

Title	RND型異物排出トランスポーターの複合体構成と機能性構造の解明
Author(s)	林, 克彦
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61689
rights	Copyright © American Society for Microbiology, [Journal of Bacteriology, Nov 2;198(2) 332-42. Nov. 2nd 2015, doi: 10.1128/JB.00587-15]
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (林 克 彦)

論文題名

RND型異物排出トランスポーターの複合体構成と機能性構造の解明

論文内容の要旨

細菌感染症治療で使われる抗生物質に対して、薬剤の能動的排出による耐性化は一つの因子で基質となる多数の抗生物質が使用できなくなる。グラム陰性細菌ではRND(Resistance Nodulation cell-Division)型異物排出トランスポーターが抗生物質への自然抵抗性を担い、高発現により多剤耐性化を引き起こす。これに対する阻害剤は特に多剤耐性緑膿菌感染症への解決策として期待されている。

RND型トランスポーターはグラム陰性菌の内膜から外膜に至る一時的複合体で基質を排出する。大腸菌ではAcrBがAcrAB-TolCを、緑膿菌ではMexB、MexYがそれぞれMexAB-OprM、MexXY-OprMを形成する。アダプタータンパク質AcrA、MexA、MexXが中継して外膜ポリンTolC、OprMと三者複合体を構成し、RND型トランスポーターがプロトン駆動力で基質を排出する。

大腸菌AcrBのX線結晶構造解析から薬剤認識機構が明らかとなり、AcrBは強固なホモ三量体で、それぞれ1/3ずつフェーズのずれた待機・結合・排出モノマーからなると分かった。主に高分子量基質を認識する近位結合ポケット、主に小分子量基質を認識する遠位結合ポケットがあり、2つはタンデムに配置し基質輸送経路を構成する。待機モノマーでは近位結合ポケット、結合モノマーでは遠位結合ポケットが活性化し、基質は3つのモノマーの連動した構造変化(機能的回転)に伴い、ペリスタルチックポンプのように押し出されることで輸送される。

MexBとMexYは多剤耐性緑膿菌に高発現する傾向にあるが、ピリドピリミジン系阻害剤ABI-PPはMexBを効果的に阻害するもののMexYを全く阻害できない。ABI-PPはAcrBとMexBでの共通の結合箇所として遠位結合ポケットから枝分かれした疎水性ピットに結合し、F178側鎖と π - π スタッキングする。MexYのホモロジーモデルから、疎水性ピットのF178位置に張り出したW177残基が存在し、ABI-PPとの立体障害がMexB、MexYでの阻害効果の有無を決定するのではないかと予測された。実際にMexY W177F、AcrB F178W、MexB F178Wを作製すると、AcrBとMexYではABI-PPの阻害効果の有無が逆転した。しかしながら予想に反してMexB F178Wは逆転が起こらず、阻害効果を決定する他の要素の存在を示唆した。

AcrB F178WとMexB F178Wの発現系構築、精製、結晶化を行い、X線結晶構造解析によりAcrB F178W、MexB F178W、MexB F178W ABI-PP複合体をそれぞれ分解能3.6Å、3.3Å、3.0Åで構造解析に成功した。MexB F178Wは野生型と同様に疎水性ピットのW178側鎖が回転のみの対応でABI-PPと π - π スタッキングしていた。AcrB F178WとMexYでは疎水性ピットのTrp残基を同様に回転させると、それぞれV139、I138と衝突した。そこで、立体障害を解消する変異体AcrB F178W/V139A、MexY I138Aを作製すると、これらはWTと同様にABI-PP感受性であった。以上から、MexYの疎水性ピットでもABI-PPの結合が阻害効果を決める重要な要素であること、MexBと比べるとAcrB、MexYの疎水性ピットの体積が若干小さい、もしくは柔軟性に乏しいことが示された。この疎水性ピットをターゲットとすることでRND型異物排出トランスポーターの阻害剤の創成が可能だと考えられる。今後の臨床応用可能な阻害剤の開発、発展を期待する。

AcrBの排出機構は機能単位のAcrAB-TolC複合体として解明が必要である。AcrB、TolCは強固な三量体であるが、機能に必要なAcrAの構成比にはAcrB:AcrA=1:1と1:2の説が存在した。*in vivo*ではシステイン変異体の架橋実験から1:1の構成比が、*in vitro*ではAcrA二量体のAcrBとの相互作用から1:2の構成比が予測された。構成比の解明には機能と複合体構造を両面から解析できる実験系が必要と考え、1:1固定比のAcrB-AcrA融合タンパク質を作製し、輸送活性の評価を通じて構成比を決定した。AcrBとAcrAを繋ぐには膜貫通リンカーが必要である。シグナル配列の切断を回避するAcrA C25A、およびAcrBの第7膜貫通ヘリックス (TM7) を融合したAcrAを、それぞれを3段階の長さのリンカーでAcrB C末に融合し、融合タンパク質を作製した。

acrB、*acrAB*欠損大腸菌BL21株に融合タンパク質を発現させると、融合タンパク質は全長発現し、抗ヒスタグ抗体、抗AcrA抗体、抗AcrB抗体で140kDaのバンドを検出した。*acrB*欠損株では内因性AcrAが恒常発現し、融合タンパク質に加え40kDaのバンドを抗AcrA抗体で検出した。抗AcrB抗体では、融合タンパク質に加えAcrB単独の100kDa付近のバンド

