

「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とそのホモログは生物界に広く分布している。そのうちのいくつかは、何らかの原因で過剰産生されることにより、病原細菌やがん細胞で多剤耐性を引き起こし、今日の化学療法上の大きな問題になっている。最近、院内感染で何人もの死者を出した多剤耐性緑膿菌の多剤耐性もこの異物排出トランスポーターの過剰産生が主原因である。多剤排出型異物排出トランスポーターは、非常に多種類の、化学構造上は一見関連性のない薬物・毒物を排出する。一方で、多くの異物排出トランスポーターホモログは通常は発現していないか、あるいは、発現していてもその本来の輸送基質が不明である。本研究では、(1) 異物排出トランスポーターの構造を決定し、構造を元に異物認識機構を解明する、(2) 多くの発現していない異物排出トランスポーターが、いついかなる時に発現するか、その調節機構を解明する、(3) 異物排出トランスポーターの本来の生理的意義は何かと言うことを解明する、という3つの大目標を掲げて研究を推進している。

2. 研究実施内容

以下、18年度に得られた主要な成果について概括する。

(1) 異物排出トランスポーターの構造決定

私たちは、本 CREST 研究開始の前年、2002 年に世界で初めての異物排出トランスポーター構造として、大腸菌の主要異物排出タンパク AcrB の構造決定に成功した。これは、イオン・プロトン共役型膜輸送体としても初めての構造決定であり、異物排出研究のみならず膜輸送研究に革命的新展開をもたらすエポックメイキングな成果と評価されている。CREST 研究はこの成果を受けて計画されたものである。2002 年の構造には、基質が結合していなかった。そのために、異物排出トランスポーターが多剤を認識する機構、また、排出経路等、輸送機構の詳細は全く不明であった。そのため、本 CREST では、基質結合型結晶構造を解くことが最も大きな課題の一つとなった。そして、昨年、2006 年に基質結合型結晶構造の決定に成功し、滞在認識機構を明らかにすることができた。

決定された基質結合型構造は驚くべきものであった。最初の構造で予想されていた基質結合部

位、AcrB3量体中央の空洞(Central cavity)には基質は無かった。モノマー頭部ポータードメイン内部のフェニルアラニンクラスター領域に結合していた。しかも、3量体当たり一個の基質が結合していた。3量体は非対称で、基質を結合しているモノマーは、基質結合ポケットが膨らみ、基質の結合に適した形に

側鎖が配置されている。そして、基質結合ポケットから頭頂部のロート状開口部への出口は、隣のモノマーから倒れ込んできた α ヘリックスによって塞がれる形になっていた。AcrB分子内部の溶媒アクセスチャンネルを見ると、頭部と膜貫通部の境界にある側面開口部からフェニルアラニンクラスターポケットまでチャンネルがつながっており、そのチャンネルの先端に基質が存在した。基質から先はチャンネルはつながっていない。一方、隣の基質を結合していないモノマーでは、基質結合ポケットは収縮し、かつ、頭頂開口部への出口が、中央 α ヘリックスが基質結合モノマー側へ倒れているために大きく開口する形になっている。一方、入り口からのチャンネルは消失していた。入り口からの経路の消失は、第8膜貫通ヘリックスの先端のランダムコイルが α ヘリックスとなって膜貫通ヘリックスが2ターン分ほど伸び、その部分が入り口からのチャンネルに突き出してシャッターの役割をしていることによるものであった。すなわち、このモノマーでは、入り口を閉じ、出口を開いて、かつ結合部位から基質を絞り出すような変化が起こっていた。そこで、このモノマーを「排出型」モノマーと名付けた。第3のモノマーは、入り口は開いているが基質結合部位はまだ収縮したままであり、基質が入ってくるのを待つ形になっていた。そこでこれを「待機型」モノマーと名付けた。すなわち、たった一つの結晶構造の中に、輸送反応の3つの主要中間体が全て含まれていた。そして、環状に配列したモノマーが互いに協調して、結合→排出→待機を繰り返すことにより排出輸送が駆動される「機能的回転輸送機構」が明らかになったのである。

どうして多剤を認識できるのかという点に関しても決定的な知見が得られた。ミノサイクリンとドキシソルビシンの結合位置を比べると、互いに一部は重複しつつ、異なるアミノ酸側鎖と相互作用していた。つまり、一つの大きな結合ポケットの中に、複数の薬剤に対する結合部位を持つという、マルチサイト結合を示していた。基質分子の形に応じた柔軟な結合ポケットの変化と相まって、マルチサイト結合が多剤認識の構造的基礎であると言うことが明らかとされた。

