The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	異物排出蛋白の分子構造と機能に関する蛋白工学的解析
Author(s)	河邉, 哲寛
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41978
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

【14】

氏　　名	河邉哲寛（かわべ てつひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　15369　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	**異物排出蛋白の分子構造と機能に関する蛋白工学的解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　山口　明人 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　馬場　明道　　教　授　東　　純一

論文内容の要旨

臨床上、問題となっている多剤耐性を克服するためには、多剤排出タンパク質の基質認識機構を明らかにし、このタンパク質によって認識されない構造を持つ新しい化学療法剤を開発しなければならない。従って、このような一群の薬剤排出タンパク質の構造－機能連関を明らかにする必要があると考えられる。基質が、排出タンパク質のどの部位で認識されるのか？という課題に対する解答はまだ得られていない。これらの課題解明に向けて、本研究では、3種類の異物排出タンパク質を材料として取り上げた。

まず、薬剤排出タンパク質のうちで最も初めに同定されたクラスBテトラサイクリン排出タンパク質［TetA(B)］をモデルとして取り上げた。TetA(B) は、細菌の他の薬剤排出タンパク質と相同性があるため、TetA(B) の分子機構と分子構造の解明は、多剤耐性を担うタンパク質理解のためのモデル構築につながっていくと考えられる。そこで、TetA(B) における新しい機能アミノ酸残基の検索を、ヒドロキシルアミンを用いたランダム変異導入で行った。その結果、新たな機能残基として332位の Gly 残基を同定した。332位では、テトラサイクリンに対する耐性度と反転膜小胞を用いたテトラサイクリン輸送活性の結果から、アミノ酸側鎖容積の小さいことが要求されていた。G332S 変異体から機能を回復した抑圧復帰変異体では、Gly332 と細胞膜を介して反対側の Ala354 が Asp に変異していた。354位近傍は、G332S 変異によって大きくコンフォメーション変化していることが，[^{14}C]N－ethylmaleimide (NEM) を用いた実験より明らかになった。さらに、以前、同様の耐性回復パターンを示していた L30S／G62L 変異体との間において、交差の耐性回復効果が見られた。すなわち、G332S変異に対して L30S 変異が、また、G62L 変異に対して A354D 変異が耐性回復効果を有していた。これは、G332S／A354C、L30C／G62L 変異体と同様の遠隔コンフォメーション効果によってもたらされていた。二次元トポロジー上で遠位に存在するこの二つの領域が相互作用し合うということから、この二つの領域が立体構造上においては近接している可能性が浮かんだ。この可能性を Cys 二重変異体を用いた S－S 架橋形成実験によって検討したところ、30位と354位の間に S－S 架橋形成が見られ、この二つの領域が非常に近接していることが明らかとなった。このことが30／62と332／354の相互間における耐性回復効果を引き起こしたと考えられる。また、この二つの領域が近接しているということは、TetA(B) 分子では N 末端と C 末端が互いに近接し、環状構造をとっていることを示唆している。

次に、他のクラスのテトラサイクリン排出タンパク質とのアミノ酸配列の相同性に基づいて、TetA(B) の保存性 Arg 残基に関して検討を行った。7つの Arg 残基のうち、31、67、71、238の4つの Arg は、重要アミノ酸ではなかっ

た。一方、127位ではArgそのものではなく正荷電が、70、101位ではArg残基そのものが要求されていた。次に、膜貫通領域に存在するArg101に関して、塩橋形成の可能性を検討したが、膜貫通領域内の酸性残基であるAsp15、84、285との間での塩橋形成を示すような結果は得られなかった。従って、TetA(B) はlactose permeases等とは異なり、膜貫通領域内の荷電残基間で塩橋を形成していないことが明らかとなった。

