

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

博士学位論文

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

学位申請者

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻 細胞生物学分野 大阪大学産業科学研究所 生体分子制御学研究分野

林 克彦

2017年3月

博士学位論文 **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 二〇一七年 林 克彦**

博士学位論文

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

学位申請者

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻 細胞生物学分野 大阪大学産業科学研究所 生体分子制御学研究分野

林 克彦

2017年3月

主論文

- <u>Hayashi K.</u>, Nakashim R., Sakurai K., Kitagawa K., Yamasaki S., Nishino K. and Yamaguchi A. AcrB-AcrA Fusion Proteins That Act as Multidrug Efflux Transporters. *Journal of Bacteriology*, Nov 2;198(2) 332-42. Nov. 2nd 2015, doi: 10.1128/JB.00587-15.
- <u>Hayashi K.</u>, Fukushima A., Hayashi-Nishino M. and Nishino K.
 Effect of methylglyoxal on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.
 Frontiers Microbiology 2014:5:180. Apr. 17th 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00180

参考論文

 Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, <u>Hayashi K</u>, Nagata C, Hoshino K, Onodera Y, Nishino K and Yamaguchi A.

Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature*, Aug 1;500(7460): 102-106, Aug 1st 2013, doi: 10.1038/nature12300.

目次

略号・記号		
做1 去	古 孙	-
舟⊥ 早		1
第2章	変異型 AcrB 及び変異型 MexB の構造解析	25
第1節	緒言	26
第2節	実験材料と方法	26
2-1.	実験に使用した菌株およびプラスミド	26
2-2.	AcrB F178W 発現用ベクターの構築	28
2-3.	MexB F178W 発現用ベクターの構築	28
2-4.	AcrB F178W/V139A、MexYI138A 発現用ベクターの構築	28
2-5.	AcrB F178W の発現と精製	28
2-6.	MexB F178W の発現と精製	29
2-7.	トランスポーターを発現した膜画分の調製	29
2-8.	AcrB F178W の精製	29
2-9.	MexB F178W の精製	30
2-10.	AcrB F178W の結晶化およびクライオプロテクタント処理	30
2-11.	MexB F178W の結晶化およびクライオプロテクタント処理	30
2-12.	AcrB F178W、MexB F178W の構造解析	31
2-13.	ABI-PP 阻害効果測定	31
第3節	結果	32
3-1.	AcrB F178Wの精製、結晶化と結晶構造解析	32
3-2.	MexB F178W の精製、結晶化と結晶構造解析	35
3-3.	MexY W177 の立体障害を回避する変異体	39
第4節	考察	41
第3章	AcrB-AcrA 融合タンパク質の作製と機能解析	45
第1節	緒言	46
第2節	実験材料と方法	46
2-1	実験に使用した菌株およびプラスミド	46
2-1. 2-2	融合タンパク質発現ベクターの構築	48
2-3	大腸菌膜画分の調製	50
2-4	大腸菌膜画分のウェスタンブロッティング	50
2-5.	MIC 測定	50

	2-6.	エチジウムブロマイド排出活性測定	50
	2-7.	計算科学による AcrA 結合位置解析	51
	2-8.	TolC発現用プラスミドの作製	51
	2-9.	AcrAB-TolC の in vivo 複合体の検出	51
第	3 節	結果	53
	3-1.	AcrB-AcrA 融合タンパク質の設計と構築	53
	3-2.	AcrB-AcrA 融合タンパク質の膜画分への発現確認	54
	3-3.	AcrB-AcrA 融合タンパク質の MIC による活性測定	57
	3-4.	エチジウムブロマイド排出活性測定	59
	3-5.	AcrB-AcrA 融合タンパク質の発現量-排出活性相関	60
	3-6.	計算科学による AcrA と AcrB の相互作用解析	64
	3-7.	AcrB-AcrA 融合タンパク質を利用した AcrAB-TolC 複合体の検出と精製の試み	67
第	4 節	考察	70
第4	章	総括	77
第5	章	引用文献	83

謝辞			

略号・記号

試薬

DTT: Dithreothiol

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

IPTG: Isopropyl-thio-β-D-galactopyranoside

KPi: Pottasium Phosphate buffer

NaPi: Sodium Phosphate buffer

PEG: Polyethylene glycol

SDS: Sodium dodecyl sulfate

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminomethane

培地

LB: Luria-Bertani

その他

AA.: Amino Acids (タンパク質に対して用いる)

aa.: amino acids (タンパク質に呼応する DNA 配列に対して用いる)

ABI-PP: AcrAB/MexAB Inhibitor Pyridopyrimidine derivertive

dsDNA: double stranded Deoxy Nuclearic Acid

EM: Electrom Microscopy

Ia: Intermediate α -Helix between TM6 and TM7

MIC: Minimum inhibitory concentrations

OD: Optical density

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PCR: Polymerase chain reaction

PDB: Protein Data Bank

rpm: Revolution per minute

TM: Transmembrane

WT: Wild type

YT: Yeast extract and Trypton

各種タンパク質の残基は、一文字表記のアルファベット、アミノ酸残基の位置の順で記した。 また、各種タンパク質の変異体に関して、置換前の一文字表記のアルファベット、アミノ酸残 基の位置、置換後の一文字表記のアルファベット、の順で記載した。例えば、F178 は 178 番目 のフェニルアラニン残基を意味し、F178W は 178 番目のフェニルアラニン残基をトリプトファ ンへと置換した変異体を意味する。

TMの後の数字は、N末から膜貫通部位の順番を示す。例えばTM7は7番目の膜貫通部位を 意味する。

第1章

序論

異物排出トランスポーター

ペニシリンの発見以降、細菌感染症の治療は化学療法が基本として行われ、その需要に伴い これまでに多くの抗生物質が発見、開発されてきた。しかしながら、細菌は様々に変化し、薬 剤耐性性を獲得してきた。薬剤耐性機構は四種に分類できる。すなわち、<u>1. 薬剤の不活性化機</u> 構の獲得、2. 薬剤標的部位の変異による親和性低下、<u>3. 薬剤透過性の低下(変異による透過</u> <u>障壁の強化)、4. 薬剤の能動的排出能の強化</u>、である[1]。

1 は薬剤不活性化遺伝子の水平伝播もしくはゲノム上に元来存在する不活性化遺伝子の活性 化によるものであり、解決策としては薬剤不活性化因子阻害剤と抗生物質の合剤が運用されて いる。2、3 は遺伝子の変異によるものであり、化学療法での抗生物質の適切な使用により薬剤 耐性菌の抑制に功を奏している。しかしながら、4. 薬剤の能動的排出は、排出基質となる抗生 物質は同定できても、これを阻害する形での対処法は未だ臨床応用できていない[2]。

異物排出トランスポーターは 5 種に分類される。RND (<u>R</u>esistance <u>N</u>odulation cell-<u>D</u>ivision)、 ABC (<u>ATP-Binding Cassette</u>)、MFS (<u>Major Facilitator Superfamily</u>)、MATE (<u>Multidrug And T</u>oxic compound <u>Extrusion</u>)、SMR (<u>Small Multidrug R</u>esistance)である[3][4]。2015 年には新しく、ACE (Acinetobacter Chlorhexidine Efflux) が発見されたが、ここでは旧来の 5 種を分類として用いる 【図 1-1】[5]。

グラム陰性細菌はグラム陽性細菌に比べ、臨床応用できる抗生物質の種類が少ないが、これ は 4. 薬剤の能動的排出による自然抵抗性および多剤耐性が主な要因として知られている。グ ラム陰性細菌には多くの異物排出トランスポーターが存在し、大腸菌では 20 種類が見つかっ ている【図 1-2】[5]。これらトランスポーターが抗生物質のみならず広範な生体異物を基質と して認識し、能動的に排出することで多剤耐性を獲得する[4]。特に、内膜から外膜にまたがる 複合体を形成する RND 型異物排出トランスポーターは他と比較して強力であり、広範な基質 を認識して排出し抗生物質への自然抵抗性を上昇させている[7]。すなわち、このトランスポー ターが高発現すると、一つの要因で多剤に対して耐性を獲得する。

緑膿菌では少なくとも13種類のRND型異物排出トランスポーターがゲノム上に存在してお り【図1-3】、多剤耐性緑膿菌(MDRP; Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*)ではこれらの うち、MexAB、MexXY の発現亢進がしばしばみられる[8][9]。緑膿菌は日和見感染菌であり、 抗生物質の効きにくい菌として知られているが、通常の化学療法で用いられるイミペネム、ア ミカシン、シプロフロキサシンの3剤に対しても耐性を持った緑膿菌が生じている。これら3 剤すべてに耐性を持った MDRP は、RND型トランスポーターを基礎とした複合要因による多 剤耐性化が一つの要因と考えられている[10]。RND型トランスポーターへの臨床応用可能な阻 害剤は、既に臨床応用がなされている抗生物質の適用範囲を拡大できると期待される。阻害剤 により、病原細菌の自然抵抗性も同時に低減できるため、通常では緑膿菌を含めグラム陰性菌 に使用できない抗生物質の再利用が可能となり、現状より低侵襲的な MDRP 感染症治療ができ ると考えられる。







RND 型トランスポーター

RND 型トランスポーターは、原核生物では、グラム陽性菌、グラム陰性菌、抗酸菌、真核 生物では、酵母、また、昆虫やヒトに至る高等生物まで広く保存されている。しかし、セクレ ターゼを除き、RND 型トランスポーターの機能は様々である [11]。グラム陰性菌では細菌間 情報伝達物質の排出、異物排出による薬剤耐性、重金属排出による金属耐性、グラム陽性菌で は Surfactant の排出と耐性、抗酸菌ではミコール酸の合成と輸送、真核生物では Hedgehog signaling pathway、後期エンドソームでのコレステロールの輸送など、機能は大きく違っている 【図 1-4】[12-17]。

2002年にグラム陰性菌異物排出トランスポーターAcrBの構造が解かれ、2011年にはトラン スロコン SecDF、重金属排出トランスポーターCusBA、2016年にヒト NPC1 (Niemann-Pick disease type C 1)の構造が解明され、RND型トランスポーターの構造比較が可能となった [11][13][18-20]。RND型トランスポーターとしては全て12回膜貫通を有し、膜貫通へリックス の相対配置などはよく似ていた。異物排出型と重金属排出型では全体で構造が類似していた一 方、SecDF、NPC1とは膜貫通部位以外の構造は全く違い、機能発現に必要な構成量比、サブ ユニット構成も異なっていた。現状では、RND型という大きな括りでは共通の構造活性相関 を述べることはできていない。よって、本論文中でRND型トランスポーターと述べる時には、 細菌のRND型異物排出トランスポーターに限定する。

グラム陰性菌の RND 型異物排出トランスポーターは、強固な三量体を構成し、プロトン駆動により基質を排出する[21]。排出に際しては、グラム陰性菌の内膜から外膜に至る複合体を形成し、排出の制御を行っている。大腸菌 AcrAB-TolC 【図 1-5】では、外膜チャネル TolC、アダプタータンパク質 AcrA とともに RND 型トランスポーターAcrB のプロトン駆動で基質を菌体外へと輸送する[22][23]。



大腸菌異物排出トランスポーターAcrB

大腸菌 AcrB の薬剤複合体結晶構造の解明により、トランスポーターの全体構造、薬剤認識 機構が明らかとなった。AcrB はポリペプチドではホモ三量体であるが、構造上ではヘテロ三 量体であり、待機・結合・排出モノマー (Access, Binding, Extrusion monomer) からなっていた。 AcrB ホモ三量体の三者間では TolC docking domain でドメインスワッピングし、強固なホモ三 量体を形成していた【図 1-6】[19]。この三量体はフェーズが 1/3 ずつずれた基質排出の各ステ ップを表していると考えられている。この三量体は協調して次のモノマーへと形を変化する機 能的回転と呼ばれる方法で基質を排出する。待機モノマーには比較的大分子量基質(1000Da<) を認識する近位結合ポケット、結合モノマーには小分子量基質を認識する遠位結合ポケットが 存在しており、これらはタンデムな位置関係にあり基質輸送経路を構成していた【図 1-7】[24]。 二つの薬剤結合ポケットは F617 ループにより区切られており、待機モノマーでは近位結合ポ ケットが、結合モノマーでは遠位結合ポケットが活性化している。この時それぞれのモノマー のもう一つの結合ポケットは縮小し、基質認識ができない。この二つの多剤認識ポケットで、 基質認識の幅を広げていることが明らかとなった。

大分子量基質は待機モノマーの近位結合ポケットに結合し、機能的回転による結合モノマー への構造変化を経て遠位結合ポケットに送り込まれる。小分子量基質は大分子量基質と同様の 経路を辿るか、もしくは結合モノマーの遠位結合ポケットに、近位結合ポケットを経ずに認識 される。結合モノマーの遠位結合ポケットに存在する基質は機能的回転による排出モノマーへ の構造変化の過程でAcrBから押し出され、複合体を構成するTolCを経て菌体外へと排出され る。この機能的回転に伴う基質の押し出しはペリスタルチックポンプ機構と呼ばれる【図1-8】。





RND 型異物排出トランスポーター阻害剤 ABI-PP

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* の RND 型異物排出トランスポーターのうち、臨床分離され た多剤耐性緑膿菌においては MexB、MexY の 2 つが高発現しているものが多く、それぞれ MexAB-OprM、MexXY-OprM といった複合体を形成し基質を排出する[25]。緑膿菌で臨床使用 可能な抗生物質の数は比較的少なく、その大きな自然抵抗性の要因の一つとして、RND 型ト ランスポーターが挙げられる。

RND 型トランスポーターに対する臨床応用可能な阻害剤は、MDRP 感染症の治療薬として 期待されている。ピリドピリミジン誘導体【図 1-9】、ペプチド系阻害剤 PaβN (MC-207 110)、 MBX 系阻害剤がこれまでに発見され、いずれも残念ながら臨床応用には至っていないが、開 発が進んできた[26-28]。近年でも新たな阻害剤の発見と開発が続けられている。このうち、最 も強力な阻害作用を持ち、抗生物質作用ならびに膜障害作用のないピリドピリミジン誘導体は、 臨床応用可能な阻害剤として有望視され、阻害剤 D13-9001 が開発された[26]。この阻害剤は MexB を効果的に阻害したので、ABI-PP と呼称される[12]。しかしながら、ABI-PP を含むピリ ドピリミジン誘導体系阻害剤は MexB を効果的に阻害するものの、MexY にその阻害スペクト ルを拡大することができなかった【図 1-10】。

AcrB と ABI-PP、MexB と ABI-PP の複合体結晶の X 線構造解析から、ABI-PP の結合箇所が 明らかとなり、AcrB と MexB で共通する疎水性ピットに結合していた【図 1-11】。この ABI-PP が結合する疎水性ビットは、結合モノマーの遠位結合ポケットから分岐した部位で、基質輸送 経路からは外れており、これまで得られていたその他の輸送基質では結合が観測されていない 箇所だった [24]。この疎水性ピットには AcrB と MexB で共通の側鎖が存在しており、F178 側 鎖が存在するが、ABI-PP のピリドピリミジン環が F178 側鎖と π-π スタッキングし、ABI-PP の 親水性部分は基質透過経路にある親水性残基と静電相互作用していた。この疎水性ピットは結 合モノマーにのみ存在しており、待機モノマー、排出モノマーでは縮小して ABI-PP が結合す ることは不可能だった。これらのことから、この疎水性ピットに ABI-PP が強く結合すること で、機能的回転が阻害されるのではないかと予測された。

MexYのタンパク質構造は解かれていないが、MexX、OprM といった膜融合タンパク質(MFP)、 外膜ポリンをコンポーネントとして持つ RND 型異物排出トランスポーターであるので、AcrB や MexB と同型と予想できる。AcrB を基にした SWISS-MODEL によるホモロジーモデルでは、 MexY の疎水性ピットに、W177 側鎖が飛び出している形が予測された[29]。MexY の W177 は AcrB、MexB における F178 に相当する。この MexY の疎水性ピットへの ABI-PP の結合を仮定 すると、W177 側鎖が ABI-PP と立体障害を起こす位置に存在していた【図 1-12】。このトリプ トファン側鎖との立体障害が AcrB、MexB、MexY での阻害効果の選択性を決定していると予 測された。

この予測を証明するため、MexY W177F、AcrB F178W、および MexB F178W 変異体を作製 すると、AcrB F178W は ABI-PP に阻害されなくなり、MexY W177F では阻害されるようにな り、ABI-PP の阻害効果の選択性が逆転した【図 1-10】。しかしながら、予想に反して MexB F178W 変異体では選択性は変わらず、ABI-PP による阻害が確認された【図 1-13】。このことは、MexB においては ABI-PP の阻害効果を決定する要素が他に存在していることを示唆しており、疎水 性ピット以外で阻害効果を発揮する可能性を示していた。今後の阻害剤開発のためには、阻害 剤の効果を決定する要素を明らかにする必要がある。そこで、筆者は博士課程における第一の 目標として、ABI-PP の阻害に関わる新たな要素の解明を目標とした。









大腸菌異物排出トランスポーターAcrAB-TolC 複合体

AcrB は AcrAB-TolC 複合体の一部として機能し、単独では多剤耐性を発揮しない。この事は acrA 遺伝子、もしくは tolC 遺伝子を欠損した大腸菌では AcrB による自然抵抗性および多剤耐 性能がなくなることから明らかである[30-32]。AcrB の結晶構造から広範な基質認識機構は明 らかとなったが、基質を認識した後の AcrB は排出機能を発揮するために、TolC と複合体を形 成する必要があり、AcrA とは二者複合体への構成が促進される必要がある[33]。機能的回転に よる薬剤排出は、菌体外に基質を排出する必要性から、AcrAB-TolC 三者複合体を構成してか ら起こると考えられ、そのためには TolC を認識した AcrA により、AcrB の機能的回転が促進 される必要がある。このような複雑な制御を三者間で行っていると考えられるが、複合体の構 成を含め、未解明な点が多い【図 1-14】。RND 型異物排出トランスポーターのより詳細な排出 機構の解明により、疎水性ピットに結合した阻害剤はどのように輸送の阻害を達成しているの か、阻害剤開発を目的とした場合にはより効果的な阻害方法は何か、などの種々の課題への解 決の糸口をつかめるだろう。

AcrAB-TolC 複合体の各コンポーネント

AcrB は強固な三量体を構成する RND 型トランスポーターであるが、これまでに解かれた結 晶構造は大きく二つ、三回対称構造と非三回対称構造に分類される。2002 年に報告された三回 対称構造では、すべてのモノマーが待機モノマーに類似した構造を持っていた[18]。2006 年に 報告された非三回対称構造では、機能的回転を反映した三つの構造が確認でき【図 1-15】、現 状では排出機構を明らかとするためには、この非三回対称構造が必要である[19]。

生理的な状態において三回対称構造が存在するのかどうかは、今後検討されるべきであるが、 もし三回対称構造が存在するのならば、AcrB が AcrA や TolC と薬剤を認識する前段階の探索 モードとして存在すると予想される【図 1-14】。

