

「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

生物界には、生体異物排出トランスポーターとよばれる一群の膜輸送体が広く分布していて、細胞レベルにおけるもっとも基本的な生体防御機構となっていることが近年注目されてきている。本研究課題では、細菌から動物細胞まで、生体異物排出トランスポーターの構造と機能、生理的役割の解析から、新規排出タンパク遺伝子の検索まで幅広く研究を展開している。その研究内容は大きく3つに区分される。(1) 異物排出タンパクの結晶構造解析：異物排出タンパクは、化学構造の大きく異なる幅広い化合物を認識し排出する。そのようなことを可能にする異物認識の分子機構が、基質認識部位のどのような分子構造に支えられているのかはきわめて興味深い未解決のテーマである。この解明は究極的には分子の立体構造を決定することによってしかなされない。私たちは昨年度、細菌のAcrB多剤排出蛋白質の立体構造決定に世界に先駆けて成功した。これは、異物排出蛋白質として初めてかつプロトン共役型の輸送体としても初の原子立体構造の決定である。(2) 細菌異物排出タンパク遺伝子資源の解析と異物排出タンパク機能と構造に関する分子生物学的解析：我々は既に推定される異物排出タンパク候補遺伝子を細菌の多剤耐性遺伝子資源としてとらえて、すべて発現クローニングし、あらかじめライブラリを構築して解析を進め、この過程で、多数の全く新しい異物排出タンパク遺伝子を発見するとともに、細菌の普遍的な環境適応情報伝達系である二成分情報伝達系が原因となって多剤排出タンパク遺伝子発現が高進して多剤耐性になるという新しい耐性機構を発見した。さらに、昨年度は、二成分情報伝達系の制御因子を32個を全てクローニングし、その薬剤耐性に対する関わりについても調べた。本年度は、二成分情報伝達系やヒストン様蛋白と薬剤耐性因子の発現制御に関して詳細に解析し、Quorum sensing因子を含むセンサー刺激物質の解明にも迫った。(3) 動物細胞情報伝達物質分泌輸送系の検索とノックアウトマウスによる解析：エキソサイトーシスによって分泌されるのでない、脂質メディエーターなどの情報伝達物質はどのような経路で分泌されているのか全く不明である。私たちは、これらの情報伝達物質も、異物排出タンパクに近縁のABC輸送体によって排出されているに違いないと考え、脳および血小板を材料に新規排出タンパク遺伝子の検索を進め、ノックアウトマウスを作成してそれら遺伝子の生理的役割の解明を目指している。

2. 研究実施内容

1. 異物排出タンパクAcrBの結晶構造解析、AcrBの部位特異的及びランダム変異導入による重要アミノ酸の解析

私たちは昨年度、異物排出タンパクAcrBの結晶構造解析に成功した。これは、異物排出タンパクで初めての結晶構造決定であるのみならず、プロトン輸送と共役する膜輸送タンパク質では初めての構造決定である。この構造決定によって、初めて溶質の膜輸送が具体的な分子機構に基づいて理解することが可能になり、構造情報と分子生物学的手法による蛋白工学とを組み合わせることで輸送機構の全貌解明を目指している。本年度は、三量体により形成されるCentral Holeが膜貫通領域中央に存在し、基質透過経路となっている可能性があるため、Central Holeに面する膜貫通領域8番全域と膜貫通領域8番上方のFlexible Regionに含まれる5残基の計28個のCys変異体を構築し、NEMとの結合により環境を調べたが、すべてNEMと反応しなかったため、Central Holeは脂質で満たされた環境にあり、基質透過経路ではないと結論した。結晶構造から異物は側面の溝を基質透過経路としてflip-flop様式により膜輸送されると推定した。膜貫通領域9番の変異体では、G908CとA912Cが多くの化合物に対し耐性が低下しこの推定を支持した。また、変異導入したシステイン間の架橋形成により、構造情報から推定していたTo1CとAcrBのドッキングを、初めて生化学的にその存在を明らかにした。現在プロトン透過経路についても解析を進めている。また、耐性が低下するランダム変異導入を行い、To1C docking, Pore, Transmembraneの各domainから約80の変異体を得て解析を行い、さらに基質特異性の異なるAcrDとAcrBのキメラ蛋白質の作製も行っており、詳細な基質輸送経路も解明を目指している。

