

「薬剤排出タンパク質複合体の機能発現に関わる連結分子の分子間認識機構の解明」
大阪大学蛋白質研究所 山下 栄樹

1 研究の背景と目的

世界中では年間約 70 万人が薬剤耐性菌感染症で亡くなっている。このまま手を打たないと、2050 年には年間死者数が 1000 万人に上り、現在のガンによる死者数（約 820 万人）を上回り、100 兆ドルにも上る経済的損失が推定されている。薬剤耐性菌問題を克服することは、世界的な重要課題の 1 つである。日和見細菌である緑膿菌は、健常者には感染症を発症しないが、免疫不全患者では重篤な症状をもたらす。特に多種の抗菌剤に耐性を持つ緑膿菌（多剤耐性緑膿菌）は院内感染を引き起こし、抗菌薬治療が困難な感染症であるため、WHO が緊急性「重大」であると分類した細菌の 1 つである。緑膿菌の薬剤耐性化の原因の 1 つとして、菌体にとって異物である抗菌剤を菌体外に排出する機能を持つ薬剤排出タンパク質複合体の過剰発現がある (Pool, *Clin. Microbiol. Infect.* 2004)。薬剤排出タンパク質複合体は、離れた環境に存在する 3 種類のタンパク質（異物の認識及び排出のためのエネルギー獲得を行い内膜に存在するトランスポーター、異物を菌体外に放出し外膜に存在するチャネル膜タンパク質、それら 2 種類の膜タンパク質を繋ぎ膜間に存在する膜融合タンパク質が、2 つの生体膜（内膜、外膜）を貫く巨大な膜タンパク質複合体を形成し機能する（図 1）。緑膿菌では、多剤耐性化に関わる薬剤排出タンパク質複合体が 4 種類存在し、抗菌薬の種類により最適な複合体が機能していることが知られている (Pool, *J. Antimicrob. Chemother.* 2005)。最近、我々は 4 種類の複合体の中の 1 つである MexAB-OprM 複合体の構造解析に成功した。MexAB-OprM 複合体の構造から、トランスポーター MexB とチャネルタンパク質 OprM との間には直接の相互作用がなく、膜融合タンパク質 MexA が MexB と OprM を連結し、薬剤排出機能の発現に重要な役割を持つことを明らかにした (Tsutumi et al., *Nat. Commun.* 2019)。しかし、緑膿菌には、複数の薬剤排出タンパク質複合体が存在するが、内膜と外膜という離れた場所に存在する構成タンパク質がどのようにして正確な複合体を形成し、薬剤排出機能を発現するのかは不明である。我々は 2 つの膜タンパク質を連結し複合体の薬剤排出機能発現に必須の膜融合タンパク質の構造の違いが、緑膿菌内での正確な複合体形成に重要と考え、構造が未知でアミノグリコシド系抗菌薬の排出に関わる膜融合タンパク質 MexX の構造を明らかにすることを目的とした。

2 研究方法・研究内容

既報の MexA の構造 (Akama et al., *J. Biol. Chem.* 2004) から、MexX も 4 つのドメインから構成され、その中の 1 つのドメイン (MP ドメイン) が他のドメインに対して複数の配置を取り得る可能性があり結晶化に不利になると想えた。そこで、MP ドメインを削除した MexXΔMP の X 線結晶構造解析により構造を明らかにすることとした。

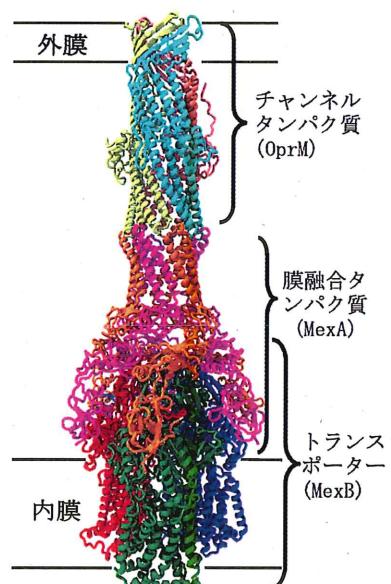


図 1 薬剤排出タンパク質複合体 (MexAB-OprM 複合体の構造)

