

「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、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。私たちは一昨年、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レベル立体構造の決定である。16年度は、立体構造情報に基づいて部位特異変異導入やキメラタンパク質の構築と解析を進め、基質認識部位の同定に向かって前進した。(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：我々は推定される異物排出タンパク候補遺伝子の全強制発現クローニングライブラリをもとに、二成分情報伝達系による発現調節ネットワークの解析を進めてきた。16年度は、とくに細胞間情報伝達と異物排出遺伝子発現調節に注目し、インドールが大腸菌の細胞間情報伝達に重要な働きをしていることを発見すると共に、その異物排出遺伝子発現制御と病原性発現について解析を行った。また、いわゆるQuorum sensingのAI-2分子の安定誘導体を合成し、AI-2による異物排出遺伝子発現調節を調べた。さらに、異物排出遺伝子発現抑制因子の探求も行った。(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。16年度はノックアウトマウスに関する第一

報を出版することができた。

## 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

私たちは一昨年、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、AcrBと極めてホモロジーが高いにもかかわらず、基質特異性がやや狭く、代わりに酸性基が一つ多いペニシリン誘導体に高い排出能を示すAcrDとのキメラタンパク質を作成し、AcrBがAcrD様の性質に転換するために必要な最低限のアミノ酸残基が、一個のAsp→Glyへの変換と、3個のArg残基の挿入にあることを突き止めた。ところが、驚くべきことに、これらの残基は構造上から当初推定されていたcentral cavityにはなく、個々のモノマー頭部内部のフェニルアラニンクラスター領域に存在した。これにより、vestibule→central cavity→pore→funnelというこれまでの想定経路ではなく、vestibuleから入った基質は、フェニルアラニンクラスター領域で認識され、ポア上部に合流するという経路が有力となった。

基質結合型AcrB結晶の構造解析はま成功していないが、少なくともYuらが2003年にScienceに報告したcentral cavityへの結合を示す構造は間違っている。私たちの研究室で追試できないだけでなく、M. Possらもまた独立に2.7Å解像度で基質結合型結晶のcentral cavityには基質はないことを示している。当研究室では、部分的に結合基質が見えてきており、それによるとやはり、フェニルアラニンクラスターである可能性が高い。16年度はこの結果を発表するまでにはいたらなかったが、本CREST期間中には、基質の透過経路について、構造情報を交え、きちんとした結論を報告したい。

### 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コードされている推定異物排出遺伝子すべての網羅的強制発現クローニングを行い、20種類が実際に何らかの既存の薬物・毒物を排出する膜輸送タンパク質であることを明らかにした。大腸菌はこのように多数の異物排出遺伝子を持っているにもかかわらず、遺伝子ノックアウトによって薬剤・毒物への感受性が変化するものはAcrBを含む2～3個にすぎない。すなわち、大部分は発現していないか、発現レベルが極めて低い。にもかかわらず、これらのオペロンに隣接して転写抑制遺伝子の存在が確認されているのはわずかに3個に過ぎない。私たちはこれらの異物排出遺伝子が、細菌の環境感知応答システムである二成分情報伝達系により発現誘導されてくることを見出し、発現制御ネットワークを報告している。

本年度はとくに、(1) 細胞間情報伝達と異物排出遺伝子発現制御の関連、および(2) 異物排出遺伝子発現抑制因子の探索という2つの方向で研究を展開した。まず、

(1) 細胞間情報伝達については、昨年度インドールが異物排出遺伝子発現を誘導することを見出したが、その制御機構について詳しく解析した。その結果、二成分系を介する誘導と、二成分系とは独立の経路の2通り存在することがわかった。また、インドールによる制御は、菌の生育段階に応じた発現制御、言い換えると定常期での発現を誘導することがわかった。大腸菌には定常期での細胞間情報伝達を担うホモセリンラクトンという情報伝達分子が欠けており、これに代わってインドールがQuorum sensingの第3のオートインデューサーとして働くことが示唆された。もうひとつの対数増殖期で働くオートインデューサー2に関しては、きわめて不安定な物質であるため、その研究が大幅に遅れていたが、私たちはこの安定誘導体を合成し、作用を確認した。それを用いて、オートインデューサー2も異物排出遺伝子制御に関連することを見出した。

(2) 異物排出遺伝子抑制因子に関しては、トランスポゾンを用いたランダムノックアウト法で検索を行い、きわめて興味深い遺伝子を発見した。鉄の代謝に関連する遺伝子の発現抑制因子furである。この遺伝子を欠損すると、異物排出遺伝子のうちAcrD, MdtABCが特に大きく発現誘導される。また、鉄欠乏状態でも発現誘導されることがわかった。」これらの異物排出タンパクが鉄取り込みに必要なキレート化合物シデロホアの排出にかかわっている可能性を含めて、鉄と異物排出の関係を今年度さらに詳しく解析していきたい。

### **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。16年度はこの成果をMolecular & Cellular Biochemistryに投稿し受理された。出版は17年夏の予定。

### **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を詳しく解析し、開口放出によってではなく、膜輸送体により分泌されていることを明らかにした。CREST期間内には、この排出トランスポーターの分子としての実態を明らかにしたい。

以上、16年度は多岐にわたる方向に向かって新しい研究の萌芽が生まれ、着実にデータが積み重ねられた。」17年度はこの成果を論文の形にまとめ、成果を広く報告する一年にしたい。

### 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（原著論文）発表

- Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system, K. Nishino, T. Honda and A. Yamaguchi, J Bacteriol., 187, (2005) 1763-72.
- Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*., H. Hirakawa, Y. Inazumi, T. Masaki, T. Hirata and A. Yamaguchi, Mol. Microbiol., 55, (2005) 1113-1126.
- Protein Crystallization by Combining Laser Irradiation and Solution-Stirring Techniques, H. Adachi, A. Niino, S. Murakami, K. Takano, H. Matsumura, T. Kinoshita, M. Warizaya, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki, Japanese Journal of Applied Physics, 44, (2005) 1365-1366.
- Membrane Protein Crystallization Using Laser Irradiation, H. Adachi, S. Murakami, A. Niino, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, A. Yamaguchi and T. Sasaki, Japanese Journal of Applied Physics, 44, (2005) 1365-1366.
- Protein Cryocrystallography Using Laser-Processed Crystal, H. Kitano, H. Matsumura, H. Adachi, S. Murakami, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi and T. Sasaki, Japanese Journal of Applied Physics, 43, (2004) L1376-L1378.
- Extramembrane Central Pore of Multidrug Exporter AcrB in *Escherichia coli* Plays an Important Role in Drug Transport, S. Murakami, N. Tamura, A. Saito, T. Hirata and A. Yamaguchi, J. Biol. Chem. 279, (2004) 3743-3748.
- 創晶プロジェクトー新しいタンパク質結晶育成技術の開発ー、安達宏昭、新納愛、北野博史、村上聡、高野和文、松村浩由、井上豪、森勇介、佐々木孝友、

構造生物、10、(2004) 1-18.

- 薬剤排出タンパク質の構造と機能 薬剤耐性化の克服を目指して、村上聡、山口明人、バイオサイエンスとインダストリー、62、(2004) 11-16.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件 (CREST研究期間累積件数：2件)