

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291014

研究課題名(和文) 薬剤耐性緑膿菌の2つの生体膜を貫く異物排出タンパク質複合体システムの構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for multidrug tripartite efflux pump through both the inner and outer membranes in *Pseudomonas aeruginosa*.

研究代表者

山下 栄樹 (Yamashita, Eiki)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：00294132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：日和見細菌である緑膿菌が多剤耐性化する主な原因として、菌体内に進入した抗生物質を排出する異物排出タンパク質複合体が関わっている。異物排出タンパク質複合体は、内膜に存在するトランスポーター、膜間に存在するアダプタータンパク質、外膜に存在する外膜チャンネルタンパク質の3種類からなり、2つの生体膜を貫く巨大な膜タンパク質複合体である。本研究では、異物排出タンパク質複合体の試料調製を行い、複合体構成蛋白質の化学量比を決定し、電子顕微鏡3次元再構成法により構造解析に成功した。また、緑膿菌の薬剤排出に関わる主な外膜チャンネルタンパク質の構造解析に成功し、外膜チャンネルの開閉機構について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* is mainly attributable to high expression of the tripartite efflux pumps that transport antibiotics from within to the external environment. The tripartite efflux pumps, each of which is composed of an inner membrane transporter, a periplasmic adaptor protein and an outer membrane factor, are membrane-protein super-complexes spanning both the inner and outer membranes. In this study, we determined the stoichiometry of the tripartite efflux pump by size exclusion chromatography and gel electrophoresis and the structure of it by negative stain electron microscope. The structures of two major outer membrane factors from multidrug-resistance *Pseudomonas aeruginosa* were determined by X-ray crystallographic analysis.

研究分野：放射光構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 膜タンパク質複合体の物質輸送

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 異物排出タンパク質複合体システムの機能

日和見細菌である緑膿菌は、健常者では感染症を発症しないが、免疫不全患者では重篤な症状をもたらす。特に多種の抗生物質に耐性を持つ緑膿菌(多剤耐性緑膿菌)は院内感染を引き起こし社会問題の一つとなっている。緑膿菌の多剤耐性化は、菌体にとって異物である抗生物質を菌体外に排出する機能を持つ異物排出タンパク質複合体システムの過剰発現によるものである(Pool, Clin. Microbiol. Infect. 2004)。異物排出タンパク質複合体システムは、3種類のタンパク質(異物の認識及び排出のためのエネルギー獲得を行い内膜に存在するトランスポーター、異物を菌体外に放出し外膜に存在するチャンネル膜タンパク質、2種類の膜タンパク質を繋ぎ膜間に存在するアダプタータンパク質)からなり、2つの生体膜(内膜、外膜)を貫く巨大な膜タンパク質複合体である。

### (2) 異物排出タンパク質複合体システムの構造

我々は、大腸菌由来の異物排出タンパク質複合体システムの構成分子であるトランスポーターAcrBのX線結晶構造解析に世界で最初に成功し、AcrBが3量体であることを明らかにした(Murakami, Yamashita et al., Nature 2002)。さらに、抗生物質結合型の構造解析に成功し、抗生物質認識部位の同定を行うとともに、抗生物質を排出する新規の作動機構(機能的回転機構)について提唱した(Murakami, Yamashita et al., Nature 2006)。また、緑膿菌由来の異物排出タンパク質複合体システムの他の構成分子であるチャンネル膜タンパク質(OprM(Akama et al. J. Biol. Chem. 2004))及びアダプタータンパク質(MexA(Akama et al. J. Biol. Chem. 2004))の立体構造を明らかにした。それぞれの構成分子の立体構造が明らかになっているが、機能する現場で形成する複合体システム全体構造は解明されていない。

## 2. 研究の目的

多種の抗生物質に耐性を持ち、院内感染を引き起こす多剤耐性緑膿菌に作用する抗生物質を開発するには、抗生物質を菌体外に放出する異物排出タンパク質複合体システムを阻害し、抗生物質を菌体内に蓄積させることが重要と考えられる。異物排出タンパク質複合体システムの阻害剤開発には、抗生物質を菌体外に放出する機構を解明する必要がある、そのためには、機能する現場で形成する複合体システム全体構造が必要不可欠である。本研究は、緑膿菌の多剤耐性化に深く関わっている異物排出タンパク質複合体システムの機能する現場で形成する全体構造を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 異物排出タンパク質複合体システムの構造解析

