

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成14年度採択研究代表者

山口 明人

(大阪大学産業科学研究所 教授)

「異物排出トランスポーターの構造機能解析」

1. 研究実施の概要

私たちは異物排出トランスポーター(MDRトランスポーター)で世界初のX線結晶構造決定に成功した。これはプロトン共役型トランスポーターとしても初の構造決定である。本研究は、その成果の上に立ち、異物認識機構、エネルギー共役機構、膜輸送機構を、初めて分子構造の基礎の上に全面的に解明することを目指す研究である。併せて、染色体上に内在しつつふだんは発現していない多数の異物排出遺伝子の発現制御ネットワークを解明する。また、動物細胞において、全く新しい生理的役割を担っている異物排出トランスポーターの新しいホモログを発見し解析することをも目指している、異物排出トランスポーターの包括的研究である。

初年度においては、これらの方向すべてにおいて大きな前進があった。

1. 結晶構造解析：AcrBの3.0Åを切る高解像度化に成功し、さらに、基質結合型結晶作成にも成功した。基質結合型結晶の高解像度構造決定に成功すれば、異物認識機構の理解に一気に前進すると期待される。また、膜融合タンパクAcrA、外膜チャネルタンパクTolCそれぞれの大量発現・精製系を確立し、輸送過程におけるこれらの解離会合状態を解明すべく複合体結晶作成の準備を進めている。
2. 構造に基づくタンパク工学的解析：構造上とくに重要な役割を担っていると考えられる部位のうち、中央ポアヘリックスのCys走査変異体を構築し、ポア内部が基質輸送に重要であることを証明した。AcrBホモログすべてに保存されている18個の荷電残基すべてをひとつずつAlaに置換し、膜貫通領域中央のAsp-Lysイオンペアが機能に必須であることを証明した。現在、TolC結合に関与する残基を同定すべくCys導入とS-S架橋実験を進めている。さらに、AcrB全域にわたりランダム変異導入を行い、基質認識に関与する残基が分子構造のどの部位に集中するか解析を進めている。
3. 細菌の環境関知応答システムである2成分情報伝達系が異物排出遺伝子を制御することを発見し、大腸菌の32種類の2成分系転写制御因子すべてを網羅的にクローニングし、異物排出遺伝子制御ネットワークの解析を行った。
4. 脳と精巣にのみ発現するABCA型異物排出遺伝子の新しいホモログを発見し、その完全町cDNAクローニングを行うとともに、ノックアウトマウスの作成を行った。興

味深いことに、脳に発現する遺伝子のノックアウトによってマウスは生後12週齢の頃に心不全で死去すること、それには甲状腺ホルモンの異常が関与していることが明らかになった。現在、症状の発現機構を詳しく解析している。

2. 研究実施体制

異物排出トランスポーターグループ

- ① 研究分担グループ長：山口明人（大阪大学産業科学研究所・教授）
- ② 研究項目：異物排出トランスポーターの構造機能解析
 1. 大腸菌主要異物排出トランスポーターAcrB結晶構造の高解像度化と基質結合型結晶の作成。
 2. AcrB結晶構造に基づく作動機構のタンパク工学的解析。
 3. 細菌異物排出トランスポーターファミリー全体像の解析と発現制御ネットワークの解明。
 4. 動物における情報伝達分子の分泌を担う新しい排出タンパクの検索同定。