OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structural studies of macromolecular assemblies using cryo-electron microscopy: Hierarchical assembly of the virus and the drug efflux mechanism of the multidrug efflux pump
Author(s)	堤, 研太
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72674
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　堤　研太　）	
論文題名	Structural studies of macromolecular assemblies using cryo-electron microscopy: Hierarchical assembly of the virus and the drug efflux mechanism of the multidrug efflux pump (クライオ電子顕微鏡による生体超分子の構造研究： 階層的なウイルスの形成機構と多剤排出ポンプの薬剤排出機構)

論文内容の要旨

クライオ電子顕微鏡は、1970年代に開発された電子顕微鏡の観察方法であり、試料を急速凍結することによって溶液状態に近い生体超分子の構造を観察できる。クライオ電子顕微鏡を利用した単粒子解析により、結晶化の必要なしに生体超分子の構造解析が可能であるが、電子線による試料損傷や照射時の試料微動が避けられず、巨大かつ高い対称性を持つウイルスやフィラメント以外ではX線結晶構造解析やNMRに匹敵する分解能は得られなかった。しかし、近年の検出器などの装置の進化や計算技術の向上により、原子分解能に近い分解能での生体超分子の構造解析が可能となってきた。この手法は、たとえ低～中分解能の分解能しか得られなくとも、既知の構造をフィッティングしタンパク質の配向を決定することで生体超分子の三次元構造を明らかにできる。さらには同じ試料中に存在する異なった構造をもつ生体超分子についても、計算機上でそれぞれ分割して構造解析できるなど、X線結晶構造解析やNMRにはない様々な利点を有している。本論文はこれらの利点を生かし、クライオ電子顕微鏡・単粒子解析法を用い、ウイルスの外殻形成時の階層的な自己組織化機構、また複数の特徴的な複数のコンフォメーションをとるRND型多剤排出ポンプの構造についてそれぞれ新たな知見を得た為、それらについて論ずる。

一つ目はイネ萎縮ウイルス (Rice dwarf Virus: RDV) の階層的な自己組織化機構の解明である。レオウイルス科ファイトレオウイルス属のウイルスであるRDVは、昆虫に媒介され、イネ科植物に感染する。RDVの感染はイネ科作物の収量を著しく減少させるため、特にアジア諸国の農業に大きな損害を与える。RDVは内殻と外殻の二重殻を形成し、内殻は60個のキャプシドタンパク質P3二量体によって、外殻は主に260個のキャプシドタンパク質P8三量体によって形成されていることが、先行研究により明らかとなっている。P8は内殻コアキャプシドに対して5種類の異なった相互作用様式で結合している。それらのうちRDVの正二十面体対称の3回軸上に位置するT-trimerが最も強く内殻と結合することが結晶構造解析により示唆されている。一方で、P8三量体は静電的な相互作用により互いに結合し、単独で二次元結晶あるいはチューブ状構造体を形成する能力を有する。以上により、内殻キャプシドで形成されたコア粒子に、まずT-trimerが結合し、それ以外のP8三量体がP8同士および内殻との相互作用によって順次会合していく、というRDVの外殻形成 (自己組織化) モデルが提唱されている。しかしながら、このモデルは原子構造に基づくタンパク質間相互作用解析とその他の間接的な実験結果に基づいており、外殻の構築過程についての実験的な検証は行われていなかった。

そこで本研究では、P8とP3の相互作用が外殻形成に与える影響を調べ、ウイルスの外殻形成に対して新たな知見を得ることを目標とした。そのために、P8のC末端にGFPを付与した融合タンパク質を内殻コアに結合させ、その粒子について位相板を用いた電子顕微鏡により観察した。位相板の効果によって、高コントラストの画像を取得することができ、平均化を用いずにP8の結合状態を解析することができた(図1 A, B, C)。この結果は同時に行った単粒子解析の結果とも一致しており(図1 D)、P8三量体は予想通り内殻粒子の3回軸の外側表面にのみ結合することが分かり、それ以外の位置でのP8三量体の粒子への会合にはP8三量体同士の結合が必須であることも明らかになった。

