

山口 明人

大阪大学産業科学研究所・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、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、助教)

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. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(研究の狙い) 臨床的に大きな問題となっている多剤耐性感染菌の多剤耐性の大きな原因である多剤排出タンパクの構造と機能を徹底的に解明し、構造に基づく阻害剤開発の目途をつけることが本プロジェクトの狙いである。

(これまでの研究の概要) 私達のグループは世界で初めて異物排出タンパクの構造決定および薬物結合構造の決定に成功し、異物排出タンパクが薬物の細胞内侵入を脂質二重層表層で排除する membrane vacuum cleaner であり、薬物排出はホモ 3 量体の各モノマーが待機→結合→排出という 3 状態を交互に取る機能的回転輸送機構によることを明らかにした。多剤の認識は薬物分子の部分構造を認識する複数のサイトの組み合わせによるマルチサイト結合で行われていること、マルチサイト結合をするポケットが 2 個用意されており、薬物は両方のポケットを通過してペリスタポンプ機構によって輸送されていること、そのエネルギーは、プロトン駆動力によるプロトン輸送の際に膜貫通領域のイオン対に生じる可逆的なねじれ運動が遠隔コンホメーション共役により薬物輸送部位に伝わることで供給されていることを明らかにしてきた。さらに、本研究プロジェクト開始直前に、世界で初めて阻害剤結合構造の決定に成功し、阻害剤の分子設計に可能性を切り開いた。

(本プロジェクト開始以来の研究進捗状況と今後の予定) 以下、研究項目ごとに記述する。

### (1) 異物排出の構造的基礎の解明:

1-1) 阻害剤結合特異性の構造的基礎の解明:ピリドピリミジン誘導体 ABI-PP は大腸菌等の AcrB、緑膿菌の MexB の優秀な阻害剤であるが、緑膿菌多剤耐性のもう一つの重要な排出タンパク MexY を全く阻害できない。本研究直前、AcrB と MexB の ABI-PP 結合構造を決定したことで、阻害剤結合ピットの存在が明らかになり、AcrB, MexB のその部位にある Phe178 が MexY では Trp に置き換わっており、その大きな側鎖による立体障害で ABI-PP が結合できなくなっていると推定された。AcrBF178W 置換体では ABI-PP による阻害を受けなくなり、逆に MexYW177F 変異体では ABI-PP に阻害されるようになったことはこの推定を裏付けるものであった。ところが、MexBF178W 変異体は依然として ABI-PP に感受性を保っていた。この原因を明らかにするため、本研究ではまず、MexBF178W の ABI-PP 結合構造を決定した。ABI-PP はたしかに野生型と同じ結合ピットに結合しており、Trp 側鎖は結合に邪魔にならない位置に納まっていた(図 1)。AcrB や MexY の構造において Trp 側鎖に同様の配置を取らせるためには V139(AcrB), I138(MexY)が障害になると推定された。そこで今度は、

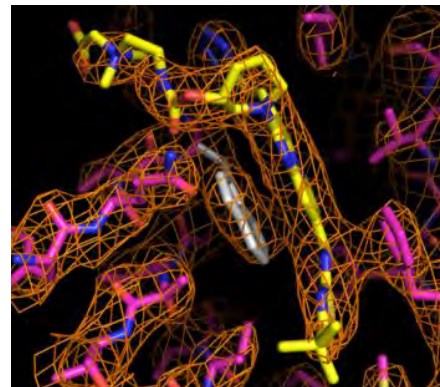


図 1 : MexBF178W の ABI-PP 結合型構造 (結合部位拡大図)

AcrBF178WV139A, MexYI138A 変異体を作り、活性測定したところ、いずれも ABI-PP に阻害される性質を示した。これにより、異物排出タンパクの ABI-PP 阻害特異性はその結合ピットの立体障害により決まることが明らかになった。本結果は米国科学誌 *Nature* に掲載される<sup>1)</sup>。

1-2) 異物排出のマルチサイト・ファジー結合仮説を証明するための FRET 解析: 24 年度は FRET 解析のための準備として Acceptor となる蛍光分子の探索を行った。図 2 に示す 4 つの Cy5 誘導体のうち、Cy5-C1O4 と Cy5-BF4 の 2 つが AcrB の良好な基質であることが確認された(図2)。ついで、Donorを結合させる AcrB 蛋白の分子設計を行った。FRET シグナル検出のためには、3 量体当たり 1 個の donor 蛍光分子を結合させねばならない。このため、Cys-free の AcrB3 分子をリンカーを介して融合し、そのうち一個の AcrB にのみ 2 個の Cys 残基(1 個の donor を 2 個の S-S 結合で安定的に結合させるため)を導入した融合 AcrB 遺伝子を生設計し、現在その構築中である。

