

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：異物排出トランスポーターの構造機能解析

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

山口 明人(大阪大学産業科学研究所 教授)

3. 研究内容及び成果

異物排出トランスポーターは生物界に広く分布しており、細胞レベルのもっとも基本的な生体防御機構を構成している。変異等により、病原細菌やガン細胞の多剤耐性を引き起こす所から、歴史的には多剤排出タンパクとして認識され、臨床上也大きな問題となっているが、その生理的意義は単なる薬剤排出にとどまるものではなく、細胞の生存戦略や情報伝達、病原性の発現など重要な生理的役割に関与するものと考えられるようになってきている。異物排出トランスポーターには解明すべき大きな3つの課題がある。(1)異物排出タンパクは化学構造上、一見何の関連性もないように見える多くの化合物を異物として認識し排出するが、このような異物の認識はどのようにして可能なのか?(2)多くの生物が多数の内在性異物排出遺伝子を染色体上に持っているが、その大部分は通常の条件下では発現していない。いったいこれら多数の異物排出遺伝子はいかなるメカニズムにより発現してくるのか?(3)異物排出遺伝子の、異物を排出する以外の本来の生理的役割はあるのか?あるとすればそれはいったい何か?

本研究プロジェクトは、異物排出タンパクを巡るこれらの問題を総合的に解明するプロジェクトとして企画され実行された。そのために、膜タンパク質のX線結晶構造解析から、異物排出遺伝子ノックアウトマウス作成までを同一プロジェクトで実施するきわめて包括的な研究プロジェクトとなった。

本研究プロジェクトの成果は、

- (1) 世界で初めて異物排出トランスポーターのX線結晶構造決定に成功し、異物認識と排出の構造的基礎を見事に解明したこと。
- (2) 細菌の異物排出遺伝子のポストゲノム解析を初めて行い、細菌の環境感知応答システムと細胞間情報伝達により発現誘導される仕組みを初めて発見し、そのメカニズムを解明したこと。
- (3) 異物排出遺伝子の本来の生理的役割として、高等生物における分泌輸送介在型情報伝達に初めて注目し、その解析を行ったこと。

これらに加えて、異物排出タンパク質が病原細菌の病原性発現に必須であることを発見し、そのメカニズムの解明を進めている。

(1) 異物排出タンパク AcrB の構造決定と、異物認識・異物排出の構造的基礎

異物を如何にして認識するかという問題は、排出タンパク質の立体構造の問題である。本プロジェクトが提案された2001年時点では、立体構造が決定されている膜輸送タンパク質は一つもなかった。その意味ではきわめて野心的なプロジェクトであった。

2002年に初めて構造決定し、Nature誌に報告した構造は3回対称軸を持つ3量体であった(Murakami, S. *et al*, *Nature* **419**, 587-593(2002))。その2年前に英国のKoronakisらにより報告された外膜チャンネルタンパク TolC と、AcrB は直接ドッキングして内膜 ペリプラズム 外膜を貫通する複合体を形成していることがわかった。AcrB 3量体構造からわかった最も重要な事実は、3量体の膜貫通部とペリプラズム頭部の境界付近に側面開口部を持つという事実である。基質はこの側面開口部を通じて、内膜脂質二重層外層から AcrB に取り込まれる。これまで、多剤排出タンパクの機能モデルとして提出されてきた membrane vacuum cleaner モデルが初めて構造的裏付けを得ることとなった。

2002年の構造決定で積み残された問題は、基質結合部位はどこかという問題である。最終的に決定された基質結合型構造では、3つのモノマーのうち1個にのみ、モノマー頭部、フェニルクラスター領域に結合していた。3つのモノマーは、排出輸送の3つの段階それぞれの中間体構造に対応していることがわかった。すなわち、待機、結合、排出の3つの中間体である。AcrB 分子内部には基質が通過するチャンネルがあるが、結合モノマーでは側面開口部からフェニルクラスターポケ

ットまでの通路が開いており、そのチャンネルの先端に基質が結合しているが、頭頂開口部への出口がふさがっている。一方、排出モノマーでは、入り口が閉じ、基質結合部は収縮して、頭頂開口部への出口が開いていた。待機モノマーでは入り口は開口しているが、基質結合部は収縮したままであった。

非常に幅広い化合物を認識できる分子メカニズムは、異なる基質が、余裕のある大きな基質結合ポケットの、それぞれ部分的にオーバーラップしているが異なるサイトに結合する、いわゆるマルチサイト結合という機構に依ることが明らかとなった(Murakami, S. *et al.*, *Nature* **443**, 173-179(2006))。

(2) 細菌異物排出遺伝子のポストゲノム解析と発現制御機構

私たちは、大腸菌を用いて異物排出遺伝子の網羅的ポストゲノム解析を世界で初めて行った。全ての候補遺伝子をクローニングし、強制的に大量発現させたところ、20種類の遺伝子が何らかの薬剤排出タンパクを発現することを明らかにした。