① 各構成タンパク質(トランスポーター、アダプタータンパク質、チャンネル膜タンパク質)の化学量比の決定。各構成タンパク質の培養・精製条件や複合体の精製条件をゲル濾過クロマトグラフィーや動的光散乱法で解析しながら、構造的に均質な複合体を得るための条件検討を行った。得られた複体の均質な試料を電気泳動法により、各構成タンパク質の構成比を求めた。

② 異物排出タンパク質複合体システムの電子顕微鏡像解析。複合体をネガティブ染色法を用いて、電子顕微鏡で観察した。得られた電子顕微鏡像から複体の単粒子を拾い出し、三次元再構成を行った。

(2) 緑膿菌の多剤耐性化に深く関わっている2種類のチャンネル膜タンパク質(OprN, OprJ)の構造解析

① OprNとOprJの発現・精製・結晶化。緑膿菌ゲノムからOprNとOprJのクローニングを行い、大腸菌の大量発現系を構築した。各膜タンパク質精製条件を確立し、結晶化条件の探索を行った。

② X線結晶構造解析。OprN結晶及びOprJ結晶を用いて放射光にてX線回折強度データを収集し、分子置換法により構造解析を行った。緑膿菌由来のチャンネル膜タンパク質の構造比較から、特徴的な構造と開閉機構について考察した。

## 4. 研究成果

### (1) 異物排出タンパク質複合体システムの構造解析

① チャンネル膜タンパク質の精製において、界面活性剤の種類や用いるカラムを検討した結果、界面活性剤ではoctyl glucosideが最も収量が得られ、アフィニティーカラムだけの精製が安定した試料を得られることが分かった。

② トランスポーターの精製では、可溶化の界面活性剤にはdodecyl maltosideが、安定化の界面活性剤には数種類のマルトシド系の界面活性剤が利用できることが分かった。

③ 複合体が安定かつ均質な構造を形成する条件について、各構成タンパク質の培養・精製条件を踏まえ、複合体の培養・精製において基質や塩などの種類や濃度の条件を変え、動的光散乱法を利用して調べた。その結果、複合体形成を促進するような試薬を見つけられなかったが、低塩濃度の条件であれば、比較的安定な複合体が得られることが分かった。低塩濃度で精製を行い、ゲル濾過クロマトグラフィーで確認したところ、各構成タンパク質より高分子量側にピークが現れた(図1a)。

高分子量側のピーク領域を回収し、動的光散乱法を用いて分子径や単分散度を解析したところ、各構成タンパク質より大きな分子サイズを示し(図1b)、単分散度は30.2%と比較的良好な値であった。また、回

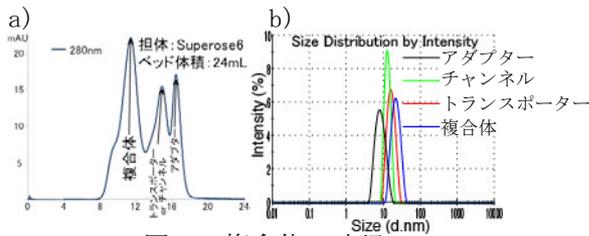


図1 複合体の確認

- a) 再構成時のゲル濾過のチャート
- b) 動的光散乱法による分子サイズ

収した試料を SDS 電気泳動したところ、3 種類の構成タンパク質が確認された (図 2)。このことから、複合体の精製方法を確立することに成功した。また、電気泳動法で各構成タンパク質の比を求めたところ、複合体ではバンド強度がトランスポーター、アダプタータンパク質、チャンネル膜タンパク質の順番で強く、各構成タンパク質の同じモル濃度ではトランスポーター、チャンネル膜タンパク質、アダプタータンパク質の順になるが、アダプタータンパク質のモル濃度を 2 倍にすると複合体と同じバンド強度の順番になる (図 2)。このことから、複合体のトランスポーター: アダプタータンパク質: チャンネル膜タンパク質の構成比が 1:2:1 であることを明らかにした。

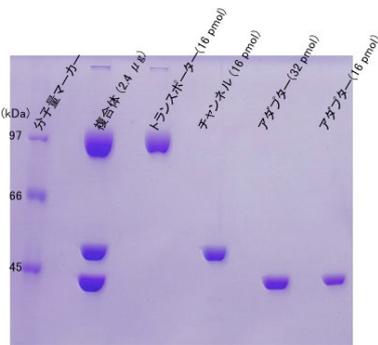


図2 SDS 電気泳動

④ネガティブ染色法による電子顕微鏡での観察では、大半が大きさや形のそろった複合体であった (図 3 a)。数枚の写真を撮影し、その中から、複合体単粒子像約 2000 枚を取

