

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22370044

研究課題名（和文） BAM 複合体による細胞膜タンパク質輸送機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the outer membrane BAM complex

研究代表者

ジェレミー テイム (J・R・H Tame)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：00336588

研究成果の概要（和文）：

多剤耐性菌の出現により、抗生剤が効かない病原菌で社会的に大きな問題となっている。特にグラム陰性の病原菌が世界に広がっており、大きな問題になっている。そこで本研究では多剤耐性グラム陰性菌に有効な新規薬剤標的分子として BAM (β -barrel assembly machinery) 複合体の構造生物学的な基盤構築を行い、新規薬剤の開発を研究目的である。

BAM 複合体はグラム陰性菌の外膜生合成で中心的な役割を担う装置であり、菌の生存に必須な機能を有する。しかし、新規薬剤開発のための構造基盤の情報は少なく、我々は、BamA-D をターゲットとし、発現系構築に成功し結晶化を試みたが、良好な結晶を得る事は出来なかった。そこで、我々は BamC と BamD の複合体での機能解析や、結晶化に成功した。BamC と BamD の X 線小角散乱 (small angle X-ray scattering) 法や分析超遠心 (AUC) により、溶液中での相互作用を確認する事が出来た。また、複合体での微結晶ながら X 線による反射点も確認する事が出来たが、構造決定までには結晶化の最適化が必要である。引き続き、結晶化条件の最適化と、Bam 機構解析を行う。

研究成果の概要（英文）：

Gram negative bacteria require the BAM complex for the insertion of membrane proteins into the outer membrane. This essential complex consists of five proteins, the large transmembrane barrel being BamA. BamA carries five POTRA domains at its N terminus which interact with other proteins in the complex. Only BamA and BamD are essential, but the roles of these proteins is unknown. We have solved the crystal structure of an outer membrane protein, Hbp, and studied the interaction between BamC and BamD. The Hbp beta-barrel is a substrate of BAM, but the interactions between the two are unclear. We have shown that BamC and BamD interact to give a flexible complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2012 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物学

キーワード：膜タンパク質、抗生剤、結晶

1. 研究開始当初の背景

現在多剤耐性細菌が増えてくる。黄色ブドウ球菌は170類ほどの抗生物質に耐性を発達した。この真剣な問題はこれからまだ悪くなれば、持っている抗生物質は無効になる。新しい薬剤を発明と発見するために、細菌のまだ触れない弱点の利用が必要である。グラム陰性細菌は二つの膜を持つ。外膜の中に、色々膜貫通タンパク質がある。このタンパク質をフォールドするBAM複合体は必須だから面白いドラッグターゲットである。また、抗生剤が効かない多剤耐性菌の出現が社会的に大きな問題となっている。特にグラム陰性菌の仲間である緑膿菌 (*P. aeruginosa*) およびアシネトバクター (*A. baumannii*) が世界で蔓延しており、この状態が続けば医療崩壊につながるのではと危惧されている。この深刻な状況を打開するための最も有効な方法は新規薬剤の開発であるが、残念ながらその進展は見られていない。

2. 研究の目的

本研究では、多剤耐性グラム陰性菌に有効な新規薬剤標的分子としてBAM(β -barrel assembly machinery)複合体の機能と構造解明を行い、新規薬剤の開発を研究目的である。BamAは膜貫通バレルとN末端POTRAドメインを含む。POTRAドメインは基質タンパク質とBamBとBamDをくっつけていると考えられている。BamCはBamDと一緒に複合体を作ることができる。BamCとBamD相互作用部位の解析でBamCを真似する化合物を設計する。BamBは基質タンパク質をくっ付けることができると報告されたがまだ確認していない。

3. 研究の方法

- ①Hbp膜貫通部分を結晶化する。
- ②BamAのPOTRAドメインとBamB, BamCとBamDを結晶化する。
- ③生物物理的手法で、相互作用を確認する。
- ④BamDの構造を基にin-silico計算による化合物の探索

4. 研究成果

①Hbpのpassengerドメインの構造はもう決定されたが、膜貫通部分は決めっていなかった。様々な断片を発現実験を行い、結晶ができる部分があった。この構造から、新しいペプチド切断メカニズムが明らかになった。BamAと相互作用領域はbetabarrelストランドになる。BamBの相互作用は確認できてい

