

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06079

研究課題名(和文)三者複合体形成型ABC輸送体MacBによる基質輸送機構の解明

研究課題名(英文)Structural and functional analysis of tripartite ABC transporter MacB

研究代表者

岡田 有意 (Okada, Ui)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：20507181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ATPを利用して基質を能動輸送するATP-binding cassette (ABC) 輸送体のうち、外膜チャンネルと膜融合蛋白質と複合体を形成して基質の輸送を行う三者複合体形成型輸送体MacBについて、その基質輸送機構を解明することを目的とした。2017年に我々は分解能3.4オングストロームでMacBの結晶構造を明らかにしたが、本研究では新たに別のMacBホモログで分解能2.0オングストロームのより精密な構造解析に成功した。さらに複数の別条件の結晶からも構造を得た。それらの構造を比較することにより、MacBの構造変化が観察され、基質輸送機構の理解につながる新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の対象であるMacBは、マクロライド系抗生物質やペプチド毒素、リポ多糖等の生物学的に重要な物質の排出に関与しており、その排出機構を解明することは、創薬のみならず生命現象の理解という観点からも非常に有用な情報が引き出せると期待される。本研究で明らかとなったMacBの構造変化は、従来のABC輸送体とは大きく異なるものであった。これらの結果から、詳細が解明されていないMacBを含むVII型ABC輸送体の基質輸送の分子機構について、新たなモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：The macrolide efflux transporter MacB is a member of ATP-binding cassette (ABC) transporter which forms a tripartite efflux complex with a membrane fusion protein MacA and an outer membrane channel TolC. The molecular mechanism of the substrate translocation by MacAB-TolC complex remains largely unknown. We determined the first crystal structure of MacB from *Acinetobacter baumannii* at 3.4 angstrom resolution in 2017. In this study, we have determined the higher resolution structure of MacB homolog at 2.0 angstrom resolution, and several structures from other conditions have also been solved. The structural comparison between these structures revealed the conformational change of MacB, and these results provide new insights into the mechanism of the substrate translocation.

研究分野：構造生物化学

キーワード：構造生物化学 X線結晶構造解析 ABC輸送体 膜蛋白質 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

ATPの加水分解エネルギーを利用して基質を能動輸送する ATP-binding cassette (ABC) 輸送体スーパーファミリーは、全ての生物界に保存されたもっとも大きな輸送体ファミリーの一つである。ABC 輸送体は、ATP を加水分解するヌクレオチド結合ドメイン (NBD) と基質輸送を行う膜貫通ドメイン (TMD) から構成される。多くの ABC 輸送体は、内膜に存在して、基質輸送を単独の蛋白質で行っている。一方、本研究の対象である三者複合体形成型 ABC 輸送体は、外膜を貫通するチャネルと膜融合蛋白質とともに複合体を形成し、細胞質またはペリプラズム空間から外膜を貫いて基質を輸送すると考えられている。大腸菌において、このような三者複合体形成型 ABC 輸送体として、マクロライド系抗生物質を排出する輸送体 MacB が同定された (Kobayashi *et al.*, *J. Bacteriol.* (2001))。MacB は、膜融合蛋白質 MacA、外膜チャネル TolC とともにマクロライド耐性に関わっている。単独で機能する ABC 輸送体は、いくつか構造解析例があり、その基質輸送の機構について様々なモデルが提唱されている。