た。

膜融合タンパク質 MexX Δ M の試料調製

MexX Δ M の精製は、MexX Δ M 遺伝子を pET28b(+) vector に挿入し、大腸菌を利用した大量発現系で発現させ、Ni アフィニティーカラム及びゲル濾過カラムを用いて行った。純度の確認は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で行った。精製した MexX Δ M の濃度を 20mg/ml に調製し、約 500 条件の結晶化条件探索を行い、その中から結晶化に有望な沈殿条件を最適化することにより結晶を得た。得られた結晶を結晶化条件に 25% ポリエチレングリコール 200 を加えた抗凍結剤に浸した後、液体窒素で急速凍結を行い、X 線回折強度測定用の試料とした。

X 線回折強度測定及び結晶構造解析

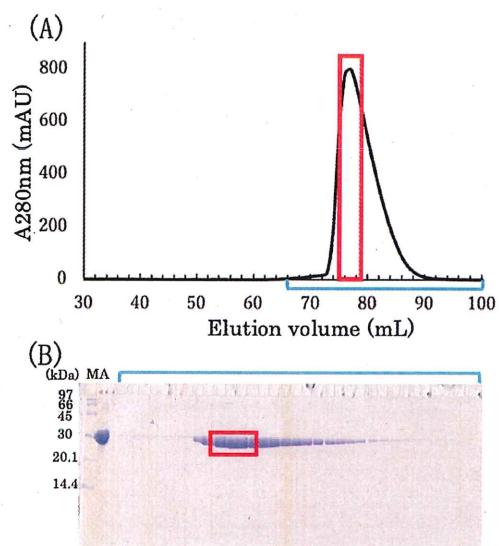
X 線回折実験は大型放射光施設 SPring-8 に設置されている阪大蛋白研ビームライン (BL44XU) で行い、波長 0.9Å, 1 イメージ辺り 0.01° / 0.05 秒の条件で、3800 枚の回折強度データを収集した。構造予測ソフトウェア AlphaFold2 で作成した構造をモデル分子とし、解析ソフトウェア Phaser を用いて分子置換法により初期位相を求めた。初期位相から得られた電子密度を基に分子グラフィックソフトウェア Coot を用いて構造を修正し、精密化ソフトウェア REFMAC5 と phenix.refine を用いて構造精密化を行った。

3 研究成果

大量発現系を用いて発現し精製を行うことにより培養 1 Lあたり約 1.5 mg の高純度の MexX Δ M が得られた (図 2)。結晶化条件の最適化を行った結果、リザーバー溶液として 0.1 M CHES pH 9.0, 1.2 M NaCl, 0.012 M CHAPS, 0.012 M HEPES, 0.012 M Tris, 0.05% ヘキサアンミンコバルト(III) 塩化物, 5% エチレングリコールを用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法でセットされた結晶化プレートを 4°C に静置させることにより結晶が得られた (図 3)。

X 線回折強度測定の結果、MexX Δ M 結晶は、空間群が $P1$ 、格子定数が $a=47.7\text{ \AA}$ 、 $b=52.5$ 、 $c=71.7\text{ \AA}$ 、 $\alpha=70.9^\circ$ 、 $\beta=71.5^\circ$ 、 $\gamma=83.9^\circ$ であった。回折強度データは、多重重度が 3.8、 $I/\sigma(I)$ が 7.8、データ完全性が 96.6%、 R_{merge} が 8.5% の回折強度データを 1.97Å 分解能で収集できた (表 1)。収集したデータを用いて分子置換法によって初期位相を求め、電子密度に対するマニュアルによるモデル修正及び構造精密化を繰り返し行うことにより、構造の信頼性を示す指標である R_{work} 、 R_{free} が 20.9%、24.2% で MexX Δ M 構造を決定することに成功した (表 1) (図 4)。

