

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24年5月14日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19109002

研究課題名（和文） 異物排出トランスポーターの構造・機能・制御と生理的役割

研究課題名（英文） Structures, functions, regulations and physiological roles of xenobiotic exporters

研究代表者

山口 明人 (YAMAGUCHI AKIHITO)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：60114336

研究成果の概要（和文）：構造に基づく異物排出輸送機構の解明においては画期的なパラダイムシフトをもたらす大きな成果が得られた。すなわち、複数のマルチサイト異物結合ポケットの発見とタンパク質の蠕動運動による異物排出のペリスタポンプ機構の解明である。また、異菌種間センシングによる発現制御では、インドールによるサルモネラ異物排出タンパクの誘導機構を詳細に解析し、RamA, RamR の役割を解明した。創薬スクリーニング系として、完備な耐性菌検出デバイスを作成した。

研究成果の概要（英文）：We found out the new proximal multisite drug-binding pocket in AcrB and proposed the periplasmic pumping mechanism of drugs by AcrB. We analyzed the expression regulation of multidrug transporters by indole-mediated sensing between different bacterial species in detail and found the roles of RamA and RamR in *Salmonella*. In addition, we developed the micro-devices for rapid detection of drug resistant bacteria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2008年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2009年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2010年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2011年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
総計	84,400,000	25,320,000	109,720,000

研究代表者の専門分野：生体情報制御学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：異物排出タンパク、多剤排出タンパク、AcrB、X線結晶構造解析、膜タンパク質結晶構造、ペリスタポンプ機構、マルチサイト結合

1. 研究開始当初の背景

異物排出トランスポーター（多剤排出トランスポーター）は、がん細胞から病原細菌に至るまで近年臨床現場で問題となっている多剤耐性の主たる原因の一つである。私たちは、世界で初めて異物排出トランスポーター

の網羅的解析を行い、通常の細菌に数多くの未発見の内在性異物排出トランスポーターが存在することを明らかにし、その発現制御機構を明らかにしてきた。また、世界で初めて、細菌異物排出トランスポーターの結晶構造決定に成功し、多剤認識の構造的基盤がマ

ルチサイト結合であることを明らかにした。本研究は、その成果の上に立って、異物排出のより深い理解を得るために計画された。

2. 研究の目的

(1) **異物認識の構造的基盤の解明**。2006年にミノサイクリンとドキシソルピシン 2 薬剤と AcrB の結合構造決定に成功し、多剤認識の構造的基盤がマルチサイト結合であることを明らかにした。しかし、AcrB の排出スペクトルはきわめて広範囲であり、果たしてマルチサイト結合だけで全てに異物認識を説明できるだろうかという問題が残る。そこで、本プロジェクトではさらに他の薬物との結合構造の決定を試み、マルチサイト結合の普遍性を探る。

(2) **インドールに仲介された異菌種間センシングによる異物排出遺伝子発現制御機構の解明**。異物排出遺伝子の高発現によって多剤耐性がもたらされるため、発現制御機構の研究は大変重要である。私達はこれまで、細菌の環境感知応答システムである 2 成分情報伝達系によって異物排出遺伝子が発現誘導される仕組みを解明してきた。その中で、大腸菌が産生するインドールが、インドールを産生しないサルモネラの異物排出遺伝子を発現誘導する事を見出したので、その情報伝達に係わる因子を同定し、異菌種間センシングによる耐性誘導の仕組みを探る。

(3) **脂溶性情報伝達物質分泌輸送体の探索と解明**。計画調書の段階では本計画は「生理的役割の解明」とのみ述べていたが、中間進捗状況報告で具体的な目標を挙げた。異物排出トランスポーターは両親媒性または脂溶性の物質の排出タンパクである。従って、そのファミリーの中に、これまで全く存在が確認されていない脂溶性情報伝達物質の分泌輸送体が含まれているのではないかと考え、スフィンゴシン 1 リン酸(S1P)分泌輸送体に的を絞って探索し、解明する。