次に、これらの異物排出遺伝子の発現制御機構解明に取り組み、細菌の環境感知応答システムである二成分情報伝達系によって発現誘導されることを発見した(Nishino, K. *et al.*, *J. Bacteriol.* **184**, 2319-2323 (2002)、Hirakawa, H. *et al.*, *J. Bacteriol.* **185**, 1851-1856 (2003))。また、細菌細胞間情報伝達によっても異物排出遺伝子の発現誘導は起こり、これらは二成分系を介する誘導と、それ以外の系を介するものとがあった。誘導の引き金となる細胞間情報伝達物質としては新たにインドールを発見した(Hirakawa, H., *et al.*, *Mol. Microbiol.* **55**, 1113-1126 (2005))。インドールは大腸菌同士の間での情報伝達だけでなく、サルモネラなどのインドールを産生できない他菌種にもセンシングされて異物排出遺伝子の発現誘導を行うメカニズムが明らかにされた。さらに、異物排出遺伝子の誘導は、カタボライトコントロールや、細菌の成長段階などでも起こっており、異物排出遺伝子の細菌の生理機能との関連を示唆している(Hirakawa, H., *et al.*, *J. Bacteriol.* **188**, 5851-5858 (2006)、Kobayashi, A., *et al.*, *J. Bacteriol.* **188**, 5693-5703 (2006))。異菌種間情報センシングによる異物排出遺伝子発現誘導機構については詳しい分子メカニズムを現在解明中である。

(3) 高等生物における分泌輸送介在型情報伝達と異物排出輸送体の役割

情報伝達は高等生物において必須の役割を担っている。神経伝達物質や、インスリンなど一部のホルモンは開口放出によって分泌されるが、ステロイドホルモン、プロスタグランジン、インターロイキン、メラトニン、脂質メディエーターなど、大部分の脂溶性情報伝達物質の分泌経路は全く不明である。私たちは、脂溶性情報伝達物質に予想される分泌機構が、脂質二重層からの分泌であり、異物排出輸送体と全く同じであることから、異物排出輸送体ファミリーのオーファン輸送体の中に分泌型情報伝達を担う輸送体があるものと考えてこの研究を開始した。

まず、血小板の分泌する脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸に注目し、その分泌が開口放出に依らず、ABCA様の膜輸送体によるものであることを明らかにした(Kobayashi, N., *et al.*, *J. Lipid Res.* **47**, 614-621 (2006))。そこで次に、ABCAファミリータンパク質のうち基質未知のもの、ノックアウトマウス作成を系統的に進め、現在、ABCA5とABCA7のノックアウトマウスを得、その解析を進めている。

分泌輸送を担う膜輸送体の同定は本プロジェクトの次のプロジェクトの研究課題として残されたが、分泌輸送介在型情報伝達の存在を明らかにしたことは本プロジェクトの大きな成果である。

以上、本プロジェクトによりこれまで未知であった異物排出タンパクの構造・機能・発現制御とその役割に関して画期的な解明の前進が見られた。異物認識・異物排出の構造的基礎を解明したことは、この分野の研究における新時代を画するものである。同時に、細菌や高等生物の生理機能を密接な関わりのあることが解明され、それらの排出膜タンパク質を標的とする創薬、トランスポーターオリエンテッドの創薬の可能性が大きく広がってきたと言える。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

原著論文28件、総説・書籍19件、口頭発表(招待講演等)、国内171件、海外37件、特許、国内1件
(平成20年1月21日現在)

特記すべき論文

1. Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. and Yamaguchi, A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443, 173-179 (2006): 初めて異物排出タンパクの基質結合部位の構造を明らかにした論文。多剤認識がマルチサイト結合であることを明らかにした。また、排機能的回転輸送機構を解明した。
2. Hirakawa, H., Inazumi, Y., Masaki, T., Hirata, T. and Yamaguchi, A. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 55, 1113-1126 (2005): インドールが細菌細胞間情報センシングのメディエーターになり、異物排出遺伝子がそれにより誘導されることを示した論文。
3. Kobayashi, N., Nishi, T., Hirata, T., Kihara, A., Sano, T., Igarashi, Y. and Yamaguchi, A. Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J. Lipid Res.* 47, 614-621 (2006): 血小板からの脂質メディエーターの分泌が膜輸送体によって仲介されていることを証明した論文。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究では、初めて異物排出タンパクの構造を明らかにし、長年の謎とされてきた多剤認識の構造的基礎を鮮やかに解明したばかりでなく、プロトン共役型膜輸送体では初めての構造決定でもあり、今日の膜輸送体ポストストラクチャー時代の突破口となり、それを先導する研究として高く評価されている。異物排出遺伝子ポストゲノム解析も本研究が始めてであり、この世界の研究を先導するものである。分泌輸送介在型情報伝達についてはまだこれからの研究に負うものであるが、輸送体に仲介されているという突破口を開いたことは意義があると考えている。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

本研究により、代表者山口明人は、平成20年日本薬学会賞、ならびに同年日本細菌学会浅川賞を受賞。共同研究者の村上聡は、平成19年度文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞。同じく西野邦彦は、ポストゲノム研究で2005年Science誌のYoung Scientist Award, 平成14年米国細菌学会Student Travel Grant Award、平成15年日本細菌学会黒屋奨学賞(史上最年少受賞)、平成18年井上研究奨励賞、Nature-Invitrogen Biotechnology Award、平成19年 日本抗生物質学術協議会奨励賞、日本化学療法学会西日本支部長賞を受賞。同じく平川秀忠は、平成17年米国細菌学会Student Travel Grant Awardを受賞。本研究に従事した学生のうち日本学術振興会特別研究員に採用されたものは7名。