AcrB は 12 回膜貫通構造であり、第 1 と第 2 貫通 α ヘリックス、および第 7 と第 8 貫通 α ヘ リックスの間に大きなループを持つ[18]。擬似の二回繰り返し構造であり、N 末と C 末は細胞 質側に存在する。三量体を構成する際、TolC Docking domain と呼ばれる部位で隣の分子と β シ ート構造を構成し、強固に結合する。薬剤認識をする部位は Porter domain と呼ばれる。膜貫通 構造は D407、D408、K940 の三残基がプロトンの透過に際して配置を大きく変化させ、この変 化と Porter domain の中心にある各モノマーからの三つのヘリックスの傾きの変化が連動し、機 能的回転の大きな構造変化を引き起こす[19]。

AcrB と TolC の間をつなぐアダプタータンパク質 AcrA は MFP (Membrane Fusion Protein) に 属し、 β シートからなる三つのドメインと α ヘリックスバンドルから構成される【図 1-16】。 AcrA の 24AA.まではシグナルペプチドであり、膜貫通したのちに Signal Peptidase II (SPII) により切断され、シグナルペプチドに続く C25 側鎖が脂質付加を受け、膜にアンカーされる[34]。

TolC はペリプラズム側に 100 Å程度突き出した α ヘリックスの筒をもつ外膜ポリンであり、 TolC 単独の結晶構造では α ヘリックスの下端が閉じられた形で観測されている【図 1-17】[22]。 TolC 変異体の X 線結晶構造解析により TolC は下端が開口した構造を取ることができ、複合体 構成時には開口し、基質排出に適した形になる[35]。通常状態では TolC 内部は閉じており、ま た膜貫通ポリン構造は開口しているため、TolC 内部は菌体外部の拡張とみなすことができ、 AcrB による TolC 内部への基質輸送により基質排出が完了する。







AcrAB-TolC 複合体の解明への試み

これまでに、AcrAB-TolC 複合体の構造、機能を予測する試みが多くなされてきた。

2000年に TolC の構造が解かれ、そして 2002年に AcrB の結晶構造が解かれた際に、AutoDock による AcrB と TolC のドッキングシミュレーションが行なわれた[18]。 AcrB の TolC Docking domain と TolC の α へリックス下端は噛み合う形をしており、シミュレーションでは AcrB と TolC が直に結合しているように描かれた【図 1-18】[36]。このシミュレーションで予測された AcrB と TolC のドッキング位置にシステイン側鎖を導入した変異体を作製し、両者を膜に発現 させると、*in vivo* において AcrB と TolC の間が側鎖同士でジスルフィド架橋された大きな分子 が観測された【図 1-19】。また、AcrB と AcrA、AcrB と TolC の両方において結合しうる面に システイン残基を導入すると、*in vivo* において AcrA の側面と TolC 側面、AcrB の側面と AcrA 側面でケミカルリンカーにより架橋された【図 1-20】[37][38]。これらの報告から、AcrB と TolC は直に結合し、AcrA:AcrB = 1:1 の構成比が妥当と信じられてきた。

一方で、AcrA:AcrB=1:2の構成比が妥当と考えられる報告も多く存在した。2006年に AcrAのX線結晶構造が報告されたが、AcrAの電子密度は結晶格子中に4分子存在し、二量体単位

が二つ存在する形で観測され AcrA が二量体で存在しうることが示された【図 1-21】[23]。ま た、表面プラズモン共鳴法(SPR)により、SPIIにより脂質付加を受けた AcrA のみが二量体を構 成し、AcrB へと結合することが報告された[39]。この報告では、AcrA 単量体では解離定数 $K_D=1.17 \mu$ M であるところ、AcrA 二量体では $K_D=0.090 \mu$ M と報告された。等温滴定型熱量測 定(ITC)による結果でも、AcrB と AcrA の間に 2 段階の結合が示唆され、それぞれ-6.0 kcalM⁻¹、 -8.7 kcalM⁻¹と水素結合数個程度の親和性が報告された[40]。SPR による方法では AcrB と TolC の間に親和性が報告されたが、ITC を用いた実験では、AcrB と TolC の間には親和性が観測さ れなかった。

2011年には、AcrBのホモログである1価重金属トランスポーターである大腸菌 CusBA 複合体のX線結晶構造解析が報告され、解かれた構造は三回対称構造であったが、CusB:CusA = 2:1の構成比での結合が観測された【図 1-22】[13]。CusBA では、CusB が AcrA に相当し、CusA が AcrB に相当する。この CusBA 複合体では、単離した CusB と CusA を用いて ITC により親和性を測定すると、AcrAB の場合と比べると明確に強い結合が観測され、結晶構造と一致する1:2の構成比が明らかとなっている。この CusBA 複合体と同様に、AcrAB においても単離したAcrB と AcrA の混合による複合体結晶構造解析が試みられたが、現在に至るまで成功例はない。AcrB は他のタンパク質の結晶化において、夾雑として含まれるだけでも結晶を生じるほど結晶化しやすく、AcrA と AcrB の相互作用が弱いことと合わせて、AcrAB 複合体に優先して AcrB 単独の結晶が現れることが理由の一つと考えられる[41]。

これらの先行研究を俯瞰すると、AcrA:AcrB = 1:1 を主張する報告では、*in vivo* での研究結 果を基としており、AcrA:AcrB=1:2 を主張する報告では、*in vitro* での研究結果を基としており、 排出機能を評価し、複合体の構成を機能と構造の両面から考察する論点が不足していると筆者 は考えた。*in vivo* もしくは再構成系においては、AcrAB-TolC 系もしくはホモログの異物排出 トランスポーターの機能を評価した例がない。排出機能を定量的に明らかとする再構成系は現 在に至るまで存在しておらず、*in vivo* における活性測定系が必要と考えられる。

博士課程における第二の目標として、機能の評価と複合体構造の解明を両面から検証できる 実験系をめざして、機能する複合体の構成と構造に関して研究を行った。構造はあくまでスナ ップショットであり、ここからは機能と動的構造は示唆されるにとどまる。必要十分の関係性 で機能を明らかとする生体分子を用いて、構造を理解することに挑戦した。

20







本研究の目的

多剤耐性に関わる RND 型異物排出トランスポーターについて、大きく二つの課題が存在する。一つは RND 型異物排出トランスポーターによる耐性獲得を回避する方法である。もう一つは、RND 型異物排出トランスポーター複合体による排出機構の解明である。本研究では以下の2つの課題について研究した。

① ABI-PP の阻害に関わる要素の解明

ABI-PP の結合する AcrB と MexB の疎水性ピットには、MexY では W177 残基が存在し、ト リプトファン側鎖との立体障害により ABI-PP が結合できないことが示唆されていた。これを 証明する変異体、AcrB F178W、MexB F178W、MexY W177F を作製すると、MexY W177F は ABI-PP により阻害され、AcrB F178W は ABI-PP により阻害されなくなったが、MexB F178W は ABI-PP に阻害された。MexB では、ABI-PP がその他の箇所に結合する可能性を含め、阻害 に関わる要素を明らかにする必要があった。そこで、X 線結晶構造解析により AcrB F178W、 MexB F178W、MexB F178W と ABI-PP の複合体構造を解明し、ABI-PP の阻害効果を決定する 要素を解明する。

② AcrB-AcrA 融合タンパク質を通じた機能の評価と複合体構造の解明

*in vivo、in vitro*における先行研究を踏まえ、AcrB と AcrA の構成比、および複合体構造を排 出機能の評価も含めて明らかとする。具体的には、1:1 の構成比で固定した AcrB-AcrA 融合タ ンパク質を作製し、*in vivo*において排出機能を評価し、機能に最低限必要な構成比を決定する。 融合タンパク質が機能を示せば、機能の評価と複合体構造の解明の両面から評価できる実験系 となるため、機能を持った AcrB-AcrA 融合タンパク質を用いて、機能する複合体の構造を解明 に挑む。

第2章

変異型 AcrB 及び変異型 MexB の構造解析

第1節 緒言

RND 型異物排出トランスポーター阻害剤 ABI-PP は大腸菌 AcrB、緑膿菌 MexB を阻害する が、MexY を全く阻害することができない。ピリドピリミジン系阻害剤の阻害スペクトルを MexY にまで拡大するためには、阻害剤がどのように RND 型トランスポーターを阻害してい るのかを解明する必要がある。

第1章でも述べたように、ABI-PP と AcrB、ABI-PP と MexB の複合体の X 線結晶構造解析 がなされ、両者に共通する F178 残基周辺の疎水性ピットの存在が判明した。MexY ホモロジ ーモデルとの比較により、AcrB、MexB の F178 に相当する MexY W177 残基が、ABI-PP の結 合を阻害していると予想された。実際にこの側鎖を交換する変異体、AcrB F178W と MexY W177F では、ABI-PP により AcrB F178W が阻害されず、MexY W177F が阻害されるという阻 害効果の逆転が確認された。しかしながら、予想に反して MexB F178W は野生型 MexB と同様 に阻害され、ABI-PP の阻害効果には未解明の要素が関連していることが示唆されていた。

そこで、ABI-PPの阻害効果を決める要素を明らかとするため、X線結晶構造解析によりAcrB F178W、MexB F178W および ABI-PP との複合体の構造を明らかとし、ABI-PP の阻害効果に関わる未解明の要素を解明することを目的とした。

第2節 実験材料と方法

2-1 実験に使用した菌株およびプラスミド

E. coli MG1655 株の acrB 欠損株、および W3104 株の acrAB 遺伝子欠損株は先行研究で使用 されたものを利用した。菌株は適切な抗生物質(クロラムフェニコール: 25µg/mL、アンピシリ ン: 100µg/mL) を含んだ LB プレートもしくは LB 液体培地により 37℃でコロニー選別、培養 を行った。

本章で用いた菌株及びプラスミドは【表 2-1】にまとめた。

Strains or Plasmid	Characteristics	References
Escherichia coli Strains		
JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_{K} ⁻ m _K ⁺), e14 ⁻ (mcrA ⁻), supE44, relA1, Δ (lac-proAB)/F ⁻ (traD36, proAB ⁺ , lac I ^q , lacZ\DeltaM15)	[42]
W3104	<i>calTt2_lN(rrnD-rrnE)L_rnh=L_</i> Flambda	[43]
W3104 AgerAB	source and a second	[44]
W3104 <i>DacrAB</i> /pAcBH F178W		This study
MG1655	F. ambda. <i>r.ph-1</i>	[45]
MG1655 AacrB	acrB eene eliminated from MG1655. markerless	[24]
MG1655 <i>DacrB DiolC</i>	acrB and to/C gene eliminated from MGI655, markerless	[46]
MG1655 ΔacrB /pUC118mexB F178W		This study
MG1655 $\Delta acrB$ /pBAD33acrB F178W		This study
MG1655 ΔacrB /pBAD33acrB F178W/V139A		This study
MG1655 AacrB MolC /pMMB67HEmexAB-oprM		This study
MG1655 \arXiv acrB \arXiv opMMB67HEmexXY-oprM		This stud
MG1655 \arcrB \arcred to lC /pMMB67HEmexAB(F178W)-oprM		This study
MG1655 ΔacrB ΔtolC /pMMB67HEmexXY(II38A)-oprM		This stud
Plasmids		
pUCP20	<i>Pep</i> colerants Ap ⁴ , pUC18 derivative	[47]
pUCP20mexB	<i>mexB</i> gene casette cloned into pUC20	[48]
pUCP20mexB F178W	mexB F178W mutation in pUCP20mexB	This stud
pUC118	rep colemnis Ap ^r	[49]
pAcBH	acrRAB gene casette cloned into pUC118; Ap ^r	[18]
pAcBH(F178W)	acrB F178W mutation in pAcBH	This stud
pUC118mexB F178W	mexB F178W mutant from pUCP20mexB F178W in pUC118mexB	This study
pBAD33	rep pisawits Cmf	[50]
pBAD33acrB	acrB gene with His tag cloned into pBAD33	[19]
pBAD33acrB F178W	acrB F178W mutation in pBAD33acrB	This stud
pBAD33acrB F178W/V139A	<i>acrB</i> V139A mutation in pBAD33acrB F178W	This stud
pMMB67HE	<i>rep</i> _{cab} Ap ^t (Carbenicillin resistant gene)	[51]
pMMB67HEmexAB-oprM	<i>mex4B-oprM</i> gene casette cloned into pMMB67HE; Ap ^c	[52]
pMMB67HEmexAB(F178W)-oprM	<i>mexB</i> F178W mutantation in pMMB67HEmexAB-oprM	This stud
pMMB67HEmexXY-oprM	<i>mexXY-oprM</i> gene casette cloned into pMMB67HE; Ap ^c	[52]
pMMB67HEmexXY(W177F)-oprM	<i>mexY</i> W177F mutantation in pMMB67HEmexXY-oprM	This study
pMMB67HEmexXY(II38A)-oprM	<i>mexY</i> 1138A mutantation in pMMB67HEmexXY-oprM	This study

2-2 AcrB F178W 発現用ベクターの構築

Escherichia coli MG1655 株を染色体 DNA の供与株として用いた[45]。先行研究より、pBAD33 プラスミドベクターに *acrB* 遺伝子の C 末に 6 個のヒスチジン残基からなる His タグを付加し てクローニングした pBAD33acrB および F178W の変異導入をした pBAD33acrB F178W が存在 していた。まず、pBAD33acrB F178W、および pAcBH を保持した *E. coli* JM109 株それぞれか らプラスミドベクターを QIAprep Miniprep (QIAGEN 社) で調製した。両プラスミドベクターを 制限酵素(BsrGI、SacII)で処理したのち、pAcBH へ AcrB F178W 変異体に相当する部位を DNA Ligation kit Mighty Mix (タカラバイオ社) で組み込んだ。プラスミド抽出を行い、Tth1111 で処 理し制限酵素マッピングすること組み込みを確認し、シークエンス解析により AcrB F178W 変 異体に相当することを確認した。シークエンス解析は、ABI PRISM 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems 社)で行った。

2-3 MexB F178W 発現用ベクターの構築

Pseudomonas aeruginosa PAO1 株を染色体 DNA の供与株として用いた。先行研究より、 pUCP20 プラスミドベクターに P. aeruginosa mexB 遺伝子の C 末に6 個のヒスチジン残基からな る His タグを付加してクローニングした pUCP20mexB、および MexB F178W 変異体をクローニ ングした pUCP20mexB F178W が存在していた。pUCP20mexB F178W、および pUC118 を保持 した E. coli JM109 株それぞれからプラスミドベクターを QIAprep Miniprep で調製した。両プラ スミドベクターを制限酵素(HindIII、XbaI)で処理したのち、pUC118 株へ MexB F178W 変異体 に相当する部位を DNA Ligation kit Mighty Mix で組み込んだ。候補のプラスミドを抽出し、制 限酵素 MfeI、HindIII、XabI、ScaI で処理して制限酵素マッピングし、pUC118mexB F178W が 構築されたことを確認した。

2-4 AcrB F178W/V139A、MexYI138A 発現用ベクターの構築

pBAD33acrB F178W および pMMB67HEmexXYoprM に、変異導入用プライマーと PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ社)を用いてプラスミド全長に変異導入して PCR により増 幅した。この直鎖 dsDNA を DpnI (タカラバイオ社)処理したもので JM109 を形質転換し、そ れぞれ 25µg/mL のクロラムフェニコール、100µg/mL アンピシリンを含んだ LB 寒天培地で選 択した。環状プラスミドを QIAprep Miniprep で調製し、変異導入をシークエンス解析により確 認した。本章で用いたプライマーは【表 2-2】にまとめた。

表 2-2. 本章で用いたプライマー一覧			
Primers	Sequences (5' -> 3')		
pacrBV139A_1 (for pBAD33acrB F178W/V139A)	CTGATGGCGGTCGGCGTTATCAACACC		
pacrBV139A_2 (for pBAD33acrB F178W/V139A)	GCCGACCGCCATCAGGAAGCTGCTGGA		
pmexYI138A_1 (for pMMB67HEmexXY(I138A)oprM)	CAGCTGGCGGTTACCCTTACCTCCTCC		
pmexYI138A_2 (for pMMB67HEmexXY(I138A)oprM)	GGTACCCGCCAGCTGGATGCTGTCCGC		

2-5 AcrB F178W の発現と精製

AcrB F178W は W3104 Δ *acrAB*/ pAcBH F178W により発現させた。アンピシリン 100µg/mL を 添加した 20mL の 2×YT 液体培地を、L 字試験管を用いて 37℃で震とう培養し、前々培養を行 った。前々培養液を 630mL の 2×YT 液体培地に加え、OD₆₀₀~0.7 になるまで 37℃、180rpm で 培養した。5L の三角フラスコに前培養液 50mL を 2.5L の Medium A (下記) に加えたものを 12 本用意し、計 30L の培養液を 37℃で 7 時間、180rpm で培養したのち、4℃、24,300×g で遠 心回収した。

<u>Medium A</u>: 0.7% リン酸水素カリウム、0.3% リン酸二水素カリウム、0.05% クエン酸ナトリウム・2 水和物、0.01%硫酸マグネシウム・7 水和物、0.1% 硫酸アンモニウムを蒸留水に溶かしオートクレーブ滅菌をした。同様にオートクレーブ滅菌した 20% glucose と 10% カザミノ酸を体積比で 1/100 ずつ加えた。

2-6 MexB F178W の発現と精製

MexB F178W は MG1655 Δ *acrB*/ pUC118mexB F178W により発現させた。アンピシリン 100µg/mL を添加した 20mL の 2×YT 液体培地を、L 字試験管を用いて 37℃で震とう培養し、 前々培養を行った。前々培養液をアンピシリン 100µg/mL を添加した 630mL の 2×YT 液体培 地に加え、OD₆₀₀~0.7 になるまで 37℃、180rpm で培養した。2-4 と同様に計 30L の Medium A 培養液を 37℃で OD₆₀₀~0.4 になるまで培養し、終濃度 1mM の IPTG を加えて 37℃、180rpm で Overnight 培養した。そののち、4℃、24,300×g で遠心回収した。

2-7 トランスポーターを発現した膜画分の調製

回収した菌を Wash buffer (下記) で洗浄し、遠心回収後、Breaking buffer (下記) で再度懸 濁した。850-900bar の圧力で菌体を破砕し、未破砕菌、封入体を 27,000×g、4℃、10 分で 2 回 遠心することで除去した。遠心上清を 200,000×g、4℃、90 分により膜画分を沈殿させ、可溶 性画分を除去した。膜画分を EDTA Wash buffer (下記) で懸濁し、再度 200,000×g、4℃、90 分により膜画分を沈殿させ、膜表在性タンパク質を除去した。調製された膜画分は Membrane Sample buffer (下記)で懸濁し、およそ 200mg のタンパク質量ごとに分け-80℃で凍結保存した。

<u>Wash buffer</u> : 50mM Tris-HCl pH7.0、0.5mM EDTA、1mM MgCl₂、10% Glycerol <u>Breaking buffer</u>: 50mM Tris-HCl pH7.0、0.5mM EDTA、1mM MgCl₂ <u>EDTA Wash buffer</u>: 50mM Tris-HCl pH7.0、0.5mM EDTA <u>Membrane Sample buffer</u>: 50mM Tris-HCl pH7.5、10% Glycerol

