

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292057

研究課題名(和文)感染症原因菌の悪性化を統御するクオルモン - 受容体膜タンパク質複合体の結晶構造解析

研究課題名(英文) Crystal structure analysis of quorumon-receptor membrane protein complex that controls the expression of virulence factor in the pathogen

研究代表者

永田 宏次 (Nagata, Koji)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：30280788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：FsrC-GBAP複合体およびFsrC-GBAP拮抗阻害剤複合体の結晶化で得られた結晶について大型放射光施設にてX線回折実験とデータ解析を行った結果、得られた一群の結晶は、FsrC精製試料に微量混在していた宿主大腸菌由来の膜タンパク質AcrBのものであると判明した。2種類の結晶のうち片方は新規の状態の結晶構造であった。AcrBはグラム陰性菌の多剤排出輸送体として機能するため、細菌感染症予防研究に資する成果と期待し、最終構造決定に向けて構造解析を続ける。また、FsrC-GFP融合タンパク質の発現の際にプロテアーゼ阻害剤を共発現させることにより発現量が数倍向上することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We performed X-ray crystallographic analysis of the crystals obtained from the purified sample of FsrC that was supplemented with GBAP (an agonist) or an antagonist. The analysis revealed that the crystals obtained did not contain FsrC but instead contain AcrB, an E coli membrane protein involved in multidrug efflux. There were two kinds of AcrB; one was the crystal of the know AcrB structure, whereas the other was the crystal of a new AcrB structure. The analysis of the latter crystal structure is in progress because this crystal structure is as an important target as the FsrC structure. In addition, we found that the expression level of FsrC-GFP fusion protein was improved by coexpressing some kind of protease inhibitor.

研究分野：構造生命化学

キーワード：膜タンパク質 結晶構造解析 細菌 抗菌 多剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

同一種の菌体の密度に依存して遺伝子発現が制御される機構を、クオラムセンシング（菌体密度依存的遺伝子発現制御機構）と呼ぶ。病原性細菌の病原因子発現がクオラムセンシングにより制御されている例が多いことから、この現象に着目した種特異的に作用する新規抗菌剤の開発が期待されている。

腸球菌 *Enterococcus faecalis* は、ヒトを含む哺乳類の腸管内に存在する常在菌であり、病原性は弱く通常であれば害はないが、抵抗力が低下した患者に対する日和見感染する例が知られ、敗血症などを引き起こす。多剤耐性菌（バンコマイシン耐性腸球菌、VRE）も存在し、特に欧米で院内感染の主要原因菌の1つとして知られているが、近年我が国でもVRE 院内感染による死亡例が何件も発生している。

腸球菌の病原因子（分泌性ゼラチナーゼ）発現は、以下のクオラムセンシングにより制御されている。

(1) 個々の腸球菌細胞は環状ペプチド GBAP (gelatinase biosynthesis-activating pheromone)を恒常的に菌体外に分泌している。(2) 菌密度の上昇に伴い菌体外の GBAP 濃度も上昇し、菌密度が閾値を超えると、病原因子ゼラチナーゼの遺伝子発現が誘導される。(3) GBAP 濃度の上昇にตอบสนองするのは、腸球菌の細胞膜上に存在する GBAP 受容体 FsrC と転写活性化因子 FsrA からなる 2 成分制御系である。GBAP が FsrC に結合すると、FsrC 細胞内ドメインのヒスチジンキナーゼが活性化され、自身のヒスチジン側鎖をリン酸化し、そのリン酸基を FsrA のアスパラギン酸側鎖に転移する。リン酸化された FsrA は、標的 DNA に結合し、ゼラチナーゼ遺伝子の転写を活性化する。(4) GBAP は膜タンパク質である GBAP 輸送体 FsrB の一部として前駆体ペプチドが生合成される。その後、FsrB のシステインプ

ロテアーゼ活性による自己切断と GBAP 前駆体の環化反応とにより、成熟型 GBAP が合成されると推測される。FsrB は GBAP の細胞外への分泌にも関与している。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記クオラムセンシングに関与する

(a) FsrC とクオルモン GBAP との複合体（活性型複合体）

(b) FsrC と GBAP 拮抗阻害剤（分担者中山二郎博士が発見）との複合体（不活性型複合体）の2つを標的とし、X線結晶構造解析により、これらのリガンド-受容体膜タンパク質複合体の立体構造を決定し、新世代の抗生物質の開発に結びつけることを目的とした。腸球菌の GBAP-FsrA-FsrB-FsrC 系と類似のクオラムセンシング系として、やはり院内感染の原因菌であるメシチリン耐性ブドウ球菌 (MRSA) の AIP-AgrA-AgrB-AgrC 系が知られている。他にも、人畜共通感染症の原因菌であるリステリア菌、食中毒の原因菌であるクロストリジウム属菌（ウェルシュ菌やボツリヌス菌）など他のグラム陽性細菌にもクオラムセンシング系が存在し、病原因子の発現を制御している。クオルモン拮抗阻害剤は、既存の微生物群の生育状態に影響を与えずに、種特異的に作用し、病原性の発現のみを遮断する効果が期待される。ヒトに有益な菌と有害な菌とを区別せずに攻撃する従来の抗生物質と異なり、この薬剤は、病原性の発現のみを遮断するという点で、画期的である。

本研究を進める過程で、上記(a)(b)の複合体の結晶と考えていたものが、実際には発現用宿主として用いた大腸菌由来の多剤排出輸送体 AcrB の結晶 2 種類であることが明らかになった。一方は既報の結晶構造と同一であったが、他方はまだ報告されていないリガンド（おそらく抗生物質）で飽和した不活性型

