The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Topology and Transport Mechanism of the Bacterial Drug Efflux Proteins, Tet K and AcrB
Author(s)	Erika, Fujihira
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41957
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	Erika（エリカ）　Fujihira（フジヒラ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　15377　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	Topology and Transport Mechanism of the Bacterial Drug Efflux Proteins, Tet K and AcrB 細菌薬剤排出蛋白 Tet K および AcrB の膜貫通トポロジー決定と輸送機構の解析
論文審査委員	（主査） 教　授　山口　明人 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　本田　武司　　教　授　宮本　和久

論文内容の要旨

近年、薬剤の能動的排出に基づく薬剤耐性菌が次々と発見され、特に多剤排出タンパクは多剤耐性の原因として注目を集めている。本研究では、まず、黄色ブドウ球菌由来のテトラサイクリン排出タンパク TetK の輸送機構と分子構造に関してグラム陰性細菌のテトラサイクリン排出タンパク TetB との比較研究を行った。

大腸菌で *tet*K 遺伝子を発現させ、TetK によるテトラサイクリン耐性を測定した。テトラサイクリンの TetK に対する最小発育阻止濃度（MIC）は25μg／mlであり、TetB と比べれば低いが、宿主菌の0.8μg／ml と比べれば、明らかに耐性を示した。次に、TetK による輸送活性を TetB による輸送活性と比較した。反転膜への^{3}H－テトラサイクリン取り込みを測定したところ、TetK は TetB とほぼ同程度の活性を示した。

TetB では膜貫通領域に存在する3個のアスパラギン酸、Asp15、Asp84、Asp285 が輸送機能に必須な残基である。ところが、TetKでは、膜貫通領域にアスパラギン酸ではなく3個のグルタミン酸が存在している。それは Glu30、Glu152 と Glu397 である。これらのグルタミン酸残基が、TetB のアスパラギン酸残基と同様な役割を果たしているのかどうかを調べるために、中性残基であるグルタミン、及び、酸性残基アスパラギン酸に置換した変異体を作成した。中性残基に置換した変異体産生菌は全て薬剤耐性が低下したが、特に、E397Q の耐性は完全に消失していた。一方、アスパラギン酸残基への置換体では、Glu397の耐性のみが低下した。次に、それらの変異体のテトラサイクリン輸送活性を測定した。中性残基への変異体では E397Q の活性は完全に消失し、E30Q と E152Q の活性は大きく低下していた。一方、アスパラギン酸残基への変異体では E397D のみ活性が消失していた。この結果から、膜貫通領域の3個の酸性残基はいずれも輸送活性に重要な残基であり、特に Glu397はカルボキシル基の空間的配置も重要であることがわかった。

次に TetK 親水性領域の酸性残基の役割について検討した。TetB では、ループ領域の中でループ2－3上の Asp66 のみが輸送に必要な残基である。TetK と TetL 共通に保存されている親水性領域の酸性残基は6個ある。それらの酸性残基を中性又は他の酸性残基に置換した。それらの変異体産生菌のテトラサイクリンに対する耐性を測定したところ D318N と D318E のみが大きく低下した。また、テトラサイクリン輸送活性も D318N と D318E のみが消失していた。以上の結果から、親水性ループ領域の酸性残基では TetB の Asp66 と位置的に対応する Asp74 は必須残基ではなく、C末端側の Asp318 が TetB の Asp66 に相当する役割を担っていると考えられる。

TetK と TetB のアミノ酸配列の相同性は低く、TetB は12回膜貫通型であるのに対し、TetK は14回膜貫通型であ

ると推定されている。両者のトポロジーは本当に違っているのかどうかalkaline phosphatase（PhoA）融合法を用いて解析した。TetKの各推定親水性ループ或いは、その付近にPhoAを融合させた。Tet K－PhoAの融合部位がサイトプラズム側に存在しているならば、生菌体はPhoA活性を示さないのに対し、ペリプラズム側に存在しているとPhoA活性を示すはずである。構築した融合タンパクを持つ大腸菌のalkaline phosphatase活性を測定したところ、サイトプラズム側の10個の融合タンパクの中では、ループ6－7に融合したもの以外は予想通り、低いPhoA活性を示した。一方、ペリプラズム側での融合タンパクではループ5－6と13－14に融合したもの以外は高い活性を示した。この結果は10回膜貫通型を示している。ところが、ループ5－6と13－14の直前の推定膜貫通領域にはGlu残基が存在する。TetCでは、融合位置直前の膜貫通領域のAsp残基がstop transfer signalとして働き、成熟タンパクでは本来貫通していた領域の融合タンパクでの貫通を阻止し、この領域の直後に融合したPhoAはペリプラズム空間に分泌されないことが報告されている。TetKでも同様のことが生じていると考えられる。そこで、直前の膜貫通領域に存在するGlu152とGlu397をAlaに置換した変異体を構築し、同様にPhoA assayを行った。すると、14回貫通トポロジーに一致する結果が得られた。