2-8 AcrB F178W の精製

2-7 により調製した膜画分を Membrane Sample buffer を用いて 10mg/mL のタンパク質濃度 に希釈し、終濃度 2%の Dodecyl-sucrose (DDS, Dojindo 社)で可溶化後、200,000×g、4℃、60 分 により不溶の膜画分を沈殿させた。可溶化膜タンパク質を Ni²⁺を保持させた Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare 社) に1時間反応させ、カラムに充填したのち、50mM、100mM、350mM の三段階で Imidazole-HCl pH7.5 を含んだバッファーでカラム容量分ずつ分取しながら溶出した。目的タンパク質を含んだ画分を 10%アクリルアミドゲルの SDS-PAGE で確認し、100kDa 限外濾過膜(Millipore 社)で濃縮し、限外濾過膜上で最終バッファー [100mM NaPi pH6.2、10% Glycerol、0.1% DDS] により 10 倍希釈を 3 回した。最終的に 28mg/mL のタンパク質濃度に調 製した。

2-9 MexB F178W の精製

2-7により調製した膜画分を Membrane Sample buffer を用いて 10mg/mL のタンパク質濃度に 希釈し、終濃度 2%の Dodecyl-maltopyranoside (DDM, Anatrace 社)で可溶化後、200,000×g、4°C、 60 分により不溶の膜画分を沈殿させた。可溶化膜タンパク質を Ni²⁺を保持させた Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare 社) に 1 時間反応させ、カラムに充填したのち、25mM、 120mM、400mM の三段階で Imidazole-HCl pH7.5 を含んだバッファーでカラム容量分ずつ分取 しながら溶出した。目的タンパク質を含んだ画分を 10%アクリルアミドゲルの SDS-PAGE で確 認し、100kDa 限外濾過膜(Millipore 社)で濃縮し、限外濾過膜上で最終バッファー[10mM Tris-HCl pH7.5、50mM NaCl、0.05% DDM] により 10 倍希釈を 3 回した。最終的に 25mg/mL のタンパ ク質濃度に調製した。

2-10 AcrB F178W の結晶化およびクライオプロテクタント処理

結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。リザーバー溶液[100mM NaPi pH6.2-6.4、 100mM NaCl、10-14% PEG4000]と1:1 で混合し、25℃で結晶を成長させた。結晶は正像光学顕 微鏡で観察し、偏光で結晶の判定を行った。ハーベスト溶液 [100mM NaPi pH6.3、20mM NaPi pH6.2、8% PEG4000、50mM NaCl、0.1% DDS、5%glycerol] の Glycerol 濃度を1 段階 15 分かけ、 5%ずつ 30%まで上昇させ、結晶のクライオプロテクタント処理を行ったのち、クライオスト リーム装置で 100K の窒素気流下で凍結させた。

2-11 MexB F178W の結晶化およびクライオプロテクタント処理

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。

MexB F178W 単独の結晶化では、0.28% n-Octyl-β-D-thioglucoside (Dojindo 社)を MexB F178W サンプルに加えた。このサンプルを、リザーバー溶液[23.6-25.6 % PEG400、50mM Sodium Acetate-HCl pH 4.0-5.0、300mM NaCl]と 1:1 で混合し、25℃で結晶を成長させた。

ABI-PP との複合体の結晶化では、MexB F178W と等モル比の ABI-PP をサンプルに加えた。 このサンプルを、リザーバー溶液[23.6-25.6 % PEG400、50mM Sodium Acetate-HCl pH 4.0-5.0、 300mM NaCl]と 1:1 で混合し、25℃で結晶を成長させた。

結晶は正像光学顕微鏡で観察し、偏光で結晶の判定を行った。ハーベスト溶液 [8mM Tris-HCl pH7.5、280mM NaCl、40mM Sodium Acetate-HCl pH4.5、0.1% DDM、30% PEG400] の PEG400

の濃度を 30, 32.5, 35%と段階的にあげて結晶のクライオプロテクタント処理を行い、クライオ ストリーム装置で 100K の窒素気流下で凍結させた。

2-1 2 AcrB F178W、MexB F178W の構造解析

AcrB F178W、MexB F178W の結晶の全回折データは SPring-8 の BL44XU にて収集した。 AcrB F178W は Oscillation 1°、Exposure 1 sec、360 frames / 360°、MexB F178W 単独および ABI-PP と複合体は Oscillation 0.5°、Exposure 1 sec、720 frames / 360°の条件で、MX225-HE CCD detector (Rayonix 社)によりデータ収集を行った。反射強度の集積および見積もりは HKL2000 により行 った[53]。反射強度の自己相関係数である CC*を指標として使用可能なデータかを見積もり、 全ての結晶において最外殻までデータを利用した[54]。AcrB F178W、MexB F178W の位相決定 はそれぞれ WT AcrB 構造(PDBID: 3AOA)、WT MexB 構造 (PDBID: 3W9I)を用い、MOLREP を 用いて分子置換を行い、決定した[55][56]。coot を用いて構造情報への変異導入を行い、リガン ドである ABI-PP は WT MexB と ABI-PP 複合体結晶構造よりデータを移送した[57]。その後 coot、 REFMAC、Phenix.refine を用いて精密化をした[58][59][60]。構造データの描画は PyMol にて行 った。

2-1 3 ABI-PP 阻害効果測定

pBAD33acrB F178W は MG1655 Δ acrB、pMMB67HEmexXY(I138A)oprM を適した抗生物質で 前培養後、LB 液体培地で OD₆₀₀=0.05 まで希釈し、100µL を 96well プレート、37℃で震とう培 養した。エタノールで溶かしたエリスロマイシンを 100 倍希釈で加えた。エリスロマイシン濃 度は AcrB F178W では 6µg/mL、MexY I138A では 16µg/mL だった。ABI-PP は同様に 0, 8, 16, 32µg/mL の濃度となるように加え、少なくとも 3 回実験した。
第3節 結果

3-1 AcrB F178Wの精製、結晶化と結晶構造解析

まず、培養条件と菌株の組み合わせの検討を行った。 培養条件には菌株とプラスミドベクターの組み合わせ、 液体培地の栄養素量、液体培地を入れる容器形状、エア レーションの程度が関連する。大量培養の関係上、容器 形状、エアレーションの程度は変更しづらく、培地の滅 菌の容易さも考慮して、Medium A による貧栄養培地を第 一条件として設定し、菌株、プラスミドベクターの組み 合わせを検討した。WT AcrB の発現では、大腸菌 JM109 とプラスミドベクターpAcBH の組み合わせが用いられて おり、pAcBH は比較的多くの大腸菌株で AcrB を発現し やすいことから、pAcBHの acrB 遺伝子部位を acrB F178W 変異体遺伝子に置き換えたものを使用することとした。

変異体の大量発現にあたっては、大腸菌では AcrB が恒 常発現することもあり、*acrB* 遺伝子が欠損していること が望ましい。WT において P1 phage による形質導入およ び Datsenko の遺伝子欠損株作製の変法を試みたが、JM109



は recA 遺伝子がゲノムから欠損しており、recA 遺伝子欠損株ではどちらも成功しなかった[61]。 そこで、研究室に存在した acrB もしくは acrAB 遺伝子を欠損した大腸菌から検討した結果、 W3104 Δ acrAB/pAcBH F178W を用いて第2節2-5の通りに培養すると、膜画分に大量発現す ることがわかった【図 2-1】。WT AcrB に準じて第2節2-8に従い、精製を行った【図 2-2】。



精製した AcrB F178W の結晶条件検討を 行い、シッティングドロップ蒸気拡散法で、 Reservoir [100mM NaPi pH6.2-6.4、 100mM NaCl、10-14% PEG4000] と 1:1 で混合、25℃ で結晶が析出した【図 2-3】。

第2節2-10の通りにクライオプロテク タント処理をし、凍結した結晶を SPring-8 でデータを回収し、HKL2000でX線回折デ ータを積分し、逆格子座標の構造因子にまと め、第2章2-12の通りデータ解析を行っ た。その結果、AcrB F178W 結晶の結晶型は WT と同じく C2、分解能は 3.60Å だった。 各統計値は【表 2-3】にまとめた。 結晶格子のサイズは 227.56 Å、134.36 Å、 162.62Å であり、各角度は 90.00°、97.97°、 90.00° だった。これは、WT AcrB の結晶格 子サイズ(a,b,c, α , β , γ) = (226.53, 134.44, 162.78, 90.00, 97,73, 90.00) (PDBID:3AOA)と 比較してほぼ変わらず、同形であった 【図 2-4】。

WT AcrB の ABI-PP 結合構造と AcrB
F178W の疎水性ピット周辺を比較する と、変異導入したトリプトファン残基が 飛び出している様子が確認された。
ABI-PP 結合構造様に残基を ABI-PP と衝 突しないように回転させてみると、周辺 の主鎖もしくは V139 側鎖と衝突し、こ れらは衝突する側鎖の向きを変更する ことでも解消されなかった【図 2-5】。

表 2-3: Data collection and refinement statistics.

Data Collection	AcrB F178W
Light source	SPring8 BL44XU
Space group	C2
Wavelength (Å)	0.9000
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	227.56, 134.36, 162.62
α, β, γ (°)	90.00, 97.73, 90.00
Resolution (Å)	50-3.60(3.66-3.60)
$R_{ m merge}$	7.5(63.7)
Ι/σΙ	30.7(3.1)
Completeness (%)	99.6(100.0)
Redundancy	7.6(7.8)
Refinement	
Resolution (Å)	50-3.60
No. reflections	433,743
$R_{ m work}/R_{ m free}$	24.7/31.0
No. atoms	
Protein	23,331
Ligand/ion	
Water	
B-factors	
Protein	184.93
Ligand/ion	
Water	
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.010
Bond .angles (°)	1.681







図 2-5. 左: AcrB F178W 変異体の W178 周辺残基と電子密度図(2Fo-Fc, σl.5) 右: AcrB F178W 変異体の阻害剤結合ピット周辺に結合型 AcrB 由来 ABI-PP を重ねた (緑:炭素、青:窒素、赤:酸素、黄:硫黄、白:W178 側鎖、 タンパクは空間充填モデル で、ABI-PP はスティックモデルで表示した。ABI-PP の炭素原子は黄色で表示した。) 3-2 MexB F178W の精製、結晶化と結晶構造解析

まず、培養条件と菌株の組み合わせの検討を行った。本節 3-1と同様に、Medium A による貧栄 養培地を選択した。AcrB は結晶化しやすいことで 知られており、AcrB は His tag を利用した精製で はコンタミしやすいことが知られている[41]。ホモ ログである AcrB と MexB は極めて構造が類似して いる。混入した AcrB が結晶化することで MexB の構造と取り違える可能性を取り除くため、*acrB* 遺伝子欠損株で発現させることとした。野生型 MexB と同様に、pUCP20 由来ベクターと MG1655 Δ*acrB* の組み合わせで MexB F178W の発現を試み たが、大量発現しなかったので、その他のプラス ミドベクターでの発現を検討した。

検討の結果、MG1655Δ*acrB*/pUC118mexB F178W を用いて第2節2-5の通りに培養すると、膜画分 に大量発現することがわかった【図2-6】。WT AcrB に準じて第2節2-8に従い、精製を行った【図2-7】。





精製した MexB F178W の結晶条件検討を行い、ハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。

MexB F178W 単独の結晶化では、WT と同条件では結晶が小さな結晶が多数析出したので、 Detergent Screening を行い条件の最適化を行った。その結果、より綺麗な結晶が析出した 0.28% n-Octyl-β-D-thioglucoside を MexB F178W サンプルに加えた。ABI-PP との複合体の結晶化では、 MexB F178W と等モル比の ABI-PP をサンプルに加えた。両サンプルを第2節2-11に従い結 晶化、クライオプロテクタント処理をした【図 2-8】。



凍結した結晶を SPring-8 でデータを回収し、HKL2000 で X 線回折データを逆格子座標の構造因子にまとめ、第2章2-12の通りデータ解析を行った。その結果、MexB F178W、MexB
F178W ABI-PP 複合体の結晶型は WT と同じく P1、分解能はそれぞれ 3.30、3.05Å だった。各統計値は【表 2-4】にまとめた。

結晶格子のサイズは WT MexB の結晶格子サイズ(a,b,c, α, β, γ) = (124.82, 133.98, 150.47, 87.14, 69.49, 88.54) (PDBID:3W9I)、および WT MexB ABI-PP 複合体の結晶格子サイズ(a,b,c, α, β, γ) = (126.20, 137.03, 152.27, 85.75, 68.93, 87.39) (PDBID:3W9J) と比較してほぼ同形であった【図 2-9】。

WT MexB ABI-PP 複合体構造 (PDBID:3W9J) と MexB F178W ABI-PP 複合体構造の疎水性ピット周辺を比較すると、変異導入したトリプトファン残基は AcrB F178W と異なり、ABI-PP と衝突しないように回転し、W178 と ABI-PP が π - π スタッキングしている様子が観測された。 ABI-PP の二股に分かれた電子密度が、主鎖と同等に強く観測されており、ABI-PP が強く結合していると推測された。W178 の周辺側鎖、主鎖とは距離があり、W178 側鎖は比較的自由に動くことができた【図 2-10】。その他の場所で ABI-PP らしき電子密度は観測されず、ABI-PP は MexB F178W においても疎水性ピットに結合しているとわかった。ABI-PP は WT と同様の機構で MexB F178W も阻害すると考えられた。

MexB F178W 単独の構造の疎水性ピット周辺の電子密度を WT MexB と比較すると、WT で は疎水性ピット周辺に観測されていた DDM が観測されなかった。また、添加した n-Octyl-β-D-thioglucoside らしき電子密度も観測されなかった。

表 2-4: Data collection and refinement statistics.

Data Collection	MexB F178W	MexB F178W +ABI-PP
Light source	SPring8 BL44XU	SPring8 BL44XU
Space group	P1	P1
Wavelength (Å)	0.9000	0.9000
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	122.92, 133.22, 149.67	125.13, 134.25, 150.84
α, β, γ (°)	87.37, 69.97, 88.42	86.99, 69.29, 88.85
Resolution (Å)	50-3.30(3.36-3.30)	50-3.00(3.05-3.00)
$R_{ m merge}$	7.2(61.2)	5.2(56.0)
Ι/σΙ	21.3(2.3)	26.3(2.6)
Completeness (%)	99.2(98.8)	99.0(98.9)
Redundancy	3.9(4.0)	4.0(4.0)
Refinement		
Resolution (Å)	50-3.30	50-3.00
No. reflections	532,541	721,024
$R_{ m work}/R_{ m free}$	24.5/33.2	22.4/30.0
No. atoms		
Protein	46,708	46,751
Ligand/ion		98
Water		
B-factors		
Protein	107.49	85.50
Ligand/ion		78.74
Water		
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.012	0.011
Bond angles (°)	1.735	1.614





3-3 MexY W177 の立体障害を回避する変異体

本節 3-2 により、F178 の側鎖の違いが ABI-PP の阻害効果の有無を決定づける大きな要因ではあるものの、決定的ではないことが示された。

構造を比較すると、AcrB、MexB では F178 の近傍には V139 が存在し、AcrB F178W の W178 側鎖を ABI-PP と結合する形と同様に回転させると、V139 と立体障害を起こす。一方、MexB F178W では W178 の近傍に存在する V139 の位置がやや遠くに位置しており、V139 とは衝突 しない【図 2-11】。MexY のホモロジーモデルにおいても W177 側鎖の近傍には I138 が存在し ており W177 を回転させると衝突する位置関係にある。AcrB、MexY においては、疎水性ピッ トの体積が小さい、もしくは MexB にくらべて柔軟性に乏しいのではないか、と仮説を立てた。

この仮説を証明するために、AcrB F178W/V139A、MexY I138A を作製した。AcrB F178W、 MexY は ABI-PP に阻害されないが、仮説に従えばトリプトファン側鎖の立体障害を回避すれ ば、ABI-PP により阻害される。

本章第2節2-13に従いエリスロマイシン存在下で増殖曲線を測定し、ABI-PPの効果を測 定した。測定の結果、AcrB F178W/V139A、MexY I138A 発現株では ABI-PP による排出阻害で エリスロマイシンの静菌効果が見られ、仮説を基にした考察と同等の結果になった【図 2-12】。



図 2-11. ABI-PP 結合型 MexB F178W 変異体と同様に W178/W177 側頻(日) を回転させた時 の立体障害 W178/W177 は球体充てんモデルで描画し、衝突部位は赤色で色を付けた。 ABI-PP は黄色で、V139、I138 側鎖はマゼンタで表示し、スティックモデルで表示した。 a. AcrB F178W 変異体の阻害剤結合ピットに結合型 AcrB 由来 ABI-PP を重ねたもの b. ABI-PP 結合型 MexB F178W 変異体結晶構造

c. MexYの阻害剤結合ピットに結合型 AcrB 由来 ABI-PP を重ねたもの



をそれぞれ 6µg/mL、16µg/mLのエリスロマイシンと ABI-PP 存在下で測定した。

第4節 考察

本章では、各変異体 AcrB F178W と MexB F178W の大量発現および、それぞれの分解能 3.6Å、 3.3Å、3.0Å での AcrB F178W、MexB F178W、MexB F178W ABI-PP 複合体の構造解析に成功した。

各トランスポーターの構造は WT のものと結晶型が同型であり、結晶格子サイズもほぼ変わ らなかった。ABI-PP により阻害される MexB F178W では ABI-PP は WT と同じく疎水性ピッ トに結合しており、WT での F178 と同様に W178 側鎖のみの対応で ABI-PP と π - π スタッキン グで結合しており、その他で ABI-PP と考えられる電子密度は観測されなかった。以上から、 ABI-PP の阻害は、この疎水性ピットに結合することにより阻害効果を発揮していることが示 された。また、AcrB、MexY の疎水性ピットの体積が小さい、もしくは柔軟性に乏しいという 仮説を証明するため、AcrB F178W での W178 側鎖と立体障害を起こす可能性のある V139、ま た MexY での W177 と衝突する可能性のある I138 をアラニンに置換した変異体を作製し、それ ぞれ acrB 欠損、acrBtolC 欠損大腸菌に発現させると、ABI-PP 用量依存的なエリスロマイシン の増殖抑制効果が見られた。第2節2-3の結果を野生型 AcrB、MexY の結果と比較すると、 AcrB F178W/V139A、MexY I138A は WT と同等程度まで ABI-PP 感受性であった。これは、 ABI-PP が W178 もしくは W177 との立体障害を回避できるようになると、ABI-PP が効果を発 揮することを示しており、MexB と比べると若干ながら AcrB、MexY の疎水性ピットの体積が 小さい、もしくは柔軟性に乏しいことが示された。

これら結果は、この疎水性ピットへの阻害剤の結合が MexY でも阻害作用を及ぼすことを示 唆するものである。MexB F178W でも、野生型と同様に疎水性ピットへの阻害剤の結合が阻害 効果の発揮に必要なため、この疎水性ピットへの化合物の結合が阻害効果をもたらす主要因で あることが証明された。この疎水性をターゲットとすることで、RND 型異物排出トランスポ ーター阻害剤が作製可能であることが本研究により示されたと筆者は考えている。ここまでの 内容は、*Nature* 500, 102–106 doi:10.1038/nature12300 に共著として掲載された。先に参考論文と して本論文を提示した。