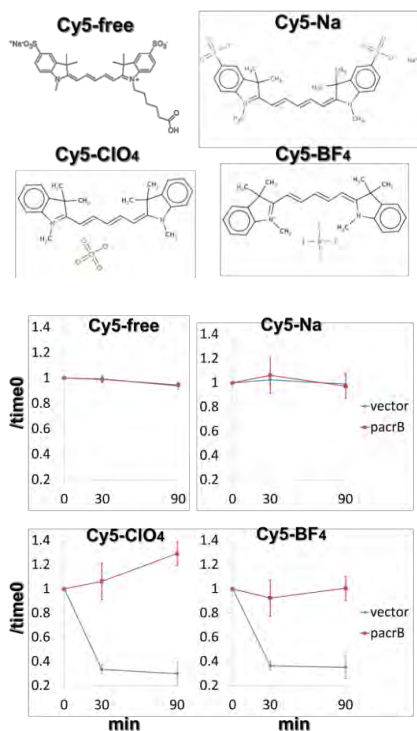


図 2. donor 候補分子 (上段) と AcrB による輸送活性 (下段)

### (2) 異物排出タンパクの多様性と生理的役割の解明

前出の MexY および、ABC 型排出タンパクでありながら RND 型と同様に外膜チャンネル TolC と共役することが知られている MacB の構造決定に向けて、発現プラスミドの構築と、産生確認を行った。

### (3) 異物排出複合体の構造機能解明: RND 型異物排出タンパクは排出タンパクと、外膜チャンネル(TolC または OprM)及び膜融合タンパク(AcrA, MexA の 3 者複合体として機能する。これらは単独には構造決定されてい

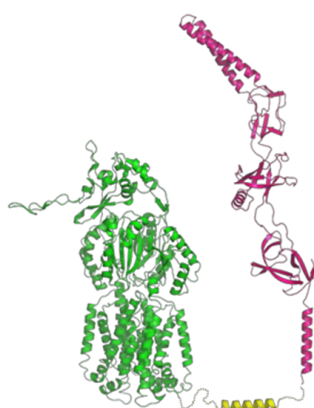


図 3. AcrB-AcrA 融合蛋白

が 1:1 であることを示す有力な知見である。

るが、実際に 3 者複合体が検出された例はなく、結合の量比も、結合構造も不明である。私達は、異物排出蛋白が薬物と結合したときにのみ一時的に外膜チャンネルとの複合体形成が生じるという探索・排出モード切り替え仮説を立てている。そこで、本研究では、2 者・3 者複合体構造の決定と、FDAP 解析によるモード切替仮説の証明を目指す。

3-1) まず、AcrB-AcrA 2 者複合体結晶作成に向けて、リンカーで両者をつないだ複合体遺伝子を生設計し(図 3)、融合タンパクが実際に大量発現することと、薬物排出輸送活性を保持している事を確認した(表1)。これは、2 者複合体結晶構築に向けた大きな一歩であるとともに、AcrB:AcrA の量比

表 1 Minimum inhibitory concentration, MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )

Strain	Oxa	CLX	ERY	MINO	NA	NOV	EtBr	Rho6G	BZC
W3104	400	400	100	3.13	6.25	800	800	>3200	100
W3104 $\Delta$ <i>acrAB</i> /pBAD33	<0.39	<0.78	<3.13	<0.2	0.78	<12.5	<3.13	6.25	3.13
W3104 $\Delta$ <i>acrAB</i> /pBAD33 <i>acrB</i> -linker- <i>acrA</i>	50	50	25	0.78	3.13	100	25	400	25

3-2) FDAP (光活性化後蛍光減衰)による菌体内での異物排出タンパク質の動態解析を行うための光活性化蛋白質 PA-GFP と AcrB の融合蛋白質発現プラスミドを構築し、排出活性を保持している事を確認した。これを用いて大腸菌生菌体で光活性化を測定した(図4)。まだ蛍光強度の増加が小さかったので、リンカー配列の挿入を検討している。併せて、TolC の標識蛋白も作成中である。

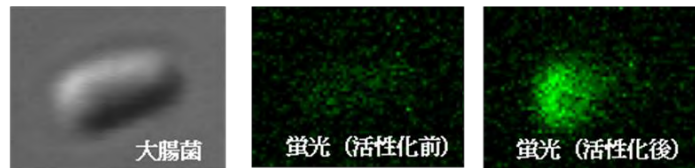


図 4. AcrB-PA-GFP 融合蛋白の光活性化

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Seiji Yamasaki, Katsuhiko Hayashi, Chikahiro Nagata, Kazuki Hoshino, Yoshikuni Onodera, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi, "Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters", *Nature* DOI 10.1038, 2013 (*in press*)