

「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

異物排出トランスポーターは生物界に広く分布し、細胞の生体防御を担うもっとも基礎的な装置である。しかしながら、病原細菌や癌細胞でこのたんぱく質の発現が上昇すると、多剤耐性というやっかいな問題を生じる。本研究課題では、(1) 異物排出トランスポーターの分子構造を決定して、異物を認識する機構を解明するとともに構造に基づいて蛋白工学的解析を行い排出輸送機構を解明する、(2) 異物排出トランスポーターの発現調節機構を解明する、(3) 動物細胞で、情報伝達分子の分泌を担う全く新しい排出トランスポーターを検索し解析する、という3つの方向で研究を進めている。

2. 研究実施内容

(1) 異物排出トランスポーターの構造決定と機能解析

大腸菌主要異物排出タンパク AcrB は外膜チャネル TolC および膜融合蛋白 AcrA と共役して異物を細胞質膜から細胞の外側へと排出している。その特徴は、化学構造上は一見関連性のない極めて幅広い化合物を排出することである。平成14年に私たちはその立体構造決定に成功し、膜貫通部とペリプラズムに突き出した頭部を持つ3量体であって、基質を細胞質膜外層から取り込み、AcrB 頭頂部から直接 TolC チャネルに渡す構造をしていることを突き止めた。本年、基質結合型 AcrB 結晶構造の決定に成功し、従来推定されてきた中央空洞ではなく、それぞれのモノマーの内部にあるフェニルクラスターに結合していることを示した。多様な化合物の認識は疎水性相互作用を中心としたフレキ

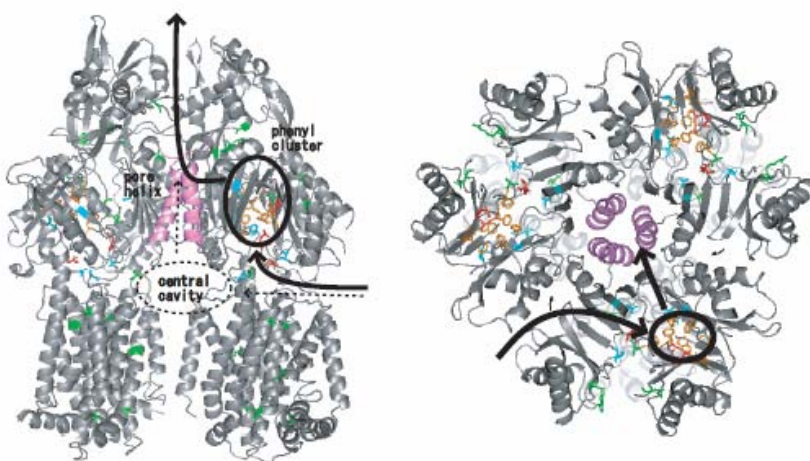


図1. AcrB による基質の輸送経路。左図は横から、右図は上から見た図。

シブルな結合部位へのマルチサイト様式による結合のためということが明らかになった。

AcrB とは膜融合タンパク AcrA や TolC を共有し、酸性ペニシリン誘導体を良く排出する AcrD との配列の比較から AcrD 型基質特異性決定部位を部位特異的変異導入により検索した結果、やはり、フェニルクラスター領域及びその近傍の 3 つの残基の荷電が決定的な働きをしていることがわかった。これらの知見から、AcrB による排出は、図 1 に示すように、それぞれのモノマーの内部を通して輸送されること、3 つのモノマーはそれぞれ、待機状態→基質結合状態→排出状態を順番に繰り返す機能的回転機構により駆動されていることが明らかとなった。

(2) 異物排出トランスポーターの発現制御機構

大腸菌には 20 種類の内在的異物排出遺伝子があるがその大部分は通常ほとんど発現していない。私たちは、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異物排出遺伝子の発現が誘導されることを見出してきた。しかしながら、それらの発現を誘導するシグナルについては不明であった。そこで、異物排出蛋白発現誘導シグナルの探索を行い、アミノ酸の代謝産物であるインドールにより複数の異物排出遺伝子が発現誘導されることを見出した。インドールは菌の生育の定常期で培地に蓄積され細胞間情報伝達を担うことがわかった。RND 型多剤排出遺伝子の一つである mdtEF はインドールにより特に強く発現誘導されるとともに、菌の定常期で大きく発現上昇し、定常期における主要異物排出タンパクとなる事がわかった。驚くべき事に、mdtEF の発現誘導は、インドールだけでなく、catabolite control によっても起こる。さらに細胞壁の崩壊を引き起こすペニシリン剤によっても誘導される。図 2 に示すように、mdtEF の発現を誘導するシグナル経路は互いに独立な 6 通りもの経路があることがわかった。このような多彩な発現制御を受けていることは、MdtEF が異物の排出以外の何らかの重要な細胞機能を担っているためと考えられる。現在、MdtEF の本来の生理的基質の探索を行っている。

