The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	異物排出タンパク質の構造と機能に関するタンパク工学的研究
Author(s)	田村, 憲久
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45669
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

【4】

氏　　名	田　村　憲　久（たむら　のりひさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　19416　号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学系研究科分子薬科学専攻
学　位　論　文　名	**異物排出タンパク質の構造と機能に関するタンパク工学的研究**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　山口　明人 （副査） 教　授　小林　祐次　　教　授　前田　正知　　教　授　本田　武司

論　文　内　容　の　要　旨

トランスポーターは膜を介した物質の輸送をつかさどり、生命現象に重要な役割を担っている膜タンパク質である。異物排出タンパク質は、がん細胞や微生物において薬剤耐性の獲得に寄与している。微生物が薬剤耐性を獲得するには、(1)薬剤の分解または修飾による不活化、(2)薬剤作用点の変異、(3)薬剤の能動的排出による薬剤濃度の低下といった種類がある。なかでもトランスポーターによる薬剤耐性化は、同時に複数の薬剤に対して耐性化することも多く、感染症の治療を困難にしている。

大腸菌の主要な多剤耐性因子である AcrAB-TolC は、内膜タンパク質 AcrB、膜融合タンパク質 AcrA、外膜タンパク質 TolC から構成されており、プロトンとの対向輸送により構造に相関のないさまざまな基質を排出する。AcrAB-TolC ホモログの MexAB-OprM は、日和見感染症で問題となっている緑膿菌での耐性に寄与している。一般的な異物排出タンパク質は、内膜タンパク質単体で機能し、cytoplasm から periplasm へと基質を排出するが、AcrAB-TolC は基質を cytoplasm および periplasm から取り込み、直接菌体外へと排出する。そのため、periplasm に作用標的のある β-lactam 剤を菌体外に排出することにより、耐性化することが可能である。また AcrB が属する RND superfamily には、ヒトのニーマンピック病の原因遺伝子である NPCl、hedgehog signaling のレセプター patched などが含まれており、このタンパク質の機能を解明することは非常に重要である。私は本研究室で結晶構造が解かれた AcrB を用いて、その機能の解明を試みた。

AcrB の結晶構造より、AcrB は homo trimer を形成していることが明らかになり、vestibule から取り込まれた基質は、central cavity から pore helix、funnel と通って TolC に受け渡されると推定された。pore helix を構成する D99 から P119 までの 21 アミノ酸の Cys 走査変異体の解析を行うと、pore helix の内側に側鎖を向けているアミノ酸残基（D101、V105、N109、Q112、P116）を Cys に置換した場合にのみ耐性低下が引き起こされ、基質輸送に pore helix が重要であることが示唆された。そこで Cys 走査変異体の耐性低下の原因を詳細に検討すると、Q112C は S-S 架橋形成により、pore helix が閉じた状態で固定されることにより耐性低下していることが示唆された。一方、V105C、N109C は、Ser 変異体でも Cys 変異体と同様の耐性低下を示したことから、アミノ酸の側鎖が機能に重要であると示唆された。次に Cys 修飾試薬（N-ethylmaleimide）を用いた解析から pore helix 両端は親水的な環境であるのに対し、中央は疎水的環境で約 helix2.5 回転分の permeability barrier が存在していることが明らかになり、pore helix が close state であるという結晶構造の知見と一致した。

つぎに、AcrBの基質認識部位の解析を行った。AcrBの基質結合型結晶は現在得られていないため、多剤排出タンパク質の遺伝子発現転写因子の基質結合型の構造より、芳香族アミノ酸が豊富で、基質結合ポケットを形成している部分に着目した。また、AcrB およびそのホモログのキメラタンパク質の解析より、認識部位は periplasm domain に存在すると推定されており、AcrB の結晶構造から２つの芳香族アミノ酸クラスターを選び出した。２つの芳香族アミノ酸クラスターのうち片方でのみ、Ala に置換することにより一部の薬剤に対して耐性低下が観察された。さらに、F136A 変異体では耐性低下だけでなく carbenicillin に耐性化し、薬剤耐性パターンの変化が観察された。このことから、片方の芳香族アミノ酸クラスターが基質認識に関与していることが示唆された。

最後に AcrAB-TolC 複合体形成についての解析を行った。AcrB と TolC は、その結晶構造解析より、それぞれ 70、100Åの非常に大きな periplasm domain を持っていることが明らかになり、直接接触して複合体を形成していることが示唆された。TolC が様々なタンパク質と共役することから、AcrB と TolC の相互作用は一過性で、非常に検出し難いものであった。そこで AcrB と TolC の結晶構造を用い、AcrB-TolC 複合体をモデリングし、shape complementarity と buried surface area という２つの指標を用いて、存在確率の高い２つの複合体モデルを得た。つぎにモデル上で近接する部位に Cys を導入し、S-S 架橋形成を検出することにより、実験的に複合体モデルの検証を行った。限られた Cys 変異体の組み合わせで AcrB-TolC 複合体を検出し、AcrB と TolC が直接接触することを実験的に初めて証明した。推定された２つのモデルはそれぞれ存在していることが示唆され、架橋形成のパターンから、２つの推定モデル以外にも AcrB と TolC の分子の先端どうして接触している中間状態も検出していると考えられた。AcrB と TolC は最初に分子の先端同士で接触した後に、安定な複合体を形成することが示唆された。このことは AcrAB が内膜を水平拡散し、必要に応じて TolC と複合体を形成し、基質を排出するというモデルによく一致する。

本論文は、結晶構造を基に AcrAB-TolC の基質輸送における pore helix の役割、基質認識部位、AcrB-TolC 複合体形成を明らかにした論文である。この研究を足がかりに、多剤排出タンパク質の阻害剤の開発、およびトランスポーターの動作原理の解明につながることを期待する。

論文審査の結果の要旨

田村憲久君の博士論文「異物排出タンパク質の構造と機能に関するタンパク工学的研究」に関して審査を行った。本論文は、田村君の所属する研究室において、世界で初めて決定された異物排出タンパク質 AcrB の立体構造に基づき、その輸送機構、異物認識機構および膜輸送複合体の分子構築を明らかにする目的で、遺伝子の部位特異的変異および変異タンパク質の部位特異的化学修飾を主な手段として行った、主に３つの成果から成っている。(1)AcrB 頭部中心にあるポアヘリックスへの変異導入。まず Cys 走査変異を導入し、機能に関係のある残基がすべてポアの内側を向いていることを明らかにした。これはポアが基質の経路の一部を構成することを示している。(2)頭部のフェニルアラニンクラスターのフェニル基に変異導入し、基質認識に変化が起こることから、基質認識部位を推定した。(3)AcrB は外膜チャンネルタンパク TolC 及び膜融合タンパク AcrA と複合体を形成し、基質を直接菌体外に排出しているが、これまで、AcrB と TolC が直接に相互作用しているとの知見はなかった。田村君は本論文で AcrB 頭頂部と TolC 底部に Cys 残基をそれぞれ導入し、特定の組み合わせの時に菌体内で S-S 結合が形成されることを確認した。これは、両者が直接複合体形成するという初めての知見である。以上のように、田村君は異物排出タンパクの作動機構について着実に理解を前進させる成果を上げた。本論文は大阪大学大学院薬学研究科博士の学位にふさわしいものと認められる。