RND 型異物排出トランスポーターを回避する方法としては、基質でない新規の抗生物質を 治療に用いるという従来の方法も有効である。これに関連して、メチルグリオキサール[62]と いうニュージーランド原産のマヌカハニーという蜂蜜の抗菌成分が緑膿菌、サルモネラ菌、大 腸菌において、RND 型トランスポーターの基質でないことを証明した(主論文: Frontiers Microbiology 2014:5:180. Apr. 17th 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00180)。メチルグリオキサールは MDRP においても、一様に効果を発揮する。論文発表後、メチルグリオキサールの標的として、 鞭毛を構成するタンパク質の一つ FliC の発現抑制をするとの報告がなされた[63]。これら新規 の抗生物質は、MDRP を含む緑膿菌に対して臨床応用される場合には、必然的に比較的苦手な 排出基質であると考えられるが、開発の結果論として、基質か否かを判定されるにとどまる。 現状では、コリスチンが MDRP 感染症への最終手段であるが、コリスチンの副作用が大きく、 臨床使用できる抗生物質としては、問題点が多い[64]。治療に用いることのできる低侵襲性の 抗生物質が増えることは、敗血症等でのエンドトキシンショックの低減が可能となるので、必 要であろう。

阻害剤が有する利点としては、これまでに臨床応用されている抗生物質が使えることにある。 新規抗生物質はその認可も含めて開発に伴うリスクが大きい。阻害剤を合剤として用いるなら ば新規と同じ扱いではあるが、臨床応用されている抗生物質であれば、薬物動態が変化しない のであれば、認可が下りる可能性は新規のものより格段に高い。

疎水性ピットに結合する阻害剤候補の要件を考えると、2つあげられる。<u>1. 両親媒性である</u> こと、<u>2. 小分子であること</u>。敗血症では、血中への直接投与が可能な剤型となるが、血中濃度 を長時間維持する必要がある。疎水性であれば、疎水性ピットへの結合能力は高いが、水溶液 としての剤型を取りづらいこと、胆汁酸排泄の速度が速くなることから不適であろう。よって、 両親媒性が適している。また、阻害剤はトランスポーターを標的とするため、グラム陰性菌の 内膜へと到達するために小分子であることが必要である。ABI-PP をはじめとしたピリドピリ ミジン系阻害剤は両親媒性、分子量ともにこの要件を満たしており、MexY にスペクトラムを 拡大することができるならば良い阻害剤となると考えられる。

阻害効果を発揮する疎水性ピットは、進化系統樹的にはフェニルアラニン残基が増えていく ことが知られている(平成 21 年度卒 田中真奈美 修士論文より)。この部位は疎水性を持つこ とで異物排出トランスポーターの基質を基質結合ポケットに誘導するというシミュレーショ ンが報告されており[65]、進化系統樹的にも疎水性であることは共通する。

ABI-PP の疎水性ピットへの結合と阻害効果との直接的な因果関係に関しては、未解明であ る。これまでに得られている結晶構造で、排出基質と阻害基質を区別しているものは、その結 合箇所である。近年新たに、RND型異物排出トランスポーターの阻害剤として、MBX系阻害 剤と AcrB ペリプラズム構造との複合体結晶構造が報告された[28]。この MBX 系阻害剤は ABI-PP と同じく疎水性ピットに結合していた。その他、コンピューターシミュレーションに おいても、この疎水性ピットと阻害剤の関係が示唆された[66]。排出基質と阻害基質の違いは、 疎水性ピットと強い相互作用を起こすかどうかであるという点に関してはコンセンサスが取 れている。

筆者は阻害剤が機能する可能性としては2つ考える。

1. 機能的回転を阻害する

2. 排出機能をもつ AcrAB-TolC 複合体の構成を阻害する

1. は ABI-PP の主鎖並みの電子密度から強い結合をしていること、また、疎水性ピットは遠 位結合ポケットの存在する結合モノマーのみに存在しており、待機、排出モノマーには存在し ていないことから予測される。2. は第3章で示す結果とも関係する。疎水性ピットは RND 型 トランスポーターの表面に近い場所に存在し、この付近はβシート構造が外部に剥き出しとなっている。第3章では、この近傍でのアダプタータンパク質の相互作用が示唆された。この部位の安定化は複合体構成に影響する可能性がある。これらの仮説は、RND型異物排出トランスポーター複合体の構造機能相関の解明で、より詳細な阻害機構が解明されることで明らかとなると考える。今後の展開を期待したい。

本章の内容により、MexY 阻害剤、もしくは MexB、MexY 両方に効くユニバーサル阻害剤 の設計への道筋が立てられたと考える。阻害剤開発に必要であるが未だ未解明の MexY のX 線 結晶構造の解明と共に、最終結果たる臨床応用可能な阻害剤の誕生を期待して本章を終える。

第3章

AcrB-AcrA 融合タンパク質の作製と機能解析

第1節 緒言

大腸菌においては AcrAB-TolC 複合体が RND 型異物排出トランスポーターの機能を担う。第 1 章において述べた通り、先行研究からは、機能と構造の両面からみた論点が不足していると 筆者は感じていた。

本来であれば、*in vitro* 再構成系を構築し膜タンパク質そのものの機能を計測するのが定石で あるが、*in vitro* 再構成系ではグラム陰性菌の二重の生体膜構造を再現する必要がある。この二 重の生体膜構造は、20nm 程度の二枚の生体膜が融合しないように制御された状態であること が求められ、なおかつこの間隙は 20nm 程度の厚さで維持される必要がある。本研究の途中の 2015 年には MexAB-OprM においてはリポソームによる *in vitro* 再構成系とされる実験系が報告 されたが、この論文では水素イオンの輸送と基質輸送能の相関は取れておらず、現在に至るま でタンパク質レベルでの定量的な話ができる再構成系は存在していない[67]。筆者は困難な *in vitro* 再構成系ではなく、*in vivo* で複合体構成と機能を詳しく調べることで、スナップショット としてのタンパク質構造と動的構造としての排出機能について関係性を明らかにしようと試 みた。

また、これまでに AcrAB 二者複合体を明らかにしようとする試みは多く行われてきたが、 結晶構造解析の成功例は報告されていない。これは再構成を試みた際の AcrA、AcrB の間の親 和性の低さが原因であり、構造を明らかとするためにも AcrAB 間の親和性を強化する必要が ある。そこで、AcrB-AcrA 融合タンパク質を作製し、一本化したタンパク質としてポンプ機能 を評価し、機能を明らかにするという方針を立てた。

第2節 実験材料と方法

2-1 実験に使用した菌株およびプラスミド

E. coli BL21 株の acrB 欠損株はカリフォルニア大学バークレー校の二階堂博教授より分譲し ていただいた[70]。 acrAB 欠損株は Datsenko らの変法により E. coli BL21 株の acrB 欠損株から、 pKD4 由来の PCR 産物によりカナマイシン耐性遺伝子と置き換えることで作製した[61]。 acrABacrEF 遺伝子欠損株は、BL21 Δ acrAB 株より pCP20 を用いてカナマイシン耐性遺伝子を 取り除いた後、MG1655 Δ acrEF 株より P1 ファージを用いてカナマイシン遺伝子を導入するこ とで形質導入した[68]。BL21(DE3) 株の acrAB 欠損株は Datsenko らの変法により pKD4 由来の PCR 産物によりカナマイシン耐性遺伝子と置き換えることで作製した。菌株は適切な抗生物質 (クロラムフェニコール: 15µg/mL、アンピシリン: 100µg/mL、カナマイシン 25µg/mL) を含んだ LB プレートもしくは LB 液体培地により 37℃でコロニー選別、培養を行った。 本章で用いた菌株及びプラスミドは【表 3-1】にまとめた。

cherichia coli Strains BL21 BL21 $\Delta acrB$ BL21 $\Delta acrAB$ BL21 $\Delta acrAB$ BL21 $\Delta acrAB$ BL21 (DE3) BL21 (DE3) BL21 (DE3) $\Delta acrAB$ MG1655 MG1655 $\Delta acrEF$ JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBIA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pBcB$	B strain wild type <i>E. coli</i> , F-, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r_{b} 'm _B), <i>gal</i> [<i>malB</i> [*]] _{K-12} (λ ^S) <i>acrB</i> gene eliminated from BL21 with the Spc ⁷ gene <i>acrB</i> gene eliminated from BL21 with the Km ⁷ gene	[60]
BL21 BL21 $\Delta acrB$ BL21 $\Delta acrAB$ BL21 $\Delta acrAB$ $\Delta acrEF$ BL21 (DE3) BL21 (DE3) $\Delta acrAB$ MG1655 MG1655 $\Delta acrEF$ JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{B}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{B}TA^{S}$	B strain wild type <i>E. coli</i> , F-, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r_{B} 'm _B), <i>gal</i> [<i>malB</i> [*]] _{K-12} (λ^{S}) <i>acrB</i> gene eliminated from BL21 with the Spc ⁷ gene <i>acrB</i> gene eliminated from BL21 with the Km ⁷ gene	[60]
BL21 $\Delta acrB$ BL21 $\Delta acrAB$ BL21 $\Delta acrAB \Delta acrEF$ BL21 (DE3) BL21 (DE3) $\Delta acrAB$ MG1655 MG1655 $\Delta acrEF$ JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBIA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{T}IA^{S}$ BL21 $\Delta crB / pB^{T}I$	<i>acrB</i> gene eliminated from BL21 with the Spc ^t gene <i>acrB</i> gene eliminated from BL21 with the Km ^t gene	[09]
BL21 $\Delta acrAB$ BL21 $\Delta acrAB$ $\Delta acrEF$ BL21 (DE3) BL21 (DE3) $\Delta acrAB$ MG1655 MG1655 $\Delta acrEF$ JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBGSA^L$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^L$ BL21 $\Delta acrB / pB^T TA^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^T TA^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^T A^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^T B^T$	acr4B gene eliminated from BL 21 with the Km ^T gene	[70]
BL21 $\Delta acrAB \Delta acrEF$ BL21 (DE3) BL21 (DE3) $\Delta acrAB$ MG1655 MG1655 $\Delta acrEF$ JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBIA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{T}IA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{T}A^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{T}A^{S}$	ucrib gene eminimated noin DE21 with the Kin gene	This study
BL21 (DE3) BL21 (DE3) $\Delta acrAB$ MG1655 MG1655 $\Delta acrEF$ JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBIA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{A}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{A}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{T}A^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pBcTB$ BL21 $\Delta acrB / pAcrB$	acrEF gene eliminated from BL21 $\triangle acrAB$ with the Km ^r gene	This study
BL21 (DE3) $\Delta acrAB$ MG1655 MG1655 $\Delta acrEF$ JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBGSA^L$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^L$ BL21 $\Delta acrB / pB^STA^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^S$	λ phage lysogenizated BL21 strain, F-, dcm (DE3), ompT, hsdS (r _B m _B), gal[λcl 857, indl, Sam7, nin5. lacUV5-779ene1]	[69]
MG1655 MG1655 $\Delta acrEF$ JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBIA^L$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^L$ BL21 $\Delta acrB / pB^STA^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^STA^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^S$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^S$ BL21 $\Delta acrB / pAcrB$ BL21 $\Delta acrB / pAcrB$	<i>acrAB</i> gene eliminated from BL21(DE3) with the Km ^r gene	This study
MG1655 $\Delta acrEF$ JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBIA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{ST}A^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pBAD3$ BL21 $\Delta acrB / pAcrB$	F-, lambda [*] , <i>rph-1</i>	[45]
JM109(DE3) BL21 $\Delta acrB / pBIA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pBAD3$ BL21 $\Delta acrB / pAcrB$	acrEF gene eliminated from MG1655 with the Km ^r gene	[68]
BL21 $\Delta acrB / pBIA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S1S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pBAD33$ BL21 $\Delta acrB / pAcrB$ BL21 $\Delta acrB / pAcrB$	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_{κ} ' m_{κ}^{+}) e14' (mcrA'), supE44, relA1, Δ (lac-proAB)/F' (traD36, proAB ⁺ , lac I ^q , lacZ Δ M15] IDE3	Promega
BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pBGSA^{L}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pB^{S1S}TA^{S}$ BL21 $\Delta acrB / pBAD33$ BL21 $\Delta acrB / pAcrB$ BL21 $\Delta acrB / pAcrB$		This study
BL21 ΔacrB / pBA ^L BL21 ΔacrB / pB ^S TA ^S BL21 ΔacrB / pB ^S TA ^S BL21 ΔacrB / pB ^{S15} TA ^S BL21 ΔacrB / pBAD33 BL21 ΔacrB / pAcrB BL21 ΔacrB / pAcrB		This study
BL21 <i>\DeltacrB</i> / pB ^S TTA ^S BL21 <i>\DeltacrB</i> / pB ^S TA ^S BL21 <i>\DeltacrB</i> / pB ^{S1S} TA ^S BL21 <i>\DeltacrB</i> / pBAD33 BL21 <i>\DeltacrB</i> / pAcrB BL21 <i>\DeltacrB</i> / pAcrB		This study
BL21 <i>bacrB</i> / pB ^T TA ^S BL21 <i>bacrB</i> / pB ³¹⁵ TA ^S BL21 <i>bacrB</i> / pBAD33 BL21 <i>bacrB</i> / pAcrB BL21 <i>bacrB</i> / pAcrB		This study
BL21 \Delta cerB / pB ³¹⁵ TA ^S BL21 \Delta cerB / pBAD33 BL21 \Delta cerB / pAcrB BL21 \Delta cerB / pAcrB		This study
BL21 AacrB / pBAD33 BL21 AacrB / pAcrB BL21 AacrB / pAcrB		This study
BL21 AacrB / pAcrB BL21 AacrB / pAcrB		This study
BL21 Ager4B/ pBLA ^L		This study
		This study
BL21 AacrAB / pBGSA ^L		This study
BL21 AacrAB / pBA ^L		This study
BL21 $\Delta acrAB / pB^{S}ITA^{S}$		This study
BL21 $\Delta acrAB / pB^{STA^{S}}$		This study
BL21 $AacrAB / pB^{S15}TA^{S}$		This study
BL21 AacrAB / pBAD33		This study
BL21 AacrAB/ pAcrB		This study
BL21 $AacrAB AacrEF / pB^{S}ITA^{S}$		This study
BL21 $AacrAB$ $AacrEF/ pB^{S}TA^{S}$		This study
BL21 $AacrAB$ $AacrEF/ pB^{S15}TA^{S}$		This study
BL21 AacrAB AacrEF/ pBAD33		This study
BL21 AacrAB AacrEF/ pAcrB		This study
BL21/nBAD33		This study
$IM109(DE3) / nET22tolC (A150C) ELAG + nB(O255C)^{S}ITA^{S}$		This study
M109(DE3) / pET22tolC (A150C) FLAG + pB(Q255C) HA		This study
BL21(DE3) $\Delta acrAB / pET22tolC (A150C) FLAG + pB(Q255C)^{S15}TA^{S}$		This study
asmids		
pUC118	<i>rep</i> _{ColE1/M13} Ap ^r	[49]
pAcBH	acrRAB gene casette cloned into pUC118; Apr	[18]
pBAD33	<i>rep</i> _{p15A/M13} Cm ^r	[50]
pET22b(+)	<i>rep</i> _{ColE1} Ap ^r	Novagen
pKD46	rep 101ts ; lambda red gene under arabinose promoter, Ap ^r	[61]
pKD4	$rep_{pANTS\gamma}$, Km ^r , Ap ^r	[61]
pCP20	λp_{R} , Rep(Ts), <i>FLP</i> ⁺ , $\lambda c1857^{+}$, Ap ^r , Cm ^r	[61]
pAcrB	acrB gene with His tag cloned into pBAD33, formally named pacrB	[24]
pBIA ^L	acrA (C25A) mutant (AcrA ¹) tandemly cloned into just after acrB with truncated C-terminus (aa. 1048-49) with duplicated AcrB linker spanning aa. 496-540.	This study
pBGSA ^L	AcrB linker spanning aa. 496-540 replaced with GSGSGSG from pBIAL	This study
pBA ^L	acrA (C25A) mutant tandemly cloned after acrB gene directly	This study
pB ^S ITA ^S	N-terminus (aa. 1-24) truncated <i>acrA</i> (C25A) mutant cloned after C-terminus truncated (aa. 1040- 1049) <i>acrB</i> gene with duplicated AcrB linker spanning AcrB aa. 496-559	This study
pB ^S TA ^S	AcrB linker spanning aa. 497-540 replaced with AcrB linker spanning aa. 539-559 from $\ensuremath{pB^{S}ITA^{S}}$	This study
pB ^{S15} TA ^S	AcrB C-terminal aa. 1035-1049 truncated from pB ^S TA ^S	This study
pET22tolC (Q255C) FLAG	tolC (Q255C) mutant gene with FLAG tag cloned into pET22b(+)	This study
pET22tolC (Q255C) PA	tolC (Q255C) mutant gene with PA tag cloned into pET22b(+)	This study
pAcrB(Q255C)	acrB (Q255C) mutant gene in pAcrB	This study
pB(Q255C) ^S ITA ^S	acrB (Q255C) mutant gene in pB(Q255C) ^S ITA ^S	This study

2-2 融合タンパク質発現ベクターの構築

E. coli MG1655 株を染色体 DNA の供与株として用いた。融合タンパク質発現ベクターの構築概要は【図 3-1】に示す。使用したプライマーは【表 3-2】にまとめた。

pBAD33 に C 末のヒスチジン 2 残基を欠損させた *acrB* 遺伝子を SacI、XbaI の間にクローニ ングした。pAcBH より *acrB* の aa. 496-540 領域(Ia)を XbaI、SalI の間にクローニングし、pBI を作製した。pBI の SalI、HindIII の間に pAcBH から *acrA* 遺伝子に C25A (ACA→CGC)の変異 を加え、*acrA^L*を作製し、*acrA^L*の C 末に 6 個のヒスチジン残基からなるヒスタグを付加してク ローニングし、pBIA^Lを作製した。pBIA^L と合成 dsDNA により GSGSGSG からなるリンカー配 列を aa.496-540 の領域で置き換え、pBGSA^Lを作製した。また、同様に aa.496-540 の領域を欠 失させ、pBA^L を作製した。

pBIA^Lから aa.496-540 の領域と acrB 部位の C 末を 10 残基分欠損させ、制限酵素 ApaI 認識配 列に置き換えた pB^S-(ApaI)-A^Sを作製した。pB^S-(ApaI)-A^Sを ApaI で処理し、*acrB*の aa.496-559 領域(Iα-TM7)を PCR で増幅、In-Fusion 反応で導入し pB^SITA^Sを作製した[71]。PCR により *acrB* 部位 C 末に付加した aa.496-538 を除去し TM7 のみとした pB^STA^Sを作製し、さらに *acrB*の C 末から 15 aa. まで欠失させた pB^{S15}TA^Sを作製した。

また、pB^SITA^Sおよび pB^{S15}TA^Sの *acrB* 部位に Q255A を PCR で変異を加え、pB(Q255A)^SITA^S および pB(Q255A)^{S15}TA^S を作製した。