一方、本研究の対象である三者複合体形成型 ABC 輸送体は、今まで構造解析例が無く、その輸送機構は不明であったが、2017 年に申請者が世界で初めて、アシネトバクター由来のマクロライド輸送体 MacB の立体構造を明らかにした (Okada *et al.*, *Nat. Commun.* (2017))。また、共同研究者らとともに、MacA-MacB-TolC 三者複合体のクライオ電子顕微鏡構造を決定した (Fitzpatrick *et al.*, *Nat. Microbiol.* (2017))。これらの構造解析によって、三者複合体形成型 ABC 輸送体は、一般的な ABC 輸送体と比較して、構造的に異なる特徴をもつことが明らかとなった。しかし三者複合体形成型 ABC 輸送体は、一般的な ABC 輸送体と異なる点が多いが、得られている立体構造情報が少なく、その基質輸送機構について、詳細が不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、独自の輸送機構をもつと考えられる MacB の基質輸送の分子機構の詳細を立体構造情報に基づいて解明することである。従来の ABC 輸送体とは構造的特徴が大きく異なる MacB は、どこでどのように基質を認識するのか、ATP の加水分解による NBD の構造変化がどのように伝搬して基質輸送が行われるのか等、その基質輸送の分子機構について、多くの解明すべき疑問が残っている。

3. 研究の方法

基質輸送の分子機構を解明するためには構造情報が非常に有効だが、本研究では MacB の構造情報を得る手法として X 線結晶構造解析法を用いることとした。これは、詳細な分子機構を議論し解明するには、十分に高解像度の構造情報が必要であり、これを得るためには X 線結晶構造解析が適していると考えたからである。以下により具体的な方法を示す。

複数の生物種由来の MacB ホモログについて、大腸菌を用いた大量発現系を構築し、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせることで精製を行った。膜蛋白質である MacB を水溶液中で取り扱うためには、界面活性剤の添加が必須であるが、どのような界面活性剤を選択するかは、精製標品の安定性や、構造解析のために結晶化した際の結晶の性質に大きく影響するため、その選択が重要である。本研究においても結晶が得られた MacB ホモログについて、複数種の界面活性剤でそれぞれ精製、結晶化を行った。

基質結合型の構造を得るため、MacB の基質となることが報告されているペプチド毒素 (Yamanaka *et al.*, *J. Bacteriol.* (2008)) の大腸菌発現系を構築した。非常に小さな分子であるために、GST と融合発現させ、アフィニティー精製後に、TEV プロテアーゼによって GST を切断す

ることで、ペプチドを精製した。このペプチド基質と別に調製した MacB を混合し、構造解析のために結晶化条件の探索を行った。さらに、エリスロマイシン、アジスロマイシン等のマクロライド系抗生物質等とも MacB を混合し、結晶化条件の探索を行った。また、ヌクレオチド結合型の構造を得るために、ATP や ADP またはそのアナログの存在下で結晶化を試みた。

X 線結晶構造解析では、X 線照射による結晶へのダメージを軽減するために、窒素ガス気流中の低温条件下で回折実験を行うが、そのためには、蛋白質の結晶に抗凍結処理をする必要がある。本研究においても、得られた結晶の抗凍結処理の条件の検討を行った。それらの結晶は、大型放射光施設 SPring-8 において X 線回折実験を行い、結晶の質を評価した。X 線回折実験および構造解析においては、東京工業大学・生命理工学院 村上聡教授、大阪大学・蛋白質研究所 山下栄樹准教授にご協力いただいた。

4 . 研究成果

複数の生物種由来の MacB ホモログについて、結晶化条件の探索に十分用いることのできる純度と収量を確保し調製することに成功した。また、基質となるペプチド毒素の調製にも成功し、別に調製した MacB と相互作用確認の実験を行い、MacB と結合することを確認した。

これらの調製したペプチド基質またはマクロライド系抗生物質と MacB ホモログをそれぞれ混合し、結晶化条件の探索を行ったところ、複数の結晶化条件において MacB の結晶が得られた。そのそれぞれの条件について界面活性剤の種類、沈殿剤の条件、抗凍結処理の条件を最適化した。現在までに得られている最も良質な結晶からは、分解能 2.0 オングストロームのデータが得られ、構造解析に成功した。残念ながら構造解析の結果、基質の結合は確認できなかったが、これは今までに報告されている MacB ホモログの結晶構造解析の分解能 3.3 ~ 3.9 オングストローム (Okada *et al.*, *Nat. Commun.* (2017)、Crow *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2017)、Yang *et al.*, *Nat. Commun.* (2018)) を大幅に上回り、より詳細な議論が可能となった (論文準備中)。さらにその他の条件で得られた結晶についても X 線回折実験を行い、回折像を取得し、それぞれ構造解析に成功した。

