

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名: 薬剤耐性化問題の克服を目指した多剤排出蛋白質の薬剤認識機構の解明とその応用

### 2 研究者氏名: 村上 聡

### 3 研究のねらい:

薬剤耐性化問題の主因である多剤排出蛋白質の立体構造を詳細に解析することで、どのような分子メカニズムにより多種多様な薬剤分子が排出蛋白質の基質として認識され、排出されるのかを明らかにすることが本研究の一つめのねらいである。次の段階のねらいとして、同多剤排出蛋白質の遺伝子発現制御に関わる転写因子の立体構造も併せて解析する。それにより多剤の結合蛋白質と、排出蛋白質両方の構造情報を比較することが可能となり、より詳細な多剤認識メカニズムに迫ることが可能となる。本研究は、構造情報が皆無であった膜輸送蛋白質の構造生物学分野に世界初の情報を供するばかりでなく、ファジーな基質認識機構という酵素化学の例外的な現象の理解へ向けて本質的な知見を与える。また基礎学問分野に対する貢献ばかりでなく、多剤耐性化問題の原理解明に繋がるためその問題克服へ向けての門戸を開くという応用面での展開も期待できる。

### 4 研究成果:

#### (1) 大腸菌多剤排出蛋白質 AcrB の立体構造の解明

昨今のゲノム解析の結果、多剤排出蛋白質は古細菌をはじめとするバクテリアから我々人間の細胞に至るまで、あらゆる細胞が持つ最も基本的で普遍的な生体防御機構であるということが分かってきた。モデル細胞である大腸菌では 1997 年の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、大腸菌の通常生育条件下で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 は細胞膜を介して存在す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膜輸送蛋白質(トランスポーター)である。AcrB は外膜チャネル蛋白 TolC と、膜融合蛋白 AcrA と複合体を形成し協調して、細胞質からのみでなく内外膜の間の空間(ペリプラズム空間)からも抗生物質などの基質を排出する強力な多剤排出蛋白質である。我々は、AcrB を大量精製し、結晶化を行い、X線結晶構造解析することに成功した。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。

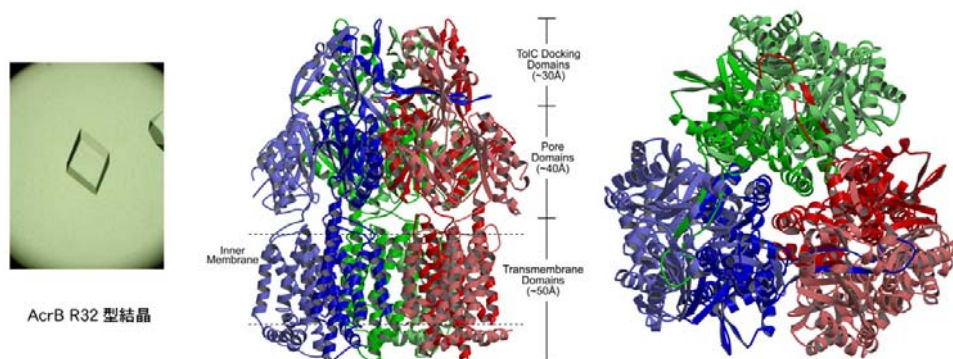


図1 AcrB の R32 型結晶(左)と、それを用いて解析した結晶構造。三量体を別々の色で示す。細胞膜に対して側方から(中)と上方から(右)

## (2) AcrB の非対称結晶構造の解明

先に述べた構造解析に用いた結晶における分子のパッキングを表す空間群は  $R32$  で、結晶学的三回対称を持つ。その3回軸が偶然(しばしば起こることだが)生物学的三回軸と一致した構造が得られた。つまり、得られた構造は三回対称性を持ち、含まれる3つの単量体の立体構造は、等価になる。これは構造解析における分子モデル構築が1/3で済むという解析上のメリットを持つものの、各単量体の協調的機能や、薬剤結合量を問うたりする化学量論的考察には向かず、機能を解析する上では大きなデメリットでもある。

