

平成22年6月2日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19207009

研究課題名(和文) RND型トランスポーターの結晶構造に基づく機能解析

研究課題名(英文) Structural and Functional analysis of RND type transporter

研究代表者

村上 聡 (MURAKAMI SATOSHI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：30300966

研究成果の概要(和文)：

院内感染などに見られる多剤耐性化の主要な原因の一つである RND 型多剤排出トランスポーターの作動メカニズムの本質的理解を目指し、立体構造情報の高解像度化を進めるとともに、得られた結晶構造に基づく機能解析を進めた。得られた結晶構造に基づく蛋白質工学的解析を行い、基質透過経路のなかほどに基質選択性に関わるフィルター様の働きを持つ部位を見いだした。また、これまで極めて困難であった RND 型トランスポーターの直接的な生化学的解析を行う手法としてグラム陽性細菌由来の RND トランスポーターホモログを用いる方法を考案した。グラム陽性細菌由来 RND 型トランスポーターにおける薬剤排出研究はこれまでほとんど行われてこなかったが、グラム陽性菌の RND 型トランスポーターも実際に薬剤を排除することが実験的に示された。また、これらのターゲットとした膜蛋白質の大量発現に成功し、結晶化が可能な高純度のサンプルを得ることに成功している。それらの結晶化に際し、フェムト秒レーザー照射や微量溶液攪拌のほか、新たに開発中の高濃度アガロースゲル中での結晶化など新たな結晶化技術の開発し特許申請を行うと共に、それらを適用して現在もトランスポーターの結晶化を行った。大腸菌 AcrB については分解能が 2.5Å 分解能にまで向上した。

研究成果の概要(英文)：

Structure of AcrB was improved beyond 2.5Å resolution.

Along the substrate translocation pathway of AcrB, an important region where determine the substrate specificity was found.

Drug transport across the membrane was observed for Gram-positive RND transporter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2009年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
年度			
年度			
総計	32,600,000	9,780,000	42,380,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：多剤排出トランスポーター・結晶化・X線結晶構造解析・多剤耐性・膜輸送

1. 研究開始当初の背景

院内感染などにみられる多剤耐性化の主因である多剤排出トランスポーターの結晶構造解析(Nature, 2002)、さらにその薬剤結合状態の結晶構造解析に成功した(Nature, 2006)。また、結晶構造に基づき同蛋白質による多剤認識については「マルチサイト型認識」で、それに続く排出機構については「機能的回転機構」で細胞内からの薬剤排除が行われることを提唱した。蛋白質の機能を理解するのに結晶構造は極めて有用な情報となるが、それ自身は静的なため、より詳細な構造情報とそれに基づく生化学的、蛋白質工学的な実験を行うことが仮説の補強の重要な鍵を握る。しかし、ここで扱われる薬剤排出トランスポーターは院内感染や、市中感染で猛威をふるう緑膿菌などグラム陰性細菌の持つ最も強力な薬剤排出トランスポーターである RND 型トランスポーターであり、この種のトランスポーターは、細胞膜と、細胞外膜とにまたがる分子複合体を形成し機能するという性質上、リボソーム再構成などの一般的な輸送研究の手法が通用せず、新たなアイデアに基づいて機能研究を行う必要があった。

また、既述のとおり明らかにした結晶構造は最高で 2.8 Å 分解能という解像度であり、機能解明の為に重要となる蛋白質に結合する水分子の観察などにはいま一步不十分なところもあり、結晶性の改良が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、世界初の多剤排出トランスポーターの立体構造決定、さらに基質結合型結晶構造の決定による、多剤の認識および、排出の新規メカニズムである「機能的回転輸送機構」を解明した実績の上に立ち、排出機構解明に対し不十分な知見について解析し、多剤排出トランスポーターの詳細な構造に基づく機能解析と構造多様性について総合的に解明することにある。

3. 研究の方法

(1). 大腸菌 AcrB の蛋白質工学的研究

大腸菌 AcrB の構造をより詳細に解析すると共に、構造に基づいて蛋白質工学的、生化学的な手法を用い、薬剤排出活性などの測定を通し AcrB の作動メカニズムを明らかにする。

(2). グラム陽性細菌由来 RND トランスポーターの構造機能解析

グラム陰性菌と違い外膜を持たないグラム陽性細菌のゲノム中から、RND 型と思しき遺伝子を検索し、それらをクローニングして、機能を解析すると共に、その大量精製と結晶化を行う。