2. 細菌の情報伝達による異物排出蛋白質の発現制御ネットワークの解明

我々は、大腸菌のゲノム上に20種類の異物排出蛋白質が存在していることを明らかにしたが、そのほとんどは標準培地中では発現していないと考えられている。大腸菌には病原因子などの遺伝子発現調節を行う細胞間情報伝達物質としてAI-2やインドールなどが知られており、それらの細胞外への分泌は厳密に制御されていると考えられる。そこでこれらの物質が排出蛋白質の発現を誘導するのではないかと考え検証を行い、インドールによって7種類の異物排出蛋白質(acrD, acrE, cusB, emrK, mdtA, mdtE, yceL)の発現が顕著に誘導されることを見出した。二成分情報伝達系BaeSR、CpxARを欠損させた株ではacrDとmdtAの発現誘導が大きく抑制された。酸条件下で機能する転写制御因子GadXを欠損させた場合にはmdtEの発現誘導が完全に消失した。mdtEやyji0をはじめとする数種類の排出蛋白質遺伝子の転写量がQuorum sensing因子であるAI-2によって発現誘導が観察された。また、MdtEFは幅広い範囲の化合物を基質として排出しているが、MdtEFの基質となる化合物は顕著な発現誘導を示さず、細胞壁構成成分のN-アセチルグルコサミンを加えたときに発現が約10倍上昇した。異物排出蛋白質の発現量はインドールやAI-2といった細胞間情報伝達シグナルや細胞壁構成成分によって調節されていることが明らかとなった。また、異物排出蛋白質を負に制御する因子の探索、H-NSやHfqなどの核様体蛋白質による異物排出蛋白質の発現制御にも受けていることも見出した。

3. 脳に発現する新規ABC輸送体ABCA5のクローニングとノックアウトマウスの解析

我々はマウス脳に発現する新規ABC輸送体ABCA5をクローニングし、その臓器発現を調べ、脳、精巣に主に発現していることを明らかにしている。その脳における機能を調べるため、ノックアウトマウス作成に成功した。ノックアウトマウスは発育不良であり、多頻度で拡張型心筋症を引き起こして10から12週令以降に高頻度で致死となる。心臓以外には甲状腺の崩壊も生じ、また脂肪の蓄積や肝の肥大、眼球突出などの異常も観察された。ラットリンパ節法により抗マウスABCA5モノクローナル抗体を作成し蛋白レベルでの発現解析に成功した。ABCA5が強制発現細胞内ではリソゾームに局在し、組織においては、脳、肺、心臓、甲状腺で検出され、特に脳内ではオリゴデンドロサイトに分布していることを明らかにした。

4. 血小板におけるスフィンゴシン1リン酸の放出輸送体の同定

血小板は、S1Pの開裂酵素が欠損しスフィンゴシンのリン酸化酵素の活性が高いためS1Pが多量に蓄積している。無刺激時に蓄積されているS1Pはトロンビンなどの刺激により血小板の外へと放出される。我々はこの放出反応が排出輸送体によって担われていると考え、輸送体のエネルギー源を明らかとするために種々のイオノフォアの効果を検討した。その結果、トロンビン刺激に伴う放出反応は水素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン勾配に依存しないことが明らかとした。今後、この輸送に関わるエネルギー源を明らかにするとともに、反転膜内へのS1Pの取込みの測定系を確立し輸送体の同定を試みる。

