

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」  
平成 24 年度採択研究代表者

H28 年度  
実績報告書

山口 明人

大阪大学産業科学研究所  
特任教授

異物排出輸送の構造的基盤解明と阻害剤の開発

## § 1. 研究実施体制

### (1) 「構造・排出輸送研究」グループ

- ① 研究代表者: 山口 明人 (大阪大学産業科学研究所、特任教授)
- ② 研究項目
  - ・異物排出輸送の構造的基盤解明と阻害剤の開発

### (2) 「有機合成研究」グループ

- ① 主たる共同研究者: 加藤 修雄 (大阪大学産業科学研究所、教授)
- ② 研究項目
  - ・異物排出タンパクに対するユニバーサル阻害剤の分子設計および化学合成

### (3) 「タンパク質動態解析」グループ

- ① 主たる共同研究者: 松田 知己 (大阪大学産業科学研究所、准教授)
- ② 研究項目
  - ・異物排出タンパク質及び排出薬剤の動態解析

## § 2. 研究実施の概要

異物排出タンパクは細菌から高等生物に至るまで、ほとんど全ての細胞に存在し、細胞レベルのもっとも基本的な生体防御システムを構成している。現実の生育環境の中では生物にとって必須なものである。ところが、何らかの原因により過剰発現すると、多剤耐性感染菌やがん細胞の多剤耐性といった問題を引き起こし、現代における化学療法に深刻な問題を提起している。異物排出タンパクが原因となる多剤耐性を克服する有効な臨床治療薬は全くない。

本研究プロジェクトは、世界で初めて異物排出タンパクの X 線結晶構造決定に成功し、世界の異物排出輸送研究を終始牽引してきた実績の上に立ち、異物排出輸送の構造的基盤と異物認識機構を全面的に解明するとともに、異物排出タンパクの過剰発現が原因で生じる多剤耐性菌感染症を克服するための阻害剤開発のための基盤研究を行う。

### (1) 異物認識の構造的基盤の解明

**MexB の基質結合構造の決定:** 可溶性精製 MexB は界面活性剤 DDM と結合しており、その結合構造はすでに決定している(Nakashima, R. et al. Nature 2013)。H28年度は DDM の約 2 倍の分子量がある界面活性剤 LMNG に続いて、さらに大型の界面活性剤 C7NG 結合構造を決定した。先の論文(Nakashima et al. Nature 2011)で大分子量薬物は近位ポケット、小分子量薬物は遠位ポケットに結合が観察されたことを報告したが、LMNG、C7NG は大分子量でも遠位ポケットに結合していたことから、結合ポケット選択は単純に分子量によるものでは無いことが示された。今後、阻害剤のインシリコスクリーニングにも役立つ情報である。

**MexY の構造解析:** 広域阻害剤の分子設計には、MexY の構造情報が必須である。界面活性剤に n-Undecyl-β-D-Maltopyranoside を用い、添加剤として界面活性剤 MEGA-9 を加える条件で結晶析出の再現性向上と結晶の大型化・高品質化を達成した。これにより 4.2Å 分解能での構造決定にも成功した。決定された分子構造は三量体との予想に反して単量体であったため、構造機能相関を議論することは困難であるが、阻害剤設計に寄与する構造情報を獲得した。

**in vitro 再構成系による基質排出時における AcrAB- TolC 複合体の 1 分子動態解析:** 膜タンパク質の輸送活性を測定に対して応用の可能性のある脂質二重膜を張ったマイクロチャンバー ALBiC (Watanabe R., et al., Nat Commun. 5:4519, 2014) を用いた in vitro 再構成系の構築に取り組んだ(図 1)。昨年度に引き続き、ALBiC に用いるマイクロチャンバーを産業科学研究所技術室との連携により作製した。チャンバー膜上に膜