MexX Δ M 構造は MexA の MP ドメインを除いた構造と同様に 3 つのドメイン (α -helical hairpin ドメイン、



M:マーカー, A:ゲル濾過前試料

図 2 精製の結果
(A) ゲル濾過の結果、(B) SDS-PAGE の結果、青角括弧: SDS-PAGE で確認した領域、赤枠: 結晶化に用いた標品

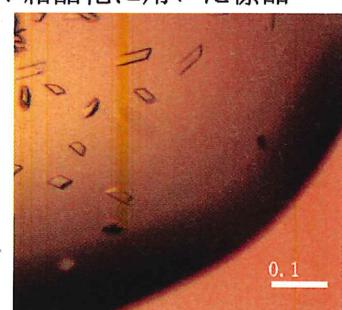


図 3 MexX Δ M の結晶

Lipoyl ドメイン、 β -barrel ドメイン)から構成されていた(図4)。結晶中の非対称単位中には MexX Δ MP 分子が 2 つ存在していた。それら分子内の各ドメインを最適に重ね合わせたときの差(RMSD)を計算したところ、 α -helical hairpin ドメインの RMSD が 0.52 Å、Lipoyl ドメインの RMSD が 0.22 Å、 β -barrel ドメインの RMSD が 0.15 Å と各ドメインにおいてほぼ同じ構造であった。しかし、ドメイン間の配置が少しずつ異なっているために、 α -helical hairpin ドメインの構造を重ねた場合、そのドメインから遠い位置にある β -barrel ドメインで約 13.7 Å の差が観測できた(図5)。このことから、MexX は、各ドメインの構造は安定だがドメインの配置が動きやすいことが推測でき、比較的柔軟性を持った分子であると推定できる。

既報の MexAB-OprM 複合体構造から、膜融合タンパク質 MexA の β -barrel ドメインにトランスポーター MexB と相互作用する領域が見られたので、本研究で得られた MexX の β -barrel ドメインの構造と比較したところ、相互作用する領域で静電ポテンシャルが異なっていることが分かった(図6)。MexA と MexB が相互作用する領域(図6 点線四角枠 A 及び B)では、MexB がネガティブ、MexA がポジティブを示した。

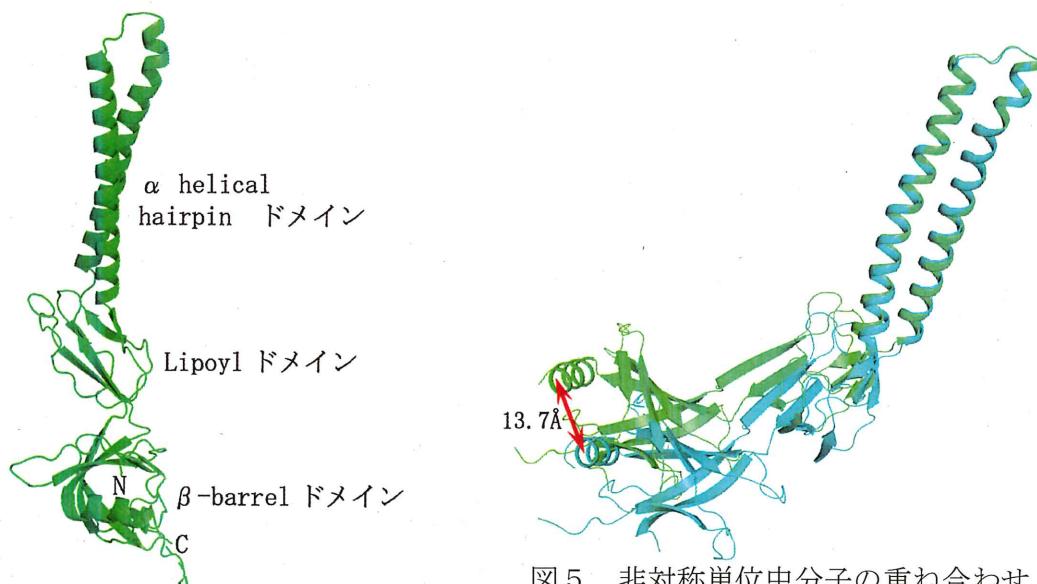
図4 MexX Δ MP の結晶構造

表1 回折強度データ・精密化の統計値

回折強度データ	
Resolution range (Å)	64.7–1.97 (2.00–1.97)
Space group	P1
a, b, c (Å)	47.7, 52.5, 71.7
α , β , γ (°)	70.9, 71.5, 83.9
Total reflections	165220 (8529)
Unique reflections	42965 (2139)
Multiplicity	3.8 (4.0)
Completeness (%)	96.9 (96.6)
Mean(I)/sigma(I)	7.8 (2.1)
CC(1/2)	0.99 (0.914)
R_{merge}	0.085 (0.533)
構造精密化	
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.209 / 242
RMSD Bonds (Å)	0.011
RMSD Angles (°)	1.07
Ramachandran	
favored (%)	98.23
allowed (%)	1.77
outliers (%)	0.00