3. 研究の方法

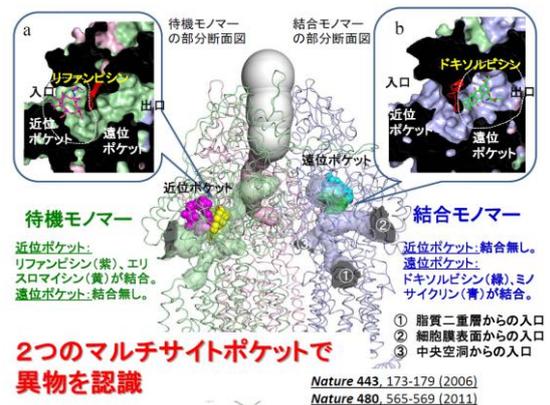
(1) 大分子量薬物と AcrB の共結晶の X 線結晶構造解析。異物排出タンパクと薬物の共結晶構造を、生理的に意味のある非対称 AcrB3 量体において決定するのは大変に難しく。これまでに私達のグループ以外には成功例がなかった。私達も 40 種類近くの薬物との共結晶を検討し、2006 年によくミノサイクリンとドキシソルピシンの 2 薬剤において決定に成功した。そこで、本研究では、その当時共結晶を試さなかった大分子量薬物との共結晶構造を集中的に検討し、リファンピシンとエリスロマイシンの共結晶構造決定に成功した。

(2) サルモネラ AcrB 発現制御因子の網羅的ノックアウトによる探索と解析。

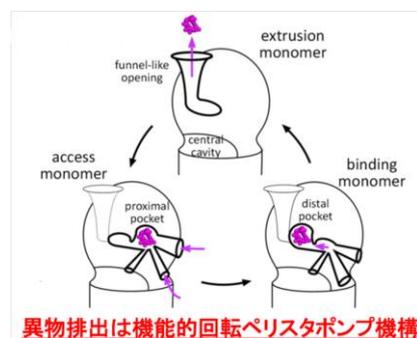
(3) ゼブラフィッシュ心臓発生欠陥変異体の解析による S1P 分泌輸送体 SPNS2 の発見と、SPNS2 ノックアウトマウスの作成と解析。

4. 研究成果

(1) **複数のマルチサイト異物結合ポケットの発見と、ペリスタポンプ機構による異物排出の解明**。リファンピシン、エリスロマイシンの結合構造は実に意外な結果をもたらした。AcrB ホモ 3 量体にただ一つの薬物分子が結合しているという点ではミノサイクリン、ドキシソルピシンと同じだったが、結合しているのが「結合」モノマーではなく、「待機」モノマーであった。結合位置は、ミノサイクリン等の結合するポケット（遠位ポケットと命名）より入口に近い位置にあり、近位ポケットと命名した。両ポケットは基質透過経路に沿って配列しており、両者の間は Phe617 を頂点とする短いループ構造によって区切られていた。「待機」段階では、近位ポケットが活性化していて、まず基質はここ



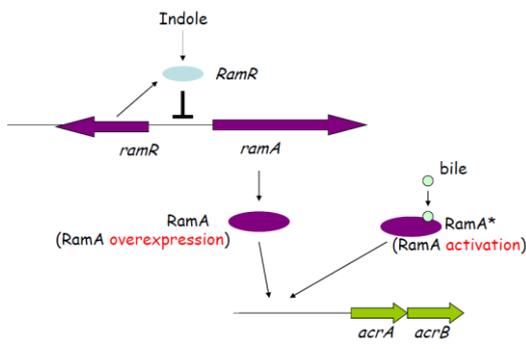
に結合し、次の段階でタンパク質の蠕動運動により「結合」段階では遠位ポケットへ送り込まれると考えられる。基質は、近位→遠位