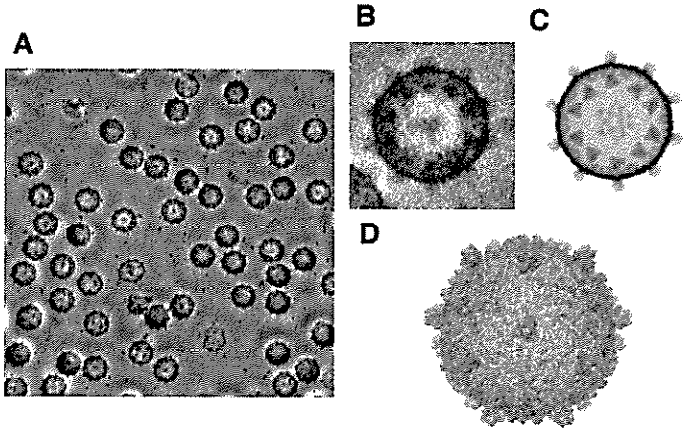

図1 位相板を用いたクライオ電子顕微鏡によるRDVの外殻形成の解析 (A, B) 生画像 (A) とその切り出し (B)。 (C) RDVの結晶構造から予想されたモデルの投影図 (D) 単粒子解析による三次元再構成像

二つ目は緑膿菌由来多剤排出ポンプ複合体の構造解析である。緑膿菌に代表されるグラム陰性菌にはプロトン濃度勾配を用いて様々な薬剤を排出するResistance Nodulation cell Division (RND) 型多剤排出ポンプが過剰発現している。RND型多剤排出ポンプは、内膜に局在し薬剤排出の根幹を担うRND, ペリプラズムに局在するアダプタータンパク質Membrane Fusion Protein (MFP), 外膜から細胞外への薬剤排出経路を確保するOuter Membrane Factor (OMF)から構成されている。緑膿菌においては複数のRND型多剤排出ポンプが発現しているが、その中でMexAB–OprMは唯一恒常的に発現するメインのポンプである。MexAB-OprMを構成するMexA (MFP), MexB (RND), OprM (OMF)のそれぞれの結晶構造は既に明らかとなっているが、OprMは結晶構造では薬剤を排出する経路が閉じられている、MexAは結晶構造ではアーティファクトな13量体を形成するなど、個々の構造のみでは多剤排出ポンプの排出機構を解明することは困難である。また、大腸菌のホモログであるAcrAB–TolCの構造は近原子分解能で明らかになっているが、この複合体解析にはペプチドリンカーやクロスリンクなどを遺伝子操作で導入したタンパク質を用いており、タンパク質同士の詳細な相互作用の議論は困難である。さらに、MexAB–OprMについてもナノディスクを用いた*in vitro*再構成とネガティブ染色法による構造解析が行われているが、分解能が20 Å前後と十分でなく、緑膿菌由来のRND型多剤排出ポンプの (近) 原子分解能の構造は不明であった。

そこで本研究では、野生型のMexAB–OprMの構造を決定し、その構造から各タンパク質間の相互作用を推定することにより、MexAB–OprMの複合体形成機構と薬剤排出機構について知見を得ることを目標とした。MexAB–OprMを構成する三種類のタンパク質を個別に発現、精製し、*in vitro*再構成を行うことでMexAB–OprMを調製した。安定な凍結を行うため、精製に用いた界面活性剤を親水性ポリマーに置換し、クライオ電子顕微鏡・単粒子会解析を行った。単粒子解析の結果、MexAB–OprMはOprMの結合状態のみが異なる2状態を取れることが明らかとなった(図2)。両者はOprMのみを60度回転させることによって関係づけることができ、この２つの結合様式はほぼ同一であることが分かった。今回得た近原子分解能のマップ(0° state: 3.64 Å分解能、60° state: 3.76 Å分解能)と原子モデルから、各タンパク質間の詳細な相互作用を推定することができたため、*in vivo*, *in vitro*の両方での機能解析実験の結果と照らし合わせることで、推定の確認を行うことができた。さらに、OprMの結晶構造との比較から、OprMが排出経路を開きながら複合体を形成するモデルを提唱した。MexBについて、これまで報告されている結晶構造と異なり、どのプロトマーも薬剤を取り込めない状態であることが明らかになった。これが凍結条件に薬剤が存在しないことに起因すると考え、MexAB–OprMの基質となる抗生物質novobiocinを添加した試料を調製し、同様の単粒子解析を行った。この結果、薬剤存在下においてMexBは結晶構造とほぼ同一の構造を取ることを見出した。以上の結果から、MexAB–OprMの複合体形成と薬剤排出についてのモデルを提唱するができ、緑膿菌やその他のグラム陰性菌のRND型多剤排出ポンプ複合体の機能解明に繋がることが期待される。

