OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure of chloramphenicol-bound MexB reveals residues in the distal binding pocket that are critical for substrate recognition
Author(s)	上田, 雄士
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105664
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　上田　雄士　　）	
論文題名	Structure of chloramphenicol-bound MexB reveals residues in the distal binding pocket that are critical for substrate recognition （クロラムフェニコール結合MexBの構造から明らかにされた基質認識に重要な遠位結合ポケットのアミノ酸残基）

論文内容の要旨

緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）はグラム陰性桿菌に属す常在菌であり、様々な薬剤に対して耐性を持つ。また、この細菌は通常健常者には毒性を示さないが、免疫不全患者に重篤な感染症を引き起こすため公衆衛生上の問題となっている。さらに近年では、緑膿菌感染症の治療に用いられてきたβーラクタム、アミノ配糖体、フルオロキノロンに対して耐性を示す多剤耐性緑膿菌が確認されており、治療選択肢を制限する点で大きな課題となっている。これらの薬剤耐性には、RND型多剤排出ポンプが重要な要因の一つとして寄与する。このRND型多剤排出ポンプは、内膜のRNDトランスポーター、外膜チャネル（outer membrane factor; OMF）、および両者を連結するペリプラズムアダプタータンパク質（periplasmic adaptor protein; PAP）から構成され、薬剤を菌体内から菌体外へ排出する。構成要素の一つであるRNDトランスポーターは基質の認識と排出という複合体の根幹的な役割を担う。緑膿菌のRND型多剤排出ポンプのうちMexAB-OprMはクロラムフェニコールやβーラクタム系を含む幅広い薬剤を認識し、臨床分離株で頻繁に過剰発現することから緑膿菌の多剤耐性化に深く関与する。これまでの構造解析により、MexAB-OprMのRNDトランスポーターであるMexBは三量体として機能し、3つのプロトマーはそれぞれ異なる構造（Access、Binding、Extrusion）を形成することが報告されている。また、MexBには基質結合部位としてproximal binding pocket（PBP）とdistal binding pocket（DBP）が存在することが示されている。しかし、既報の複合体構造は、界面活性剤および阻害剤がDBPに結合したものに限られ、薬剤が基質結合部位（PBP/DBP）に結合した構造は報告されていない。そのため、薬剤の結合部位や認識に直接寄与するアミノ酸残基、ならびに結合様式は特定されておらず、多剤認識機構の構造基盤は十分に解明されていない。

そこで本研究では、MexBの多剤認識機構を理解するため、クロラムフェニコール結合型MexBの結晶を作製し、X線結晶構造解析によって2.89 Å分解能で複合体構造を決定した(図A)。得られた構造では、クロラムフェニコールがBinding状態のプロトマーのDBP深部（DBP groove）に結合しており、その結合様式に基づいて相互作用に関与する残基（Q125、R128、F178、G179、S180、Q273）を同定した(図B)。これら残基の寄与を検証するためDBP groove単一置換変異体（Q125E、R128E、F178Y/W/A、G179A、S180A、Q273E）を作製し、クロラムフェニコール添加培地での大腸菌増殖アッセイにより機能評価を行った。0.32 μg/mLクロラムフェニコール条件下で野生型MexBを発現する大腸菌は増殖低下を示さなかった一方、各DBP groove変異体を発現する大腸菌のいずれでも増殖低下が観察された。DBP grooveに位置する極性残基の置換（Q125E、R128E、S180A、Q273E）は疎水性残基の置換（F178Y/W/A、G179A）と比較して、より顕著な増殖低下をもたらし、その影響はQ125Eで最も大きかった(図C)。さらに、DBP groove内サブサイトが他の薬剤認識にも共通して関与するかを検証するため、クロラムフェニコールと基本骨格の異なる薬剤としてミノサイクリンおよびレボフロキサシンを用いて同様の大腸菌増殖アッセイを行った。その結果、DBP groove変異体では両薬剤においてWTと比べて増殖が低下し、特にQ125E、S180A、Q273E変異の影響が顕著であった。以上より、クロラムフェニコール結合構造で特定したDBP groove内サブサイトが複数薬剤の認識に共通して寄与することが示された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　上田雄士　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主査　教授	中川敦史
	副査　教授	高木淳一
	副査　教授	昆隆英

論文審査の結果の要旨

緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は、水中や土中などの自然環境に広く分布しており、健康な人の腸管などに保菌されていることも知られている。健常者には、通常、病原性を示さない弱毒細菌の一つであるが、一方で、感染防御能力の低下した患者においては病原性を発揮して、日和見感染症を引き起こす原因菌として問題となる。特に、複数の抗生物質に耐性を持つ多剤耐性緑膿菌による院内感染症の発生は、しばしば大きな社会問題となっている。緑膿菌の薬剤耐性化機構の１つとして、RND（Resistance-Nodulation-Division）型の多剤排出ポンプ複合体の過剰発現が知られている。RND ポンプ複合体は、内膜に存在して基質（異物）認識と薬剤排出を担う RND、外膜に存在しチャネルとして働く Outer Membrane Factor (OMF)、ペリプラズムにし、RND と OMF をつなぐ役割を担う Membrane Fusion Protein (MFP)からなる三者複合体である。

申請者の上田雄士氏は、緑膿菌でもっとも多く発現する RND 型多剤排出ポンプ複合体である MexAB-OprM の薬剤認識・排出機構の解明を目指し、そのトランスポーター部である MexB に着目して研究を進めた。ソーキング法を用いて様々な薬剤との複合体の調製を試みたが、従来得られていた結晶では薬剤との結合構造が得られなかった。そこで上田氏は、新たに弱塩基性条件下での結晶化条件の最適化を行い、薬剤結合を確認できる 3Å 以上の分解能の結晶化条件を決定し、抗生物質の１つであるクロラムフェニコール結合状態の MexB の原子構造を 2.89Å 決定する事に成功した。得られた複合体構造から、クロラムフェニコールが、多くの薬剤の主要な結合部位と考えられている distal binding pocket と呼ばれる領域に結合する事を明らかにし、相互作用に関与する残基を同定した。さらにこれら相互作用に関与すると考えられる残基の寄与を検証するために、クロラムフェニコール添加培地での増殖（耐性）アッセイにより機能評価を行い、クロラムフェニコール結合構造で特定した部位が複数の薬剤の認識に広く寄与することを示した。

これらの結果は、緑膿菌の薬剤排出機構の一端を明らかにするとともに、新たなメカニズムに基づいた多剤耐性緑膿菌に対する抗菌剤の開発につながる重要な知見である。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。

1) Structure of chloramphenicol-bound MexB reveals residues in the distal binding pocket that are critical for substrate recognition. Yushi Ueda, Ryo Yonehara, Etsuko Ishizaka-Ikeda, Atsushi Nakagawa & Eiki Yamashita. *The Journal of Biochemistry*, *Accepted*.