→出口とペリスタポンプ機構によって送られ排出される。このような機構が見つかった

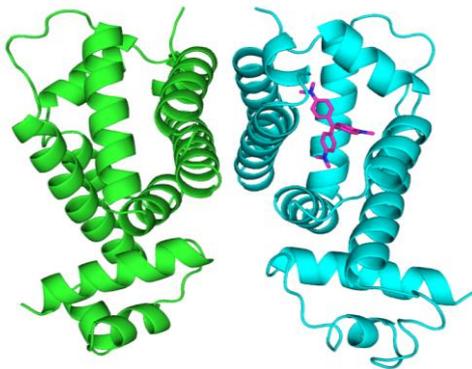
のは膜輸送体では全く初めてのことである (Nakashima *et al.*, *Nature* 480, 2011)。

(2) インドール、胆汁酸などによって誘導されるサルモネラ異物排出タンパク AcrB の発現制御因子として RamA, RamR を同定しその構造機能解析を行った。サルモネラでは、インドールや胆汁酸といった環境因子によって AcrB 発現が誘導される。これには、大腸菌には無い RamA-RamR 発現調節系が関与していることを同定し、その発現制御機構を詳細に解析した。まず、インドールは、最初に RamR に作用し、RamR の ramA 転写抑制機能を解除することにより AcrB 転写促進因子である RamA の発現を上昇させ、AcrB 発現を誘導していた。一方、胆汁酸による発現誘導には RamR は全く関与していなかった。胆汁酸を加えても RamA 発現量は一定であるが、胆汁酸が結合することにより RamA の転写促進因子としての活性がさらに高まり、AcrB の発現誘導が起こっていた (Nikaido E., *et al.* *J. Biol. Chem.* 183, 2008; Nikaido E., *et al.*, *Microbiology* 157, 2011)。



インドールと胆汁酸による AcrAB 発現誘導機構

さらに、RamR, RamA の性質を詳しく解析し、RamR については結晶構造の決定を行った。



RamR-クリスタルバイオレット結合構造

(3) スフィンゴシン1リン酸(S1P)分泌輸送体の発見と、ノックアウトマウスの解析。生物における情報伝達は情報の出し手と受け手があって成り立つ。情報の受け手は受容体と呼ばれ詳細に研究されているが、他方、情報の出し手の方の研究は余り進んでいない。情報伝達物質が細胞外に出される方法としては、開口放出と分泌輸送体が考えられる。開口放出の場合は、それに先だって情報伝達物質が分泌小胞中に蓄積されるので、分泌小胞内へ伝達物質を輸送する輸送体が必要になる。いずれにせよ、輸送体は必要である。ところが、情報伝達物質輸送体については報告例が少ない。とりわけ、直接細胞外に分泌する輸送体についてはほとんど無いのが現状である。私達は、循環器病研究センターのグループとの共同研究で、心臓発生に異常のあるゼブラフィッシュ変異体の遺伝子解析により、SPNS2 が S1P 分泌輸送体であることを発見し報告した (Kawahara A., *et al.* *Science* 323, 2009)。

FTY720 は最近開発された免疫抑制剤で、細胞内でリン酸化され FTY720-P として S1P 受容体 S1P1 に結合し、リンパ球の血中への移動を阻害することが知られている。細胞内でリン酸化された FTY720-P がどのようにして分泌されるのかは不明であったが、私達の研究で SPNS2 がその分泌を担っていることがわかった (Hisano Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 286, 2011)。

SPNS2 ノックアウトマウスは正常に分娩され生殖能力もあるが、出生時に eye-open-at-birth 形質を示し、4 週齢で半数が死亡する。S1P を分泌する主な細胞は赤血球と血小板であるが、ノックアウトマウスの赤血球並びに血小板からの S1P 排出は正常であった。一方、血中の定常 S1P 濃度は野生型の 6 割程度に低下していた。血管内皮細胞は S1P 分泌能を有するが、ノックアウトマウスの血管内皮細胞からは S1P の分泌が全く認められなかった。すなわち、SPNS2 は内皮系の細胞からの S1P 分泌輸送体であった。きわめて興味深いことに、ノックアウトマウスでは血中のリンパ球が大きく減少していた。中でも、T-細胞はほとんど消失していた。脾臓や胸腺での成熟リンパ球数はむしろ増加していたので、SPNS2 によって分泌される S1P はとくにリンパ球の脾臓や胸腺から血中への移動に深く関係している事が示された (論文投稿中)。

