

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370045

研究課題名(和文)細菌の TolC 共役型異物排出タンパクの X 線結晶構造解析

研究課題名(英文) Crystallographic study of multidrug efflux proteins coupled with outer membrane channel TolC

研究代表者

中島 良介 (NAKASHIMA, RYOSUKE)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：20379100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000 円

研究成果の概要(和文)：しばしば多剤耐性化して臨床の場で問題となっている緑膿菌の主要な耐性因子 MexB (TolC 共役型) の結晶構造解析に成功し、次いで特異的阻害剤との結合構造も解明した。これにより現有的特異的阻害剤がユニバーサル阻害薬とならない理由が判明した。この他、最終年度には新たに基質結合構造の解析にも成功した。これらは異物排出トランスポーターオリエンテッドな、構造に基づいた創薬の足がかりとなる成果である。

研究成果の概要(英文)：Xenobiotic extruding pumps have recently been known to be widely distributed in living organisms from mammalian to bacteria as a host-defense mechanism in cellular level. These pumps confer multidrug resistance for cancer cells and pathogenic bacteria. We had reported the first inhibitor-bound structures of MexB which couples with TolC type outer membrane channel. Additionally, we succeeded in solving the crystal structure of new substrate binding MexB. These are result to lead to transporter-oriented structure based drug development.

研究分野：構造生物学

キーワード：異物排出トランスポーター 立体構造 多剤耐性

1. 研究開始当初の背景

私たちが 2002 年に RND 型異物排出膜輸送体 AcrB の構造を世界に先駆けて解析した頃には、膜を介して物質の移動を仲介する膜輸送体の構造決定は全くなされていなかったが、その後のおよそ 10 年の間に LacY など多くの特異的膜輸送体の構造決定がすすみ、また、ABC 型多剤排出輸送体 MDR の構造も解かれるなど、膜輸送体の構造解析は格段に発展した。しかしながら当時において(現在においても)依然として結晶構造解析の難しいタンパク質群であることに違いなく、また、AcrB 以外には構造解析によって輸送機能が良く理解できたというところまでは到達したものは無かった。TolC 共役型としては AcrB 以外は構造の解かれた物はなかった。そこで本研究では、解析対象を TolC 共役型排出トランスポーターに絞る事とした。MacB は ABC 型排出蛋白で TolC と共役している。これについては、細菌の病原性とも深く関わっているので、本来の基質の探索と組み合わせで大変興味深い。EmrB は MFS 型でありながら TolC を必要とする。しかし、分子サイズから MFS 型として推定される 12 ~ 14 回膜貫通構造では TolC との共役に必要なペリプラズム側ループを構成する余裕がない。この他、大腸菌には全部で 8 種類の TolC 共役型排出蛋白があるが、TolC と共役する配列モチーフなどは一切わかっていない。これらの共通性は、構造決定により初めて明らかにすることが出来る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、異物排出トランスポーターの立体構造を世界で初めて決定し、さらに基質結合型結晶構造の決定によって、異物排出の全く新しい機構である機能的回転輸送機構を解明した実績の上に立って、異物排出トランスポーター構造の多様性と異物認識の普遍性の問題を解明し、異物排出トランスポーターオリエンテッドの創薬に繋げることである。

細菌には AcrB 以外にも機能上、構造上大変興味深いものがいくつも存在する。それらの構造を解き明かすことは、異物認識・排出の普遍的な機構を知る上で必須であるばかりでなく、異物排出タンパクの本来の生理的役割を解明し、多剤耐性を克服する新たな創薬ターゲットを開発する上でも大変重要である。本研究では、異物排出蛋白質の中でも特に、生理的に重要な役割を果たしていると考えられる外膜チャネル TolC 共役型の異物排出タンパクに焦点を絞り、その結晶化と構造決定を行う。