エネルギー共役についても重要な知見が明らかになった。膜貫通ヘリックス束の中央に位置する第4膜貫通ヘリックスの Asp407、408 と第 10 ヘリックスの Lys940 は互いに向き合っており、イオンペアを構成している。これらの残基はホモログ内で保存されており、変異させると活性を失い、かつ膜貫

ARTICLES

Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism

Sudhakar Jaisankar^{1,2,3,4}, Suresh Kanchirala^{1,2,3,4}, Sriya Nandori^{1,2,3,4}, Tripathi Mahapatra^{1,2,3,4} & Ashish Varshney^{1,2,3,4}

AcrB is a multidrug efflux transporter in Escherichia coli that cooperates with an outer-membrane channel, TolC, and a membrane fusion protein, AcrA, to form an extrusion system for export of drugs and other substrates. The AcrB drug transport cycle consists of three primary states of substrate binding, and a different conformational arrangement of the three functional states of the transport cycle. Bound substrate was found in the progressive channel of one of the three monomers. The substrate binding pocket is generally, and allosterically, flexible. The substrate binding state was supported by a three-step functionally rotating mechanism in which substrate undergoes conformational change.

Multidrug resistance is a major problem in the treatment of infectious diseases. AcrB is a multidrug efflux transporter in Escherichia coli that cooperates with an outer-membrane channel, TolC, and a membrane fusion protein, AcrA, to form an extrusion system for export of drugs and other substrates. The AcrB drug transport cycle consists of three primary states of substrate binding, and a different conformational arrangement of the three functional states of the transport cycle. Bound substrate was found in the progressive channel of one of the three monomers. The substrate binding pocket is generally, and allosterically, flexible. The substrate binding state was supported by a three-step functionally rotating mechanism in which substrate undergoes conformational change.

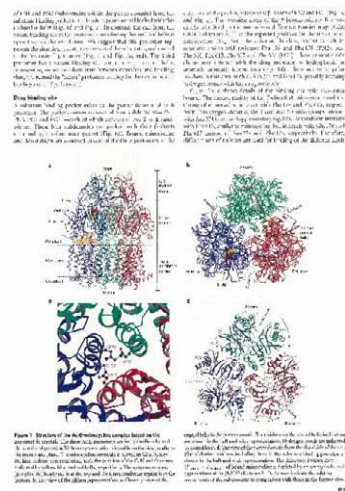


Figure 1. Structure of AcrB showing the transport cycle. (a) AcrB monomer with substrate bound in the progressive channel. (b) AcrB monomer with substrate bound in the extrusion channel. (c) AcrB monomer with substrate bound in the binding channel. (d) AcrB monomer with substrate bound in the binding channel, showing the conformational change of the alpha-helix.

通部で荷電残基はこれ以外には存在しないことから、プロトンの透過経路と考えられてきた。「排出型」モノマーの膜貫通部では、Lys940 残基が 45° 回転して、両 Asp 残基側鎖の外に出て、イオンペアが解消していることがわかった。これはおそらく Asp 残基のプロトン化によるものであろう。そして、このねじれが頭部に伝わって、排出型モノマーの中央 α ヘリックスを結合型モノマー方向に倒れ込ませ、且つ入り口を閉じ、基質結合部を収縮させる一連の変化を誘起するものと考えられる。

この構造決定により、異物排出輸送のメカニズムはかなり良く理解できるようになった。しかしまだ、膜融合蛋白 AcrA の役割、外膜チャンネル TolC との結合がどうして起こり、TolC 下端を開かせる変化がどうやって誘起されるのかなど、残された課題もいっぱいある。これらの解明に向かって、複合体構造の決定に取り組みたい。

(2) 細胞間情報センシングによる異物排出トランスポーターの発現誘導

昨年度、大腸菌は自らの産生、排出するインドールを感知して、特定の異物排出遺伝子発現を誘導することを発見した。今年度は、インドールを産生しないサルモネラ菌が、やはりインドールを感知して同様の異物排出遺伝子を誘導することを見出した。すなわち、インドールは異菌種間でセンシングされている。現在、その感知機構の解明に全力を挙げている。