(3). 膜蛋白質の結晶化方法について

全ての項目においてその目的達成の膜蛋白質の結晶解析がキーとなるので、技術的に困難な膜蛋白質の結晶化において、我々が開発してきた新たな結晶化手法を高度化し、それらを適用し、AcrB の高解像度化および、新奇トランスポーターの結晶取得を行う。

4. 研究成果

(1). 大腸菌 AcrB の蛋白質工学的研究

結晶構造から理解出来たことは、分子内部に存在する芳香族アミノ酸に富んだポケットに疎水性の薬剤分子が結合することであるが、それだけで全ての基質の特異性を説明するのに十分かどうかは問題として残されていた。そこで、基質特異性の異なるホモログとのキメラ蛋白質を構造に基づき作成し、基質特異性の変化を調べた結果、基質透過経路に基質特性を変化させる領域が存在する事が明らかとなった。この部位は基質取り込み口から少し入ったところで、上述の基質結合ポケットへいたる部位に存在し、荷電性のアミノ酸により構成される表面を形成していた。これはあたかも基質透過経路に存在する「フィルター」のような役割を担っているように考えられたことより、「filter region」と名付けて論文投稿の準備を進めている。

(2). グラム陽性菌由来 RND トランスポーター詳細な構造に基づいて様々な作動メカニズムを提唱してきたが、これらの *in vivo* の裏付けをとるには、一般的には生化学的な解析が必要であるが、既述の通りグラム陰性菌由来の RND トランスポーターではそれが極めて込んでいるため、グラム陽性菌由来 RND を用いる方法を考案した。これまでグラム陽性菌由来 RND では、明確に薬剤排出が観察された例は報告されていないが、我々は乳酸菌を用いた系で実際に蛍光性の基質を輸送するというを実験的に証明した(ケンブリッジ大学との共同)。これにより、グラム陽性菌由来のホモログを用いて RND 型トランスポーターのリボソーム再構成などの生化学的研究方法を確立できたこととなる。

(3). 膜蛋白質の結晶化方法について

グラム陽性菌由来 RND 型トランスポーターの

結晶構造はこれまで報告がない。我々は、構造と機能の両面からの研究を行う必要からその構造が見たい。しかし、トランスポーターを含め、膜蛋白質の結晶化は生物科学分野での最難関技術の一つである。我々はフェムト秒レーザー照射や微量溶液攪拌などが、結晶化確率を向上させ、さらに結晶性の向上も見込める事をあきらかにしてきた。これらの技術の原理解明と高度化を通して、グラム陽性菌由来トランスポーター結晶化にも応用可能なより高度な結晶化促進技術の開発を進め、高濃度ゲル中での結晶化が一般的な溶液中での結晶化、あるいは低濃度ゲル中での結晶化に比べ優位に結晶性を向上させる例を見いだした。この技術は大腸菌 AcrB の結晶化にも用いることができ、方法の一般性を示すこともできた（特許出願済み）。現在までのところ、グラム陽性細菌由来トランスポーターの回折を与える結晶は得られていないが、大量精製系の確立したいくつかの生物由来標品で擬結晶が得られている。このことは標品の健全性の現れであり、今後の継続的な研究により結晶構造解析を行う為の基盤が整った。また、これらの技術の適用により、大腸菌 AcrB の分解能は 2,5Å まで向上し機能を考える上で重要となる蛋白分子に結合する水分子もいくつか見え始めた。

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 30 件)

1. Ryota Murai, Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoshinori Takahashi, Mihoko Maruyama, Shigeru Sugiyama, Gen Sasaki, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue and Yusuke Mori.
Enhancement of femtosecond laser-induced nucleation of protein in a gel solution(043702)
Appl. Phys. Lett. **96** 1-3 (2010) 査読有
2. Hitoshi Hasenaka, Shigeru Sugiyama, Mika Hirose, Noriko Shimizu, Tomoya Kitatani, Yoshinori Takahashi, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori and Hiroyoshi Matsumura.
Femtosecond laser processing of protein crystals grown in agarose gel
J. Cryst. Growth **312** (2009) 73-78 査読有
3. Tomoya Kitatani, Hiroaki Adachi, Shigeru Sugiyama, Hiroyoshi Matsumura,

Ryota Murai, Yoshinori Takahashi, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori and Kazufumi Takano.