3. 研究の方法

膜タンパク質結晶化の成否は、如何に良質の精製標品を得るかに懸かっている。しかし、トランスポーター精製標品の質の判断に最も有効な活性、つまり輸送活性を測定するの

は容易ではない。まして、ToIC 共役型のトリパルタイト輸送体ともなると再構成に成功した報告も無い。分子サイズの均一性、変性温度からの安定性評価から標品の質を見積もることとする。均一性はゲルろ過、動的光散乱、あるいは静的光散乱を用いて評価する。もう一つの膜タンパク質結晶化における重要なファクターは、用いる界面活性剤の選択にある。近年、市販され利用可能な界面活性剤の種類は著しく増えた。これらは高価だが、資金的裏付けを持ってふんだんに利用する事が出来れば、それだけでも成功の可能性は高まる。本研究課題では構造上結晶化に有利と考えられる特徴を持ち、大量発現に既に成功している MacB を第一のターゲットに、その結晶化に取り組む。

4. 研究成果

(1) 緑膿菌はしばしば多剤耐性化して臨床の場で問題となっているが、多剤排出タンパクがこの耐性化の主要な原因である。また現状ではこの病原菌に対する有効な治療薬はない。24 年度は、感染症の原因菌である緑膿菌の持つ RND 型多剤排出タンパク(TolC 共役型) MexB の結晶構造を解くことに成功し、次いで特異的阻害剤 (ABI-PP) との結合構造の解析にも成功した。これは異物排出トランスポーターオリエンテッドな構造に基づいた創薬の足がかりとなる成果である。ABI-PP は MexB に限らず大腸菌 AcrB の優秀な阻害剤であるが、一方で緑膿菌の多剤耐性に重要なもう一つの排出タンパク MexY を阻害できない。そこで AcrB と MexB の ABI-PP 結合構造を決定した。これにより阻害剤結合ピットの存在が明らかとなった。このピット入り口付近には、AcrB、MexB では Phe178 が位置し阻害剤との相互作用に重要な役割を果たしているが、MexY (ホモロジーモデル) では Trp177 であり、その大きな側差が ABI-PP と立体的な障害となっていることが予想された。AcrB/F178W 変異体では ABI-PP による阻害を受けなくなり、逆に MexY/W177F 変異体では ABI-PP に阻害されるようになったことはこの推定を裏付けるものであった。ところが、MexB/F178W 変異体は依然として ABI-PP に感受性を保っていた。この原因を明らかとする

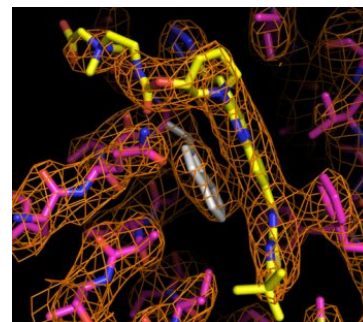


図 1 : MexBF178W の ABI-PP 結合型構造 (結合部位拡大図)

ために、MexB/F178W の ABI-PP 結合構造を決定した(図1)。結果は野生型と同じピットに結合しており、Trp は Phe の代わりに機能していた。AcrB と MexY で Trp 側差に立体障害を回避して同様の配向をとらせるために V139A(AcrB), I138A(MexY)変異体を作成した。今度はいずれも ABI-PP に阻害される性質を示した。これにより異物排出タンパクの ABI-PP 阻害特異性は、その結合ピットの立体障害により決まることが明らかになった(Nature, 500, 2013)。

MexB は基質を加えなくともタンパクの安定化に用いる界面活性剤(DDM)を結合したいわゆる基質結合型として構造解析されたため、抗生剤等の結合型を調整することができなかった。26年度は DDM 以外の界面活性剤を用いることで非基質結合型を調整すること、DDM 存在下であっても結合しうる基質の探索に取り組んだ。その結果、新しい基質結合型結晶を作成して 3.6 分解能での構造決定に成功した。これまでに得られていた ABI-PP 結合サイトとも、DDM 結合サイトとも明確に異なる結合位置が判明した(図2)。

