

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02412

研究課題名（和文）三者複合体を形成し機能するABC輸送体の構造機能解析

研究課題名（英文）Structural and Functional analysis on tripartite ABC transporters.

研究代表者

村上 聡 (Murakami, Satoshi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：30300966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の主要なターゲットである三者複合体形成型ABC輸送体であるLoICDEの機能解析に関して、光クロスリンク法を用いた解析により、基質の輸送に直接関与する機能残基を明らかにすることに成功した（共著）。これら残基を我々が明らかにしたMacBの結晶構造より求めたホモロジーモデル上にマッピングすることにより、細胞膜から引き抜かれた基質が輸送体のもつ基質結合ポケットをたどり輸送される経路を明らかにした。また、外膜チャンネルToICとアダプターMacAのホモログとで同じく三者複合体を形成し機能する別種の多剤排出トランスポーターの構造に基づく作動機構の一端を明らかにすることにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LoICDE系はグラム陰性細菌にとって生育に不可欠な蛋白質群であり、その阻害による抗菌剤開発など新たな作用機序をもつ抗菌剤開発へと繋がる可能性がある。その分子機構解明は近年社会問題となっている多剤耐性化（AMR）の対策へ繋がる知見となり、社会的な意義の高いものといえる。また、直接的に薬剤排出に関わる蛋白質群の構造機能解析に於ける成果も同様の理由により社会的注目が大きい。新たに認知されたVII型ABC輸送体であるLoICDEやMacBの構造機能解析において我々は世界のトップランナーである。それ故、輸送体関連の教科書などへの執筆依頼も複数受けていることを研究成果として付記しておきたい。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in identifying functional residues directly involved in substrate transport by optical crosslinking analysis (co-author) on the tripartite-type ABC transporter, LoICDE, the main target of this study. By mapping these residues on a homology model derived from our crystal structure of MacB, we clarified the substrate translocation pathway through the substrate-binding pocket in the periplasmic domain of the LoICDE. We also succeeded in elucidating the structure-based mechanism of another multidrug efflux transporters, BpeB and BpeF, that forms a tripartite complex with the outer membrane channel ToIC and a homolog of the periplasmic adaptor protein, MacA.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 膜輸送体 多剤耐性 X線結晶構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌のマクロライド系抗生物質排出に関わる三者複合体形成型 ABC 輸送体である MacB の結晶構造を世界に先駆けて明らかにする事に成功した(*Nat. commun*, 2017)。さらに、MacB と共役して機能する外膜チャンネル蛋白質 TolC、さらに MacB と TolC を繋ぐアダプター蛋白質である MacA との三者複合体をクライオ電子顕微鏡解析により明らかにした(*Nat. Microbiol*, 2017)。MacB の構造解析から明らかになったのは、これが全く新しいタイプの ABC 輸送体であるということ(新たに Type-VII 型と分類された)が分かった。加えて、MacB のホモログだが、薬剤排出に関わるのではなく外膜蛋白質の輸送に関わる LolCDE との立体的な相同性が高いことが明らかになった。Lol 輸送系では、外膜チャンネル蛋白質(OMC)やペリプラズム・アダプター蛋白質(PAP)とは共役せず、別のペリプラズム蛋白質(LolA)と、外膜蛋白質(LolB)と機能的に共役する。このように新たに立体構造が明らかになった Type-VII 型 ABC 輸送体の構造に基づく輸送機能を考えることが出来るようになった、三者複合体型 ABC 輸送体におけるポスト構造時代が正に拓かれた状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、マクロライド系薬剤の排出に関わる MacB と、外膜蛋白質輸送に関わる LolCDE という 2 つの相同蛋白質、およびそれらと共役する蛋白質群に焦点をあて、これらの構造に基づく作動機構の詳細を明らかにすることを研究の主目的とした。