A Manipulating Tool for Protein Microcrystals in Solution Using Adhesive Materials(118001)

Jpn. J. Appl. Phys. **48** 1-2 (2009) 査読有

4. Kana Tanabe, Mika Hirose, Ryota Murai, Shigeru Sugiyama, Noriko Shimizu, Mihoko Maruyama, Yoshinori Takahashi, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Yusuke Mori, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue and Hiroyoshi Matsumura.

Promotion of Crystal Nucleation of Protein by Semi-Solid Agarose Gel(125501)

Appl. Phys. Express **2** 1-3 (2009) 査読有

5. Noriko Shimizu, Shigeru Sugiyama, Mihoko Maruyama, Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoshinori Takahashi, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Hiroyoshi Matsumura and Yusuke Mori.

Growth of Large Protein Crystals by Top-Seeded Solution Growth Together with the Floating and Solution-Stirring Technique

Cryst. Growth Des. **9** 5227-5232 (2009) 査読有

6. Shigeru Sugiyama, Hitoshi Hasenaka, Mika Hirose, Noriko Shimizu, Tomoya Kitatani, Yoshinori Takahashi, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori and Hiroyoshi Matsumura.

Femtosecond Laser Processing of Agarose Gel Surrounding Protein Crystals for Development of an Automated Crystal Capturing System(105502)

Jpn. J. Appl. Phys. **48** 1-5 (2009) 査読有

7. 村上聡

多剤耐性 Multi-drug resistance

Medical Science Digest **35** 346-347 (2009) 査読有

8. Shigeru Sugiyama, Kana Tanabe, Mika Hirose, Tomoya Kitatani, Hitoshi Hasenaka, Yoshinori Takahashi, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Yusuke Mori, Tsuyoshi Inoue and Hiroyoshi Matsumura.

Protein Crystallization in Agarose Gel

with High Strength: Developing an Automated System for Protein Crystallographic Processes(075502)
Jpn. J. Appl. Phys. **48** 1-5 (2009) 査読有

9. Keiji Inaba, Satoshi Murakami, Atsushi Nakagawa, Hiroka Iida, Mai Kinjo, Koreaki Ito and Mamoru Suzuki.

Dynamic nature of disulfide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB.

EMBO J. **28**. 779-791 (2009) 査読有

10. Hiroshi Y. Yoshikawa, Ryota Murai, Shigeru Sugiyama, Gen Sazaki, Tomoya Kitatani, Yoshinori Takahashi, Hiroaki Adachi, Hiroyoshi Matsumura, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Kazufumi Takano and Yusuke Mori.

Femtosecond laser-induced nucleation of protein in agarose gel

J. Cryst. Growth **311** 956-959 (2009) 査読有

11. Tomoya Kitatani, Hiroaki Adachi, Shigeru Sugiyama, Hiroyoshi Matsumura, Ryota Murai, Yoshinori Takahashi, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori and Kazufumi Takano.

Evaluation and Improvement of a Technique to Manipulate Protein Crystals in Solution

Jpn. J. Appl. Phys. **47** 8995-8997 (2008) 査読有

12. Masashi Mima, Chika Kawai, Kumsun Paku, Koji Tomoo, Toshimasa Ishida, Shigeru Sugiyama, Hiroshi Matsumura, Tomoya Kitatani, Hiroshi Y. Yoshikawa, Syou Maki, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Satomi Kita and Takahiro Iwamoto.

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Ca²⁺-free primary Ca²⁺-sensor of Na⁺/Ca²⁺ exchanger

Acta Crystallogr. **F64** 1125-1127 (2008) 査読有

13. Hiroshi Matsumura, Motoyasu Adachi, Shigeru Sugiyama, Shino Okada, Megumi Yamakami, Taro Tamada, Koushi Hidaka, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso, Tomoya Kitatani, Syou. Maki, Hiroshi Y. Yoshikawa, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Ryota Kuroki and Yusuke Mori.

Crystallization and preliminary neutron

diffraction studies of HIV-1 protease cocrystallized with inhibitor KNI-272
Acta Crystallogr. **F64** 1003-1006 (2008) 査読有

14. Shigeru Sugiyama, Yusuke Nomura, Taiichi Sakamoto, Tomoya Kitatani, Asako Kobayashi, Shin Miyakawa, Yoshinori Takahashi, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Yoshikazu Nakamura and Hiroyoshi Matsumura.

Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of an RNA aptamer in complex with the human IgG Fc fragment

Acta Crystallogr. **F64** 942-944 (2008) 査読有

15. Barbara Woebking, Saroj Velamakanni, Luca Federici, Markus A. Seeger, Satoshi Murakami and Hendrik van Veen.

Functional role of transmembrane Helix 6 in drug binding and transport by the ABC transporter MsbA.

Biochemistry. **47** 10904-10914 (2008) 査読有

16. Satoshi Murakami

Multidrug efflux transporter, AcrB-the pumping mechanism.

Curr. Opin. Struct. Biol. **18** 459-465 (2008) 査読有

17. Hiroshi Y. Yoshikawa, Ryota Murai, Syou Maki, Tomoya Kitatani, Shigeru Sugiyama, Gen Sazaki, Hiroaki Adachi, Tsuyoshi Inoue, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Takatomo Sasaki and Yusuke Mori.

Laser energy dependence on femtosecond laser-induced nucleation of protein

Appl. Phys. A **93** 911-915 (2008) 査読有

18. Ryota Murai, Hiroshi Y. Yoshikawa, Hisato Kawahara, Syou Maki, Shigeru Sugiyama, Tomoya Kitatani, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Takatomo Sasaki and Yusuke Mori.

Effect of solution flow by rotary shaker on protein crystallization

J. Cryst. Growth **310** 2168-2172 (2008) 査読有

19. Syou Maki, Ryota Murai, Hiroshi Y. Yoshikawa, Tomoya Kitatani, Shinya Nakata, Hisato Kawahara, Hitoshi Hasenaka, Asako

Kobayashi, Shino Okada, Shigeru Sugiyama, Hiroaki Adachi, Hiroshi Matsumura, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Takatomo Sasaki and Yusuke Mori.

Protein crystallization in a 100 nI solution with new stirring equipment
J. Synchrotron Rad. **15** 269 - 272 (2008) 査読有

20. Tomoya Kitatani, Shigeru Sugiyama, Hiroyoshi Matsumura, Hiroaki Adachi, Hiroshi Y. Yoshikawa, Syou Maki, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Kazufumi Takano.

New Technique of Manipulating a Protein Crystal Using Adhesive Material (037002)
Appl. Phys. Express **1** 1-3 (2008) 査読有

21. Satoshi Murakami,
Multidrug recognition and pumping by bacterial multidrug transporter ~ A structural view.
Protein Science, **17** Sup.1 68 (2008) 査読有

22. Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi
Crystal structures of a bacterial multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism.
FEBS Journal **274** Sup.1 119 (2007) 査読有

23. 村上 聡
多剤排出トランスポーターの構造と機能 結晶構造から明らかになった機能的回転メカニズム
蛋白質核酸酵素 **52** 406-414 (2007) 査読有

24. 村上 聡
多剤耐性の仕組み
日本臨床 **66** 193-203 (2008) 査読無

[学会発表] (計 30 件)

1. 村上 聡、細菌の薬剤耐性化機構の結晶学的解析 Mechanism of bacterial multi-drug resistance based on the crystal structure of efflux transporter、**第 83 回日本細菌学会総会**、2010 年 3 月 27~29 日、横浜

2. Satoshi Murakami、
RNDtransporter, AcrB-Thepumping mechanism
3rd FEBS Special Meeting 『ATP-Binding Cassette Protein:From Multidrug Resistance to Genetic Diseases』、2010 年 2 月 27 日~3 月 5 日、オーストリア

3. Satoshi Murakami、Structure and Function of Multi-drug Transporter AcrB、**4th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT TRENDS IN MACROMOLECULAR STRUCTURE AND FUNCTION**、2010 年 1 月 21~23 日、インド

4. Satoshi Murakami、Structure and Function of the Drug EffluxTransporter、**第一回台湾膜タンパク質・生物膜結晶構造生物学シンポジウム**、2009 年 12 月 9~10 日、台湾

5. Satoshi Murakami、Multidrug Efflux Transporter -The Pumping Mechanism、**1st International Multidisciplinary Workshop 『Membrane Biology Frontiers -Dynamics, Energy, Structure and Technology-』**、2009 年 5 月 28 日~6 月 2 日、ギリシャ