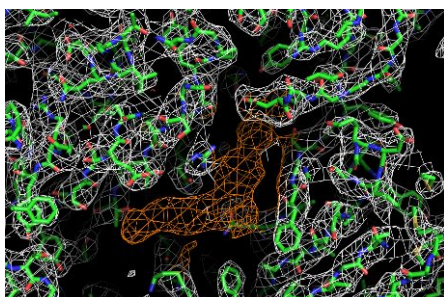


図2. MexB の新規基質結合サイト

基質由来の電子密度をオレンジで示した

(2) 多剤排出タンパク MacB は膜融合タンパク MacA、外膜チャンネル TolC と三者複合体を形成して機能する。しかしそのストイキオメトリーの詳細は分かっていない。25年度は MacB 単独での結晶構造解析を目指した研究と平行して、複合体の結晶化を見据えて結合量比を解明する研究を行った。MacA、MacB の量比を変えてリンカーでつないだ融合タンパクの構築を目指して、まず 1:1 の量比の融合タンパクを構築した。Western Blotting により、設計通りの MacB-linker-MacA が細胞膜に発現していることを確認した。また、MacB-linker-MacA 発現株で MIC が上昇したことから、融合タンパクが薬剤排出活性を有している事を示した。MacA は六量体の結晶構造が解かれ、これが機能単位であることが示唆されている。また MacB は NBD ドメインを持ち、二量体で機能すると考えられている。このことから従来は、MacA と MacB は 3: 1 の比で結合しているというのが有力であった。今回、MacB-linker-MacA(1:1)が排出活性を示した事から 1: 1 の比で機能することが新たに判

明した。

これまでに TolC 共役 ABC 型排出タンパク MacB の大量発現を達成し、可溶化に適した界面活性剤の絞込みは完了していたが、断片化の問題が結晶化の大きな障害になると考えられた。大腸菌発現系ではタグ精製後も夾雑物が含まれ、このうちの幾つかは末端の His-tag を含む MacB 断片であることが判明した。他のバンドも MacB の断片であることが予想される。これに対して無細胞発現系を用いると断片化を回避できる事を見出した。小麦胚芽を利用した無細胞発現系を用いた場合、精製 MacB 画分は勿論のこと、MacB 発現リポソーム画分にも断片は観測されない(図3)。

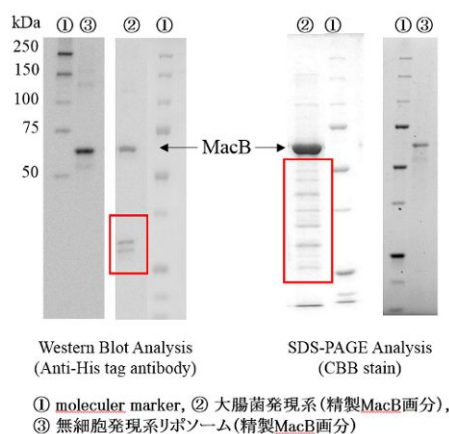


図3. MacB 発現系の比較

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6件)

Akihito Yamaguchi, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Structural basis of RND-type multidrug exporters, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, Vol.6, 2015, pp. article327,

doi: 10.3389/fmicb.2015.00327

Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Seiji Yamasaki, Katsuhiko Hayashi, Chikahiro Nagata, Kazuki Hoshino, Yoshikuni Onodera, Kunihiko Nishino, Akihito Yamaguchi, Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters, *Nature*, 査読有, Vol.500, 2013, pp. 120-6,

doi: 10.1038/nature12300

[学会発表](計31件)

山口明人、中島良介、櫻井啓介、異物排出の構造的基盤、生体エネルギー研究会 第40回討論会、2014年12月11-13日、愛媛

林克彦、中島良介、山崎聖司、櫻井啓介、北川公恵、西野邦彦、山口明人、大腸菌多剤

排出トランスポーターAcrAB の機能複合体の構成比、第 14 回 蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 25-27 日、大阪

中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、林克彦、西野邦彦、山口明人、多剤排出タンパクの阻害剤結合構造、生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2013 年 11 月 21-22 日、東京

中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、林克彦、西野邦彦、山口明人、多剤排出タンパク AcrB, MexB の阻害剤結合構造、第 8 回トランスポーター研究会、2013 年 6 月 15-16 日、熊本

中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、西野邦彦、山口明人 "多剤排出トランスポーターの基質認識と排出機構、第 12 回 日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 22 日、愛知

〔図書〕(計 1 件)

中島良介、櫻井啓介、山口明人、羊土社、「実験医学増刊号 構造生命科学で何がわかるのか、何ができるのか」、2014 年、106-112

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/cm/b/>

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・特任准教授

研究者番号：20379100