

Title	異物排出タンパク質AcrAB-TolC複合体の結晶構造を基にした機能及び構造に関する 研究
Author(s)	岩田, 歩
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49678
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	岩田歩
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第22870号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	異物排出タンパク質 AcrAB-TolC 複合体の結晶構造を基にした機能及び構造に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人 (副査) 教授 宇野 公之 教授 土井 健史 教授 本田 武司

論文内容の要旨

異物の排出、情報伝達物質の輸送、pH調節などの膜を介した輸送は基本的且つ重要な生理現象である。膜輸送はチャネルやポンプ、トランスポーターと呼ばれる膜タンパク質によって行われる。トランスポーターの中には異物排出タンパク質と呼ばれる細胞にとって異物である薬剤や毒物を細胞外へと排出する一群のタンパク質が存在し、これらのタンパク質による輸送は細菌からヒト細胞に至るまで広く存在する最も基本的な生体防御機構であると認知されている。異物排出タンパク質による薬剤の能動的排出は同時に複数の薬剤に対して耐性化する事が多く感染症の治療を困難にしている。また真核生物においても異物排出タンパク質は癌細胞の抗癌剤耐性や解毒過程における抱合体の排出に関わっていることから注目を浴びている。

細菌の異物排出タンパク質はアミノ酸の一次配列の類似性やエネルギー共役機構などから5つのファミリーに分類されるが、中でも大腸菌に存在するRND (Resistance nodulation cell-division)型に属するAcrAB-TolC複合体は強力な異物排出タンパク質として知られている。この複合体は外膜コンポーネントであるチャネルタンパク質TolCとペリプラズムコンポーネントである膜融合蛋白質AcrA、そして輸送体本体である内膜タンパク質AcrBとでマルチコンポーネント型の排出システムを形成し機能している。本研究では多剤耐性機構の解明を目指し、AcrAB-TolC複合体の基質認識部位の解析と三者複合体の構造解析を行った。

基質認識部位の解析は本研究室にて解かれたAcrBの基質結合型の結晶構造を基に変異を導入し、その影響を調べることにより行った。結晶構造解析では抗生物質のミノサイクリンと抗癌剤のドキソルビシンの二種類の基質についてその構造が解かれている。これらの二つの分子はどちらもAcrBのPhe残基の豊富なフェニルクラスター内に結合していた。そこでフェニルクラスターを構成するPhe残基をAlaに置換し薬剤耐性への影響を調べたところ、Ala変異体では各種薬剤に対して感受性化した。また薬剤耐性パターンの変化は変異を導入するアミノ酸残基の位置によって異なる事が判明した。結晶構造解析においてミノサイクリンと相互作用している様子が見て取れたF615は単独のAla変異では薬剤耐性の大きな変化は無かったが、同様にミノサイクリンとの相互作用が

見られたF178と二箇所を同時にAlaに置換した場合には耐性が大幅に減少した。以上のことはAcrBの基質認識は基質分子により複数のアミノ酸残基を異なる組み合わせで利用する、マルチサイト型認識によって行われることを示している。更に詳細に調べるため、Alaに加えてVal、Leu、Ile及びTyrへの置換を行った変異体を構築して薬剤耐性への影響を調べた。すると疎水性アミノ酸残基であるVal、Leu、Ileでは様々な薬剤に対して感受性化した。Tyr変異体では野生型と同等の耐性が維持されていた。このことからAcrBの基質認識では疎水的相互作用よりもπ電子の重なりを利用した芳香環-芳香環相互作用がより重要な役割を担っていることが判明した。RND型に属するAcrBのホモログ間でフェニルクラスター内のPhe残基はよく保存されている。一方でこれらの異物排出タンパク質の基質特異性は異なるという事が知られている。これはRND型異物排出タンパク質でフェニルクラスターという基質認識を行う「場」は保存されているが、実際に基質分子を認識する際にはフェニルクラスター内のPhe残基とホモログ間で保存されていないアミノ酸残基が協調的に働いているためと考えられた。