なかった。

②BamAは五つのPOTRAドメインを持つ。このドメインを発現し結晶化したが、三つのドメインが切断した。

③X線小角散乱でBamCとBamD

の複合体の形を調べた。BamCのN末端とC末端の間にあるリンカーは柔軟であると分かった。

④BamDの界面は薬剤に会うポケットがないから、結合している低分子は見つかっていない。今後、BamCの構造を基新しい化合物を設計と実験行う予定である。また、BamDの結晶は得られたが、現在最適化を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Campbell, K. L., Roberts, J. E., Watson, L. N., Stetefeld, J., Sloan, A. M., Signore, A. V., Howatt, J. W., Tame, J. R. H., Rohland, N., Shen, T. J., Austin, J. J., Hofreiter, M., Ho, C., Weber, R. E. & Cooper, A. (2010). Substitutions in woolly mammoth hemoglobin confer biochemical properties adaptive for cold tolerance. *Nat Genet* **42**, 536-40.
2. Nishimura, K., Tajima, N., Yoon, Y. H., Park, S. Y. & Tame, J. R. H. (2010). Autotransporter passenger proteins: virulence factors with common structural themes. *J Mol Med* **88**, 451-8.
3. Nishimura, K., Yoon, Y. H., Kurihara, A., Unzai, S., Luirink, J., Park, S. Y. & Tame, J. R. H. (2010). Role of domains within the autotransporter Hbp/Tsh. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 1295-300.
4. Rajasekar, K., Muntaha, S. T., Tame, J. R. H., Kommareddy, S., Morris, G., Wharton, C. W., Thomas, C. M., White, S. A., Hyde, E. I. & Scott, D. J. (2010). Order and disorder in the domain organization of the plasmid partition protein KorB. *J Biol Chem* **285**, 15440-9
5. Soprova, Z., Sauri, A., van Ulsen, P., Tame, J. R. H., den Blaauwen, T., Jong, W. S. & Luirink, J. (2010). A conserved aromatic residue in the autochaperone

domain of the autotransporter Hbp is critical for initiation of outer membrane translocation. *J Biol Chem* **285**, 38224-33

6. Tajima, N., Kawai, F., Park, S. Y. & Tame, J. R. H. (2010). A novel intein-like autoproteolytic mechanism in autotransporter proteins. *J Mol Biol* **402**, 645-56

7. Malay, A. D., Watanabe, M., Heddle, J. G. & Tame, J. R. H. (2011). Crystal structure of unliganded TRAP: implications for dynamic allostery. *Biochem J* **434**, 427-34

8. Tame, J. R. H. (2011). Autotransporter protein secretion. *BioMol Concepts* **2**, 525-536

9. Tame, J. R. H. (2011). 4000 holes. *J Mol Biol* **412**, 551-2

10. Hansman, G. S., Taylor, D. W., McLellan, J. S., Smith, T. J., Georgiev, I., Tame, J. R. H., Park, S. Y., Yamazaki, M., Gondaira, F., Miki, M., Katayama, K., Murata, K. & Kwong, P. D. (2012). Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J Virol* **86**, 3635-46

11. Matsunaga, Y., Koike, R., Ota, M., Tame, J. R. H. & Kidera, A. (2012). Influence of structural symmetry on protein dynamics. *PLoS One* **7**, e50011

12. Noguchi, H., Campbell, K. L., Ho, C., Unzai, S., Park, S. Y. & Tame, J. R. H. (2012). Structures of haemoglobin from woolly mammoth in liganded and unliganded states. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 1441-9

13. Yoshida, H., Kawai, F., Obayashi, E., Akashi, S., Roper, D. I., Tame, J. R. H. & Park, S. Y. (2012). Crystal structures of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the apo and cefotaxime-bound forms. *J Mol Biol* **423**, 351-64

14. Nishiyama, T., Noguchi, H., Yoshida, H., Park, S. Y. & Tame, J. R. H. (2013). The structure of the deacetylase domain of *Escherichia coli* PgaB, an enzyme required for biofilm formation: a circularly permuted member of the carbohydrate esterase 4 family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 44-51

[学会発表] (計 6 件)

1. Jeremy Tame “Thermodynamics and ligand binding”. Gordon conference

“Computer-aided drug design”. Tilton, NH, USA. July 18-24, 2009.

2. Jeremy Tame “Fifty years of globins”. European Crystallography Meeting, Istanbul, Turkey. August 16-21, 2009.

3. Jeremy Tame “Influenza RNA polymerase”. RNA Society Meeting, Nottingham University, England. April 15, 2010.

4. Jeremy Tame “Animal hemoglobins”. Allosteric cooperativity. Bari University, Bari, Italy. May 29 - June 1, 2010.

5. Jeremy Tame “Drug design”. J-CUP II. Tokyo. May 19-20, 2011.

6. Jeremy Tame “Scoring functions”. CUP meeting, Santa Fe. March 5-7, 2012.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www-mls.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/pdl/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ジェレミー テイム (J・R・H Tame)

横浜市立大学 生命医科学研究科 教授

研究者番号：00336588

(2) 研究分担者

朴 三用 (PARK SAM-YONG)

横浜市立大学 生命医科学研究科 教授

研究者番号：20291932

雲財 悟 (Unzai Satoru)
横浜市立大学 生命医科学研究科 助教
研究者番号：60336592

(3) 連携研究者
()

研究者番号：