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た。膜蛋白質の結晶化は非常に難しい技術であることは生化学分野における常識であるが、試行錯誤の末、精製および結晶化に用いる界面活性剤の種類を変更することにより、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。その結晶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解析を行った。分解能についても  $2.8 \text{ \AA}$  と従来の  $3.5 \text{ \AA}$  からの大幅な改善がみられた。

得られた立体構造は先の構造と比べ、全体的成り立ちについてはほとんど等しかった。しかしより詳細に AcrB に含まれる三量体の立体構造を非対称的に観測することで、同蛋白質による排出メカニズムを知る上で非常に重要な、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。この構造解析結果は、同薬剤排出蛋白質の薬剤輸送メカニズムにおける反応中間体を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、抗生物質 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差フーリエ・ピークが観測された。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。薬剤の結合は AcrB 分子の水溶性ドメインのほぼ中央あたりのフェニルアラニンに富む分子の内腔に見出された。この部位は  $R32$  型結晶構造の結果から推定された基質透過経路から幾分ずれていた。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秩序だてて順に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機能の協調性と密接に関係する機構である。

対称性の低い新型結晶を用いた多剤排出蛋白質-薬剤複合体の構造解析結果より、芳香族-芳香族相互作用を中心とする多剤の認識機構と、非対称性に基づく新規薬剤排出機構を提唱するに至った。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るばかりでなく、非対称性構造に基づく新しい反応メカニズムは、構造変化と薬剤結合状態の非対称性を無理なく説明でき、当該分野におけるエポックメイキングな成果である。

#### (4) 多剤結合型転写調節因子の結晶構造の解明

大腸菌ゲノム解析の結果、大腸菌には数多くの薬剤排出蛋白質が存在することが判っているが、これらの大部分は菌の通常生育環境では発現して居らず、薬剤暴露の刺激など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、その排出にあたと説明されている。つまり、多剤排出蛋白質の発現制御因子は多剤のセンサーとしてはたらく多剤結合蛋白質である。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、大量発現系構築、結晶化を行い、分解能 1.1 Å での超高分解能結晶構造解析に成功した。立体構造はいわゆるヘリックス-ターン-ヘリックス・モチーフを持つ既知の立体構造であり、新規性はなかったが、当該分野における最も分解能が高い解析例となった。

高分解能で解析できたため、構造の中に内在性の基質の結合を偶然にも発見した。マスマススペクトル等の分析により、この基質の化学的同定を完了したが、その生理的意味づけを進めている。現段階では、この物質はどうやら脂溶性の代謝産物であり、好気的環境下での活性酸素等の働きにより生ずる脂溶性毒素である可能性が高い。多剤排出蛋白質の発現制御因子の中に多剤排出蛋白質の基質類似物質の結合を認めたことで、多剤排出蛋白質群の本来の生理的役割について示唆を与えた。すなわち、多剤排出蛋白質は 20 世紀に氾濫した抗生物質や抗がん剤を排出するために細胞の起源から脈々と備えてきたわけではなく、細胞内で自然発生する脂溶性毒素を排出することが本来の役割であると考えの方が自然であろう。排出蛋白質の内因性基質の探索は排出蛋白質阻害剤開発のリード化合物としての有用性があるため多くの研究者により行われてきたが、本研究のような多剤排出系の発現制御因子の結晶構造中に見出されたことはまさにセレンディピティーといえる。

#### (5) 今後の展開

高分解能での立体構造情報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。こ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。

#### 5 自己評価:

膜を介した物質輸送に関わる膜蛋白質は、ポンプ、チャネル、トランスポーター(トランスポーターのみ膜輸送体という日本語訳を持つ)と大別することが出来る。このうちイオンの輸送に関わるポンプ、チャネルの構造と機能に関わる研究は、1990 年代半ばから急速に発展し、カリウム・チャネルの基質選択メカニズムを構造を基に解明したマッキノンらは 2003 年のノーベル賞に輝いた。一方で薬剤などの分子の輸送に関わる膜輸送蛋白質は結晶化が困難であるが故、構造解析が筆者らの研究以前はひとつも成功しておらず、機能の本質的理解のための最大のミッシング・ピースとなっていた。本さがけ研究における、多剤排出蛋白質 AcrB の世界初の立体構造解析、AcrB・薬剤複合体構造解析、及び、それらから想起されたトランスポーターの基質輸送メカニズム(回転触媒機構)はまさに世界にさがける成果であり、この種の蛋白質の構造・機能研究における本質的な解を与えたものと思われる。

