

平成22年 4月 23日現在

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

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：構造生物学

1. 研究計画の概要

(1) AcrAB-TolC 複合体作動機構の残された問題解決。とくに、マルチサイト結合機構が多剤認識機構として普遍妥当性を持つかどうか、大分子量薬物分子で確認すること。

(2) 異菌種間、宿主・細菌間情報センシングによる異物排出遺伝子発現制御機構の解析。

(3) 異物排出遺伝子の本来の生理的役割の解明。とくに高等生物における排出輸送体介在型情報伝達の解明。

2. 研究の進捗状況

(1) 大分子量薬物分子と異物排出トランスポーターAcrB との共結晶構造決定に成功（未発表）し、マルチサイト結合の普遍性を立証した。これまで結合構造の決定に成功していたミノサイクリン、ドキシソルピシンに加えて、その約2倍の分子量を持つリファンピシンとエリスロマイシンとAcrBの共結晶構造の決定に成功した。その結果、これらの薬物分子の結合サイトは、ミノサイクリン等の結合サイトであるフェニルクラスター領域とは重なり合っておらず、タンパク分子内の薬物取り入れ口からフェニルクラスターまでのチャンネルの中で、フェニルクラスター領域に入る入り口のところに両分子が結合していた。リファンピシンとエリスロマイシンの結合サイトは一部重複しており、その点ではミノサイクリンとドキシソルピシンの結合サイト間の関係と共通していた。このことから、AcrBには小分子量の薬物に対応した結合ポケットと大分子量の薬物に対応したポケットが別の場所にそれぞれマルチポケット状

態で存在するということがわかった。なお、タンパク質自体の構造は、大分子量薬物結合によっても大きくは変化しておらず、多剤認識が induced-fit によるものではないことがわかる。

(2) サルモネラ菌における、インドール（他菌種のシグナル）および胆汁酸（宿主のシグナル）によるAcrAB発現誘導が、同じRamAR調節因子を介して行われること、しかし前者がRamAの発現量上昇によるのに対し、後者はRamA活性化によるという誘導分子機構の違いがあることを詳細に解明した(*J. Biol. Chem* **283**, 24245-24253, 2008)。

(3) 脂溶性情報伝達物質分泌輸送体として、初めて、スフィンゴシン1リン酸排出輸送体Spns2を同定した(*Science* **323**, 524-527, 2009)。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

AcrBと薬物の共結晶構造決定は大変難しく、最初にAcrB構造決定に成功した2002年から、最初にミノサイクリン等との共結晶構造決定が行われた2006年まで4年かかった。しかもこの間に、他の研究者たちから出された薬物結合構造は結果的にほとんどが間違いであったことが今日ではわかっている。従って、本研究申請時点でも、大分子量薬物分子との結合構造決定がマルチサイト結合の立証に一番重要なポイントであることはわかっていたが、目的として明記することはできなかった。そこで、残された問題の解決と

いう曖昧な表現をしたわけである。しかし、研究期間をあと2年残して、2つの大分子量薬物（確認されている中で AcrB によって排出される最も大きい薬物分子）との共結晶構造決定に成功したことは大ヒットであり、当初の計画を大きく上回るものである。

さらに、脂溶性情報伝達物質分泌輸送体の同定は、高等生物における異物輸送体ファミリーのあり得べき本来の生理的役割として焦点を定め、10年以上にわたり私たちがその同定に取り組んできたが、これまで発見できなかった。従って、この点も、目的には本来の生理的役割を解明するという曖昧な書き方しかできなかったのだが、本計画期間中に、Spns2 を発見するという大ヒットを飛ばした。これは、分泌輸送介在型情報伝達の解明という現代生物学の未開拓の領域に一步踏み込むエポックメイキングな成果である。

4. 今後の研究の推進方策

(1) リファンピシン、エリスロマイシンと AcrB の共結晶構造の論文出版に向けて全力を上げる。それにはもう少し結合構造の精細度を上げ、結合分子の配向をきちんと決定する必要がある。

(2) 大腸菌などにはない異物排出遺伝子発現制御系として RamAB 系を同定したが、今後は RamA, RamB の構造決定を行い、転写誘導因子の活性化の分子機構を解明してゆく。

(3) Spns2 はゼブラフィッシュで発見され、心臓の発生に重要な役割を持っていることがわかった。ヒトやマウスのホモログも同様にスフィンゴシン1リン酸分泌輸送体として機能することはすでに解明したが、今後はマウスなど高等生物での Spns2 の役割をノックアウトマウスの形質解析等により明らかにしていく。同時に、同じファミリーに属する Spns1, 2 がどういう性質を持つタンパク質であるのか明らかにしていきたい。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 15 件)

1. H-NS modulates multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by repressing multidrug efflux genes *acrEF*, Nishino K., Hayashi-Nishino M., Yamaguchi A., *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3541-3543, (2009) 査読有

2. Characterization of the ATP-dependent sphingosine-1-phosphate transporter in rat erythrocytes, Kobayashi N., Kobayashi N., Yamaguchi A., Nishi T., *J. Biol. Chem.* **284**, 21192-21200, (2009) 査読有

3. The Sphingolipid Transporter Spns2 Functions in Migration of Zebrafish Myocardial

Precursors, Kawahara A., Nishi T., Hisano Y., Fukui H., Yamaguchi A., Mochizuki N., *Science* **323**, 524-527, (2009) 査読有

4. AcrAB Multidrug Efflux Pump Regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in Response to Environmental Signals, Nikaido E., Yamaguchi A., Nishino K., *J. Biol. Chem.* **283**, 24245-24253, (2008) 査読有

5. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Nishino K., Nikaido E., Yamaguchi A., *J. Bacteriol.* **189**, 9066-9075, (2007) 査読有 [学会発表] (計 38 件)

1. ○ Yamaguchi A., Identification of the transporter that export sphingosine 1-phosphate from the cells, 11th International Conference - Cancun, Mexico * October 25 - 28, 2009 (招待講演)

2. ○ Yamaguchi A., Structure and Mechanism of the Tripartite Multidrug Exporter, The Joint 4th AOHUPO (Asian Oceania Human Proteome Organisation) and 2nd PRICPS (Pacific Rim International Conference on Protein Science) (22-26 Jun. 2008, Carins Convention Center, Australia)

3. ○ Yamaguchi A., Novel Aspects of Mechanisms of Antibacterial Resistance Revealed by Crystal Structure, 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Sep. 17-20, 2007, McCormick Place, Illinois USA) (招待講演) [その他]

ホームページ

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