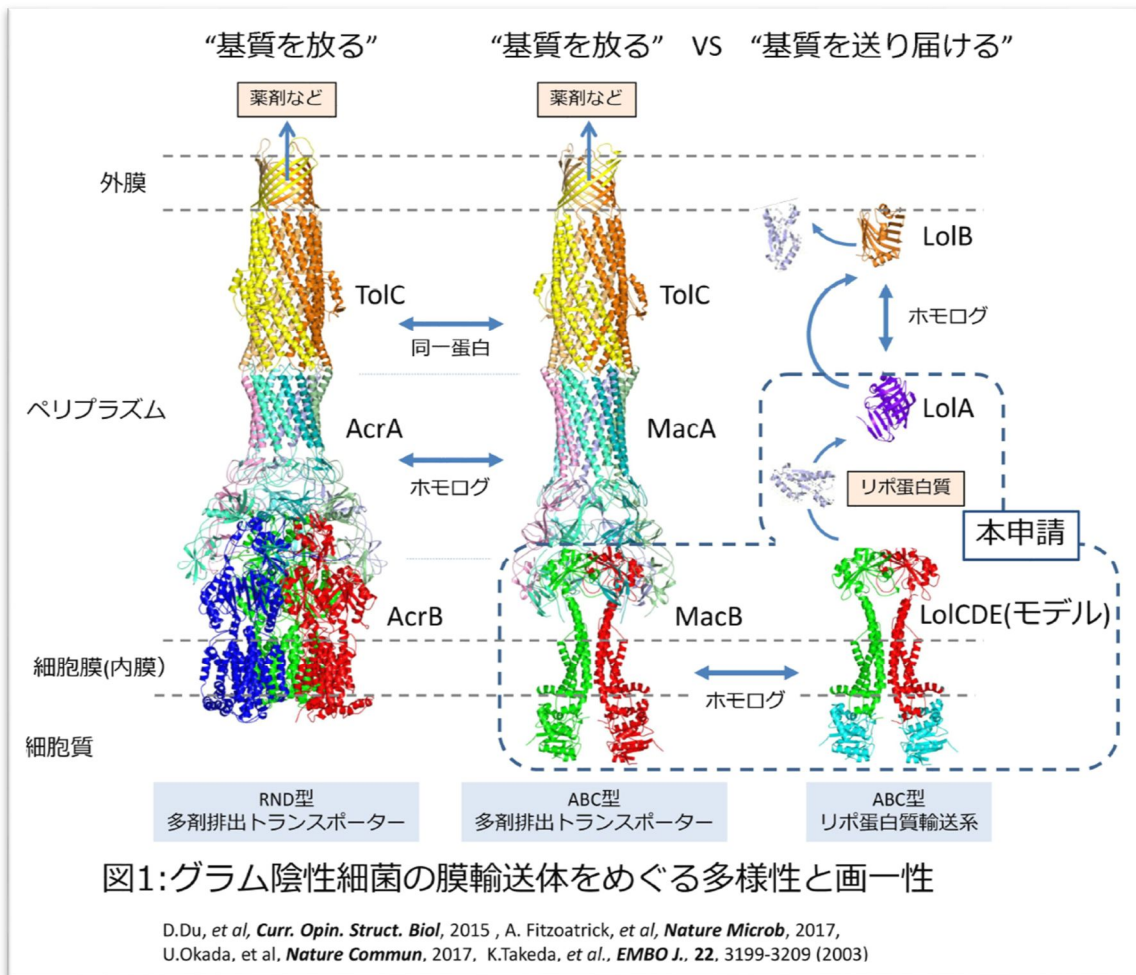
これまで研究代表者らが約二十年にわたり研究を進めてきた多剤排出輸送体である RND 型輸送体と同様、OMC と PAP で形成されるチャンネル複合体と共役する MacB 系は、ATP 加水分解エネルギー依存的に基質をペリプラズムから引き抜き、チャンネル複合体へ放出すると考えられている。チャンネル複合体への基質輸送以降の排出については三者複合体型輸送体としての共通性の点から RND 型輸送体と類似していると考えられる。しかし、細胞膜外葉およびペリプラズムからの輸送体蛋白質分子内への基質の取り込みについては、RND 輸送体に見られる分子内の基質輸送経路は Type-VII 型 ABC 輸送体には見つけることが出来ないため、機構が異なると考えられた。一方で、Type-VII 型 ABC 輸送体として、薬剤排出に関わる MacB も、外膜蛋白質輸送に関わる LolCDE も分子構造の類似性の点から共通する基質輸送機構を持つ可能性が高いと考えられた。MacB も LolCDE も ATP 加水分解により輸送体の構造変化をともなう基質輸送がペリプラズムドメインで行われる。しかし、MacB では基質が OMC-PAP から成るチャンネル複合体に送り込まれるが、LolCDE では運び屋の LolA へきちんと受け渡される。これら輸送体による作動機構を構造に基づき明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

