

薬剤耐性化問題の克服を目指した多剤排出蛋白質による薬剤認識機構の解明

研究者 村上 聡
大阪大学 産業科学研究所

概要

多剤排出蛋白質は、病原性細菌の細胞やがん細胞から、抗生物質や抗がん剤などの多種多様な化学療法剤を排出するはたらきを持つ膜蛋白質です。細胞に入って有効性を発揮する薬剤を能動的に細胞外に排出し、それを無効にしてしまいます。これは院内感染や抗がん剤耐性化などの薬剤耐性化問題の主因であり、临床上大きな問題になっています。これら薬剤耐性化問題の克服を目指し、多剤排出蛋白質による多剤認識と、その排出の仕組みを詳細な立体構造に基づいて本質的に理解することを目的とし研究を行ってきました。

1. 大腸菌多剤排出蛋白質 AcrB の立体構造の解明

多剤排出蛋白質をはじめ、細胞膜を介して物質輸送を行うタンパク質の立体構造解析は、極めて困難である。とりわけ、イオンでなく分子を運ぶ膜輸送体(トランスポーター)の立体構造解析は、私たちの研究以前には全く例が無かった。1997年の大腸菌ゲノム解析完了をうけて、大腸菌には約40種類もの薬剤排出蛋白質が存在することが予測された。これらのうち、通常の生育条件下で膜に構成的に発現しており、大腸菌の薬剤自然抵抗性を担う最も重要な多剤排出蛋白質がAcrBである。AcrBは細胞膜を介してかかっている水素イオン濃度勾配ポテンシャルをエネルギー源として多剤を能動的に排出するトランスポーターである。外膜チャンネル蛋白 TolC と、膜融合蛋白 AcrA と複合体を形成し協調して働く。我々は、AcrB を大量精製し、結晶化を行い、X線結晶構造解析に成功した。その結果、AcrB 分子は三量体で存在し、細胞外に大きな水溶性ドメインを有する12回膜貫通型蛋白質であることを示した。プロトンや基質(薬剤)透過、および排出メカニズムに対して多くの知見を与えた。多剤排出蛋白質としても、またトランスポーターとしても世界で初めての詳細な立体構造解析例であるこの成果は、英科学誌「ネイチャー」の表紙を飾った。

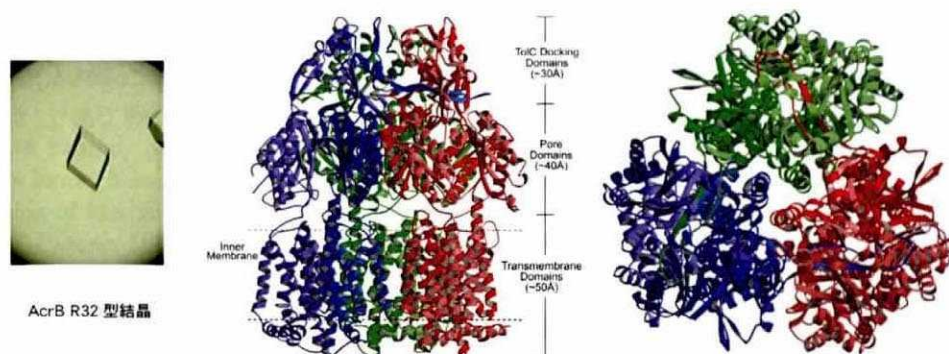


図1 AcrB 結晶(左)と、結晶構造(R32型を用いて)、細胞膜に対して側方から(中)と上方から(右)

2. AcrB の非対称結晶構造の解明

上で述べた構造解析に用いた結晶は、結晶学的三回対称を持つため、得られた単量体各々の構造は三回対称で等しくなり、薬剤結合量など化学量論的考察には向かなかった。そこで、薬剤