図5 非対称単位中分子の重ね合わせ

しかし、MexX ではそれらの領域（図 6 点線四角枠 A' 及び B'）がネガティブになつており、MexB との安定な複合体形成が困難であると考えられる。構造比較によって発見したこれらの領域は、膜融合タンパク質においてトランスポーターを正確に認識するのに重要な部位であると推測できる。今後は、本研究で見つけた部位について変異体を作成し、複合体形成への影響を分子レベルで証明するとともに、他の膜融合タンパク質の立体構造を明らかにすることにより、各複合体形成に重要な部位や特徴的な構造を特定し、緑膿菌における薬剤排出タンパク質複合体の構造形成機構の理解を深める。

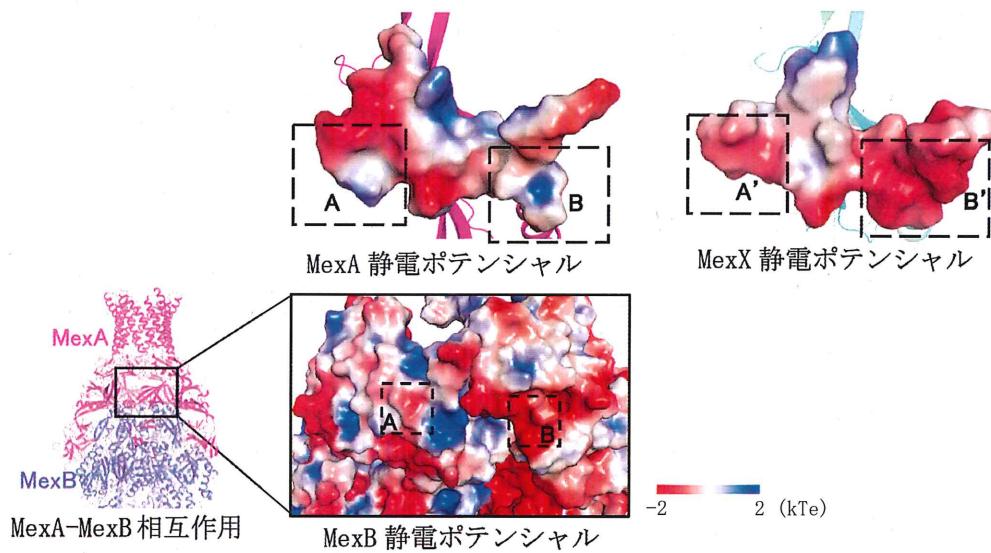


図 6 β -barrel ドメイン内のトランスポーターと相互作用する領域の静電ポテンシャルマップ

MexA の点線四角 A 付近と MexB の点線四角 A 付近が相互作用、MexA の点線四角 B と MexB の点線四角 B が相互作用している。MexX の点線四角 A' 、B' がそれぞれ MexA の点線四角 A 、B の位置に対応する。

4 生活や産業への貢献および波及効果

薬剤耐性菌問題を克服することは、世界的な重要課題の 1 つである。複数の抗菌薬が効かない多剤耐性緑膿菌による免疫不全患者への院内感染は、重篤な症状を引き起こすため社会的に大きな問題となっている。このため、多剤耐性化に関わる排出タンパク質複合体の阻害剤の開発が新しい抗菌薬の開発に繋がると考えられており、複合体の構成タンパク質であり薬剤を認識するトランスポーターをターゲットとした阻害剤の開発研究が主にされている。しかし、複合体の構造形成に着目した創薬研究はまだない。本研究では、緑膿菌内で正確な複合体形成に重要な膜融合タンパク質間の構造比較を行うことにより、構造形成の鍵となる部位の発見及びその立体構造が得られた。このことは複合体形成を阻害することを目的とした化合物の設計に有用な情報が得られたと考えており、新規の作用機序を持った抗菌薬の開発に繋がるを考えている。