MacB の基質認識および輸送過程を観るために、基質複合体や異なる輸送中間体の構造など、
:MacB の結晶構造解析の高度化を行うことを第一の目的とした。世界で我々だけが MacB の結晶構造解析と三者複合体のクライオ電顕解析の両方に成功し、それらの構造比較による知見を得ている。この優位性の上に立ち、既に MacB の構造変化についてのデータを蓄積しつつある。2017 年に発表したアシネトバクター由来 MacB の ADP 結合型と構造比較が可能な MacB ホモログの高解像度解析に適した結晶を使って、基質結合型の構造を解き、基質認識とその輸送機構の両方を明らかにする。また :LolCDE の結晶構造解析および機能解析を進めることを第二の目的とした。MacB について既に分解能が向上した結晶を得たのでその構造解析を進めることにした。LolCDE の結晶構造解析については、MacB と同様の手法での結晶取得を目指した。一方、機能解析については、MacB の構造を元にした LolCDE のホモロジーモデリングとび配列比較解析を行い機能性残基を変異導入および輸送活性測定により明らかにする分子遺伝的アプローチのほか、生化学的手法を用いることで、機能性残基および輸送経路の同定を行うこととした。

4. 研究成果

本研究での主要なターゲットである三者複合体形成型 ABC 輸送体である LolCDE の機能解析に関して、光クロスリンク法を用いた解析により、基質の輸送に直接関与する残基を明らかにすることに成功した(*J. Biochem.* 共著: オンライン出版 2023 年 12 月)。これら残基を我々が明らかにした MacB の結晶構造より求めたホモロジーモデル上にマッピングすることにより、細胞膜から引き抜かれた基質が輸送体の持つ基質結合ポケット内のどの基質と相互作用するかを明らかにした。さらに、同輸送体の阻害剤が輸送活性のどの過程を阻害するのかを明らかにすることができた。RND 型輸送体は、基質輸送に直接関わる基質輸送経路をペリプラズムドメイン中に持つ。その蠕動運動のような分子構造変化を伴う機構で細胞膜外葉辺りおよびペリプラズムから分子



内部にある基質輸送経路中に基質を導き入れるが、LoiCDEではそのようなペリプラズムドメイン中の基質輸送経路は存在せず、代わりにペリプラズムドメイン中の二量体の界面あたりにある残基が基質を「摘み上げる」ような機構である可能性を見出した。このことはType-VII型ABC輸送体における輸送機構において重要な発見である。

また、2017年我々のType-VII型ABC輸送体の構造解析成功以降、幾らかのType-VII型ABC輸送体の構造解析が報告されているが、それらの構造を比較解析することで、ペリプラズムドメインが当に基質を細胞膜からペリプラズム側に摘み上げるような動きがあることが示唆されている。

また、多剤耐性化 (Antimicrobial Resistance: AMR) が社会問題となっている昨今、新奇の抗菌剤開発が強く求められているところである。Loiによる外膜蛋白質輸送はグラム陰性細菌にとって欠くべからざる生理機能であり、それゆえLoiCDEは所謂ハウスキープな蛋白質であるため、その阻害は抗菌剤開発の可能性を拓く。詳細な立体構造と作動機構の理解は、この系を阻害する基礎的知見を与える。

また、外膜チャネルTolCとアダプターMacAのホモログとで同じく三者複合体を形成し機能するRND輸送体の構造も明らかにする事に成功した。一つは肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* 由来のOqxBで、これは同種蛋白質の結晶構造解析の最高分解能世界記録タイ(1.85 Å)をマークした。

(*Nature Communications*, 2021) また、殺人バクテリアと称されバイオテロへの悪用が危惧されている *Burkholderia pseudomallei* 由来 BpeB, BpeF の結晶構造解析にも成功した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2023)。これらもまた、グラム陰性細菌の多剤排出に関わる輸送体である。こちらでは輸送機構における中間状態の構造を捉えることに成功し、輸送体を形成しているサブドメインの大きな動きによる輸送経路の構造変化が観察でき、MacBおよびLoiCDEの輸送機構を考えるうえでの興味深い対比の対象となった。