これらの作業では、必要に応じてシークエンス解析により融合タンパク質全長の DNA 配列を 確認した。



rimers or dsDNA		Sequences (5' -> 3')
delacrAB(FRT-km)Fw	(for and B carried advice)	ITTAACTITTTGACCATTGACC AATTTGAAATCGGACACTCG AGGTTTACATGTGTGGCTG GAGCTGCTTC
delacrAB(FRT-km)Re		TCGTATGAGATCCTGAGTTG GTGGTTCAATTACTCCTTAT GTTCGTAGGATGGGGAATTAG CCATGGTCC
SacSDacrBF	(fDI)	TTAGAGCTCAAGTCTTAACT TAAACAGGA
XbaAcrBR	(101 Jul)	ATATCTAGAATCGACAGTAT GGCTGTGC
XbaLinkF		GGCTCTAGAATGCTGAAACC GATTGCCA
SalLinkR	(101 pp1)	AATAAGCTTACGCCCCGTAC TGCGCAG
SalAcrAF	(for pBIA ^L)	ATATGTCGACATGAACAAAA ACAGAGGGTT
acrAhis6HindIII	(for pBIA ^L and pBA ^L)	CAAAACAGCCAAGCTTAATG GTGATGGTGATGGTGAGGACT TGGACTGTTCAGGCTGAGCA C
BLA_3GS (dsDNA)	(for pBGSA ^L)	TACTGTCGATTCTAGAGGTA GCGGTAGTGGTAGTGGTGTC GACATGAACAAAA
XbaacrAhis_fw	(for pBA ^L)	CGTTTCTAGAATGAACAAAA ACAGAGGGTTTACGCCTCT
BΔ10Apa-Atrunc-fw	STE G TY SE ST	AGATGGGCCCGCGGACGAC AAACAGGCC
BΔ10Apa-Atrunc-rv	(Ior pb -(Apai)-1A)	TCCGCGGGGCCCATCTTCATT CTTGCGGCT
L497-559-fw	S v 11251 37	GCAAGAATGAAGATGGCAAA CCGATTGCCAAAGG
L497-559-rv	(IOL DB 111A)	TGTTTGTCGTCCGCCCAG ACGCACGAACAGATAG
TML-acrA-fw	(for pB ^S TA ^S and pB ^{SI5} TA ^S)	GTGGTCGGCATGGCCTATCT GTTCGTGCGCGCGGGGCGCGGGACAAACAGGCCCAACAA GGTGGCCAGC
TML-acrBA10-rv	(for pB ^s TA ^s)	GGCCATGCCGACCACGATGA TCAGATACAGCACCAGGTAA CGCCCGCTGCCATCTTCATT CTTGCGGGCTA
TML-acrBA15-rv	(for pB ^{S15} TA ^S)	GGCCATGCCGACCACGATGA TCAGATACAGCACCAGGTAA CGCCCGCTAAAGCGGCGGCG AACCACCAC
acrBQ255Clong-fw	(for pAcrB(Q255C), pB(Q255C) ^S ITA ^S ,	GTGAATTGCGATGGTTCCCG CGTGCTGCTGCGTGACGTCG CGAAGATTGAGCTGGGTGGT
acrBQ255Clong-rv	and pB(Q255C) ^{S15} TA ^S)	ACCATCGCAATTCACTTTCA GCAGGATTTTGCCGGAACTCT TCAGTAGAGGTCAGACGCGT
ET22NdeITolC-fw		AAGGAGATATACATATGAAG AAATTGCTCCCCATTCTTAT
ET22TolCFLAGHind-rv		GTGCGGCCGCAAGCTTACTT GTCATCGTCGTCCTTGTAGT CGTTACGGAAAGGGTTATGA CCGTTACTGG
tolCA150C-fw		CTGGTATGCATCACCGACGT GCAGAAC
tolCA150C-rv		IGGTGATACCAGGCCCA CGTTAAA

2-3 大腸菌膜画分の調製

適切な抗生物質で選択した Overnight の前培養液 1mL を、10mM アラビノースを添加した 100mL の LB 液体培地に加えた。排出活性を持つ融合タンパク質に関しては、さらに 32µg/mL のオキサシリンを培地に加えた。OD₆₀₀が 0.7 に達してから 2 時間後に回収し、7,680×g で 10 分遠心することで菌を回収した。第 2 章 第 2 節 2-6 と同様に、Wash buffer で洗浄し Breaking buffer で懸濁したのち、超音波破砕を行った。未破砕菌、封入体を 27,000×g で除去し、上清 を 200,000×g, 30 分で超遠心することで可溶性画分を除去した。膜画分を EDTA Wash buffer で 懸濁し、再度 200,000×g、4℃、90 分により膜画分を沈殿させ、膜表在性タンパク質を除去し た。精製された膜画分は Membrane Sample buffer で懸濁し、実験に用いた。

2-4 大腸菌膜画分のウェスタンブロッティング

2-3 で大腸菌膜画分を調製し、10% Criterion TGX stain-free precast gel (Bio-Rad 社) で 100 ボ ルトの定電圧で SDS-PAGE を行った。LAS3000 を用いて 312nm の UV 光下でタンパク質のバ ンドを可視化し、その後 Trans-Blot Turbo Midi polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad 社)で 25 アンペアの電流値で PVDF 膜へ転写した。一次抗体、二次抗体反応は、iBind Western system によって行った。抗ヒスタグモノクローナル抗体は Sigma-Aldrich (H1029-0.2ML) を使用し、抗 AcrA ポリクローナル抗体、抗 AcrB ポリクローナル抗体は先行文献のものを使 用した。化学発光には Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク社)を使用し、LAS3000 で検出し た。各ウェスタンブロッティングにおいて、抗ヒスタグ抗体を用いたものでは 15µg、抗 AcrA 抗体を用いたものでは 2µg、抗 AcrB 抗体を用いたものでは 15µg の膜タンパク質を使用した。

2-5 MIC 測定

MIC 測定には、オキサシリン (MPIPC, 東京化成工業社)、クロキサシリン (MCIPC, Sigma 社)、セファマンドール (CMD, Sigma 社)、エリスロマイシン (EM, ナカライテスク社)、テト ラサイクリン (TC, Sigma 社)、ミノサイクリン (MINO, Duchefa Biochemie 社)、ナリジクス酸 (NA, 東京化成工業社)、ノボビオシン (NB, Wako 社)、アクリフラビン (ACR, Wako 社)、エ チジウムブロマイド (EtBr, Sigma 社)、ローダミン 6G (R6G, Sigma 社)、塩化ベンザルコニウ ム (BZC, ナカライテスク社)を用いた。適切な抗生物質で選択した Overnight の前培養液を 100 倍希釈し、マイクロプランターで各抗生物質と 10mM アラビノースを添加した LB 寒天培 地に 1µL 相当をスポットし、37℃で 16-18 時間静置した。コロニーの出現を目視により確認し、 コロニーの出現が観測できなくなった最小の濃度を MIC とした。MIC の比較には 4 倍以上の 濃度差を有意とした。

2-6 エチジウムブロマイド排出活性測定

適切な抗生物質で選択した Overnight の前培養液を 0-10mM のアラビノースを添加した LB 液体培地で 100 倍希釈し、OD₆₀₀ が 0.5 になるまで培養を行った。菌を遠心回収し、A buffer

[100mM KPi pH7.5, 5mM MgSO₄] で2回洗浄した。OD₆₀₀が36相当になるようにA buffer で希 釈し、培養の時に用いたアラビノース濃度とエチジウムブロマイドを添加したA buffer で1:1 に希釈することで終濃度 OD₆₀₀=18, 終濃度 10µM のエチジウムブロマイドを 96-well black flat-bottom plate (Corning)に調製した。エチジウムブロマイドのインターカレート蛍光を励起波 長 530nm、検出波長 600nm で SD-8100 マイクロプレートリーダー (Corona Electric 社)で2分ご とに検出した。実験は少なくとも3回行い、各値を平均し、標準偏差をエラーバーとして表示 した。

発現量-排出活性相関の測定では、エチジウムブロマイド排出活性測定に用いた菌を分取し、 2-3の破砕、膜画分回収手順、および2-4のウェスタンブロッティングの手順に従い、3µg の膜画分を抗 AcrB 抗体によって検出した。

2-7 計算科学による AcrA 結合位置解析

AcrBとTolCの複合体は *in vivo* でのシステイン変異体を使用したダイレクトクロスリンク実 験での複合体予想を利用した[36]。AcrB (PDBID: 3AOA)、Open-state の TolC (PDBID: 2XMN) を使用し、PyMol (Schrödinger 社)を使用し位置関係を調整して配置した[35]。構造情報にリン カー配列を付加して AcrB-TolC を擬似的に 1 本化した構造にし、この構造情報を基に SWISS-MODEL ホモロジーモデリングサーバーにてエネルギー最小化計算を含むホモロジー モデル作製行程により、全体構造のエネルギー最小化を行った。その後、リンカー配列を構造 データから取り除いた。この AcrB-TolC のドッキングモデルを元に再度 AcrB、Open-state TolC の結晶構造を配置し、AcrB-TolC 複合体とした。結晶構造中で観測されていない AcrA 部位を SWISS-MODEL ホモロジーモデリングサーバーにより作製し、結晶構造に結合したのち、これ を再度 SWISS-MODEL ホモロジーモデリングサーバーに通し、全長 AcrA モデルとした。AcrA 結合サイトは AcrB、TolC の膜貫通部位への結合を除外して、Schrödinger suite の BioLuminate により計算した[72]。BioLuminate による計算では、パラメータは default を用いた。

2-8 TolC 発現用プラスミドの作製

E. coli MG1655 株のゲノム DNA より、C 末に FLAG タグを挿入した *tolC* 遺伝子を PCR で増幅し、pET22 を Die、HindIII で処理して In-Fusion 反応により組み込み pET22tolC FLAG を作製した[71]。ここに A150C の変異を PCR で導入し、pET22tolC(A150C) FLAG を作製した。同様 に PA タグを付加した TolC(A150C)PA 発現プラスミドを作製した。これらの作業では、必要に応じてシークエンス解析により *tolC* 遺伝子全長の DNA 配列を確認した。

2-9 AcrAB-TolC の in vivo 複合体の検出

pET22tolC(A150C)PA、および pB(Q255C)^{S15}TA^Sを BL21(DE3) Δ acrAB 株へ導入した。この菌 株の前培養を 100 倍希釈し、IPTG およびアラビノースで誘導し菌を回収した。これを 2-3 と 同様に超音波破砕により破菌し、膜画分を調製した。調製した膜画分を 2-4 と同様、15μg の 膜画分タンパク質量を使用し、10% Criterion TGX stain-free precast gel、100 ボルトで SDS-PAGE を行い、UV 光下でタンパク質を可視化した。PVDF 膜へ転写し iBind Western system によって 抗体反応を行った。検出は抗ヒスタグ抗体(Sigma aldrich 社 H1029-0.2ML)、抗 FLAG M2 抗体 (Sigma aldrich 社)および抗 PA タグモノクローナル抗体(012-25863, Wako 社)により検出した。

第3節 結果

3-1 AcrB-AcrA 融合タンパク質の設計と構築

AcrB は 12 回膜貫通であり、N 末と C 末が共に細胞質に存在する[18]。一方、AcrA は C25 において、Siganl Peptidase II によって 1-24AA.が切断され C25 に脂質付加される[34]。トポロジー的には AcrA の N 末はペリプラズム空間に存在する【図 3-2】。AcrB-AcrA 融合タンパク質を作製するためには、細胞質側の AcrB C 末とペリプラズム側の AcrA N 末を結合する TM リンカーが必要となる。発現用プラスミドベクターは 2-2 の通りに作製した。



TM リンカーとして、1 つは AcrA のシグナル配列を利用して AcrBIA^L、AcrBGSA^L、AcrBA^L を作製した。AcrA のシグナル配列は、AcrA C25A では切断されなくなり、排出機能は低下す るものの、失われないことが報告されている[34]。そこで、AcrA C25A (AcrA^Lと称す)と AcrB の C 末を様々なペプチドリンカーで結合させ一本化した。AcrBIA^L、AcrBGSA^L、AcrBA^Lは この AcrA シグナル配列を利用した TM リンカーを使用したものである。6 回膜貫通へリック スで擬似の二回繰り返し構造のある AcrB は TM6 と TM7 の間を細胞質側にある $a \sim$ リックス である Ia で繋がれる。先行研究から、Ia は AcrB 三量体を一本化した AcrB-B-B においてリン カーとして使われており、これを細胞内リンカーとして利用した[70]。これにより、AcrBIA^L を作製した。また、グリシンとセリンのリピート配列である GSGSGSG を Ia と置き換え、 AcrBGSA^Lを作製した。さらに、リンカー配列をなくし直に結合させた AcrBA^Lを作製した。 もう一つの TM リンカーとして、AcrB の TM7 を利用し AcrB^SITA^S、AcrB^STA^S、AcrB^{S15}TA^S を作製した。TM7 は AcrB の最も外側に位置しており、比較的自由度が高いと考えられる。AcrB の C 末を 10AA.ほど削り込み、ここへ Ia と TM7 を用いて、AcrA のペリプラズム部位(AcrA^S と称す)を繋いだ AcrB^SITA^S を作製した。ここから Ia を除去した AcrB^STA^S、および AcrB 部位 を WTAcrB の C 末から 15AA.ほど欠失させた AcrB^{S15}TA^S を作製した。



3-2 AcrB-AcrA 融合タンパク質の膜画分への発現確認

AcrB-AcrA 融合タンパク質は pBAD33 プラスミドベクターのアラビノースプロモーター P_{BAD} の下に組み込んだので、アラビノース添加量により発現の調製が可能である[50]。これら AcrB-AcrA 融合タンパク質を acrB もしくは acrAB 遺伝子を欠損した *E. coli* BL21 株に発現させ た。構築した AcrB-AcrA 融合タンパク質の膜画分への発現を 2-4 に従い、ウェスタンブロッ ティングで確認した。発現を検出したウェスタンブロッティングは【図 3-4】【図 3-5】に示す。

抗ヒスタグ抗体では、AcrB-AcrA 融合タンパク質のバンドと思われる 140kDa 付近のバンド が観測された【図 3-4 a】【図 3-5 a】。全ての AcrB-AcrA 融合タンパク質でその他にバンドはな く、AcrB-AcrA 融合タンパク質で C 末のヒスタグをもっているものは、全長発現したもののみ であった。この C 末は、先行研究において排出活性に重要ということがわかっており、C 末の ヒスタグが保存されたことは機能を担保していると考えられた。

抗 AcrA 抗体では、140kDa 付近のバンドの他に、*acrB* 遺伝子欠損大腸菌で発現させたものでは、内因性の WT AcrA と思われる 40kDa 付近にバンドが検出された【図 3-4 b】【図 3-5 b】。

抗 AcrB 抗体では、140kDa 付近のバンドの他に、100kDa 付近のバンドが検出された【図 3-4 c】。この 100kDa のバンドは AcrBIA^L、 AcrBGSA^L、 AcrBA^Lにおいては強く検出されたが、 AcrB^SITA^S、AcrB^STA^S、AcrB^{S15}TA^Sにおいては少なかった。この位置は WT AcrB の位置であ り、その他のバンドは検出されなかった。100kDa 付近のバンドの位置を各 AcrB-AcrA 融合タ ンパク質で比較すると、よりリンカーの長いもののほうが、より分子量が大きいバンドが検出 された。これは、細胞質側のリンカーが切断の原因ではなく、膜貫通リンカーの直前、途中も しくは直後で切断されていることが示唆された。

AcrBGSA^Lを精製したのち質量分析すると、WT AcrB よりわずかに質量の大きなペプチドが 観測された。この結果は、TM リンカー部位で切断されていることを示唆しており、AcrB-AcrA 融合タンパク質間で用いた TM リンカーの違いが切断率を左右し、TM7 からなる AcrB^SITA^S、 AcrB^STA^S、AcrB^{S15}TA^Sで 100kDa 付近のバンドが少なくなったことに説明がつけられる【図 3-5 c】。また、抗 AcrA 抗体では 140kDa 付近以外ではほぼバンドが検出されない。以上から、AcrB の直後でミスフォールディングもしくは翻訳の停止が起こったために AcrA 部位のみが欠失し たと考えられた。

TM7 による AcrB-AcrA 融合タンパク質では、250kDa 以上の位置にマルチマーと思われるバ ンドが検出された【図 3-5 b,c】。AcrB^{S15}TA^Sを、ヒスタグを利用して TALON、Superdex200 GL 10/300 を用いてサイズ排除クロマトグラフィーで精製すると、SDS-PAGE によりこのマルチマ ーと思われるバンドが検出されており、またわずかに AcrB 単独のバンドも同時に検出された 【図 3-6】。サイズ排除クロマトグラフィーでは AcrB-AcrA 融合タンパク質の単量体と思われる 溶出ピークは検出されず、AcrB-AcrA 融合タンパク質は AcrB 部位のみのものも含んで三量体 を構成していると考えられた。

Western blotting の結果をまとめると、AcrB:AcrA=1:1の比率で固定した AcrB-AcrA 融合タンパク質は膜に全長発現し、一部は AcrB 部位のみで切断されていた。しかしながら、AcrB-AcrA 融合タンパク質を発現させた acrAB 欠損株では遊離した AcrA 部位はなく、膜に発現するもの は全長 AcrB-AcrA 融合タンパク質と切断された AcrB であるとわかった。この切断率は TM7 を使用した AcrB-AcrA 融合タンパク質では AcrA シグナル配列を使用した AcrB-AcrA 融合タン パク質に比べ低下していた。





3-3 AcrB-AcrA 融合タンパク質の MIC による活性測定

第2節2-5に従い AcrB-AcrA 融合タンパク質および AcrB を発現させた *acrB、acrAB* 遺伝 子欠損 BL21 株に対して様々な抗生物質の MIC を測定し、プラスミドベクターのみを導入した 宿主菌株と値を比較した。結果は【表 3-3】【表 3-4】にまとめた。

WT AcrB を発現させた BL21 Δ acrB 株では宿主株と比べ 2² から 2¹⁰ 倍の有意な差があった。 BL21 Δ acrB 株では 3-2 で AcrA が恒常発現していることが確認できており、導入した WT AcrB と WT AcrA が協調して機能したと考えられた。WT AcrB を発現させた BL21 Δ acrAB 株では、 プラスミドベクターのみの導入株と比べて有意差がなく、恒常発現した AcrA もしくはそのホ モログが存在しないために、機能できないと考えられた。

AcrB-AcrA 融合タンパク質を発現させた BL21 $\Delta acrB$ 株および BL21 $\Delta acrAB$ 株では WT AcrA と WT AcrB を発現している株並みに薬剤耐性を回復した。これらにより、AcrB-AcrA 融合タンパク質が AcrA、AcrB と同様の抗生物質耐性能を有していることが確かめられた。

AcrB-AcrA 融合タンパク質間で MIC を比較すると、Iα の有無で耐性が変化しなかった。これは、Iα は 40Åと長く立体障害を回避できると考えられるが、リンカーが短いもしくはほと

んど存在しない AcrBGSA^L、 AcrBA^L、AcrB^STA^S、AcrB^{S15}TA^S でも AcrBIA^L、AcrB^SITA^S とあ まり差はなく、抗生物質耐性能にリンカー長の影響がほぼないことを示唆していた。また、AcrA シグナル配列と TM7 を利用した AcrB-AcrA 融合タンパク質の間でもあまり差はなく、AcrA シ グナル配列を利用した AcrBIA^Lでは、比較するとわずかに MIC が落ちていた。