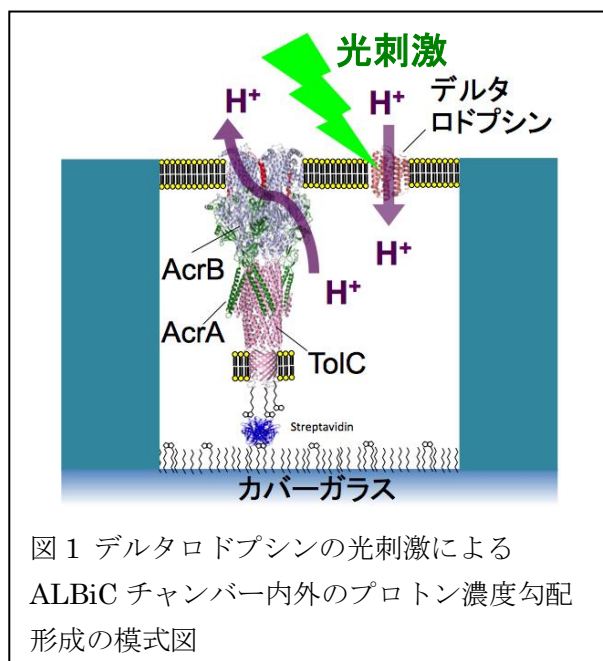


図 1 デルタロドプシンの光刺激による ALBiC チャンバー内外のプロトン濃度勾配形成の模式図

貫通型ナノポアを形成する  $\alpha$ -Hemolysin の埋め込みを試みたところ、チャンバー内の蛍光色素 alexa 488 の外部への移動に伴う蛍光強度の減少が見られ、AcrAB-TolC 複合体の観測系での H<sup>+</sup>濃度勾配作成に応用できる可能性が示唆された。さらに、基質輸送中の機能的回転のイメージングを目指して、標識した AcrAB-TolC 複合体構成要素の膜への埋め込み、及び光駆動プロトンポンプ、デルタロドプシンを用いたプロトン濃度勾配を生み出す系の構築に着手した。

### (3) 異物排出複合体の構造機能解明:

**2 者, 3 者複合体構造解析:** CryoEM を用いた AcrAB-TolC 三者複合体構造が相次いで報告されており、それらは全て構成比が 3:6:3 であった。AcrB と TolC は適切な位置にシステイン残基を導入するとジスルフィド結合を形成すること、構成比 1:1 の AcrB-AcrA 融合タンパクが野生型 AcrA の有無に関わらず十分な排出活性を有していることから、3:3:3 型三者複合体の存在が考えられる。*acrAB* 遺伝子欠損大腸菌株で AcrB-AcrA 融合タンパクと TolC を同時発現させる *in vivo* 実験において、AcrB と TolC が直接作用する AcrB-AcrA-TolC 三者複合体の形成を確認した。

**分子拡散測定による異物探索・排出モード切替仮説の検証:** FDAP 解析を用いた探索・排出モード切替仮説の検証: 前年度までに、生菌体での光活性化蛍光タンパク質 PA-GFP を融合した AcrB に対する FDAP 測定により、近位ポケット結合基質(近位結合基質)存在下では AcrB の拡散速度が有意に低下することを明らかにしてきた。本年度はさらに、近位結合基質の輸送に影響を与える変異が導入された AcrB 変異体を用いて、FDAP 測定により拡散速度に与える影響を調べた。その結果、変異体では近位結合基質存在下でも拡散速度が変化しないことから、近位ポケットでの基質の滞在が、AcrAB-TolC の複合体の安定性に寄与していることが示唆された。

### (4) 構造に基づく広域阻害剤の開発:

**SBDD による阻害剤の開発:** MexB の阻害剤結合ポケット内部に存在し得る「水」の性状を分子設計支援ソフト・WaterMap (Schrödinger K.K.) によって評価し、その情報を基に阻害剤の新たな化学構造テンプレートを設計した。このテンプレートに対するフォーカストライブラリーを化学合成によって構築した。その結果、MexY に対して阻害能を有する数種の化合物を得ることができた。広域阻害剤を指向した展開を継続中である。

**広域阻害剤の感染症治療薬としての可能性の検証:** 一昨年度、MexB および MexY を同時に阻害する広域阻害剤 **H-31** を見出し、国内製薬企業によって各種抗菌薬との顕著な併用効果も実証されていた。しかし、①血清添加時に併用効果が減弱する、②動物細胞に対する細胞毒性を有する、③マウスに対する急性毒性を有することも明らかになった。また、膜障害性を有することもあり、そのまま感染症治療薬として開発することには難があると判断した。

**化合物データベースからの阻害剤探索:** 既に東大化合物ライブラリーを用いたスクリーニングから、MexY 選択的阻害能を有する化合物を見出していたが、新たに阪大化合物ライブラリーから、より強力な MexY 阻害剤を含め数種のヒット化合物を見出した。このうち、MexY 阻害剤については、周辺化合物を合成することで、構造活性相関研究も遂行した。