SPNS2 の発見は、輸送体介在型情報伝達という全く新しい研究分野を切り開くきっかけとなる発見である。また、SPNS2 ノックアウトマウスにおいて、赤血球や血小板からの S1P 分泌に異常はないにもかかわらず、リンパ球の血中への移動が著しく低下するという発見は、これまでの S1P 受容体の部位によ

る機能の違いに加えて、S1P 分泌部位による S1P シグナリングの違いがあるという事実を示しており、S1P というきわめて多機能な情報伝達物質が生体機能を調節する巧妙な仕組みの解明に向かって大きく前進したと言える。

本基盤研究 (S) は、異物排出トランスポーターとそのホモログの解析を巡って推進されたが、ペリスタポンプ機構という膜輸送体に前例のない輸送機構が解明され、環境センシングによる異物排出発現制御のメカニズムが明らかになり、さらに、高等生物で初めての脂溶性情報伝達物質の分泌輸送体が発見されるなど、膜輸送体の歴史にエポックメイキングないくつもの前進がなされた。また、これらの知見は、多剤耐性菌感染症の克服や、免疫抑制剤の開発などにつながる社会的インパクトの大きいものである。

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 4 4 件)

- ① Nakashima R., Sakurai K., Yamasaki S., Nishino K., Yamaguchi A., Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket, *Nature*, 査読有、vol. 480, 2011, 565-569
- ② Nishino K., Yamasaki S., Hayashi-Nishino M., Yamaguchi A., Effect of overexpression of small non-coding DsrA RNA on multidrug efflux in *Escherichia coli*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 査読有、vol. 66, 2011, 291-6
- ③ Hisano Y., Kobayashi N., Kawahara A., Yamaguchi A., Nishi T., The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720, *J. Biol. Chem.*, 査読有、vol. 286, 2011, 1758-1766
- ④ Horiyama T., Nikaid E., Yamaguchi A., Nishino K., Roles of *Salmonella* multidrug efflux pumps in tigecycline resistance, *J. Antimicrob. Chemother.*, 査読有、vol. 66, 2011, 105-10
- ⑤ Horiyama T., Yamaguchi A., Nishino K., TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *J. Antimicrob. Chemother.*, 査読有、vol. 65, 2010, 1372-6
- ⑥ Nishino K., Yamasaki Y., Hayashi-Nishino M., Yamaguchi A., Effect of NlpE overproduction on multidrug resistance in *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 査読有、vol. 54, 2010, 2239-2243
- ⑦ Yamada J., Yamasaki S., Hirakawa H., Hayashi-Nishino M., Yamaguchi A., Nishino K., Impact of RNA chaperone Hfq on multidrug resistance in *Escherichia coli*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 査読有、vol. 65, 2010, 853-858
- ⑧ Nishino K., Hayashi-Nishino M., Yamaguchi A., H-NS modulates multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by repressing multidrug efflux genes *acrEF*, *Antimicrob Agents Chemother.*, 査読有、vol. 53, 2009, 3541-3543
- ⑨ Kawahara A., Nishi T., Hisano Y., Fukui H., Yamaguchi A., Mochizuki N., The Sphingolipid Transporter Spns2 Functions in Migration of Zebrafish Myocardial Precursors, *science*, 査読有、vol. 323, 2009, 524-527
- ⑩ Nikaido E., Yamaguchi A., Nishino K., AcrAB Multidrug Efflux Pump Regulation

in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in Response to Environmental Signals, *J. Biol. Chem.*, 査読有、vol. 283, 2008, 24245-24253

[学会発表] (計188件)