次に、マルチコンポーネント型多剤排出タンパクAcrBの分子構造を解析した。AcrABは、内膜タンパク、ペリプラズムタンパク、外膜タンパクで構成されており、薬剤を外膜の外側に直接排出するが、その生化学的性質や構造などはほとんどわかっていない。本研究では、*acr*AB遺伝子をクローニングし、内膜タンパク成分であるAcrBの膜貫通トポロジーを部位特異的化学修飾法により決定した。

まず、大腸菌の染色体より*acr*AB遺伝子をクローニングし、MICを測定した。テトラサイクリン以外、測定した全ての薬剤（ethidium bromide、SDS、tetracycline、rifampin、acriflavin、crystal violet、novobiocinとerithromycin）に対して耐性を示した。これは、AcrABは多剤耐性因子であることを示している。

次に、Cys－less変異体を構築し、それをもとに、各推定ループ、或いはその付近にCys残基を導入した。構築した全てのCys変異体産生大腸菌より超音波破壊膜を調製し，^{14}C－NEMとの結合性を測定した。それらの変異体のうち約半分の変異体では^{14}C－NEMとの反応性は低かった。^{14}C－NEMと結合した変異体については、さらに生菌体でのAMSによるNEM結合阻害を測定した。［^{14}C］－NEMは膜透過性であり、AMSは膜不透過性のSH試薬である。挿入したCys残基がペリプラズム側であれば、［^{14}C］－NEMの結合はAMS前処理により阻害される。逆に、Cys残基がサイトプラズム側であれば［^{14}C］－NEM結合はAMSに阻害されない。AMS阻害測定の結果より、ループ1－2、5－6と7－8のCys残基は膜不透過性SH試薬AMSにより阻害され、ペリプラズム領域にあると確認された。他方、CとN末端、ループ4－5、6－7、8－9と10－11のCys残基はAMSに阻害されなかった。従って、それらの部位は細胞質側に存在していることがわかった。

導入されたCys残基の約半数はNEMとの反応性が低く、特に、ペリプラズム側では6本の推定ループ中3本では全く反応するCys残基がなかった。これは、大きな2つのループが物理的に覆い被さっていることを示すものかもしれない。そこでペリプラズム側のC末端の大きなループ7－8を削った効果について調べたところ、ループ3－4、5－6、9－10、11－12では、NEMの結合が観察された。これはループ7－8がペリプラズム側表面を覆っているという推定を裏付けている。

以上の結果からAcrBは12回膜貫通型構造をとり、2つの大きなループはペリプラズム側に存在していることがわかった。

論文審査の結果の要旨

近年、薬剤の能動的排出に基づく薬剤耐性菌が次々と発見され、特に多剤排出タンパクは多剤耐性の原因として注目を集めている。多剤排出タンパクによる多剤耐性という現象を克服するためには、排出タンパクの構造を決定して基質認識機構を明らかにし、認識されない薬剤の開発、或いは、多剤排出タンパクの阻害剤の開発に役立てることが必要である。

本研究では、まず、黄色ブドウ球菌由来のテトラサイクリン排出タンパクTetKの輸送機構と分子構造に関してグ

ラム陰性細菌のテトラサイクリン排出タンパクTetBとの比較研究を行った。まず、TetK と TetL 共通に保存されている酸性残基を中性又は他の酸性残基に置換した。その結果、TetK 膜貫通領域の 3 個の酸性残基はいずれも輸送活性に重要な残基であり、特にGlu397はカルボキシル基の空間的配置も重要であることがわかった。TetK 親水性ループ領域の酸性残基では TetB の Asp66 と位置的に対応する Asp74 は必須残基ではなく、C末端側の Asp318 が TetB の Asp66 に相当する役割を担っていることがわかった。

TetK と TetB のアミノ酸配列の相同性は低く、TetB は12回膜貫通型であるのに対し、TetK は14回膜貫通型であると推定されている。両者のトポロジーは本当に違っているのかどうか alkaline phosphatase（PhoA）融合法を用いて解析した。その結果、14回貫通トポロジーに一致する結果が得られた。

次に、マルチコンポーネント型多剤排出タンパク AcrAB の分子構造を解析した。内膜タンパク成分である AcrB の膜貫通トポロジーを部位特異的化学修飾法により決定した。まず、Cys－less 変異体を構築し、それをもとに、各推定ループ、或いはその付近に Cys 残基を導入した。その結果 AcrB は12回膜貫通構造をとり、2 つの大きなループはペリプラズム側、N－、C－末端はサイトプラズム側に存在していることがわかった。

以上のように、本論文では、グラム陽性細菌のテトラサイクリン排出タンパクTetKと大腸菌由来の多剤排出タンパク AcrAB システムの分子機能と構造を明らかにした。今後の基質認識機構、及び多剤耐性の解明につながる研究があり、博士の学位を授与するにふさわしいものと考える。