また、薬剤排出蛋白質の発現制御因子の構造解析に成功したことで、多剤の排出蛋白質と、結合蛋白質の詳細な立体構造が両方そろった。そのような例は本研究以外に無く、多剤認識機構の解明へ向けて、当該分野における最も重要な知見であると言われている。

そればかりでなく、構造解析の結果得た多剤排出システムの内因性基質の偶然なる発見は、なぜ生物は排出蛋白質をもつことで、有史以来様々な薬剤に対する対抗策を講じていたか?というナゾに対するヒントも与えた。すなわち、排出系は細胞の中で自然発生する毒性のある脂溶性代謝産物を吐き捨てるための掃除機であり、近代医薬はその掃除機にたまたま吸い込まれて耐

性が起こるという説を強く示唆するものであった。つまり薬剤排出蛋白質は本来の生理的な役割をもち、薬剤の排出は二次的なものであるという説に実質的なデータを与えた。これら全ての知見はなぜこれまで排出蛋白質を封じ込める特効薬が存在しなかったか？なぜ新薬もしばらくすると排出され始めるのか？という事象を説明する杖となる。今後も薬剤耐性化問題の克服へ向け、基礎的知見を積み重ねてゆきたい。

#### 6 研究総括の見解:

さがけ研究採択直前に世界で初めて多剤排出蛋白質である AcrB の構造決定に成功するという画期的成果を出した。そこで一服せず、さがけ研究開始後も、この蛋白質の機能認識メカニズムの解明を課題に掲げ、AcrB・薬剤複合体、AcrB 発現制御因子、内因性基質等の結晶構造解析に次々と成功して、多剤認識や薬剤排出の機構を明らかにするという画期的な成果を挙げた点、大いに評価する。機能を理解するために必要な実験をデザインして、それを証明していくという、構造研究者のお手本になる研究の進め方が身につけていると感じる。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

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. 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)

ほか 10 報

##### 出版物

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 村上聡、(分担執筆)  
“多剤耐性化を引き起こす薬剤排出タンパク質”  
*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)、pp.178-190、株式会社クバプロ、(2004)

5. 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)

ほか 2 報

受賞

1. 国立大学法人大阪大学・教育研究功績賞 (平成 16 年 1 月)

招待講演

1. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita, Akihito Yamaguchi  
“X-ray crystallographic analysis of bacterial multidrug efflux transporter AcrB”  
*Gordon Research Conferences on Multi-Drug Efflux Systems*, March 9-14, 2003, Four point Sheraton, Ventura, CA, USA., (2003)
2. Satoshi Murakami  
“X-ray crystallographic analysis of multidrug efflux transporter AcrB”  
*Japan-UK Membrane Protein Structure Biology-Towards high-throughput membrane protein crystallography and related technology*, September 11-12, SPring-8 Public Relation Hall, Hyogo, JAPAN, (2003)
3. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita Akihito Yamaguchi  
“Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB”  
*The Sixth Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA'04) Symposium, "Macromolecular assemblies"* June 27-30, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China, (2004)
4. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita Akihito Yamaguchi  
“X-ray crystallographic analysis of multi-drug efflux transporter”  
*The 8th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation(BSR2004), Symposium "Membrane Proteins*, September 7-11, Egret Himeji, Hyogo, JAPAN, (2004)
5. Satoshi Murakami  
“Structure and function of bacterial multi-drug efflux transporter”  
*Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems*, August 28-September 2, Magdalen college, Oxford University, UK, (2005)

ほか招待講演 12 件(国際) 15 件(国内)

ほか学会発表等 9 件(国際) 43 件(国内)