さらに、構造解析に成功した MacB ホモログについて、その機能を調べるためにマクロライド排出活性の有無を調べた。複合体を形成する膜融合蛋白質 MacA と外膜チャネル TolC とともに MacB ホモログを大腸菌で共発現させ、マクロライド存在下での最小発育阻止濃度 (MIC) を測定することにより活性測定を行った。もともと MacB によるマクロライド排出活性が多剤排出輸送体 AcrB 等の RND 型輸送体に比べて弱いことに加え、異なる生物種での蛋白質発現のため、MacB ホモログによるマクロライド排出活性は非常に低かった。しかし、従来法よりも精密に MIC を測定する実験系を確立することで、MacB ホモログのマクロライド排出活性を確認した (論文準備中)。確立した MIC 測定法は非常に有用であり、今後 MacB ホモログだけでなく、他の薬剤排出輸送体の活性測定にも利用することができる。

本研究により得られた MacB ホモログの複数の新規構造やこれまでに報告されている MacB の構造を比較することによって、どの部分の構造が大きく稼働するのかが明らかとなった。それは、今までに提唱されていた ABC 輸送体の基質輸送の過程における構造変化とは大きく異なることが明らかとなった。これらの結果等から、MacB を含む三者複合体形成型 ABC 輸送体による基質輸送のモデル "periplasmic alternating access mechanism" を提唱した (Murakami *et al.*, *FEBS Lett.* (2020))。今後、本研究で得られた成果を生かして、さらに基質結合型等の別の状態の構造情報を得ることで、三者複合体形成型 ABC 輸送体による基質輸送の分子機構の詳細を明らかにしたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Bharatham Nagakumar, Bhowmik Purnendu, Aoki Maho, Okada Ui, Sharma Sreevalli, Yamashita Eiki, Shanbhag Anirudh P., Rajagopal Sreenath, Thomas Teby, Sarma Maitrayee, Narjari Riya, Nagaraj Savitha, Ramachandran Vasanthi, Katagihallimath Nainesh, Datta Santanu, Murakami Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Structure and function relationship of OqxB efflux pump from Klebsiella pneumoniae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25679-0	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 岡田 有意、村上 聡	4. 巻 56
2. 論文標題 三者複合体形成型ABCトランスポーターMacBの構造解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 499 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.6_499	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 -
1. 著者名 Murakami Satoshi, Okada Ui, Veen Hendrik W.	4. 巻 594
2. 論文標題 Tripartite transporters as mechanotransmitters in periplasmic alternating access mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3908 ~ 3919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13929	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 Horikawa Tomonari, Hung Li-Wei, Kim Heung-Bok, Shaya David, Kim Chang-Yub, Terwilliger Thomas C., Yamashita Eiki, Aoki Maho, Okada Ui, Murakami Satoshi	4. 巻 74
2. 論文標題 BpeB, a major resistance-nodulation-cell division transporter from Burkholderia cenocepacia: construct design, crystallization and preliminary structural analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 710 ~ 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X18013547	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ui Okada
2. 発表標題 Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from Acinetobacter baumannii
3. 学会等名 PDB50 Anniversary Symposium in Asia (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ui Okada, Eiki Yamashita, Arthur Neuberger, Mayu Morimoto, Hendrik W. van Veen & Satoshi Murakami
2. 発表標題 Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from Acinetobacter baumannii
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ui Okada, Eiki Yamashita, Arthur Neuberger, Mayu Morimoto, Hendrik W. van Veen & Satoshi Murakami
2. 発表標題 Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from Acinetobacter baumannii
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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