- ① Yamaguchi A., Structural basis of multidrug efflux, The 80th Anniversary Commemoration of Osaka University International Symposium Series, Jun. 22, 2011, Hampshire Hotel-Plaza (Groningen, The Netherlands) (招待講演)
- ② Yamaguchi A., Structural basis of multidrug recognition, Nanofair 2010 - 8th International Nanotechnology Symposium, Jul. 6, 2010, International Congress Center (Dresden, Germany) (招待講演)
- ③ 山口明人, 異物排出トランスポーターの構造・機能とその制御に関する研究、日本薬学会第128回年会、2008年3月26日、パシフィコ横浜(横浜) (日本薬学会賞受賞公演、招待講演)
- ④ 山口明人, 細菌異物排出タンパクの構造・機能とその発現制御に関する研究、第81回日本細菌学会総会、2008年3月25日、国立京都国際会館(京都) (浅川賞受賞講演、招待講演)
- ⑤ Yamaguchi A., Novel Aspects of Mechanisms of Antibacterial Resistance Revealed by Crystal Structure, 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sep. 18, 2007, McCormick Place (Chicago, Illinois, USA) (招待講演)

[図書] (計2件)

- ① 山口明人、京都廣川書店、化学療法学 - 医療のあるべき姿を見据えて- [抗生物質最前線] (山口明人 編著)、2010年3月、315
- ② 山口明人 (分担執筆)、京都廣川書店、トランスポーター科学最前線 - フロントサイエンスへの招き- (辻彰 総編集) 15章 多剤排出トランスポーターの構造と多剤認識・排出機構、2008年4月、384(305-320)

[産業財産権]
出願状況 (計2件)

- ① 名称: 細菌または真菌の抗菌薬感受性の検査方法およびそれに用いるシステム
発明者: 松本佳巳、葉山浩平、榊原昇一、西野邦彦、山口明人、野地博行、飯野亮太
権利者: 国立大学法人大阪大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-200036
出願年月日: 平成 23 年 9 月 13 日
国内外の別: 国内
- ② 名称: スフィンゴシン 1-リン酸の新規トランスポーター分子
発明者: 望月直樹、川原敦雄、西毅、山口明人
権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団/国立大学法人大阪大学
種類: 特許
番号: 特願 2008-245177
出願年月日: 平成 20 年 9 月 25 日
国内外の別: 国内

[その他]

○ホームページ等
<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/cm b/>

○新聞報道

- ① 読売新聞、2011年12月5日、病原菌ポンプで抗生物質排除 阪大グループ仕組み解明
- ② 朝日新聞、2011年11月28日、多剤耐性菌 構造を解明 阪大グループ

- ③ 毎日新聞、2011年11月28日、多剤耐性緑膿菌 治療薬に光 阪大チーム 抗生物質効かぬ謎解明
- ④ 産経新聞、2011年11月28日、多剤耐性菌の異物認識システム解明 阪大チーム「創薬へ展望」
- ⑤ 日経新聞、2011年11月28日、抗生物質、細胞外へ排出 阪大が仕組み解明 新薬開発に可能性

○受賞

- ① 平成 22 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞、「異物排出タンパク構造・機能・制御と生理的役割に関する研究」、山口明人
- ② 平成 20 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞（若手科学者賞）、「細菌ゲノムに潜む多剤耐性因子と制御機構の研究」、西野邦彦
- ③ 平成 20 年 日本薬学会賞、「異物排出トランスポーターの構造・機能とその制御に関する研究」、山口明人
- ④ 平成 20 年 日本細菌学会浅川賞、「細菌異物排出タンパクの構造・機能とその発現制御に関する研究」、山口明人

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 明人 (YAMAGUCHI AKIHITO)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：60114336

(2)研究分担者

中島 良介 (NAKASHIMA RYOSUKE)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：20379110

(3)連携研究者

西野 邦彦 (NISHINO KUNIHICO)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号：30432438

(平成 20 年度まで分担者、平成 21 年度から
連携研究者として参画)