異物排出遺伝子は N-アセチルグルコサミンによっても誘導されることがわかった。この誘導はいわゆるカタボライトコントロールによるもので、カタボライトシュガーであるグルコースやグルコサミンでも同じく誘導されるが、ノンカタボライトシュガーのショ糖では誘導されない。カタボライトコントロール機構である PTS システム、cAMP、CRP などがこの誘導機構に関与していることを明らかにした。これまで、カタボライトコントロールは、グルコースに対する取り込み輸送系 PTS^{Glu} のサブユニットである Enzyme IIA^{Glu} を経由して生じるとされてきたが、N-アセチルグルコサミンによる異物排出遺伝子誘導には IIA^{Glu} は全く関与しておらず、N-アセチルグルコサミン特異的輸送系 NagE のみに依存していた。すなわち、それぞれのカタボライトシュガーに対応した PTS システムが独立にカタボライトコントロールを行うという事実を発見した。これについては現在論文準備中である。

(3) 異物排出遺伝子の生理機能

異物排出トランスポーターが細菌のイオン恒常性維持に関与しているという論文を現在執筆中である。

動物の異物排出トランスポーターの生理的機能については、血小板で脂質メディエータースフィンゴシン1リン酸の分泌が ABCA 様膜輸送体によって仲介されているという結果を得て報告した。さらに、その分子実体を同定するため、ABCA ファミリータンパク質の血小板での発現を調べたところ、ABCA7 のみが高発現していることがわかった。そこで、ABCA7 ノックアウトマウスの作成に取り組み、現在ヘテロマウスを経てホモノックアウトマウスが誕生したところである。

3. 研究実施体制

(1) 「異物排出トランスポーターの構造機能解析」グループ

①研究者名

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
- ・ 異物排出トランスポーターの構造決定と機能解析
- ・ 異物排出トランスポーター発現制御機構
- ・ 異物排出トランスポーターの本来の生理的機能の解明

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- T. Numata, Y. Ikeuchi, S. Fukai, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, T. Suzuki and O. Nureki.
Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the tRNA Thiolation Enzyme MnmA from Escherichia coli Complexed with tRNA^{Glu}.
Acta Crystallographica Section F. **62**(4), 368-371(2006)
- T. Tsukazaki, H. Mori, S. Fukai, T. Numata, A. Perederina, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, D. G. Vassylyev, O. Nureki and K. Ito.
Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction of SecDF, a Translocon-Associated Membrane Protein, from Thermus Thermophilus.
Acta Crystallographica Section F. **62**(4), 376-380 (2006)
- S. R. Krungkrai, K. Tokuoka, Y. Kusakari, T. Inoue, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori, Y. Kai, J. Krungkrai and T. Horii.
Crystallization and Preliminary Crystallographic Analysis of Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase from the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum.
Acta Crystallographica Section F. **62**(6), 542-545 (2006)
- S. Yamada, N. Awano, K. Inubushi, E. Maeda, S. Nakamori, K. Nishino, A. Yamaguchi and H. Takagi.
Effect of Drug Transporter Genes on Cysteine Export and Overproduction in Escherichia coli.
Appl Environ Microbiol. **72**(7), 4735-4742 (2006)
- A. Kobayashi, H. Hirakawa, T. Hirata, K. Nishino and A. Yamaguchi.
Growth Phase-Dependent Expression of Drug Exporters in Escherichia coli and Its Contribution to Drug Tolerance.
J. Bacteriol. **188**(16), 5693-5703 (2006)
- H. Hirakawa, Y. Inazumi, Y. Senda, A. Kobayashi, T. Hirata, K. Nishino and A. Yamaguchi.

N-Acetyl-D-Glucosamine Induces the Expression of Multidrug Exporter Genes, *mdtEF*, via Catabolite Activation in *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. **188**(16), 5851-5858 (2006)

- S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto and A. Yamaguchi.
Crystal Structures of a Multidrug Transporter Reveal a Functionally Rotating Mechanism
Nature **443**(7108), 173-179 (2006)
- K. Inaba, S. Murakami, M. Suzuki, A. Nakagawa, E. Yamashita, K. Okada and K. Ito.
Crystal Structure of the DsbB-DsbA Complex Reveals a Mechanism of Disulfide Bond Generation.
Cell **127**, 789-801 (2006)

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:1 件 (CREST 研究期間累積件数:4 件)