を検出し、これはTM7を用いると改善されたが、切断に伴いAcrA側は抗AcrA抗体で検出されず欠失していた。これら融合タンパク質は様々な抗生物質の最小発育阻止濃度を有意に上昇させた。これは $acrAB$ 株欠損株での発現でも同様であり、融合タンパク質は膜に全長発現し、単独で多剤耐性能を持つとわかった。輸送活性をゲノムDNAへのインターカレート蛍光を指標にエチジウムブロマイド排出活性測定で測定すると、融合タンパク質はAcrAの有無にかかわらず、蛍光上昇を大きく抑えた。この系で融合タンパク質の発現量を調節し発現量と排出活性の相関を取ると、融合タンパク質の発現量上昇に伴い排出活性も上昇したが、活性相関はAcrAの有無で大きく変化しなかった。この内因性AcrAが無視される結果は融合タンパク質がそれ単独で機能することを意味し、AcrB:AcrA=1:1の構成比が機能に最低限必要と結論付けた。

リンカー長さは活性にあまり影響しなかった。最も短い融合タンパク質ではAcrAの位置が制限されているが、この位置関係で機能するので、AcrAはAcrB三量体の単量体間で機能する事が示唆された。BioLuminateによる計算でもこの位置での結合が解として求まり、予測した相互作用を支持するものと思われる。

この結果は、近年報告された1:2構成比のAcrAB-TolC構造と食い違う。複合体構造を明らかとしたクライオ電子顕微鏡像では、プロトン駆動力がない状態での*in vitro*再構成であり、実際に機能する*in vivo*では1:1構成比で十分ではないか、という仮説を立てている。いずれにせよ排出機構解明のため、高分解能構造と変異体実験が必要であろう。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (林 克 彦)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 西野 邦彦
	副 査 教授 大久保 忠恭
	副 査 教授 高木 達也

論文審査の結果の要旨

異物排出トランスポーターは、原核生物と真核生物に通じて細胞膜に存在する生体異物排除を担っている因子である。特に、細菌において異物排出トランスポーターは、感染症治療の際に用いられる抗菌薬を認識して排出することで、細菌の自然耐性および獲得耐性に関係していることが知られている。これまで報告された、異物排出トランスポーターは、RND (Resistance Nodulation cell-Division)、ABC (ATP-Binding Cassette)、MFS (Major Facilitator Superfamily)、MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion)、SMR (Small Multidrug Resistance)の5つに分類される。グラム陰性菌においては、特に、RND型異物排出トランスポーターが幅広い抗菌薬を認識し、様々な薬剤に対する細菌の自然耐性および獲得耐性の原因となっている。

これら異物排出トランスポーターの機能を阻害する化合物が開発することができれば、多剤耐性細菌による感染症治療に用いることができる新規治療薬につながると期待される。しかし、これまでに異物排出トランスポーターの阻害機構はよく分かっていない。そこで、林克彦氏は、緑膿菌異物排出トランスポーターMexB阻害剤ピリドピリミジン系化合物ABI-PPによる阻害機構を明らかにする目的で解析を進めた。ピリドピリミジン系阻害剤ABI-PPはMexBを効果的に阻害するが、多剤耐性緑膿菌で発現しているMexYを阻害できない。ABI-PPはMexBと大腸菌ホモログAcrBでの共通の結合箇所として遠位結合ポケットから枝分かれした疎水性ピットに結合し、F178側鎖と π - π スタッキングする。MexYのホモロジーモデルから、疎水性ピットのF178位置に張り出したW177残基が存在し、ABI-PPとの立体障害がMexB、MexYでの阻害効果の有無を決定するのではないかと予測された。MexY W177F、AcrB F178W、MexB F178Wが作成された結果、AcrBとMexYではABI-PPの阻害効果の有無が逆転した。しかしながら予想に反してMexB F178Wは逆転が起こらず、阻害効果を決定する他の要素の存在を示唆した。AcrB F178WとMexB F178Wの発現系構築、精製、結晶化を行い、X線結晶構造解析によりAcrB F178W、MexB F178W、MexB F178W ABI-PP複合体をそれぞれ分解能3.6Å、3.3Å、3.0Åで構造解析に成功した。MexB F178Wは野生型と同様に疎水性ピットのW178側鎖が回転のみの対応でABI-PPと π - π スタッキングしていた。AcrB F178WとMexYでは疎水性ピットのTrp残基を同様に回転させると、それぞれV139、I138と衝突した。そこで、立体障害を解消する変異体AcrB F178W/V139A、MexY I138Aを作製すると、これらはWTと同様にABI-PP感受性であった。以上から、MexYの疎水性ピットでもABI-PPの結合が阻害効果を決める重要な要素であること、MexBと比べるとAcrB、MexYの疎水性ピットの体積が若干小さい、もしくは柔軟性に乏しいことが示された。

大腸菌異物排出トランスポーターAcrBは、Membrane Fusion ProteinであるAcrAと、外膜蛋白質であるTolCと複合体を形成し、機能している。これまで、機能に必要なAcrAの構成比にはAcrB:AcrA=1:1と1:2の説が存在した。そこで、林氏は、構成比の解明には機能と複合体構造を両面から解析できる実験系が必要と考え、1:1固定比のAcrB-AcrA融合タンパク質を作製し、輸送活性の評価を通じて構成比を決定した。解析の結果、AcrB:AcrA=1:1の構成比が機能に最低限必要と結論付けられた。

林克彦氏による研究は、細菌の抗菌薬耐性に関与する異物排出トランスポーターの阻害機構と、複合体形成の機構を明らかにしたものであり、大変興味深く、異物排出トランスポーターの基礎的理解につながるだけでなく、将来的に応用面でも耐性菌感染症を防ぐ薬剤の開発にもつながると考えられ、その価値は高く評価されるものである。

以上の理由から、審査員の合議により、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。