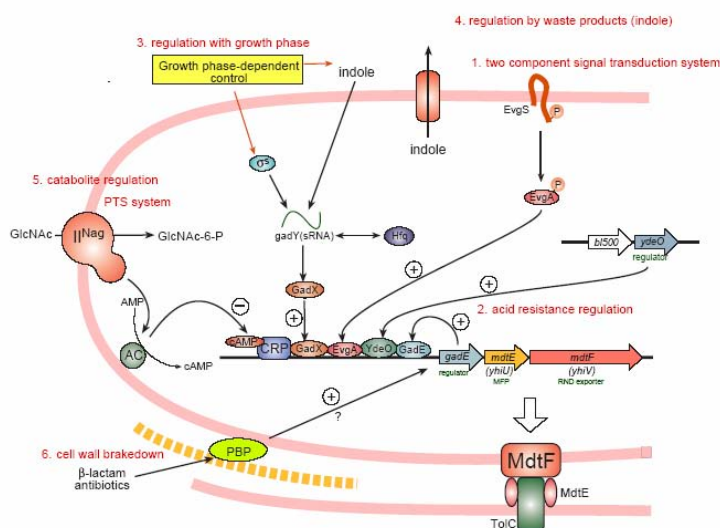


図 2. mdtEF の多彩な発現制御機構

らに細胞壁の崩壊を引き起こすペニシリン剤によっても誘導される。図 2 に示すように、mdtEF の発現を誘導するシグナル経路は互いに独立な 6 通りもの経路があることがわかった。このような多彩な発現制御を受けていることは、MdtEF が異物の排出以外の何らかの重要な細胞機能を担っているためと考えられる。現在、MdtEF の本来の生理的基質の探索を行っている。

(3) 高等生物における生理的機能の解明

異物排出遺伝子は高等生物にも数多く存在する。しかし、それらの排出タンパクが異物以外にどのような生理的物質を輸送するのかは未解明の部分が多い。基質が全く未知のオーファン輸送体も数多く存在する。一方、疎水性の情報伝達物質の多くは、その分泌輸送機構が未知である。異物の多くは疎水的ないしは両親媒的な物質が多く、異物排出タンパクは脂質二重層から基質を排出することにより異物を識別していると考えられている。この分子機構はまさに疎水的な情報伝達物質の予想される排出機構と同じである。私たちは、異物排出タンパクファミリーのオーファン輸送体の中に、疎水性情報伝達物

質の排出輸送体が含まれているに違いないと考えこの研究を行っている。まだ同定には至っていないが、17年度はそれに向かって大きな前進があった。

まず、血小板から放出される脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸(S1P)の排出について詳しく研究し、S1Pが血小板内部の分泌小胞に蓄積され開口放出されるのではなく、細胞質に存在して排出輸送体により排出されることを証明した。S1P輸送体には、ATP加水分解に共役するABC型と、Caにより活性化されるものの2種類存在することも明らかになった。現在、標識S1Pを用いて、親和性標識法により血小板膜中の輸送タンパク質を同定する試みを行っている。

ノックアウトマウスを構築して解析していたABCA5については、甲状腺での分布を詳しく調べ、ろ胞細胞のろ胞側細胞質膜近傍のリソソームあるいはファゴソームに局在し、その分布は甲状腺ホルモン前駆体サイログロブリンのろ胞細胞内分布と一致することを見出した。

3. 研究実施体制

異物排出トランスポーター構造機能解析グループ

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. 異物排出トランスポーターの構造決定と機能解析
2. 異物排出トランスポーター発現制御機構
3. 高等生物における生理的機能の解明

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

- N. Kobayashi, T. Nishi, T. Hirata, A. Kihara, T. Sano, Y. Igarashi, and A. Yamaguchi
Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner
J.Lipid.Res., **47(3)**, (2006) 614-621.
- N. Tamura, S. Murakami, Y. Oyama, M. Ishiguro, and A. Yamaguchi
Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking
Biochem., **44(33)**, (2005) 11115-11121.
- Y. Kubo, S. Sekiya, M. Ohigashi, C. Takenaka, K. Tamura, S. Nada, T. Nishi, A. Yamamoto, and A. Yamaguchi
ABCA5 resides in lysosomes, and ABCA5 knockout mice develop lysosomal disease-like symptoms
Mol. Cell. Biol., **25(10)**, (2005) 4138-4149.
- K. Nishino, T. Honda, and A. Yamaguchi
Genome-Wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system
J. Bacteriol., **187(5)**, (2005) 1763-1772.

- H. Hirakawa, Y. Inazumi, T. Masaki, T. Hirata, and A. Yamaguchi

Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*
Mol. Microbiol., **55(4)**, (2005) 1113-1126.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数： 0 件 (CREST 研究期間累積件数： 3 件)