結合型構造解析に先立ち、三回対称を持たない結晶の作成を試み、結晶化に用いる界面活性剤を変えることによって、対称性の低い空間群に属する結晶を得ることに成功した。その構造解析にあたっては、改めて重原子同型置換法により位相情報を実験的に求め注意深く立体構造解析を行った。得られた構造には、先の構造と比べ、三回対称からずれて単量体各々で構造が異なる部分が複数箇所あることが判明した。それら構造変化を起こしている部分は、分子中央に存在するチャンネル様構造を持つポア・ヘリックスや、AcrB と強調して機能するアダプター蛋白 AcrA の結合部位、薬剤取り込み口など、機能的に重要と考えられている部分に集中していた。この解析により反応中間体を3種類得たと解釈することも出来、多剤排出メカニズムを解明する決定的な知見となった。

3. AcrB 薬剤複合体結晶構造の解明と機能的回転メカニズム

多剤認識機構解明の為に AcrB 分子に薬剤を複数種結合させた複合体状態での構造解析が不可欠である。ポンプやチャンネルが膜を介したイオンの輸送を行うのに対し、トランスポーターは薬剤などの“分子”を輸送するため、基質結合および解離による構造変化が大きいいためか、複合体形成目的の為に通常行われる基質溶液への結晶の浸潤法は成功せず、共結晶化法をとる必要があった。40 種類以上に及ぶ多剤に対してすべて結晶化を行った結果、薬剤 A を用いた場合に、AcrB 単量体の水溶性ドメインのほぼ中心辺りに薬剤由来の電子密度が観測された。しかし、基質結合が弱いためか、電子密度が幾分不明瞭であった。より結果を確信の持てるものにする為に臭素化した抗生物質 A を化学合成し、臭素原子の異常散乱測定により薬剤結合部位の決定を試みた。SPRING8 放射光を用いることで、明瞭な臭素の異常散乱ピークが得られ、臭素と結合する薬剤位置の確定に成功した。薬剤の結合部位は AcrB 分子の水溶性ドメインのほぼ中央あたりに位置し、F32 型結晶構造の結果から考えられた基質透過経路からずこしはずれていた。さらに驚くべき事に薬剤分子は AcrB 三量体の一つにしか結合しないことが分かった。三量体の持つ構造的な非対称性と、単量体特異的な薬剤結合は、非対称性に基づく多剤の結合・解離の調節機構が存在することを意味している。つまり AcrB 三量体のなかで、単量体各々が、違った結合中間状態を持ち、このそれぞれの状態が順序だって変化することにより、一方向への輸送を達成させている。これは、ATP 合成を司る F1Fo-ATPase の回転触媒機構との共通点が多く、非対称性を利用した結合状態調節の一般的機構であると考えることが出来る。F1Fo-ATPase と異なり物理的な回転を伴うことはないにしても、機能的状態の秩序だった転位が協調的機能と密接に関係する機構である。これらの知見から、多剤排出トランスポーターによる薬剤認識機構と、新しい薬剤排出機構が明らかとなった。排出蛋白質基質複合体の結晶構造解析は世界初の例であり、また非対称性構造に基づく新しい反応メカニズムも世界で初めての業績となる。

5. 多剤結合型転写調節因子の結晶構造の解明

ゲノム解析の結果、大腸菌は数多くの薬剤排出蛋白質を持つことが分かっているが、これらは通常の生育環境では発現して居らず、薬剤暴露の刺激により排出蛋白質をコードする遺伝子の転写活性が高進し、排出蛋白質が発現されると説明されている。つまり、排出蛋白質の発現を制御する転写因子は多剤のセンサーとしてはたらく多剤結合蛋白である。多剤認識機構の詳細な解析をめざし、本研究では大腸菌のもつこれらセンサー蛋白質の立体構造解析もおこなってきた。いくつかの多剤結合型転写調節因子のクローニングを行い、大量発現系を構築し、結晶化を精力的に行い、結晶構造解析にも成功している。

