

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) 異物排出の構造的基盤の解明:

FRET 解析によるマルチサイトファジー結合仮説の検証: 異物認識の構造的基盤として、これまでの研究結果に基づき提唱したマルチポケット・マルチサイト結合に加えて、さらに、基質分子がマルチサイト結合ポケットの中で複数のサイトを振動している可能性が考えられる。これにより、一つ一つは弱い結合でもトータルとして効率的な輸送が可能になる。また、異物排出輸送体に対する基質結合位置の特定が難しい理由も説明できる。このマルチサイトファジー仮説を検証するため、基質分子と排出輸送体間の FRET 解析を行う。FRET 解析に当たって解決すべき問題は、AcrB は 3 量体で機能し、各モノマーがそれぞれ異なる輸送中間段階に相当する異なる構造を取るため、異なる輸送段階の FRET シグナルが混合されてしまうことである。これを解決するため、AcrB 3 量体当たり 1 個の FRET donor 蛍光分子を結合させるために、Cys-free の AcrB2 分子と 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 AcrB1 分子を融合させた AcrB 3 量体融合タンパク質発現プラスミドの構築を進めている。このような 3 量体融合タンパクが輸送活性を持つということは報告されている。これにより、3 量体当たり 1 個の蛍光分子で修飾することができる。これまでに、AcrB 遺伝子を 2 つタンデムに融合させたコンストラクトを作製し、3 つ目の AcrB の融合したコンストラクトを作製中である。また、精製 AcrB をカバーガラス上に再構成した脂質二重膜に取り込ませた 1 分子観察用サンプルの調製法を確立した。

(2) 異物排出タンパクの多様性と生理的役割の解明

RND 型以外の排出タンパクの構造決定: 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 MacB の構造解析に向けて、発現系の改良と自動結晶化装置を用いた結晶化条件のスクリーニングを行っている。この他生理基質の探索を可能とする定量用 LC-MS/MS を 25 年度中に導入した。

(3) 異物排出複合体の構造機能解析

RND 型排出タンパクの 2 者、3 者複合体構造の決定に向けた準備: RND 型異物排出タンパク AcrB または MexB は、外膜チャンネル (TolC, 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。実際に排出輸送体として機能する複合体を結晶化し構造決定する必要がある。しかし、これらサブユニット間の親和性はきわめて低く、個々の精製タンパクを混合し結晶化しても、それぞれ単独の結晶が形成されるだけである。そこで、これらのサブユニットをリンカーでつないで融合タンパクとして発現させ、輸送活性を検証した後結晶化することを試みる。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構築した。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。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 の量比が 1:1 であることを示す有力な知見である。

(4) 構造に基づくユニバーサル阻害剤の開発

SBDD による阻害剤の開発: 多剤耐性緑膿菌の主たる異物排出タンパク質である MexB および MexY に対するユニバーサル阻害剤を創出すべく、MexB と既知の阻害剤との共結晶構造および MexY のホモロジーモデルをもとに、*in silico*に設計した分子を約 30 種類ほど合成した。その結果、MexY 阻害剤を得るには至らなかったが、既知の MexB 阻害剤と同等の活性を持ち、かつ、はるかに分子サイズの小さな阻害剤の創出に成功した。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国内)

該当なし

論文詳細情報(国際)

1. Seiji Yamasaki, Saya Nagasawa, Aiko Fukushima, Mitsuko Hayashi-Nishino and Kunihiko Nishino, “Cooperation of the multidrug efflux pump and lipopolysaccharides in the intrinsic antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 68, No. 5, pp.1066-1070, 2013 (doi: 10.1093/jac/dks528)
2. Suguru Yamasaki, Eiji Nikaido, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Daisuke Fujiwara, Ikuo Fujii and Kunihiko Nishino, “The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs”, *Nature Communications*, vol. 4, No. 2078, pp.1-7, 2013 (doi: 10.1038/ncomms3078)
3. 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*, vol. 500, No. 7460, pp.120-126, 2013 (doi: 10.1038/nature12300)
4. Ryota Iino, Yoshimi Matsumoto, Kunihiko Nishino, Akihito Yamaguchi and Hiroyuki Noji, “Design of a large-scale femtoliter droplet array for single-cell analysis of drug-tolerant and drug resistant bacteria”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 4, No. 300, pp.1-6, 2013 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00300)
5. Naoki Kobayashi, Norihisa Tamura, Hendrik W. van Veen, Akihito Yamaguchi and Satoshi Murakami, “ β -Lactam Selectivity of Multidrug Transporters AcrB and AcrD Resides in the Proximal Binding Pocket”, *The Journal of Biological Chemistry*, (in press)