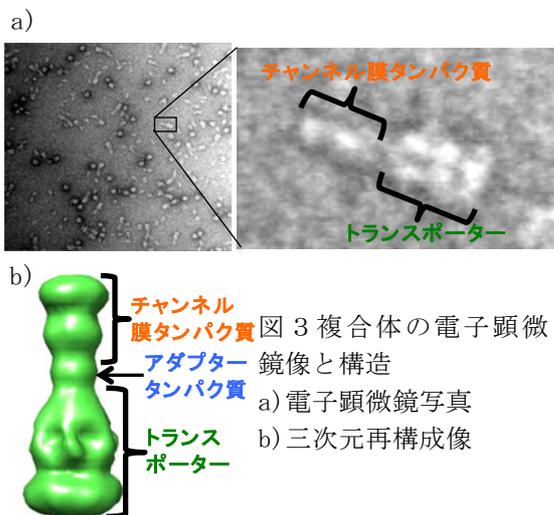


図3 複合体の電子顕微鏡像と構造

- a) 電子顕微鏡写真
- b) 三次元再構成像

集することに成功し、低分解能での複合体システムの全体構造を明らかにした (図 3 b)。複合体の大きさが膜面に垂直な方向に約 330Å であったことから、チャンネル膜タンパク質とトランスポーターが直接相互作用していないことを示唆した。

(2) OprN と OprJ の構造解析

①外膜のチャンネル膜タンパク質である OprN 及び OprJ の可溶化には、共に octyl glucoside が最適であった。可溶化後、Ni アフィニティーカラムを用いることにより結晶構造解析に耐えうる十分な質の精製標品を得ることに成功した。

②それぞれの精製標品から結晶を作製し、SPRing-8 の BL44XU で回折実験を行い、OprN は 1.69Å 分解能と 2.70Å 分解能の 2 種類の回折強度データを、OprJ は 3.10Å 分解能の回折強度データを収集した。OprM の結晶構造 (PDB code 1WP1) をモデル分子として、分子置換を行った。決まった座標を元に、精密化を行ったところ、OprN では、R 及び FreeR がそれぞれ 16.0%、18.0% の 1.69Å 分解能の構造と、それぞれ 23.2%、27.2% の 2.70Å 分解能の構造を、OprJ では、それぞれ 26.9%、30.7% の 3.10Å 分解能の構造を得ることに成功した。これにより、緑膿菌の多剤耐性化に深く関わっている主な異物排出タンパク質複合体システムのチャンネル膜タンパク質の構造を全て明らかにすることができた。

③OprN、OprJ の構造 (図 4) は OprM と同様に 3 量体で筒を形成しており、β-バレルドメイン、α-バレルドメイン、エカトリアルドメインの 3 つのドメインから構成されていた。

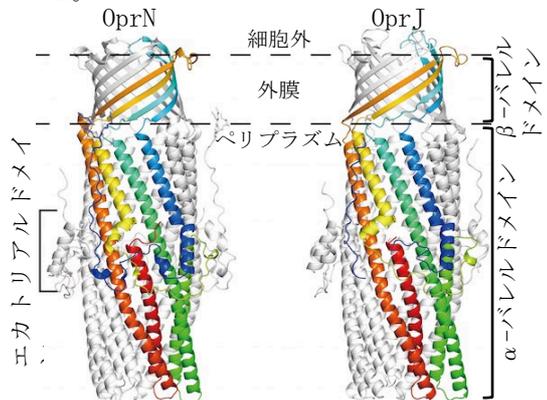


図4 OprN と OprJ の全体構造

④OprN の構造はこれまで構造解析されたチャンネル膜タンパク質の中で最も高分解能で構造解析された構造で、N 末端のシステイン残基がトリアシル化されていることを電子密度で明らかにした (図 5)。

(3) 緑膿菌の多剤耐性化に深く関わっているチャンネル膜タンパク質の構造比較

OprN、OprJ、OprM の構造比較をすることにより以下のことが明らかになった。

①緑膿菌のチャンネル膜タンパク質のペリプラズムエンドは閉構造を取っていた。この閉じた構造が、抗菌薬への耐性をあげている原因の一つだと考えられる。

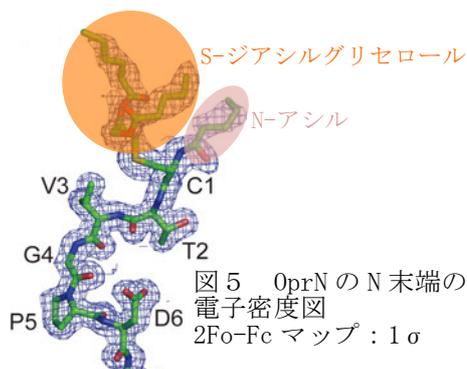


図5 OprNのN末端の電子密度図  
2Fo-Fc マップ : 1 $\sigma$

②  $\alpha$ -バレルドメインの内側コイルドコイルのヘリックス7 (H7)と8 (H8)は3者共に同じ構造を取っていたが、外側コイルドコイルのヘリックス3 (H3)と4 (H4)は異なる構造を取っていた (図6)。ペリプラズムエンドの開閉時には内側ヘリックスが同じ構造変化を持つことを示唆した。

