

Title	Crystal structure analysis of the outer membrane factors of multidrug efflux pumps from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Author(s)	米原, 涼
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/56071">https://doi.org/10.18910/56071</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 米原 涼 )

## 論文題名

Crystal structure analysis of the outer membrane factors of multidrug efflux pumps from *Pseudomonas aeruginosa*  
(緑膿菌由来多剤排出ポンプの外膜因子の結晶構造解析)

## 論文内容の要旨

グラム陰性好気性桿菌の緑膿菌はヒトに対する病原性を有し、免疫力の低下した患者に感染することで日和見感染を引き起こす。緑膿菌は様々な抗生物質に対して内在性の耐性を示し、その主な原因は多剤排出ポンプの発現に由来する。さらに、多剤耐性緑膿菌においては多剤排出ポンプが過剰発現されている。多剤排出ポンプはペリプラズムの membrane fusion protein (MFP)、内膜の resistance nodulation cell division (RND) トランスポーター、外膜の outer membrane factor (OMF) から構成される。RND トランスポーターが基質の結合能を有し、輸送を担う。OMF は輸送されてきた基質の外膜における通路として機能し、MFP は RND と OMF をつないでいる。

緑膿菌の多剤排出ポンプとして12種類が同定されている。各多剤排出ポンプの中で MexAB-OprM が内在性の耐性に関与し、多剤耐性緑膿菌では、MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY-OprM の中でいずれかが過剰発現している。多剤排出ポンプの各構成分子の中で OprM、OprJ、OprN は基質の排出機能に必須である。一方で、緑膿菌内では本来の組み合わせ以外の MFP-RND に対して OMF の選択性が示唆される。特に、OprJ は MexAB と機能できるのに対して、OprN は機能できない。緑膿菌の OMF を理解するには立体構造が重要であるが、これまでに OprM の構造解析しか成功していない。本研究では、緑膿菌の OMF を理解することを目的として、OprN および OprJ の結晶構造解析を行い、OprM との構造比較を行った。

*oprN* と *oprJ* のクローニング、大腸菌発現系と精製系の構築を行った。数百条件の結晶化条件探索と条件の最適化により、再現性良く結晶を得られ、空間群  $P321$  と  $I4$  の2種類の結晶系にて、分解能がそれぞれ  $2.70 \text{ \AA}$  と  $1.69 \text{ \AA}$  で OprN、空間群  $P2_12_12_1$ 、分解能が  $3.10 \text{ \AA}$  で OprJ の構造決定に成功した。OprN と OprJ の全体構造はこれまでに決定された OMF の全体構造に類似していた。OprN の高分解能構造解析により、N 末端システインが N-アシルと S-ジアシルグリセロールによるトリアシル化を受けていることが明らかとなった。また、OprN は2つの結晶系で構造解析に成功し、結晶化条件が OprN の全体構造に与える影響は少ないことを明らかとした。OprN、OprJ、OprM の構造比較より、equatorial ドメイン、および、 $\alpha$ -barrel ドメインのペリプラズム側端領域に構造的差異が確認できた。さらに、ペリプラズム側端領域における表面電荷は OprN、OprJ、OprM で異なっていた。 $\alpha$ -barrel ドメインのペリプラズム側端領域は MFP との結合に重要であることから、各 OMF の構造は多剤排出ポンプごとに最適化されていることが示唆された。しかしながら、OprN、OprJ、OprM の  $\alpha$ -barrel ドメインと  $\beta$ -barrel ドメインが閉じているという特徴は一致した。特に、 $\alpha$ -barrel ドメインのゲートを形成する疎水性相互作用と塩橋、および閉じたゲートを維持する分子内相互作用は保存され、緑膿菌 OMF にとって重要な構造であることが示された。

本研究により、OprN と OprJ は OMF に共通した特徴を有しながら、その構造は特定の多剤排出ポンプごとに最適化されているということが明らかとなった。OprN、OprJ、OprM の構造が明らかとなったことにより、構造情報を基にした機能解析への足がかりが得られ、緑膿菌の多剤排出機構の更なる解明につながることを期待される。

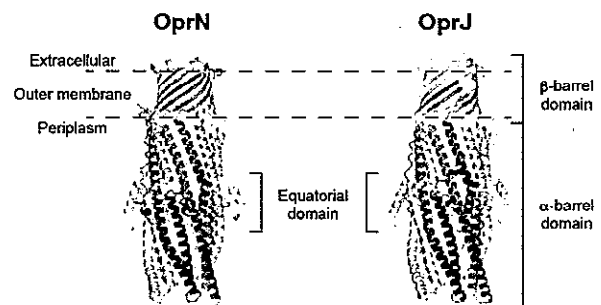


図 OprN と OprJ の結晶構造

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 米 原 涼 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 中 川 敦 史
	副 査 教 授 栗 栖 源 嗣
	副 査 教 授 高 木 淳 一

## 論文審査の結果の要旨

グラム陰性好気性桿菌の緑膿菌は人に対する病原性を有し、免疫力の低下した患者に感染することで日和見感染を引き起こす。緑膿菌は様々な抗生物質に対して内在性の耐性を示し、その主な原因の1つに多剤排出ポンプの発現が知られており、多剤排出ポンプが過剰発現した多剤耐性緑膿菌による院内感染はしばしば深刻な問題となっている。多剤排出ポンプはペリプラズムに存在する membrane fusion protein (MFP)、内膜に結合した resistance nodulation cell division (RND) トランスポーター、外膜に結合した outer membrane factor (OMF) から構成される。RND トランスポーターが基質の結合能を有し輸送を担う。OMF は輸送されてきた基質の外膜における通路として機能し、MFP は RND と OMF をつなぐ役割を果たしている。

緑膿菌の多剤排出ポンプとして、12 種類が同定されている。各多剤排出ポンプの中で MexAB-OprM が内在性の耐性に関与し、多剤耐性緑膿菌では、MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY-OprM のいずれかが過剰発現している。緑膿菌では、OprJ は MexAB と機能できるのに対して OprN は機能できないなど、本来の組み合わせ以外の MFP-RND に対して OMF の選択性が示唆されている。

本研究では、緑膿菌の多剤排出ポンプ形成における OMF の認識機構を理解することを目的として、OprN および OprJ の結晶構造解析を行い、OprM との構造比較を行った。OprN については、空間群  $P321$  と  $I4$  の2種類の結晶系について分解能がそれぞれ  $2.70 \text{ \AA}$  と  $1.69 \text{ \AA}$  で、OprJ については分解能が  $3.10 \text{ \AA}$  で構造決定に成功した。OprN の高分解能構造解析により、N末端システインが N-アシルと S-ジアシルグリセロールによるトリアシル化を受けていることが明らかにした。OprN、OprJ、OprM の構造比較により、equatorial ドメイン、および、 $\alpha$ -barrel ドメインのペリプラズム側端領域の構造的な違いを明らかにし、さらにペリプラズム側端領域における表面電荷の違いを明らかにした。特に、 $\alpha$ -barrel ドメインのペリプラズム側端領域の表面電荷の違いが MFP との結合における分子認識に重要であることを示した。さらに、 $\alpha$ -barrel ドメインのゲートを形成する疎水性相互作用と塩橋、および閉じたゲートを維持する分子内相互作用が保存され、緑膿菌 OMF にとって重要な構造であることを示した。

これらの成果は、OMF の分子認識機構を理解する上で重要な知見であるとともに、緑膿菌の多剤排出機構の更なる解明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。