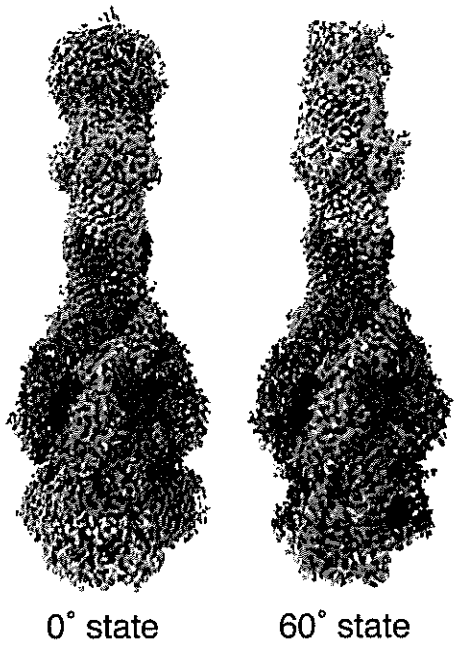

図2 クライオ電子顕微鏡・単粒子解析法により明らかとなった2状態のアポ型MexAB–OprMの三次元マップ

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　　堤　研太　　）	
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教授	中川敦史
	副査　教授	栗栖源嗣
	副査　教授	今田勝巳
	副査　准教授	山下栄樹

論文審査の結果の要旨

近年急速に進歩してきたクライオ電子顕微鏡による生体超分子の単粒子解析は、結晶を必要としない、同じ試料中に存在する異なった構造をもつ生体高分子についても計算機上でそれぞれ分割して構造解析できるなど、X線結晶構造解析法やNMR法にはない様々な利点を有している。本論文はこれらの利点を生かし、クライオ電子顕微鏡・単粒子解析法を用いて、ウイルスの外殻形成時のキャプシドタンパク質の構造構築機構の解明と、複数の特徴的なコンフォメーションをとるRND型多剤排出ポンプの構造解析を行った。

一つ目はイネ萎縮ウイルス（Rice dwarf Virus: RDV）の階層的な自己組織化機構の解明である。イネ萎縮ウイルスは、二重殻構造を持つレオウイルス科ファイトレオウイルス属のウイルスである。本研究では、外殻構成蛋白質P8と内殻構成蛋白質P3の相互作用が外殻形成に与える影響を調べ、ウイルスの外殻形成に対して新たな知見を得ることを目指した。そのために、外殻構成蛋白質であるP8のC末端にGFPを付与した融合タンパク質を内殻コアに結合させ、その粒子について位相板を用いた電子顕微鏡により観察することで、高コントラストの画像を取得し、平均化を用いずにP8の結合状態を明らかにした。この結果は、同時に行った単粒子解析の結果とも一致しており、P8-3量体は内殻粒子の3回軸の外側表面にのみ結合し、それ以外の位置でのP8-3量体の粒子への会合にはP8-3量体同士の結合が必須であることを明らかにした。この結果から、イネ萎縮ウイルスが二重殻構造を形成する際に、階層的な構造構築を行うことを明らかにした。

二つ目は緑膿菌由来RND型多剤排出ポンプ複合体MexAB-OprMの構造解析である。本研究では、MexAB-OprMを構成する三種類のタンパク質（MexA, MexB, OprM）を個別に発現・精製し、*in vitro*再構成を行うことでMexAB-OprMを調製した。安定な凍結を行うため、精製に用いた界面活性剤を親水性ポリマーに置換し、クライオ電子顕微鏡・単粒子解析を行った。単粒子解析の結果、MexAB-OprMはOprMの結合状態のみが異なる2状態を取れることが明らかとなった。本研究で得られた近原子分解能のマップと原子モデルから、各タンパク質間の詳細な相互作用を推定することができ、*in vivo*, *in vitro*の両方での機能解析実験の結果と照らし合わせることで、推定の確認を行うことができた。さらに、OprMの結晶構造との比較から、OprMが排出経路を開きながら複合体を形成するモデルを提唱した。また、MexBについては、これまで報告されている結晶構造と異なり、どのプロトマーも薬剤を取り込めない状態であることが明らかになった。これが凍結条件に薬剤が存在しないことに起因すると考え、MexAB-OprMの基質となる抗生物質novobiocinを添加した試料を調製し、同様の単粒子解析を行った結果、薬剤存在下においてMexBは結晶構造とほぼ同一の構造を取ることを見出した。以上の結果から、MexAB-OprMの複合体形成と薬剤排出についてのモデルを提唱し、緑膿菌やその他のグラム陰性菌のRND型多剤排出ポンプ複合体の機能解明に繋がる成果を得ることができた。

これらの成果は、クライオ電子顕微鏡の応用の可能性を広げるとともに、イネ萎縮ウイルスの構造構築機構や緑膿菌の多剤排出ポンプ複合体の薬剤排出機構の理解に重要な知見を与える成果である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。