以上から、AcrB-AcrA 融合タンパク質は大腸菌の生体膜に全長発現し、多剤耐性機能を持つ ことがわかった。

	表 3-3. Ac	erA シク と発現し	ゲナル した acr	记列を ·B、 a	:利用し <i>crAB</i> 欠	た Ac :損株の	erB-Ac の MIC	rA 融合	トタン/	パク質		
		Minimum inhibitory concentrations (MIC)										
Host	Expressed protein	MPIPC	MCIPC	EM	MINO	NA	NB	ACR	CV	EB	Rho6G	BZC
BL21∆acrB	vector (pBAD33)	0.5	1	1	0.13	0.5	< 0.5	2	0.5	2	<1	1
BL21 $\Delta acrB$	$\mathrm{AcrB}^{\mathrm{His}}$	256	256	256	0.5	1	512	32	64<	256	8192	8
BL21 $\Delta acrB$	AcrBIA ^L	256	256	64	1	1	256	16	64	256	8192	8
BL21 $\Delta acrB$	AcrBGSA ^L	256	256	128	1	2	512	16	64	256	8192	16
BL21 $\Delta acrB$	$AcrBA^{L}$	256	256	64	1	1	512	16	64<	256	8192	8
BL21 $\Delta acrAB$	vector (pBAD33)	0.5	0.5	8	0.13	0.5	2	2	8	4	8	2
BL21 $\Delta acrAB$	$\mathrm{AcrB}^{\mathrm{His}}$	0.5	0.5	8	0.13	0.5	2	2	8	4	8	2
BL21∆acrAB	AcrBIAL	64	256	32	0.5	1	64	16	16	128	4096	8
BL21∆acrAB	AcrBGSAL	256	256	128	0.5	2	512	16	32	128	8192	8
BL21 $\Delta acrAB$	$AcrBA^{L}$	256	256	128	1	1	512	16	64	128	8192	16

Heat 1	E-main diametric	Minimum inhibitory concentrations (MIC) for										
Host	Expressed protein	MPIPC	MCIPC	EM	MINO	NA	NB	ACR	CV	EB	Rho6G	BZC
BL21∆acrB	vector (pBAD33)	2	2	8	0.13	0.5	4	2	2	4	8	4
BL21∆acrB	AcrB ^{His}	256	256	128	0.5	1	256	16	64<	256	8192	8
BL21∆acrB	AcrBIA ^L	128	256	64	0.5	2	256	16	64	128	8192	8
BL21∆acrB	AcrB ^s ITA ^s	256	256	256	1	2	1024	32	32	256	8192	8
BL21∆acrB	AcrB ^s TA ^s	256	256	256	0.5	1	256	8	32	128	8192	8
BL21∆acrB	AcrB ^{S15} TA ^s	128	256	256	0.5	1	256	16	32	128	1024	8
BL21∆acrAB	vector (pBAD33)	0.5	0.5	8	0.13	0.5	4	4	4	4	8	4
BL21∆acrAB	$\mathrm{AcrB}^{\mathrm{His}}$	0.5	0.5	8	0.13	0.5	4	2	4	8	8	8
BL21∆acrAB	AcrBIA ^L	128	256	64	0.5	1	128	16	32	128	8192	8
BL21∆acrAB	AcrB ^S ITA ^S	256	256	256	0.5	1	512	16	32	128	8192	8
BL21∆ <i>acrAB</i>	AcrB ^s TA ^s	128	256	128	0.5	1	256	8	16	128	4096	8
BL21∆acrAB	AcrB ^{S15} TA ^s	64	128	128	0.25	0.5	256	8	16	64	2048	4

3-4 エチジウムブロマイド排出活性測定

本章 3-3で AcrB-AcrA 融合タンパク質は機能として多剤耐性能を持つことがわかったが、 MIC 測定によりわかることは耐性上昇のみであるので、この耐性獲得が排出によるものかどう かを検証した。

エチジウムブロマイドは AcrAB-TolC の基質であることが知られており、ペリプラズムに存 在するエチジウムブロマイドを菌体外に排出し、細胞内への侵入を阻止できる[4]。細胞質内の エチジウムブロマイドは、ゲノム DNA へのインターカレート蛍光として観測できる[73]。排出 活性測定には Glucose を加えることで蓄積された基質の排出を促進させ評価する方法と、基質 の侵入の阻止を評価する方法がある[74][75]。AcrAB-TolC の発現により、確かに細胞質内に蓄 積されたエチジウムブロマイドの菌体外への排出亢進がみられるが、AcrB の細胞質側には基 質通過可能な通路は空いておらず、細胞質からペリプラズム空間への輸送経路は、SMR や MFS 型を経由すると考えられる[66]。AcrB では基質認識を行うペリプラズム側にのみ基質認識ポケ ットへの経路が存在しているため、後者の方法が適していると考えた。そこで、本章 2-6 の 方法に従い、エチジウムブロマイド排出活性測定を行った。

エチジウムブロマイド排出活性測定にあたっては、AcrA 以外のコンポーネントにも考慮した。AcrA のホモログである AcrE は AcrEF-TolC 複合体として機能するが、AcrA と AcrE は相同性 95%、一致度 70%、AcrB と AcrF は相同性 95%、一致度 77%であり、AcrE は AcrB とも機能することがサルモネラ菌において報告された[76]。同様に大腸菌でも AcrE が AcrB と協調して機能するとされるため、*acrAB* 遺伝子に加え、*acrEF* 遺伝子を追加で欠失させた大腸菌 BL21 株を作製し、エチジウムブロマイド排出活性測定で比較した。

acrB 遺伝子欠損株に AcrB、AcrB-AcrA 融合タンパク質を発現させたものの両者で、インタ ーカレート蛍光の上昇が大きく抑えられた【図 3-7】。*acrB* 遺伝子欠損株では WT AcrA が恒常 発現しているため、AcrB と協調してエチジウムブロマイドを排出し、細胞質への侵入が阻止 されたと考えられた。*acrAB* 遺伝子欠損株では、AcrB を発現させても蛍光上昇が確認された。 これは、AcrA がないため、エチジウムブロマイドを排出できないためと考えられた。一方、 *acrAB* 遺伝子欠損株に AcrB-AcrA 融合タンパク質を発現させると蛍光上昇が大きく抑えられた。 よって AcrB-AcrA 融合タンパク質は生体膜に発現し、エチジウムブロマイドを排出しているこ とが確かめられた。これらから、AcrB-AcrA 融合タンパク質はその他の抗生物質でも同様に排 出を行うことにより薬剤耐性を獲得しているものと考えられる。

本節 3-1 で構築した AcrB^{S15}TA^S であるが、AcrB の C 末から 15AA.の場所は、AcrB 結晶構 造中において主鎖が確認出来る場所であり、膜貫通部位から細胞質側に出た直後に位置する。 この場所に 20 アミノ酸からなる TM7 を結合しており、AcrB^{S15}TA^Sにはリンカーの自由度はほ とんど存在しない。この AcrB^{S15}TA^Sにおいても他の AcrB-AcrA 融合タンパク質と変わらない 排出活性が見られた。

また、acrABacrEF 遺伝子欠損株においても acrAB 遺伝子欠損株と同様の結果を示し、AcrB

の発現は蛍光上昇を抑制せず、AcrB-AcrA 融合タンパク質の発現によって蛍光上昇の抑制が見られた。これは、AcrA のホモログである AcrE が LB 培地を利用した通常の培養条件では発現 せず、耐性上昇に寄与しないためと考えられた。本章 3-2 での抗 AcrA ポリクローナル抗体に よる AcrB-AcrA 融合タンパク質の検出では、*acrAB* 遺伝子欠損株において 40kDa 付近にバンド が検出されなかった【図 3-4b】【図 3-5b】。AcrE は AcrA と一致度が 70%あり、抗 AcrA ポリク ローナル抗体は AcrE も検出できると考えられる。40kDa 付近にバンドが検出されなかったこ とは、AcrE が発現していないことを支持していると考えられた。



³⁻⁵ AcrB-AcrA 融合タンパク質の発現量-排出活性相関

AcrB-AcrA 融合タンパク質の機能を相対的に評価するため、エチジウムブロマイド排出活性

測定を用いて、発現量-排出活性相関を測定した【図 3-8】【図 3-9】【図 3-10】。pBAD33 プラス ミドベクターでは、アラビノース添加量依存で発現量を調節することができる。アラビノース 濃度を上昇させると、排出活性がそれ以上上昇しなくなる濃度が存在した。この実験系におい て活性が頭打ちとなる活性を最大活性、またこの最大活性の半分の値を活性半値と呼称する。

野生型 BL21 にプラスミドベクターを単独で導入し、アラビノース濃度の影響を調べると、 アラビノース量依存的な排出活性の上昇が見られた【図 3-8a,b】。一方、*acrB* 遺伝子欠損もし くは *acrABacrEF* 遺伝子欠損株にプラスミドベクターを単独で導入すると、アラビノース量依 存的な排出活性の変化はほとんどなかった。ここから、アラビノースはタンパク質の発現誘導 だけでなく、エネルギー源としても使われることがわかった。*acrABacrEF* 遺伝子欠損株に AcrB を発現させたものではプラスミドベクター単独のものと差がなかったので、このエネルギーは エチジウムブロマイドの分解ではなく、排出活性のエネルギー源として使われたと考えられた 【図 3-8c】。

排出活性はアラビノース濃度により若干の活性上昇を示した。しかしながら、発現量-排出活 性相関の測定で用いた 0~2mM、特に 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1mM ではアラビノース濃度が大き く違わない限り排出活性の比較が可能であると考えた。プラスミドベクターを単独で導入した *acrB* 遺伝子、もしくは *acrABacrEF* 遺伝子を欠損した大腸菌株においては、ともに蛍光が 200 arbitary units (AU)へと上昇し、最大活性では 50-60AU 付近であった。この活性半値である 120-130AU に到達する点でのアラビノース濃度、発現量でエチジウムブロマイド排出活性を比 較した。



acrB 欠損株に AcrB を発現させると、アラビノース添加量に依存して、排出活性が上昇して いる様子が観測された【図 3-8 d】。一方、*acrABacrEF* 欠損株に AcrB を発現させても、活性の 上昇は見られず最終的な蛍光量は 200AU 付近であり、アラビノース添加によってほぼ変化し なかった。活性半値にあたるアラビノース濃度は、0.25mM 付近だった。また、アラビノース 濃度を上昇させると、それによる発現量上昇が確認できた。活性半値の AcrB 発現量は、BL21 野生株と比較して、変わらない程度の発現であった。

AcrB-AcrA 融合タンパク質の発現量を調整すると、*acrB* 欠損、*acrAB acrEF* 欠損大腸菌株に おいて、アラビノース添加量依存で排出活性が上昇する様子が観測された【図 3-9】【図 3-10】。 *acrABacrEF* 欠損株において活性半値となる濃度は、AcrB^SITA^S では 0.25mM、AcrB^STA^S、 AcrB^{S15}TA^S では 0.5mM であった。内因性の WT AcrA が発現する acrB 欠損株に AcrB-AcrA 融 合タンパク質の発現量を発現させると、活性半値は AcrB^SITA^S、AcrB^STA^S、AcrB^{S15}TA^S で 0.1-0.25mM の間の濃度であった。

AcrB と同様に AcrB-AcrA 融合タンパク質でもアラビノース濃度を上昇に伴う発現量上昇が 確認できたが、同じアラビノース濃度での AcrB の発現と比べ、より多くの AcrB-AcrA 融合タ ンパク質が発現していた【図 3-10】。この発現量の違いは、転写時のプラスミド DNA の構造や mRNA の構造の違いによるものと考えられるが、AcrB の活性半値と比較して、約5倍からそ れ以上の AcrB-AcrA 融合タンパク質が発現していた。これにより、AcrB-AcrA 融合タンパク質 の活性は、AcrB と比べて 20%程度に低下しているものと考えられた。

AcrB-AcrA 融合タンパク質を発現した acrB 欠損株と acrABacrEF 欠損株の両株間を比較する と、活性半値でのアラビノース濃度が acrB 欠損株では 0.1-0.25mM、acrABacrEF 欠損株では 0.25-5mM とあまり変わらず、またこの時の発現量もあまり違わなかった【図 3-9】【図 3-10】。 このことは、acrB 欠損株においてゲノムから恒常発現する内因性 AcrA は AcrB-AcrA 融合タン パク質の活性上昇に関与していないことを意味すると考えられた。

以上から、AcrB-AcrA 融合タンパク質、AcrB^SITA^S、AcrB^STA^S、AcrB^{S15}TA^Sは AcrB と比べ てエチジウムブロマイド排出活性が低下しているものの、内因性 AcrA が AcrB-AcrA 融合タン パク質の活性には関与しなかった。AcrB-AcrA 融合タンパク質は強固なホモ三量体を構成する 【図 3-6】。AcrB-AcrA 融合タンパク質が別の同一分子から AcrA を借りると仮定すると、内因 性 AcrA の有無で活性が変化しないことの説明ができない。よって、発現量-排出活性相関から は AcrB-AcrA 融合タンパク質が単独で機能することが示唆された。ここから、ホモ三量体を構 成する AcrB-AcrA 融合タンパク質が構成比 AcrB:AcrA=1:1 で排出機能を持つと結論づけられた。

AcrB-AcrA 融合タンパク質は活性が低下していた。通常 AcrA は脂質付加されているが、膜 貫通部位を持つ AcrA では AcrA C25A (AcrA^L) では若干の活性の低下が報告されていた[34]。 AcrB-AcrA 融合タンパク質の活性低下は、この AcrA^Lの活性低下と合わせて、3-2で検出さ れた AcrA 部位の欠損した AcrB-AcrA 融合タンパク質のためと考えられる。AcrB 部位が強固 な三量体を構成する【図 1-15】ため、AcrA 部位を1つでも欠損した AcrB-AcrA 融合タンパク 質三量体の割合は、AcrA 部位の欠損割合に関連して大きく上昇する。これらが原因となり、





3-6 計算科学による AcrA と AcrB の相互作用解析

3-5で三量体を構成する AcrB-AcrA 融合タンパク質が単独で排出機能を有することが示さ れた。特に AcrB^{S15}TA^Sでは、AcrA の存在できる位置が制限されている考えられた。この制限 された AcrA 位置関係は AcrAB 複合体の機能と構造の関係を明らかとする重要な情報と考えら れた。AcrB^{S15}TA^Sでは C 末を削った AcrB に TM7 を結合させており、この情報をもとに AcrB^{S15}TA^Sの構造モデルを作製した。

AcrB^{S15}TA^Sの構造モデルからは、AcrA 部位は AcrB の単量体と単量体の間、インタープロト マーの位置に制限されると考えられる。この位置に AcrA が本当に相互作用しうるかに関して、 本章 2-7 に従い、櫻井特任助教の協力のもと、計算科学により検証を試みた。

構成比 1:1 の AcrB-AcrA 融合タンパク質が機能することから、1:1 の排出モードが存在する と考えられた。この時、AcrA は基質の漏出しない 6 量体の筒構造を形成できないため、AcrB と TolC が直に結合する必要がある。AcrB と TolC はシステイン変異体同士で直にジスルフィ ド結合できることが知られており、この AcrB Q255C、TolC A150C の相互作用を基に、AcrB と TolC の複合体構造モデルを作製した【図 3-11】。



Schrödinger suite の BioLuminate で AcrB-TolC 複合体構造モデルに全長 AcrA 構造モデルのド ッキングを行うと、AcrB もしくは TolC の膜貫通部位で相互作用をする解のみが得られた【図 3-12 左】[72]。そこで、膜貫通部位との相互作用を除外して再度試み、50 個の解を得た【図 3-12 右】。すると、AcrA の膜より最も遠い α ヘリックスバンドルが TolC と平行もしくは寄り添っ ていて、N 末、C 末が内膜にある解が 6 つ得られた【図 3-13】。その他は AcrA の配置は、MFP として TolC と AcrB の結合を仲介するには適した形ではなかった【図 3-12 右】。



AcrB は三つのコンフォメーションをもった強固なホモ三量体であるが、AcrA はインタープ ロトマーの位置に結合したものが 5 つ、待機モノマーのクレフトに結合したものが 1 つであっ た【図 3-13】。

BioLuminate では AcrA の柔軟性は考慮せず、変形しない構造モデルをもとにドッキングシミ ュレーションを行っているため、得られた情報は限定的なものであるが、インタープロトマー の位置は、AcrB^{S15}TA^Sの構造モデルから予測された位置であり、特定の場所に相互作用する解 が得られることは、AcrB-AcrA 融合タンパク質の機能と複合体構造を支持するものと考えられ た。



3-7 AcrB-AcrA 融合タンパク質を利用した AcrAB-TolC 複合体の検出と精製の試み

AcrB と TolC は直接の相互作用を取ることが知られている。AcrB-AcrA 融合タンパク質が機能するので、AcrB:AcrA=1:1 の排出モードが存在し、この時には AcrB と TolC が直に結合する必要がある。そこで、AcrB-AcrA 融合タンパク質のシステイン変異体と TolC のシステイン変異体を構築し、検出および精製を試みた。

本章 2-1、2-2に従い、pB(Q255C)、pB(Q255C)^SITA^S および pET22tolC(A150C)FLAG を作 製した。これらを JM109(DE3)に導入し、AcrB(Q255C)と TolC(A150C)FLAG、および AcrB(Q255C)^SITA^S と TolC(A150C)FLAG を同時に発現させた。大腸菌のペリプラズム空間は酸 化条件であり、ペリプラズムで複合体を形成する AcrAB-TolC 複合体では、接触し合う距離で 存在すれば、システイン残基により AcrB と TolC が直接的に複合体を形成し得る。膜画分を回 収し、還元剤(DTT)あり、還元剤なしの 2 条件でサンプルを処理し、抗 FLAG タグ抗体でウェ スタンブロッティングを行った【図 3-14】。

DTT で処理したサンプルでは、100kDa 付近と 50kDa 付近にバンドが検出された。100kDa 付 近のバンドは全てのサンプルで検出され、TolC の二量体と考えられた。TolC は外膜ポリンで あり、β シートからなる膜貫通構造が安定なため、高温で処理する必要があり、高温で処理す ると本来の分子量である 50kDa のみのバンドが検出されることを確認している。しかしながら、
AcrB は高温で処理するとバンドが乱れるので、熱処理を行っていない。DTT を添加しなかったサンプルでは、140kDa 付近に共通したバンドと、AcrB(Q255C)では 200-220kDa、AcrB(Q255C)^SITA^S では薄い 200-220kDa のバンドと、濃い 250kDa 超のバンドが検出された。AcrB(Q255C)と TolC(A150C)を同時発現させた先行研究では、50kDa に TolC の単量体、215kDa 付近に濃い AcrB-TolC 複合体、そして 145-155kDa に TolC 二量体とされるバンドが検出される としていたが、今回の検出ではさらにもう一本、100kDa 付近のバンドが検出された。この 100kDa のバンドはその他のバンドに比べて薄く、先行研究では検出できなかったものと考えられ、SDS-PAGE でも構造が壊れずに維持された TolC の二量体と考えられた。これまでに得られていた 145-155kDa のバンドは、システインの結合を含んで構造が安定化された三量体と 考えられた。AcrB(Q255C)では 200-220kDa で得られたバンドは先行研究の 215kDa と位置が一致するため、AcrB-TolC 複合体と考えられた。AcrB(Q255C)^SITA^S の 250kDa 超のバンドは、AcrB-AcrA 融合タンパク質の AcrA 部位とリンカーを合わせると 40-50kDa に相当し、AcrB(Q255C)^SITA^S と TolC(A150C)FLAG の複合体で想定される分子量と一致した。



