行ったところ、結合型、排出型は RMSD が 1.0 \AA 以下と pH によって構造の差異はほとんどなかったが、取込型については pH6.5 だけが、他2つの構造に対して差異が大きかった (表2)。大きな差異があった取込型の構造を重ねると、結合サイトの入口に存在する一つのドメインの位置が大きく異なっており、pH6.5 では入口が他の2つに比べて広く開いていた (図7)。

RND型多剤排出トランスポーターと基質との分子量比が非常に大きく、かつ、精製時に用いる界面活性剤の影響で、これまで基質との相互作用の定量的なデータを蓄積できなかったが、本研究を遂行したことによって、界面活性剤非存在下の条件でRND型多剤排出トランスポーターを安定に保つ方法

表2 構造比較 ($C\alpha$ 原子の RMSD (\AA))

	取込型	結合型	排出型
pH4.5/pH6.5	1.7026	0.6908	0.7908
pH6.5/pH8.0	1.3460	0.4983	0.5063
pH8.0/pH4.5	0.9528	0.6504	0.6268

を見出し、熱力学的なパラメーターから定量的な結合能が得られる ITC を利用できる測定条件の確立に成功し、一定の結合力を持つ阻害剤あるいは基質の定量的な情報が得られた。また、阻害剤や複数の基質について、ITC と DSC を用いて相互作用解析を行った結果、結合力が弱い基質に対しては、DSC で熱量変化を観測できることが分かった。これらにより、RND 型多剤排出トランスポーターと基質との相互作用解析を効率的に行う手法を示すことができ、解析を網羅的に進められるようになった。相互作用の可視化については、中性付近の結晶が得られたことにより、酸性条件では扱えなかった基質や阻害剤の結合型構造が得られると期待できる。本研究により、相互作用解析及び結晶構造解析のための基礎的な条件を決定することができたが、今後、この基礎的な条件を使ってより多くの基質について解析を進める必要がある。特に、結晶構造解析は精緻な構造が得られるので、異なる pH における基質との結合型構造解析を進め、pH 変化による詳細な構造変化の

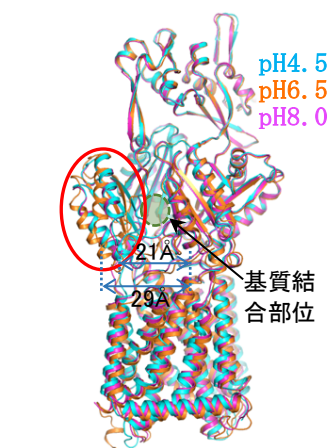


図7 排出型構造の重ね合わせ
pH6.5MexB 構造だけ、赤丸の部分で大きな構造の差異を確認。
の情報も重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Takaaki, Okada Ui, Hung Li-Wei, Yamashita Eiki, Kim Heung-Bok, Kim Chang-Yub, Terwilliger Thomas C., Schweizer Herbert P., Murakami Satoshi	4. 巻 120
2. 論文標題 Crystal structures of multidrug efflux transporters from Burkholderia pseudomallei suggest details of transport mechanism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2215072120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2215072120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryou Yonehara, Etsuko Ishizaka-Ikeda, Atsushi Nakagawa, Eiki Yamashita
2. 発表標題 Crystal structure of RND-type multidrug transporter MexB from Pseudomonas aeruginosa at near neutral pH
3. 学会等名 26rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田雄士, 米原涼, 池田悦子, 中川敦史, 山下栄樹
2. 発表標題 多剤排出トランスポーターMexBの中性付近の結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田雄士, 荒谷剛史, 米原涼, 池田悦子, 堤研太, 中川敦史, 山下栄樹
2. 発表標題 緑膿菌由来膜融合タンパク質MexXの機能解明に向けた構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

薬剤排出タンパク質複合体の構造生命科学研究
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/research/theme/yakuzai-haisyutu/>

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
研究協力者	堤 研太 (Tsusumi Kenta)		
研究協力者	永野 皓太 (Nagano Kouta)		
研究協力者	上田 雄士 (Ueda Yushi)		
研究協力者	中川 敦史 (Nakagawa Atsushi)		

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
---------	---------