AcrAB-TolC複合体の複合体形成に関してはAcrAとAcrBの相互作用領域の同定を行った。AcrAのAcrB相互作用領域はこれまでにそのC末が関与していることが知られていたが、近年報告された結晶構造ではC末100残基余りがディスオーダーしている。そのためAcrAがAcrBとどのようにして結合しているのかは未だ不明であった。今回NMR解析によりAcrAのW347~T350の領域がAcrBと相互作用しあうことが示唆された。中でもW347はCysに置換するとほとんどの薬剤に対して感受性化したことからAcrBとの複合体形成に関わっていると考えられた。AcrB側についてはAcrAが内膜にアンカーされた状態で存在する事からAcrAとの相互作用領域はAcrBペリプラズムドメイン上にあると推測された。そこでAcrBペリプラズムドメイン表面を中心にCys変異を導入しAcrA/W347Cとの間に分子間S-S架橋が形成されるアミノ酸残基を特定した。架橋形成が見られたアミノ酸残基は複数存在した事からAcrAのC末部分はAcrBのペリプラズムドメイン表面をなぞるように動いていると考えられた。またこれらのアミノ酸残基の位置は結晶構造解析において基質の取込型、結合型、排出型で構造が大きく変化する領域に集中していた。AcrAB-TolC複合体の基質輸送を行う際にはTolCのclosed formからopen formへの構造変化が必要であり、この変化はAcrAによって引き起こされるとされている。今回の結果と合わせるとAcrAB-TolC複合体の基質輸送が行われる際にはAcrAのC末を介してAcrBの基質結合状態がTolCに伝えられ、それによりTolCのゲートの開閉が行われるのではないかと推測される。

本研究によって異物排出タンパク質がどのようにして基質を認識しているのかをより詳細に知ることが出来た。またAcrA-AcrB複合体形成に重要な領域の決定がされた。これらの知見を応用し、認識されない薬剤や阻害剤の設計・開発などに繋がる研究が進められる事を期待する。

論文審査の結果の要旨

岩田歩さんの学位論文「異物排出タンパク質AcrAB-TolC複合体の結晶構造を基にした機能及び構造に関する研究」について論文審査を行った。

AcrAB-TolC及びそのホモログは、院内感染などで近年大きな問題となっている、緑膿菌などのグラム陰性細菌の多剤耐性の主たる原因の一つであり、その克服は重要な課題であるが、臨床的に有効な治療薬は確立していない。通常の膜輸送体とは異なり、非常に広範な化合物を排出すること、細胞質からの排出ではなくペリプラズムからの排出であることなど、特異的な性質を持っており、その解明が阻害剤の確立にも必要である。岩田さんの論文は、AcrB結晶構造に基づいて、部位特異的な変異導入を主たる手段として、(1)基質認識部位の特定とその性

質、(2)複合体構築の機序について研究を行ったものである。

(1)基質認識については、構造上、フェニルクラスター領域に結合することがわかっているが、岩田さんは、その領域の中のフェニルアラニン残基の役割について詳しく解析した。その結果、郵送される基質に応じて、相互作用するフェニルアラニン残基が異なっていることが確かめられ、基質認識における「マルチサイト結合」メカニズムが確認された。

(2)複合体構築に於いて、膜融合タンパクAcrAが何処に何個結合するのかは全くわかっていない。岩田さんはAcrB、AcrAの推定相互作用領域とその近傍にCys残基を導入して、S-S結合形成の有無を調べる方法により、相互作用部位の同定を試みた。結果、輸送過程の結合→排出段階で大きく構造変化するクレフト部位が相互作用領域であることを突き止めた。このことは、複合体当たり3個のAcrAが結合することを示唆すると共に、輸送に伴うAcrBの構造変化がAcrAを通じてToICに伝達され、ToICチャンネルの開閉を行うメカニズムを示唆するものであった。

岩田さんの論文は、AcrAB-ToIC系による異物排出メカニズムの詳しい理解に大きく貢献するものであり、本学薬学研究科博士学位論文としてふさわしい内容を備えていると判定した。