JM109(DE3)では野生型 AcrA が発現しているため、AcrB-AcrA 融合タンパク質が野生型 AcrA を借りて複合体を形成したのか、AcrB-AcrA 融合タンパク質そのものが複合体を構成したのか 区別ができない。BL21(DE3)の acrAB 遺伝子欠損株を構築し、この菌株を用いてリンカーの短 い AcrB(Q255C)^{S15}TA^Sおよび FLAG タグの代わりに PA タグを導入した TolC (A150C) PA を発 現させ、AcrB-AcrA 融合タンパク質を用いた AcrAB-TolC 複合体の精製を試みた。

AcrB(Q255C)^{S15}TA^Sおよび TolC (A150C) PA を発現させ、1.5% Lipodisq により膜画分を可溶 化した[77][78]。TALON レジン(Clontech 社)に通し、0mM、10mM、300mM の pH8.0 のイミダ ゾールで溶出した。これをウェスタンブロッティングにより抗 PA タグ抗体で検出した【図 3-15】。

Lipodisq により AcrB(Q255C)^{S15}TA^S-TolC(A150C)PA 複合体は可溶化され、150kDa の TolC 三 量体は 0、もしくは 10mM のイミダゾールにより全て溶出し、非特異的な結合と判断できるが、 一方で AcrB(Q255C)^{S15}TA^S-TolC(A150C)PA 複合体は 300mM イミダゾールにより溶出され、ヒ スタグを持った AcrB(Q255C)^{S15}TA^S と同様の挙動を示した。



この複合体を精製する試みは今のところ成功していない。詳細は伏せるが、 AcrB(Q255C)^{S15}TA^Sを精製する、もしくは TolC(A150C)PA を精製することで、複合体と考えら えるバンドが見えるものの、どちらで精製してもシステインによる複合体を形成していない AcrB(Q255C)^{S15}TA^Sもしくは TolC(A150C)PA が挙動を共にするためである。これは、AcrB-AcrA 融合タンパク質が TolC と *in vitro* でも相互作用を持つことを示唆しているが、AcrAB-TolC 複合 体を精製する試みには障害となっており、この点を克服することが必要である。

第4節 考察

本章では、AcrB:AcrA = 1:1の比率で固定した AcrB-AcrA 融合タンパク質を作製し、その排 出活性を詳細に調べた。その結果、AcrB-AcrA 融合タンパク質が生体膜に発現し、野生型 AcrA の手助けなしで AcrB-AcrA 融合タンパク質がそれ単独で薬剤排出を行えることがわかった。こ れにより、AcrAB-TolC 複合体のなかで、AcrB と AcrA は少なくとも 1:1 で機能することが示 された。発現量-排出機能相関を明らかとすると、最もリンカーの自由度が制限された AcrB-AcrA 融合タンパク質 AcrB^{S15}TA^Sにおいてもより自由度の高い AcrB-AcrA 融合タンパク 質と同等のポンプ機能を有していた。AcrB^{S15}TA^Sにおいては AcrA 部位の N 末が存在できる位 置は、強固な AcrB 三量体の間、インタープロトマーの位置に制限され、少なくともこの位置 が排出機能に重要であることが示唆された。

AcrB-AcrA 融合タンパク質は AcrA 部位を3 つしか持っていないため、緑膿菌 MexA や MacA など他の MFP の結晶構造で観測されている6量体以上の構造を取ることができず、筒状の薬 剤経路を形成することができない[79][80]。薬剤排出を担うことのできる AcrB-AcrA 融合タンパク質では AcrB-TolC が直接相互作用する複合体が必須と考えた。

AcrA モデルによる AcrB-TolC 複合体上へのドッキングシミュレーションでは、BioLuminate により、生体膜に結合できる状態 AcrA 構造の解 6 つが提示され、5 つがインタープロトマー の位置、1 つが待機モノマーのクレフト部位に結合していた。このシミュレーション結果は、 AcrB^{S15}TA^Sではインタープロトマー位置に制限される AcrA がこの位置で機能することを支持 するものと考えた。第2章で、阻害剤である ABI-PP はこのインタープロトマーの位置に近い 場所に結合して効果を発揮していた。複合体の形成と阻害剤の関係性については不明であるが、 阻害剤の結合が複合体形成に影響を及ぼす可能性があると考えられる。

AcrB-TolC が直接相互作用することは、AcrB(Q255C)^{S15}ITA^S および AcrB(Q255C)^{S15}TA^S と TolC(A150C)とが直に複合体を形成することで確かめられた。この複合体を精製することがで き、構造解析ができれば、機能できる最小比率で固定された AcrAB-TolC 三者複合体の構造が 明らかになると考えられる。

ここまでの内容の一部は、AcrB-AcrA Fusion Proteins That Act as Multidrug Efflux Transporters. Journal of Bacteriology, Nov 2;198(2) 332-42. Nov. 2nd 2015, doi: 10.1128/JB.00587-15. に主要著者 としてまとめた。これは主論文として先に提示した。

この章で得られた AcrB:AcrA=1:1 という結果を検証する途中で、2014年の4月に AcrAB-TolC 三者複合体のクライオ電子顕微鏡による構造が報告された【図 3-16】[81]。その構造では、筆 者には意外ではあったが、AcrB:AcrA=1:2 の構造が観測されていた。また、2015年、2016年 に報告されたクライオ電子顕微鏡(Cryo-EM)構造でも同様の結果であった【図 3-17】[82][83]。 これらの複合体構造は本章で明らかとされた結果と合わせ、構造と機能の観点から理解するた めに重要である。考察に必要であるため、これらの複合体構造を簡単に紹介する。



2014 年に *Nature* で 16Å分解能の構造が報告されたが、これには二つの融合タンパク質を用いていた【図 3-16】。一つは AcrA を AcrB 内部に融合させた融合タンパク質であり、AcrB の 1回目のペリプラズム構造の配列の途中(AA. 328-329)に AcrA 全長(25-397)をグリシン-セリンリンカーで融合していた。もう一つは AcrZ-AcrA であり、AcrAB-TolC の活性をわずかに向上させる 48AA.からなる AcrZ が AcrB と相互作用することを利用して AcrA(AA.1-397)の C 末にグリシン-セリンリンカーで AcrZ を融合していた[84]。これら AcrABZ-TolC で得られた構造は、AcrA の 6量体を構成し、TolC の α ヘリックスバンドルの先端で tip-to-tip 相互作用をしていた。また、複合体形成時の TolC は Open 構造であった。AcrA-AcrZ 融合タンパク質が結合した位置は、インタープロトマーの位置であった。この構造では、エチジウムブロマイドおよび trimethylammonium diphenylhexatriene (TMA-DPH)の排出活性は WT AcrB と比べて小さいものの存在し、MIC は 1-2 段の回復であった。

2015 年に新たに AcrAB-TolC 複合体が報告され、その構造は 2016 年に TolC と MacA のキメ ラタンパク質の利用により 8.2Å分解能の高分解能で解析された【図 3-17】[81][82]。この構造 では、AcrB の C 末に AcrA を二分子融合した、AcrB-AcrA-AcrA 融合タンパク質を使用してい た。この AcrBAA-TolC 構造でも、一つはインタープロトマーの位置、もう一つはクレフト位 置に結合していた。TolC も開かれた構造で解かれていた。この構造の tip-to-tip 相互作用は 2014 年に報告されたものとはわずかに異なっており、2014 年の AcrABZ-TolC の構造では、AcrA の 6 量体で作られた筒構造に 7-8Åほど TolC が入り込む形になっていたが、AcrBAA-TolC では TolCの先端と噛み合う形で結合すると報告された【図 3-18】。

ナノディスクに封入した WT AcrB、WT TolC および WT AcrA を用いて AcrAB-TolC を再構築 した結果からは、同様の6量体 AcrA と思われる概形が報告された【図 3-19】[85]。6量体 AcrA が使われる構造は確かに一つのモードとして AcrAB-TolC 複合体に存在するのだろう。





筆者の構築した AcrB-AcrA 融合タンパク質では 1:1 の結合比率で十分な排出活性を示した。 先ほど挙げた構造と比較すると、AcrA のインタープロトマー位置関係は AcrB-AcrA 融合タン パク質と一致しており、少なくともこの位置は複合体が機能を持つために必須の位置と考えら れた。

しかしながら、構成比に関する矛盾が存在する。この矛盾に関しては、複合体形成と機能に 関する近年の報告から、説明が可能であると考える。構造関係の報告に不足している観点とし て、プロトン駆動力が挙げられる。AcrB、MexBではプロトン駆動力が排出能力に使われ、こ れらは共通の D407、D408 および K940 残基の動きが元となっている【図 3-20】[19]。これま でに報告された構造では、排出機能に必要なプロトン駆動力がない状態で再構成された。



複合体と排出機能の関係に関しては、近年の複数のグループから研究成果が報告されている。 2015 年に緑膿菌のホモログである MexAB-OprM の *in vitro* 活性測定系で、排出に伴う MexAB-OprM 複合体の解消が報告された【図 3-21】[86]。この *in vitro* 活性測定系では、MexAB を含んだリポソームと OprM を含んだリポソームの二つからなり、MexAB を含むリポソーム にはビオチン化脂質が封入された。活性測定系において、WT MexB、輸送能力を欠く MexB D407N は、ともに基質排出前にはストレプトアビジンビーズにより精製すると OprM が検出さ れるが、基質排出後には MexB D407N では引き続き OprM が検出されるものの、WT MexB では OprM が検出されなくなることが報告された。



OprM は MexAB のほか、MexXY、においても、MexXY-OprM として使われる。また、TolC は、AcrAB のほか、AcrAD、AcrEF、MdtABC、MdtEF、EmrAB、EmrKY、MacAB、また Type I Secretion system である HlyABC にも使われる【図 1-2】[87]。その他のトランスポーターが TolC を利用することを考慮すると、常時 AcrAB-TolC 複合体を形成しているとは考えづらい。これ は、AcrB の探索/排出モード切り替え仮説とも通じるが、2016 年に AcrB の動態解析において 報告され、仮説を示唆する結果が出ている[88]。AcrB、AcrD はそれぞれ AcrAB-TolC、AcrAD-TolC 複合体を形成し、AcrB が認識する基質と AcrD が認識する基質は共通するもののが多いものの、 一部は異なっている。AcrB と AcrD は認識基質依存的に生体膜中での拡散速度が低下する旨が 報告された。TolC はペリプラズム空間でペプチドグリカンに固定されているため、拡散速度の 低下は複合体の形成を意味する。これらの報告は TolC を利用した複合体は、常時複合体では なく一時的複合体から構成されていることを示唆している。

これらを総合して、AcrAB-TolC 複合体には静的と動的な二つの複合体構造が存在するのではないか、と筆者は考察した【図 3-22】。すなわち、AcrA と AcrB は基質を認識すると複合体

を形成し、AcrA と TolC の親和性によって 6 量体 AcrA、もしくはそれ以下の量比で AcrAB-TolC 複合体を形成する。その後、AcrB が排出モードに切り替わり、AcrAB 間の相互作用の変化に より AcrB と TolC が側鎖同士の相互作用を得られる距離まで近づけられ、AcrB から TolC 内部 に基質が排出される。この後、AcrAB-TolC 複合体は解消され、再び AcrB は探索モードに戻る。 この仮説であれば、すべての研究報告に矛盾せず、AcrAB-TolC の機能と構造を包括的に理解 出来ると考える。この仮説だとしても、どのように安定的な AcrA の 6 量体構造が壊れ、AcrB と TolC が近づく動きとなるのか、また、膜タンパク質である AcrB と TolC が近づくにあたっ ては必然的に生体膜構造が歪むが、プロトン駆動力でそれがまかなえるのか、といった疑問が 浮かぶ。ともあれ、AcrAB-TolC 複合体のより高分解能の構造と変異体実験による機能解明が 必須であり、今後、構造の観点から排出機能の詳細が解明したい。



第4章

総括

異物排出トランスポーターは、細胞という脂質二重膜で区切られた空間を制御するには必須 のものであり、原核生物から真核生物に至るまで生体異物排除の仕組みを備えている。感染症 を引き起こす細菌も例外ではないが、細菌の異物排出トランスポーターは化学治療に用いられ る抗生物質に対し、自然抵抗性および多剤耐性を発揮する。従来は新規の抗生物質が常に開発 されることによって細菌感染症が克服されていた。しかし、近年では、耐性菌の出現が抗生物 質の利益率低下を招き、開発頻度が低下し、細菌感染症の再興リスクが上昇している。長年に わたる抗生物質の使用に伴い、すべての抗生物質が効かない病原細菌の出現も報告されつつあ る。

グラム陰性菌では抗生物質耐性の原因として、RND 型異物排出トランスポーターが近年注 目されている。現在の課題として、大きく二つある。一つは、RND 型異物排出トランスポー ターを克服し、感染症に対抗する手段を創出すること、もう一つは、RND 型異物排出トラン スポーターの排出機構を解明することである。

緑膿菌では、RND 型異物排出トランスポーターは創薬ターゲットであり、阻害することが できれば、抗生物質の適用範囲の拡大が可能となるのみならず、多剤耐性緑膿菌感染症の治療 に用いることができる新規治療法として期待される。しかしながら、異物排出トランスポータ ーに対する臨床応用可能な阻害剤は存在していない。MexB に対し効果的なピリドピリミジン 系阻害剤の阻害範囲を MexY に拡大することを目標に、ピリドピリミジン系阻害剤 ABI-PP の 阻害に関わる要因を明らかにすることを博士課程の第一の目標とした。

大腸菌 AcrB の X 線結晶構造解析によって RND 型異物排出トランスポーターの排出機構、 基質認識機構の一端が解明され、基質認識の広さの仕組みが解明された。しかし、アダプター タンパク質、外膜ポリンとの複合体として、機能する RND 型異物排出トランスポーターの排 出過程を解明するためには、機能が保証された複合体構造を知る必要がある。

本研究では、RND 型異物排出トランスポーターの阻害要素の解明と、機能する複合体構造の解明の二つを大目標とした。本研究で得られた知見を、以下に要約する。

1. ABI-PP は疎水性ピットに結合することで阻害効果を発揮する

ABI-PP は AcrB、MexB、を選択的に阻害するものの、MexY を阻害することができない。 AcrB と ABI-PP、MexB と ABI-PP の複合体結晶構造から、ABI-PP の結合する疎水性ピットに あると予測され、AcrB、MexB では F178 である残基が MexY では W177 であり、ABI-PP の選 択性は、この嵩高いトリプトファン側鎖と ABI-PP が立体障害を起こすためではないかと予想 された。これを確かめるために AcrB F178W、MexB F178W、MexY W177F が作製すると、AcrB F178W は ABI-PP により阻害されず、MexY は ABI-PP に阻害されるというの選択性の逆転が 見られた。ABI-PP が疎水性ピットに結合し阻害をすることは、おおむね正しいと考えられた が、予想に反して MexB F178W は WT MexB と同様に阻害され、ABI-PP の阻害効果を決める 要因が他に存在することが分かっていた。 ABI-PP が結合する疎水性ピットの阻害効果を決める要因を解明するため、AcrB F178W、 MexB F178W、および MexB F178W と ABI-PP の複合体の X 線結晶構造解析を行い、それぞれ 3.6Å、3.3Å、3.0Å 分解能で構造解析に成功した。各構造は WT のものと結晶型、結晶格子サイ ズは同一であり、MexB F178W と ABI-PP の複合体構造では、WT と同様に MexB F178W の疎 水性ピットに ABI-PP が結合していた。この結合は WT MexB の F178 側鎖と同様に、W178 側 鎖が回転して対応しており、ABI-PP とπ-πスタッキングしていた。その他の箇所に ABI-PP の電子密度は観測されず、ABI-PP の阻害効果が疎水性ピットに由来することが確かめられた。 一方、AcrB F178W では W178 側鎖が疎水性ピットに飛び出しており、W178 側鎖を回転させる と周辺の V139 側鎖や主鎖に衝突した。

ABI-PP 周りの構造から、疎水性ピットが MexB では余裕があるのではないかという仮説が 生じた。これを証明するために AcrB F178W/V139A、および MexY I138A を作製し、ABI-PP の 選択性を調べた。AcrB F178W/V139A、MexY I138A は共に WT と同程度まで ABI-PP 感受性で あり、MexB と比べると、AcrB、MexY の疎水性ピットの体積が若干小さいことが示された。

この研究成果により、疎水性ピットへの阻害剤の結合により阻害効果を生じることが確かめられた。また、ABI-PP にその他の阻害要因がないことから、この疎水性ピットが阻害剤の創 薬ターゲットとなることが示された。

2. AcrB:Acr A= 1:1 構成比の AcrB-AcrA 融合タンパク質は排出による多剤耐性能を持つ

機能する AcrAB-TolC 三者複合体の構造を解明するにあたり、AcrB と AcrA の間の親和性が 低いことが問題で、AcrA と AcrB 二者複合体の構成比が決定されていなかった。排出機能を持 っ AcrB-AcrA 融合タンパク質ならば、機能に際しての AcrAB-TolC 三者複合体の構成比および 構造を明らかにできると考えた。

AcrB:AcrA = 1:1 で固定した構成比を持つ AcrB-AcrA 融合タンパク質は、生体膜への発現に より最小発育阻止濃度が上昇し、多剤耐性能を持つことが確かめられた。また、これは内因性 の AcrA の有無にかかわらなかった。AcrB の基質であるエチジウムブロマイドにより排出能力 を測定すると、AcrB-AcrA 融合タンパク質はエチジウムブロマイドを排出しており、排出によ り多剤耐性能を持つことがわかった。

エチジウムブロマイド排出活性測定系を使用し、AcrB-AcrA 機能を作製し、発現量-排出機能の相関関係を調べた。AcrB-AcrA 融合タンパク質の排出活性は、WT AcrB と比べると 20%程度に低下していることがわかった。しかしながら、内因性 AcrA の有無にかかわらず、AcrB-AcrA 融合タンパク質の活性は大きく変化せず、AcrB-AcrA 融合タンパク質がそれ単独で排出機能を持つことがわかった。

3. AcrA は AcrB のインタープロトマー位置で機能する

AcrB-AcrA融合タンパク質は、融合に用いたリンカーの長さに関係なくそれ単独で機能した。 リンカーの最も短い融合タンパク質では、AcrA の位置が制限されており、AcrB-AcrA 融合タ ンパク質 AcrB^{S15}TA^Sからは機能に必要な AcrA の位置が予測できる。AcrA は、強固な AcrB 三 量体の間、インタープロトマーの位置に存在すると考えられた。AcrB-TolC 複合体へのシミュ レーションでは、AcrA が取りうる形の解 6 個のうち、この予測されたインタープロトマーの 位置に AcrA が相互作用する解が 5 個を占めており、この位置で AcrA が機能することを示唆 した。