AcrB 結晶構造と考えられるため、当初の目的から多少外れるが、これも細菌感染症予防研究に資する成果と期待されるため、その構造解析を進めた。

### 3. 研究の方法

FsrC の大腸菌 C41(DE3)を宿主とする高発現系および精製系と GBAP・GBAP 拮抗阻害剤の化学合成系を確立し、FsrC-GBAP 複合体および FsrC-GBAP 拮抗複合体の結晶化を蒸気拡散法と脂質立方晶法により行った。途中から発現宿主を C41(DE3) *acrB* に変更した。FsrC の発現量を可視化するために緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現した。

得られた結晶の X 線回折実験は大型放射光施設 (SPring-8 および Photon Factory) にて行った。結晶構造解析は、所属研究室および大型放射光施設のソフトウェアを用いて行った。

### 4. 研究成果

FsrC の調製について、FsrC 発現用プラスミドを保有する組換え大腸菌の集菌後の精製と結晶化を一両日中に完了する系を確立した。結晶化については、蒸気拡散法と脂質立方相法の両法を用いて行った。

FsrC-GBAP 複合体および FsrC-GBAP 拮抗阻害剤複合体の結晶化で得られた結晶について大型放射光施設 (SPring-8 と Photon Factory) にて X 線回折実験とそのデータ解析を行った結果、20-25% PEG400 または PEG500DME または PEG550MME を沈殿剤として pH 7.0~9.0、20 で得られた一群の結晶は、FsrC-GBAP 複合体や FsrC-GBAP 拮抗阻害剤複合体の結晶ではなく、FsrC 精製試料に微量混在していた宿主大腸菌由来の膜タンパク質 AcrB の結晶であることが明らかになった。AcrB 結晶は 2 通りあり、一方

は空間群  $R32$ 、格子定数  $a = b = 144.8$ 、 $c = 515.6$  で既報の AcrB 構造と同一の結晶構造を有しており (図 1(a))、他方は空間群  $R32$ 、格子定数  $a = b = 134.0$ 、 $c = 519.5$  で空間群は同じであるが  $a$  軸、 $b$  軸が 10.8 短く、 $c$  軸が 3.9 長くなっており、既報の AcrB 構造と異なる状態の構造であった (図 1(b))。

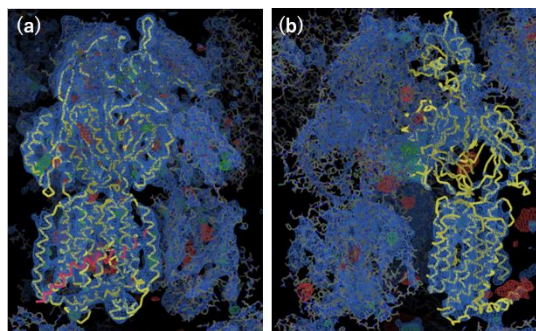


図 1. AcrB の結晶構造 2 種類。(a)既報の構造と同一の構造、(b)既報の構造からずれが生じている新規状態の構造。

AcrB はグラム陰性菌において多剤排出輸送体として機能するホモ 3 量体膜タンパク質であり、すでにその結晶構造は報告されている。しかし、我々が解いた AcrB 結晶構造には、3 つのサブユニットいずれにもリガンドが結合しており、AcrB の薬剤排出を阻害している状態の新規構造と考えられるため、細菌感染症予防研究に資する成果と期待され、当初の目的から多少外れるが、このまま分解能向上および最終構造決定に向けて構造解析を続ける。

上記の FsrC 精製試料では AcrB のバンドは SDS-PAGE では確認されなかったが、AcrB の安定性と結晶性の高さから、ごく微量混在した AcrB が結晶したのと考えられた。AcrB 不含の FsrC 試料を調製するために、AcrB 遺伝子を破壊した C41(DE3) *acrB* 株を使用して FsrC 発現・精製・結晶化を行い、結晶を得たが最高分解能 7 で構造解析には至らなかった。そこで、FsrC の安定性を向上させるべく、Cys 残基を

Ala/Ser に置換する変異、次にヒスチジンキナーゼ活性を恒常的に活性型または不活性型に固定する変異(リン酸化される His 残基を Glu または Val 残基に置換)を導入したが、これまでに良質の結晶は得られていない。今後、FsrC 等の膜タンパク質の安定性をさらに増強させて結晶性を向上させる変異導入を進める。

FsrC の発現検討においてプロテアーゼ阻害剤を共発現させることにより FsrC と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質の発現量が数倍向上することを見出した(図2)。現在、他の膜タンパク質発現への効果とまとめて論文発表する予定である。

PX type	R	R	MR	MR	M	M
IPTG	-	+	-	+	-	+

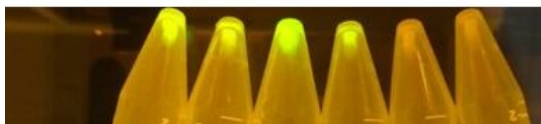


図2. FsrC-GFPとプロテアーゼ阻害剤PXとの共発現による FsrC-GFP の発現量増大。PX として R, MR, M の3通りを試した。R と MR の共発現で FsrC-GFP の発現量が数倍向上した。

## 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0件)

プロテアーゼ阻害剤の共発現により FsrC の発現量が向上することを他の膜タンパク質発現への効果と合わせて、論文発表する予定である。

AcrB (リガンド結合不活性型)の結晶構造が解け次第、論文発表する予定である。

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

永田 宏次 (NAGATA, Koji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：30280788

### (2)研究分担者

中山 二郎 (NAKAYAMA, Jiro)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40217930