5. 新規マウスRND型膜蛋白質の検索と発現解析

バクテリアのRND型膜輸送体であるAcrBは異物排出を担い、バクテリアの薬剤耐性に関与している。高等動物において、AcrBと相同性を有する蛋白質としてNiemann-Pick病原因遺伝子NPC1が知られている。NPC1のような哺乳類型RND膜輸送体が他にも存在するとすれば、その生態における役割は大変に重要であると予想される。本年度、我々は哺乳類型RND膜輸送体と考えられる新規遺伝子を相同解析により検索し、Sterol-sensing domain (SSD)をもつ3種の新規遺伝子を得た。また、その転写レベルでの臓器解析を行なった結果、各遺伝子が特異的な臓器発現を示したことから臓器特異的な役割をもつことが期待された。特にその新規遺伝子の1つであるRNDEu-3はその発現経時変化から精巣の成熟に関与する可能性も考えられた。

3. 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。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Effects of Efflux Transporter Genes on Susceptibility of *Escherichia coli* to Tigecycline (GAR-936). T. Hirata, A. Saito, K. Nishino, N. Tamura, and A. Yamaguchi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, (2004) 2179-2184.
- Role of Histone-like Protein H-NS in MultiDrug Resistance of *Escherichia coli*. K. Nishino, and A. Yamaguchi *J Bacteriol.* 186, (2004) 1423-1429.
- Comprehensive Studies of Drug Resistance Mediated by Overexpression of Response Regulators of Two-Component Signal Transduction Systems in *Escherichia coli*, H. Hirakawa, K. Nishino, T. Hirata, and A. Yamaguchi : *J. Bacterio.*, 185, (2003) 1851-1856.
- Global Analysis of Genes Regulated by EvgA of the Two-Component Regulatory System in *Escherichia coli*, K. Nishino, Y. Inazumi, and A. Yamaguchi : *J. Bacteriol.*, 185, (2003) 2667-2672.
- Cloning of Rat ABCA7 and Its Preferential Expression in Platelets, M. Sasaki, A. Shoji, Y. Kubo, S. Nada, and A. Yamaguchi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304, (2003) 777-782.
- Membrane Topology of ABC-type Macrolide Antibiotic Exporter MacB in *Escherichia coli*, N. Kobayashi, K. Nishino, T. Hirata, and A. Yamaguchi: *FEBS Lett.*, 546, (2003) 241-246.
- Roles of TolC-dependent Multidrug Transporters of *Escherichia coli* in Resistance to β -lactams, K. Nishino, J. Yamada, H. Hirakawa, T. Hirata, and A. Yamaguchi: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, (2003) 3030-3033.
- β -lactam Resistance Modulated by the Overexpression of Response Regulators of Two-Component Signal Transduction Systems in *Escherichia coli*, H. Hirakawa, K. Nishino, J. Yamada, T. Hirata, and A. Yamaguchi: *J. Antimicrob. Chemother.*, 52, (2003) 576-582.
- Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB, A. Yamaguchi, S. Murakami, R. Nakashima and E. Yamashita: *FASEB J.* 17, (2003) A1185(part2) suppl. S.
- Mechanisms of Drug/H⁺ Antiport: Complete Cysteine-Scanning Mutagenesis and the Protein Engineering Approach, N. Tamura, S. Konishi, and A. Yamaguchi: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7 (2003) 570-579.

- Multidrug-Exporting Secondary Transporters, S. Murakami, and A. Yamaguchi: Curr. Opin. Struct. Biol., 13 (2003) 443-452.
- 異物排出トランスポーターの結晶構造、ついに決まる, 村上 聡、山口 明人: 蛋白質・核酸・酵素, 48, (2003), 26-32.
- 多剤排出トランスポーターAcrBの結晶構造解析, 村上 聡: 生物工学 81, (2003)155-160.
- 大腸菌多剤排出トランスポーターAcrBの結晶構造解析, 村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人: 放射光 16 (2003) 204.
- 大腸菌多剤排出トランスポーターAcrBの結晶構造解析, 村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人: 日本結晶学会誌 45 (2003) 256-261
- 薬剤排出蛋白質遺伝子資源の解析に関する研究 (黒屋奨学賞受賞論文), 西野邦彦: 日本細菌学雑誌、 58 (2003) 581-594.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数: 0件 (CREST研究期間累積件数: 0件)