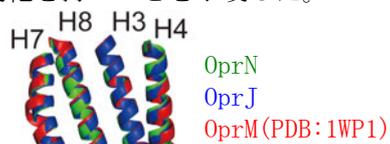


図6  $\alpha$ バレルドメインの内膜に近い側の構造

内側コイルドコイル 外側コイルドコイル

③ アダプタータンパク質と相互作用する $\alpha$ -バレルドメインの部分について、表面電荷が、OprNではネガティブ、OprJではポジティブに分布しており、OprMが両者の中間に分布していた (図7)。このことから、各チャンネル膜タンパク質と各アダプタータンパク質は特異的な相互作用を持ち、最適な複合体を形成すると考えられる。

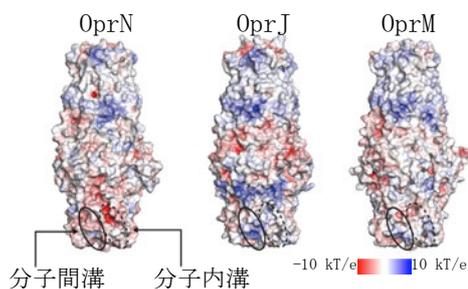


図7 表面電荷分布図

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6件)

① Yonehara R., Yamashita E., Nakagawa A., Crystal structures of OprN and OprJ, outer membrane factors of multidrug tripartite efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*., *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 84, 759-769, (2016). 査読有

② Hasan S. S., Proctor E. A., Yamashita E., Dokholyan N. V., Cramer W. A., Traffic within the Cytochrome  $b_6f$  Lipoprotein Complex: Gating of the Quinone Portal., *Biophys J.* 107, 1620-1628, (2014). 査読有

③ Harada K., Yamashita E., Nakagawa A., Miyafusa T., Tsumoto K., Ueno T., Toyama Y., Takeda S., Crystal structure of the C-terminal domain of Mu phage central spike and functions of bound calcium ion., *Biochim Biophys Acta.*, 1834, 284-291 (2013). 査読有

[学会発表] (計 14件)

① 比嘉悠貴, 中川敦史, 山下栄樹, 緑膿菌由来異物排出トランスポーター-MuxBのX線結晶構造解析、日本結晶学会年会、2015年10月17~18日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス

② Eiki Yamashita, Synchrotron radiation beamline of the Institute for Protein Research., International Symposium Establishment of Structural Biology Network in the Asian Region, 2015年9月30日、台湾

③ Atushi Nakagawa, Structure Determination of Biological Macromolecules by X-ray., The First Trilateral Workshop for Frontier Protein Studies, 2015年4月23~25日、中国

④ 住田一真, 中川敦史, 山下栄樹, 緑膿菌異物排出蛋白質のX線結晶構造解析、日本放射光学会年会、2015年1月10~12日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

⑤ Eiki Yamashita, IPR Beamline for Macromolecular Assemblies at SPring-8 (BL44XU), 23rd Congress and General Assembly of the IUCr, 2014年8月5~12日、カナダ

⑥ 山下栄樹, SPring-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン (大阪大学蛋白質研究所) BL44XUの現状、日本放射光学会、2014年1月11~13日、広島国際会議場

⑦ 中川敦史, 構造生物学と放射光、日本蛋白質科学会年会、2013年6月12~14日、とりぎん文化会館

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 栄樹 (YAMASHITA EIKI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号 : 00294132

(2) 研究分担者

中川 敦史 (NAKAGAWA ATSUSHI)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号：20188890

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

米原 涼 (YONEHARA RYO)  
大阪大学・蛋白質研究所・研究員

池田 悦子 (IKEDA ETSUKO)  
大阪大学・蛋白質研究所・博士研究員

堤 研太 (HIGA YUKI)  
大阪大学・蛋白質研究所・博士前期課程

比嘉 悠貴 (HIGA YUKI)  
大阪大学・蛋白質研究所・博士前期課程

住田 一真 (SUMITA KAZUMA)  
大阪大学・蛋白質研究所・博士前期課程