6. Satoshi Murakami、Transport by AcrB;a Structural approach、**Gordon Research Conferences**、2009 年 3 月 22~27 日、アメリカ

7. 村上 聡、多剤排出輸送体の結晶構造に基づく多基質認識と輸送メカニズム、**第 82 回日本薬理学会年会**、2009 年 3 月 16~18 日、横浜

8. 村上 聡、大腸菌多剤排出トランスポーターによる薬剤認識および排出機構、**日本生物物理学会第 46 回年会**、2008 年 12 月 3~5 日、福岡

9. Satoshi Murakami、Bacterial multi drug efflux transporter AcrB ,-The pumping mechanism、**XXI Congress of the International Union of Crystallography**、2008 年 8 月 23~31 日、大阪

10. Satoshi Murakami、Multidrug Recognition and Pumping by Bacterial Multidrug Transporter-A structural View、**22nd Annual Symposium of The Protein Society**、2008 年 7 月 19~23 日、アメリカ

11. 村上 聡、多剤排出トランスポーターによる多基質認識とその排出メカニズム、**第 7 回微生物研究会微生物研究会**、2008 年 6 月 14 日、横浜

12. 村上 聡、大腸菌多剤排出トランスポーターによる薬剤認識および排出機構、**第 8 回日本蛋白質科学会年会**、2008 年 6 月 10~12 日、東京

13. 村上聡、中島良介、松本崇、近藤洋平1、津田岳夫1、小川治夫1、豊島近1（1東京大学）、膜輸送体作動メカニズムの結晶学的解明、**第11回 Spring8 シンポジウム**、2007年10月29～30日、兵庫

14. 村上聡、膜タンパク質を含むターゲット蛋白質の精製、**千里ライフサイエンス技術講習会 第47回 「蛋白質 X線構造解析技術 ～発現からデータ処理まで～」**、2007年10月23日、大阪

15. Satoshi Murakami、Structure and mechanism of bacterial multi-drug efflux transporter、**24th European Crystallographic Meeting**、2007年8月22～27日、モロッコ

16. Satoshi Murakami、Structure and mechanism of AcrAB bacterial multi-drug efflux pump、**AstraZeneca Membran Protein Day (Seminar)**、2007年8月20日、イングランド

17. Satoshi Murakami、Session1 Multi-Protein complex, Structural studies of multi-drug efflux transporter、**9th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation**、2007年8月13～17日、イングランド

18. Satoshi Murakami、Crystal structures of a bacterial multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism、**32nd FEBS Congress, Molecular Machines**、2007年7月7～12日、オーストリア

〔図書〕（計3件）

1. 村上聡（分担執筆）

膜タンパク質の可溶化と調整

化学同人、「やさしい原理から入る タンパク質科学実験：I タンパク質をつくる — 抽出・精製と合成」、(2008)、208P、107-133

2. 村上聡（分担執筆）

膜タンパク質の可溶化

村上聡（分担執筆）

廣川書店、「シリーズ 生物薬科学実験講座」、(2008)、250P、89-107

3. 村上聡

大腸菌の異物排出トランスポーターAcrBの構造と異物認識機構

日本生化学会、「生化学 vol. 79」、(2007)、総ページ数、542-549

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

1. 名称：粘着式ピンセット、粘着式ピンセット用部材、粒子の保持方法、粒子の解析方法および分析装置

発明者：安達宏昭、松村浩由、高野和文、村上聡、井上豪、森勇介、柴田和博、上野元信、山本浩司

権利者：有限会社シバタシステムサービス

種類：特許権

番号：特願 2007-296354

出願年月日：2007年11月15日

国内外の別：国内

番号：PCT/JP2008/063760（出願番号）・

PCT/WO2009/063663（公開番号）

出願年月日：2008年7月31日

国内外の別：PCT出願

2. 名称：結晶製造方法、凍結結晶製造方法、結晶構造解析方法、結晶化スクリーニング方法、結晶化スクリーニング装置

発明者：杉山成、安達宏昭、松村浩由、高野和文、村上聡、井上豪、森勇介

権利者：株式会社創晶（506243161）

種類：特許権

番号：特願 2008-008561

出願年月日：2008年1月17日

国内外の別：国内

番号：PCT/JP2009/050592（出願番号）・

PCT/WO2009/091053（公開番号）

出願年月日：2009年1月17日

国内外の別：PCT出願

3. 名称：有機高分子結晶製造装置

発明者：杉山成、安達宏昭、松村浩由、高野和文、村上聡、井上豪、森勇介、国宗範彰

権利者：株式会社クニムネ

種類：特許権

番号：特願 2009-275465

出願年月日：2009年12月3日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上聡 (MURAKAMI SATOSHI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：30300966

(2) 研究分担者

なし