研究遂行中に解かれた AcrAB-TolC 三者複合体の全体構造からは、AcrB 三量体に AcrA が 6 つ作用した構成比 AcrB:AcrA=1:2 形が見られたが、AcrA の位置のうち 3 つはインタープロトマーの位置であり、実際にこの位置で相互作用することがわかっている。

AcrAB-TolC 三者複合体の構造と、筆者の得た 1:1 で機能する融合タンパク質は互いに矛盾しているが、これまでに得られた三者複合体はプロトン駆動力のない場合に複合体であることを考慮し、仮説として静的な構造と動的な構造の二つが存在すると考察した。この仮説に基づけば、AcrB-AcrA 融合タンパク質は排出時の構造を反映できるものと予測される。とはいえ、そのような構造の情報が不足しているのは確かであり、構造解析で得られる高分解能スナップショットと排出機能との関連を、変異体を用いた解析が組み合わせて詳細を解明したいと考えている。

第5章

引用文献

- 1. 山口明人編 (2010). 化学療法学 -医療のあるべき姿を見据えて- [抗生物質学最前線]
- Zechini B, Versace I., Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. (2009) *Recent* Pat Antiinfect Drug Discov. 2009 Jan;4(1):37-50.
- Nishino K & Yamaguchi A (2008) Physiological functions of drug efflux systems in Gram-negative bacteria: Their roles in bacterial drug resistance and virulence. *Jpn J Chemother* 56: 443-452.
- 西野邦彦,山口明人 (2008) グラム陰性菌における薬剤排出システムの役割.日化療会
 誌 2008; 56(4): 443-52.
- Hassan KA, Elbourne LD, Li L, Gamage HK, Liu Q, Jackson SM, Sharples D, Kolstø AB, Henderson PJ, Paulsen IT. (2015) *Front Microbiol.* 2015 Apr 22;6:333. doi: 10.3389/fmicb.2015.00333.
- 6. Nishino K & Yamaguchi A (2001) Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 5803-5812.
- Nikaido H, Zgurskaya HI. (2001) AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol. 2001 Apr;3(2):215-8.
- Schweizer HP. (2003) Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas* aeruginosa and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res.* 2003 Mar 31;2(1):48-62.
- Xavier DE, Picão RC, Girardello R, Fehlberg LC, Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol.* 2010 Aug 12;10:217. doi: 10.1186/1471-2180-10-217.
- Poole K. (2014) Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: multidrug efflux and more. *Can J Microbiol.* 2014 Dec;60(12):783-91. doi: 10.1139/cjm-2014-0666.
- Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, Perederina A, Vassylyev DG, Kohno T, Maturana AD, Ito K, Nureki O. (2011) Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*. 2011 May 11;474(7350):235-8. doi: 10.1038/nature09980.
- Minagawa S, Inami H, Kato T, Sawada S, Yasuki T, Miyairi S, Horikawa M, Okuda J, Gotoh N. (2012) RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol.* 2012 May 10;12:70.
- Su CC, Long F, Zimmermann MT, Rajashankar KR, Jernigan RL, Yu EW. (2011) Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*. *Nature*. 2011 Feb 24;470(7335):558-62.

- Kearns DB, Chu F, Rudner R, Losick R. (2004) Genes governing swarming in Bacillus subtilis and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Mol Microbiol*. 2004 Apr;52(2):357-69.
- Bailo R, Bhatt A, Aínsa JA. (2015) Lipid transport in Mycobacterium tuberculosis and its implications in virulence and drug development. *Biochem Pharmacol.* 2015 Aug 1;96(3):159-67. doi: 10.1016/j.bcp.2015.05.001.
- Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G. (2001) A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell*. 2001 Jun;7(6):1279-91.
- 17. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF 3rd, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA. (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science.* 1997 Jul 11;277(5323):228-31.
- Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, & Yamaguchi A (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419: 587–593.
- Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, & Yamaguchi A (2006) Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443: 173–179.
- Gong X, Qian H, Zhou X, Wu J, Wan T, Cao P, Huang W, Zhao X, Wang X, Wang P, Shi Y, Gao GF, Zhou Q, Yan N. (2016) Structural Insights into the Niemann-Pick C1 (NPC1)-Mediated Cholesterol Transfer and Ebola Infection. *Cell.* 2016 Jun 2;165(6):1467-78. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.022.
- Chih-Chia Su, Ming Li, Ruoyu Gu, Yumiko Takatsuka, Gerry McDermott, Hiroshi Nikaido, and Edward W. Yu (2006) Conformation of the AcrB Multidrug Efflux Pump in Mutants of the Putative Proton Relay Pathway *J Bacteriol*. 2006 Oct; 188(20): 7290–7296.
- Koronakis V., Sharff A, Koronakis E, Luisi B, & Hughes C (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405: 914–919.
- 23. Mikolosko J, Bobyk K., Zgurskaya HI &Ghosh P (2006) Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure* 14: 577–587.
- Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. (2011) Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature* 27;480(7378):565-9.

- Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. (2002) Alterations of susceptibility of *Pseudomonas* aeruginosa by overproduction of multidrug efflux systems, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY/OprM to carbapenems: substrate specificities of the efflux systems. *J Infect Chemother*. 2002 Dec;8(4):371-3.
- 26. Yoshida K, Nakayama K, Ohtsuka M, Kuru N, Yokomizo Y, Sakamoto A, Takemura M, Hoshino K, Kanda H, Nitanai H, Namba K, Yoshida K, Imamura Y, Zhang JZ, Lee VJ, Watkins WJ. (2007) MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 7: highly soluble and in vivo active quaternary ammonium analogue D13-9001, a potential preclinical candidate. *Bioorg Med Chem.* 15;15(22):7087-97.
- 27. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ. (2001) Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jan;45(1):105-16.
- 28. Sjuts H, Vargiu AV, Kwasny SM, Nguyen ST, Kim HS, Ding X, Ornik AR, Ruggerone P, Bowlin TL, Nikaido H, Pos KM, Opperman TJ. (2016) Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 29;113(13):3509-14. doi: 10.1073/pnas.1602472113.
- 29. Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D387-92.
- 30. Nakamura H. (1968) Genetic determination of resistance to acriflavine, phenethyl alcohol, and sodium dodecyl sulfate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1968 Oct;96(4):987-96.
- Nakamura H, Hachiya N, Tojo T. (1978) Second acriflavine sensitivity mutation, acrB, in Escherichia coli K-12. J Bacteriol. 1978 Jun;134(3):1184-7.
- 32. Fralick JA (1996) Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1996 Oct;178(19):5803-5.
- 33. Yamaguchi A, Nakashima R, Sakurai K. (2015) Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front Microbiol.* 2015 Apr 20;6:327. doi: 10.3389/fmicb.2015.00327.
- 34. Kawabe T, Fujihira E, Yamaguchi A. (2000) Molecular construction of a multidrug exporter system, AcrAB: molecular interaction between AcrA and AcrB, and cleavage of the N-terminal signal sequence of AcrA. J Biochem. 2000 Aug;128(2):195-200.
- Pei XY, Hinchliffe P, Symmons MF, Koronakis E, Benz R, Hughes C, Koronakis V. (2011) Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 1;108(5):2112-7. doi: 10.1073/pnas.1012588108.
- 36. Tamura N, Murakami S, Oyama Y, Ishiguro M, Yamaguchi A. (2005) Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed

disulfide cross-linking. Biochemistry. 2005 Aug 23;44(33):11115-21.

- 37. Symmons MF, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. (2009) The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 28;106(17):7173-8.
- 38. Lobedanz S, Bokma E, Symmons MF, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. (2007) A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 13;104(11):4612-7.
- 39. Tikhonova EB, Yamada Y, Zgurskaya HI. (2011) Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Chem Biol.* 2011 Apr 22;18(4):454-63.
- 40. Touzé T, Eswaran J, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. (2004) Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol Microbiol.* 2004 Jul;53(2):697-706.
- Veesler D, Blangy S, Cambillau C, Sciara G. (2008) There is a baby in the bath water: AcrB contamination is a major problem in membrane-protein crystallization. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2008 Oct 1;64(Pt 10):880-5. doi: 10.1107/S1744309108028248.
- 42. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 1985;33(1):103-19.
- 43. Yamamoto T, Tanaka M, Nohara C, Fukunaga Y, Yamagishi S. (1981) Transposition of the oxacillin-hydrolyzing penicillinase gene. *J Bacteriol*. 1981 Feb;145(2):808-13.
- 44. Kobayashi N, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi A. (2003) Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter MacB in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 2003 Jul 10;546(2-3):241-6.
- 45. Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 1997 Sep 5;277(5331):1453-62.
- Nishino K, Senda Y, Hayashi-Nishino M, Yamaguchi A. (2009) Role of the AraC-XylS family regulator YdeO in multi-drug resistance of *Escherichia coli*. J Antibiot (Tokyo). 2009 May;62(5):251-7. doi: 10.1038/ja.2009.23.
- 47. West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. 1994 Oct 11;148(1):81-6.
- 48. Eda S, Maseda H, Nakae T. (2003) An elegant means of self-protection in gram-negative bacteria by recognizing and extruding xenobiotics from the periplasmic space. *J Biol Chem.* 2003 Jan 24;278(4):2085-8.

- 49. Vieira J, Messing J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1987;153:3-11.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol*. 1995 Jul;177(14):4121-30.
- 51. Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, Blöcker H, Scholz P, Bagdasarian M, Lanka E. (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene.* 1986;48(1):119-31.
- 52. Mokhonov VV, Mokhonova EI, Akama H, Nakae T. (2004) Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa. Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep 17;322(2):483-9.
- 53. Otwinowski Z, Minor W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 1997;276:307-326. doi: 10.1016/S0076-6879(97)76066-X.
- 54. Karplus PA, Diederichs K. (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science*.
 2012 May 25;336(6084):1030-3.
- 55. Vagin A, Teplyakov A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Jan;66(Pt 1):22-5. doi: 10.1107/S0907444909042589.
- 56. Collaborative Computational Project, Number 4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1994 Sep 1;50(Pt 5):760-3.
- 57. Emsley P, Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Dec;60(Pt 12 Pt 1):2126-32.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*: 1997 May 1;53(Pt 3):240-55.
- Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2012 Apr;68(Pt 4):352-67.
- Zwart PH, Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Hung LW, Ioerger TR, McCoy AJ, McKee E, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK, Storoni LC, Terwilliger TC, Adams PD. (2008) Automated structure solution with the PHENIX suite. *Methods Mol Biol.* 2008;426:419-35.
- 61. Datsenko KA, Wanner BL. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6640-5.
- Kwakman PH, Zaat SA. (2012) Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*. 2012 Jan;64(1):48-55. doi: 10.1002/iub.578.

- Roberts AE, Maddocks SE, Cooper RA. (2015) Manuka honey reduces the motility of *Pseudomonas aeruginosa* by suppression of flagella-associated genes. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Mar;70(3):716-25. doi: 10.1093/jac/dku448.
- Dhariwal AK, Tullu MS. (2013) Colistin: re-emergence of the 'forgotten' antimicrobial agent. J Postgrad Med. 2013 Jul-Sep;59(3):208-15. doi: 10.4103/0022-3859.118040.
- Zuo Z, Weng J, Wang W. (2016) Insights into the Inhibitory Mechanism of D13-9001 to the Multidrug Transporter AcrB through Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B*. 2016 Mar 10;120(9):2145-54. doi: 10.1021/acs.jpcb.5b11942.
- Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Apr;28(2):337-418. doi: 10.1128/CMR.00117-14.
- Verchère A, Dezi M, Adrien V, Broutin I, Picard M. (2015) In vitro transport activity of the fully assembled MexAB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun*. 2015 Apr 22;6:6890. doi: 10.1038/ncomms7890.
- Horiyama T, Nishino K. (2014) AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in enterobactin export in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2014 Sep 26;9(9):e108642. doi: 10.1371/journal.pone.0108642.
- 69. Studier FW, Moffatt BA. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986 May 5;189(1):113-30.
- Takatsuka Y, Nikaido H. (2009) Covalently linked trimer of the AcrB multidrug efflux pump provides support for the functional rotating mechanism. *J Bacteriol.* 2009 Mar;191(6):1729-37. doi: 10.1128/JB.01441-08.
- 71. Zhang Y, Muyrers JP, Testa G, Stewart AF. (2000) DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2000 Dec;18(12):1314-7.
- 72. Zhu K, Day T, Warshaviak D, Murrett C, Friesner R, Pearlman D. (2014) Antibody structure determination using a combination of homology modeling, energy-based refinement, and loop prediction. *Proteins*. 2014 Aug;82(8):1646-55.
- Le Pecq JB, Paoletti C. (1966) A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem.* 1966 Oct;17(1):100-7.
- 74. Bohnert JA, Schuster S, Kern WV, Karcz T, Olejarz A, Kaczor A, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K. (2016) Novel Piperazine Arylideneimidazolones Inhibit the AcrAB-TolC Pump in *Escherichia coli* and Simultaneously Act as Fluorescent Membrane Probes in a Combined Real-Time Influx and Efflux Assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Mar 25;60(4):1974-83. doi: 10.1128/AAC.01995-15.
- 75. Bohnert JA, Schuster S, Kern WV. (2013) Pimozide Inhibits the AcrAB-TolC Efflux Pump in *Escherichia coli. Open Microbiol J.* 2013;7:83-6. doi: 10.2174/1874285801307010083.

- 76. Smith HE, Blair JM. (2014) Redundancy in the periplasmic adaptor proteins AcrA and AcrE provides resilience and an ability to export substrates of multidrug efflux. J Antimicrob Chemother. 2014 Apr;69(4):982-7.
- 77. Postis V, Rawson S, Mitchell JK, Lee SC, Parslow RA, Dafforn TR, Baldwin SA, Muench SP. (2015) The use of SMALPs as a novel membrane protein scaffold for structure study by negative stain electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1848(2):496-501. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.10.018.
- 78. Lee SC, Knowles TJ, Postis VL, Jamshad M, Parslow RA, Lin YP, Goldman A, Sridhar P, Overduin M, Muench SP, Dafforn TR. (2016) A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment. *Nat Protoc.* 2016 Jul;11(7):1149-62. doi: 10.1038/nprot.2016.070.
- Akama H, Matsuura T, Kashiwagi S, Yoneyama H, Narita S, Tsukihara T, Nakagawa A, Nakae T. (2004) Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 2004 Jun 18;279(25):25939-42.
- Yum S, Xu Y, Piao S, Sim SH, Kim HM, Jo WS, Kim KJ, Kweon HS, Jeong MH, Jeon H, Lee K, Ha NC. (2009) Crystal structure of the periplasmic component of a tripartite macrolide-specific efflux pump. *J Mol Biol.* 2009 Apr 17;387(5):1286-97. doi: 10.1016/j.jmb.2009.02.048.
- Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, Venter H, Chiu W, Luisi BF.
 (2014) Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*. 2014 May 22;509(7501):512-5.
- Kim JS, Jeong H, Song S, Kim HY, Lee K, Hyun J, Ha NC. (2015) Structure of the tripartite multidrug efflux pump AcrAB-TolC suggests an alternative assembly mode. *Mol Cells*. 2015;38(2):180-6.
- 83. Jeong H, Kim JS, Song S, Shigematsu H, Yokoyama T, Hyun J, Ha NC. (2016) Pseudoatomic Structure of the Tripartite Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC Reveals the Intermeshing Cogwheel-like Interaction between AcrA and TolC. *Structure*. 2016 Feb 2;24(2):272-6.
- 84. Hobbs EC, Yin X, Paul BJ, Astarita JL, Storz G. (2012) Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 9;109(41):16696-701. doi: 10.1073/pnas.1210093109.
- Daury L, Orange F, Taveau JC, Verchère A, Monlezun L, Gounou C, Marreddy RK, Picard M, Broutin I, Pos KM, Lambert O. (2016) Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat Commun.* 2016 Feb 12;7:10731.
- 86. Ntsogo Enguéné VY, Verchère A, Phan G, Broutin I, Picard M. (2015) Catch me if you can: a biotinylated proteoliposome affinity assay for the investigation of assembly of the MexA-MexB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2015 Jun

2;6:541.

- 87. Lee M, Jun SY, Yoon BY, Song S, Lee K, Ha NC. (2012) Membrane fusion proteins of type I secretion system and tripartite efflux pumps share a binding motif for TolC in gram-negative bacteria. *PLoS One.* 2012;7(7):e40460. doi: 10.1371/journal.pone.0040460.
- Yamamoto K, Tamai R, Yamazaki M, Inaba T, Sowa Y, Kawagishi I. (2016) Substrate-dependent dynamics of the multidrug efflux transporter AcrB of *Escherichia coli*. Sci Rep. 2016 Feb 26;6:21909.

謝辞

本研究は、大阪大学産業科学研究所・第3研究部門・生体情報制御学研究分野、同研究所・ 特別プロジェクト研究部門・生体防御学研究分野(山口研)、同研究所・特別プロジェクト研 究部門・感染制御学研究分野、および同研究所・第3研究部門・生体分子制御学(西野研)に おいて行われたものです。本研究を行う機会を与えてくださり、暖かい御指導、激励をいただ きました、山口明人 特任教授、西野邦彦 教授、西毅 准教授、中島良介 特任准教授、に厚く 御礼申し上げます。中島良介 特任准教授、櫻井啓介 特任助教には長い間基礎から X 線結晶構 造解析を教えていただきました。松本佳巳特任教授(現 株式会社フコク)には緑膿菌の多剤 耐性に関して御指導、御助言を、西野美都子特任助教には電子顕微鏡の使用に関する知識を基 礎より、山崎聖司助教には修士、博士課程在籍中から実験の進め方および生化学実験の知識・ 方法をご指導いただきました。この場では語り尽くせず、簡易ではありますが、深く心より感 謝申し上げます。

貴重な大腸菌株を分譲していただいた二階堂博 教授(現 University of California, Berkeley) に御礼申し上げます。

福島愛子技術員には生化学実験を含め研究室生活でのサポートを、北川公恵技術員、韓珍珉 技術員には丁寧な実験作業の遂行と熟練した技術、そして研究室生活でのサポートをいただき、 研究の遂行と論文作製にあたって非常に大きなお力添えをいただいたと感じております。また、 松岡澄恵事務補佐員には経費の処理を含め、事務的な面で大変な大きな御力添えを賜りました。 技術員、事務補佐員の方々には心から深く感謝申し上げます。

また、ともに研究に励み、研究以外の面においても色々と支えていただきました、五十嵐綾技術員、大野愛子修士、山﨑優修士、松山ゆみ子修士、眞下雅貴修士、岡祐馬修士、Mr. Martijn Zwama (MSc),河嶋啓太学士、武内優奈学士、藤岡拓真学士、重山紗紀様、中尾香様、にこの 場を借りて心より厚く感謝を申し上げます。

最後に、いつも暖かく見守り支えていただいた友人、またこのような大変恵まれた環境で学 ぶ機会を与え、長きに渡り協力をいただいた家族に心より感謝を申し上げます。

今後のみなさまの人生が充実されますことを心よりお祈り申し上げます。

本学位論文の審査は、大阪大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査

大阪大学教授(薬学研究科・産業科学研究所)	薬学博士	西野邦彦教授
副查		
大阪大学教授(薬学研究科)	薬学博士	高木達也教授
大阪大学教授(薬学研究科)	薬学博士 ナ	、久保忠恭教授