6. 今後の展開

本研究では、多剤排出蛋白質による多剤認識機構を多剤排出蛋白質・基質複合体の結晶構造解析を行うことにより明らかにした。また、構造変化に伴う薬剤排出活性について、全く新しいメカニズムを提唱するに至った。今後の展開として、残された課題は、膜を介したプロトン濃度勾配により引き起こされる膜貫通部分の構造変化が、薬剤結合部位の構造変化として如何に伝達されるかについてであろう。これに関しては、より高分解能での構造解析と、結晶構造に基づく蛋白質工学的解析を行うことにより明らかになると期待される。現在、構造の高分解能化に対しフェムト秒レーザー等を利用した高品質結晶育成技術の開発を行っている。また、高分解能での立体構造は構造に基づくアンタゴニスト設計にも直接供することが出来る。それら本研究で得られた構造情報は全て PDB データベースに登録し、多剤耐性化問題の克服を目指すあらゆる研究者に対して公開する。本研究により多剤耐性化問題の主因である多剤排出蛋白質の分子実態とその働きが明らかになったばかりでなく、細胞内での本来の生理的役割についても知るところとなった。つまり、問題の責任蛋白質のいわゆる“攻めどころ”が多く明らかとなったことで、今後の特効薬開発や、新しい治療方法の開発などに拍車がかかることが大いに期待される。本研究が多剤耐性化問題克服への一助となることを祈念する。

参考文献

1. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi, “Crystal structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB” *Nature* **419**, 587–593 (2002)
2. Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, “Multidrug-exporting secondary transporters” *Curr.Opin. Struct. Biol.* **13**, 443–452 (2003)
3. Satoshi Murakami, Norihisa Tamura, Asami Saito, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, “Extramembrane Central Pore of Multidrug Exporter AcrB in *Escherichia coli* Plays an Important Role in Drug Transport” *J. Biol. Chem.* **279**, 3743–3748 (2004)
4. Hiroaki Adachi, Satoshi Murakami, Ai Niino, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Akihito Yamaguchi and Takatomo Sasaki
Membrane Protein Crystallization Using Laser Irradiation.
Jpn. J. Appl. Phys. **43**, No.10B, L1376–L1378 (2004)
5. Hiroshi Kitano, Satoshi Murakami, Hiroaki Adachi, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Masaaki Doi and Takatomo Sasaki
Processing of Membrane Protein Crystal Using UV Laser Irradiation
J. Biosci. Bioeng. **100**, 50–53 (2005)
6. Norihisa Tamura, Satoshi Murakami, Yoshiaki Oyama, Masaji Ishiguro, Akihito Yamaguchi
Direct Interaction of Multidrug Efflux Transporter AcrB and Outer Membrane Channel TolC Detected via Site-Directed Disulfide Cross-Linking.
Biochemistry **44**, 11115–11121 (2005)
7. 村上聡、山口明人
多剤排出トランスポーターAcrB の結晶構造解析。

細胞工学 21, 1520-1521 (2002)

8. 村上聡、山口明人

異物排出トランスポーターの結晶構造、ついに決まる。

蛋白質・核酸・酵素 48, 26-32 (2003)

9. 村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人

大腸菌多剤排出トランスポーターAcrB の結晶構造解析

日本結晶学会誌 45, 256-261 (2003)

10. タンパク質のかたちから生命の謎を解く 生物マシーナリー構造生物学の最前線(編集者:田之倉優, 総ページ数:232 頁), 村上聡、(分担執筆)、株式会社クバプロ、(2004) pp.178-190.

11. 村上聡、山口明人

薬剤排出タンパク質の構造と機能 ~薬剤耐性化の克服を目指して

バイオサイエンスとインダストリー 62, 11-16 (2004)

これらを加えて、原著論文(14報)、総説(9報)、国際会議発表23件、うち14件招待講演、国内会議発表68件、うち14件招待講演)をさきがけ研究の成果として発表した。