

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23825

研究課題名(和文)多剤耐性緑膿菌への創薬基盤を目指したMexYの薬剤認識の解明

研究課題名(英文)Structural analysis of MexY for the basis of drug discovery against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

堤 研太 (Tsutsumi, Kenta)

大阪大学・蛋白質研究所・特任研究員

研究者番号：60844785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性緑膿菌への有効な薬剤ターゲットであり、これまで立体構造の報告がない MexY の構造解析に向け、可溶化方法の検討、精製方法の検討を行った。アミノグリコシド耐性株 PA7 由来については、界面活性剤を用いた精製、又は膜から直接ナノディスクを形成させるポリマーを用いて機能体三量体を精製することに成功した。アミノ酸の一時配列から、MexY の C 末端が機能体の安定化に寄与している可能性が示唆された。残念ながら、目標としていたクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を達成することはできなかったが、MexY の構造決定に向けた直実な一歩となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床で多用されているアミノグリコシド系の抗生物質を緑膿菌のポンプの中で唯一排出することが可能な RND 型多剤排出ポンプの中核を担う MexY の機能を阻害する方法が開発できれば、これまで多剤耐性緑膿菌に効果のなかったアミノグリコシド系の抗生物質が使用できる可能性が出てくる。本研究は未だに有効な手立てのない多剤耐性緑膿菌感染症に対する有効な手段となり、本研究は阻害剤の開発に向けた一歩となったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze the structure of MexY, which is an effective drug target for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and whose three-dimensional structure has not been reported, I screened solubilization and purification methods. For the aminoglycoside-resistant strain PA7, I succeeded in purifying the functional trimer using detergents or a polymer that forms nanodiscs directly from the membrane. The amino acid sequence suggested that the C-terminus of MexY may contribute to the stabilization of the functional trimer. Unfortunately, I was not able to achieve structural analysis using cryo-electron microscopy, but this research may be a step toward the determination of the structure of MexY.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造解析 クライオ電子顕微鏡 単粒子解析 薬剤耐性 膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

種々の抗生物質に対して抵抗性を示す多剤耐性菌は全世界で増加しており、世界保健総会や先進国7カ国首脳会議においても議論されるなど、世界的な問題となっている。特に、グラム陰性多剤耐性菌の一種である多剤耐性緑膿菌に対しては、臨床的に有効な薬剤が存在しないことから、一度拡大した感染症に対して有効な治療方法がないことが大きな問題である。グラム陰性菌にはRND型多剤排出ポンプ複合体という、菌体の内膜・外膜の両方を貫通する複合体が過剰に発現しており、このポンプが菌体に取り込まれた薬剤を排出することが多剤耐性化に大きく寄与している。緑膿菌は12種類のポンプを持つことが知られている。本研究では、その中でも、臨床で多用されているアミノグリコシド系統の抗生物質を緑膿菌のポンプの中で唯一排出することが可能なMexXY-OprMポンプの薬剤認識に着目した。

RND型多剤排出ポンプ複合体はペリプラスムアダプター (membrane fusion protein: MFP)、内膜トランスポーター (RND transporter: RND)、外膜チャネル (outer membrane factor: OMF) から成り、薬剤の認識など、薬剤排出の根幹はRNDが担っている (図1)。RNDは三量体で機能し、プロトン濃度勾配のエネルギーを用いて、3つのプロトマーがそれぞれ異なる構造をとりながら薬剤を排出する。RNDの中でも、緑膿菌のメインポンプ (MexAB-OprM)のRNDであるMexBと、その大腸菌ホモログであるAcrBについては、薬剤や阻害剤との複合体結晶構造が報告されている。しかしながら、MexXY-OprMのRNDであるMexYについては、三次元構造が全く報告されておらず、創薬基盤に必要な不可欠な基質認識機構についてはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、現状有効な臨床薬の存在しない多剤耐性緑膿菌に対する創薬基盤を確立するため、MexYのアポ状態、薬剤結合状態それぞれの三次元構造をクライオ電子顕微鏡、単粒子解析によって明らかにし、MexYの薬剤認識機構を解明することを目標とした。

3. 研究の方法

まず、PA01株由来のMexYについて、各種界面活性剤による抽出条件の検討を行った。また、界面活性剤を用いず、細胞膜から直接ナノディスクを形成させて膜タンパク質を抽出できるポリマー-DIBMAを用いた可溶化についても検討を行った。

また、過去の研究から、RNDトランスポーターのC末端は3量体の安定性に寄与していることが示唆されている。そこで、より安定なMexYを求め、PA01株由来のMexY以外の由来のMexYを探した。その結果、アミノグリコシド系薬剤耐性緑膿菌PA7由来MexYでは、1045残基中36残基に変異が見られ、そのうち8残基がC末端に集中していることを見出した。このMexYがより高い安定性を示すことを期待し、現在PA7由来のMexYを発現する遺伝子を作成した。このMexYについても、PA01株と同様に可溶化、精製条件の検討を行った。精製したMexYについて、クライオ電子顕微鏡用のグリッド作成と観察を行った。

4. 研究成果

アポ状態MexYの調製を目指し、MexYのC末端にHisタグを付加したタンパク質を大腸菌内膜に発現させた。界面活性剤を用いた精製では機能体を精製することはできなかった。DIBMAを用いた可溶化方法では、従来の界面活性剤を用いた可溶化と比較して可溶化効率が著しく悪いため、可溶化条件の詳細な検討を行った。精製したMexYはゲル濾過クロマトグラフィーと動的光散乱の結果から、精製したMexYは主に機能体である三量体であると考えられるが、粒子の均一性が十分ではなく、単量体や凝集体を多分に含んでいると推察された。

PA7由来のMexYについて初期精製条件検討を行った結果、PA7由来MexYは複数の界面活性剤を用いた可溶化、精製において三量体として安定である事が分かった。配列の比較から、MexYの三量体の安定性にC末端が寄与している可能性が高まった。さらにPA01と同様に、DIBMAを用いても精製可能であった。また、MexY単量体の結晶構造において、ドメインスワッピングにより三量体を安定すると考えられているファネルライク (FL)ドメインが大きくひしゃげていたこと、さらに同じRNDトランスポーターであるAcrBの膜タンパク質ドメイン削除変異体は、溶液状態ではモノマーである一方で、アンキリンリピートタンパク質DARPin存在下で結晶化することによって三量体を形成することから、MexYの安定化にFLドメインの安定性も寄与しているのではないかと考え、MexXやその削除変異体との共発現によるMexY三量体の安定性への寄与を調

べた。しかし残念ながら、共発現による安定性の向上は認められなかった。

PA7 由来の MexY の精製条件の検討を行い、得られた高純度の MexY について、界面活性剤を両親媒性ポリマー-amphipol への置換を行う、もしくは膜骨格タンパク質を用いたナノディスクへと再構成した後に、クライオ電子顕微鏡による観察を試みたが、残念ながら今日に至るまでに単粒子構造解析に適した試料グリッドを作成することはできなかった。今後、精製条件やグリッド作成条件を最適化することで、MexY の立体構造解析が達成されることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------