次に、大腸菌の内在性異物排出タンパク質であるAcrAB系のAcrAの分子構築に関して解析を行った。AcrAB系は、グラム陰性細菌に特有の膜構造に起因したRND familyに属するタンパク質である。浸透圧ショック法、ショ糖密度勾配遠心法、ureaを用いた膜表在性タンパク質の分画の3stepの分画を行った結果、AcrAタンパク質は内膜表在性の膜タンパク質であることが明らかとなった。AcrA－TetBCtとAcrB－$(His)_6$を共発現させた大腸菌より調製した膜画分に対して、抗Histidine－tagモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、AcrBのみならずAcrAも同時に免疫沈降されてきたことより、AcrAとAcrBが直接相互作用して複合体を形成していることが明らかとなった。AcrAのN末端の24アミノ酸は、その配列の特徴からsignal sequenceであると推定されてきたが、この点に関して、[^{14}C]NEMとAMSのSH基に対する反応性を利用した方法によって検討を行った。NEMとAMSのCys残基に対する反応性と、免疫沈降されてきたAcrAタンパク質の分子量から、AcrAのN末端がAcrAの成熟化に伴ってsignal sequenceとして切断されること、その過程にCys25が必須であること、しかし、この切断はAcrAの機能発現には必須のプロセスでは無いことを証明した。今回得られた結果と、以前明らかにされた結果をまとめると、AcrAの分子構築は以下のようにまとめることができる。すなわち、AcrAは、N末端のsignal sequenceが切断されて成熟型のタンパク質になった後、ペリプラズム空間に出てくる。ペリプラズム空間に出てきたAcrAは、AcrBと複合体を形成し、さらに、外膜に存在するTolCタンパク質と相互作用することによって、大腸菌の異物排出を行い、生体防御を担っていると考えられる。

最後に、抗癌剤を含めた異物排出と生体内老廃物の排出の両面から興味深いcMOATタンパク質の培養細胞系における発現系と、基質輸送活性の測定系確立を行った。そのために、まずcMOATタンパク質に対するウサギポリクローナル抗体を作製した。この抗体は、CHO－K1、COS－7株に発現させたcMOATタンパク質を特異的に認識した。CMFDAとmBClを基質としたcMOATの基質輸送活性測定では、CHO－K1／cMOAT株、COS－7／cMOAT株において、CHO－K1株、COS－7株と比べ約3～4倍の基質排出活性が見られた。また、この排出反応後の細胞内における残存蛍光基質量にも有意の差が見られた。これより、CMFDAとmBClを用いたcMOATの基質輸送活性測定系が確立出来た。

論文審査の結果の要旨

現在、臨床現場において、種々の異物排出タンパク質（特に全く構造や作用機序の異なる複数の薬剤を排出できる多剤排出タンパク質）の存在がクローズアップされ、問題となっている。

これを克服するためには、異物排出タンパク質の基質認識機構を明らかにし、このタンパク質によって認識されない構造を持つ新しい薬剤を開発しなければならない。しかし、異物排出タンパク質が、どのように基質を認識し、輸送しているのか？という課題に関しては、まだ不明の点が数多く残されている。

これらの課題解明に向けて、本研究では、まず、薬剤排出タンパク質のうちで最も初めに同定され、多剤排出タンパク質とも相同性の高いクラスBテトラサイクリン排出タンパク質［TetA(B)］をモデルとして取り上げている。ランダム変異導入、抑圧復帰変異体、[^{14}C]－NEM結合実験、Cys二重変異体を用いた分子内架橋などを用いた解析により、TetA(B) 分子はN末端とC末端が近接した環状構造を採っていることを明らかにしている。また、新たに構造維持や機能に必須、または重要なアミノ酸残基も同定している。今回、確立したCys二重変異体を用いた方法は、TetA(B) タンパク分子の立体構造予測のための基礎的方法として用いることが出来ると考えられる。

続けて大腸菌の内在性多剤排出タンパク質であるAcrAB系に関して、AcrAの詳細な分子構築について解析を行っている。複数の分画法を用いAcrAが内膜表在性のタンパク質であること、免疫沈降法を用いてAcrAとAcrBが複合体を形成していること、[^{14}C]－NEM結合実験よりN末端がsignal sequenceとして切断されることなどを明らか

にしている。これらの事実は、今後、RND family に属するタンパク質の多剤排出機構を理解するための基礎的知見を与えている。

最後に、動物細胞における異物排出タンパク質としてヒト cMOAT タンパク質に対するポリクローナル抗体を作製し、cMOAT の培養細胞における発現系と、基質輸送活性測定系の確立を行っている。今後、この方法を用いて、簡便に cMOAT の新しい基質や阻害剤の探索、cMOAT の機能アミノ酸残基の検索を、行っていくことが可能になると考えられる。

以上のように、本論文は、複数の異物排出タンパク質に関した多くの基礎的知見を引き出したと共に、今後の異物排出タンパク質の分子機構解明に向けた解析方法を確立しており、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。