上述したが、我々はType-VIIの構造機能解析において世界のトップランナーである。それ故、輸送体関連の教科書などへの執筆依頼も複数受けるなど当該研究分野における研究成果として誇るべきことでありここに付記しておきたい。

また、Loi系蛋白質の結晶解析など研究期間内に出版には至らなかった成果もあり、それについては適宜出版する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Tao Kazuyuki, Narita Shin-ichiro, Okada Ui, Murakami Satoshi, Tokuda Hajime | 4. 巻 175 |
| 2. 論文標題 Dissection of an ABC transporter LolCDE function analyzed by photo-crosslinking | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 427 ~ 437 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad118 | 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 - |
| 1. 著者名 Kato Takaaki, Okada Ui, Hung Li-Wei, Yamashita Eiki, Kim Heung-Bok, Kim Chang-Yub, Terwilliger Thomas C., Schweizer Herbert P., Murakami Satoshi | 4. 巻 120 |
| 2. 論文標題 Crystal structures of multidrug efflux transporters from <i>Burkholderia pseudomallei</i> suggest details of transport mechanism | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 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) 10.1073/pnas.2215072120 | 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 Chisuga Taichi, Murakami Satoshi, Miyanaga Akimasa, Kudo Fumitaka, Eguchi Tadashi | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Structure-Based Analysis of Transient Interactions between Ketosynthase-like Decarboxylase and Acyl Carrier Protein in a Loading Module of Modular Polyketide Synthase | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 ACS Chemical Biology | 6. 最初と最後の頁 1398 ~ 1404 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.3c00151 | 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 - |
| 1. 著者名 Bhowmik Purnendu, Bharatham Nagakumar, Murakami Satoshi, Ramachandran Vasanthi, Datta Santanu | 4. 巻 174 |
| 2. 論文標題 Identification of key amino acid residues in Oqx B mediated efflux of fluoroquinolones using site-directed mutagenesis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Research in Microbiology | 6. 最初と最後の頁 104039 ~ 104039 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resmic.2023.104039 | 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 Okada Ui, Murakami Satoshi | 4. 巻 168 |
| 2. 論文標題 Structural and functional characteristics of the tripartite ABC transporter | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology | 6. 最初と最後の頁 1~15 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.001257 | 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Murakami Satoshi, Adachi Hiroaki, Matsumura Hiroyoshi, Takano Kazufumi, Inoue Tsuyoshi, Mori Yusuke | 4. 巻 173 |
| 2. 論文標題 Real-time monitoring of polyacrylamide gel electrophoresis by the shadowgraph technique | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 65-72 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac087 | 査読の有無 無 |
| 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 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 Raturi Sagar, Nair Asha V., Shinoda Keiko, Singh Himansha, Bai Boyan, Murakami Satoshi, Fujitani Hideaki, van Veen Hendrik W. | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Engineered MATE multidrug transporters reveal two functionally distinct ion-coupling pathways in NorM from Vibrio cholerae | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 1-17 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02081-6 | 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Okada, U., Kato, T., Huang, L.-W., Yamashita, E., Kim, H.-B., Kim, C.-Y., Terwillger, T., Schweizer, H., Murakami, S. |
| 2. 発表標題 Crystal structures of multidrug efflux transporters from Burkholderia pseudomallei suggest details of transport mechanism |
| 3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Okada, U., Murakami, S. | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 World Scientific Pub Co Inc | 5. 総ページ数 23 |
| 3. 書名 Therapeutic Protein Targets for Drug Discovery and Clinical Evaluation: Bio-crystallography and Drug Design | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 2023年07月11日 米国科学アカデミー紀要 (PNAS) に論文出版した際のプレスリリース資料 https://www.titech.ac.jp/news/pdf/tokyotechpr20230711-murakami-2.pdf |
|---|

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 |
|-------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 岡田 有意 (Okada Ui) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|------------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 山下 栄樹 (Yamashita Eiki) | | |
| 研究協力者 | 埜 和之 (Tao Kazuyuki) | | |
| 研究協力者 | 成田 新一郎 (Narita Shin-ichiro) | | |
| 研究協力者 | 徳田 元 (Tokuda Hajime) | | |

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 | | | |
|---------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | 米国 | Los Alamos National Laboratory | New Mexico Consortium | Northern Arizona University |
| インド | Bugworks, Inc. | | | |
| 英国 | The University of Cambridge | | | |