

異物排除システムの分子基盤

— 異物排出蛋白の分子構造解析 —

特集 プロジェクト研究

山口 明人*

Molecular Basis of Xenobiotic Export Systems
—Molecular Structures of Xenobiotic Export Proteins—

Key Words : Xenobiotic Export, Multidrug Resistance,
Membrane Topology, Tetracycline

1. はじめに

生体には、細胞レベルの防御機構として異物排除システムが備わっている。このことは、自明のことのように、生命科学の研究者たちに認識されはじめたのはごく最近のことに過ぎない¹⁾。1980年代に、全く別の2つの領域の研究者たちがそのことに気づきはじめた。細菌感染症およびガンの研究者たちは、1980年代の終わりから、1990年代始めにかけて、「多剤耐性」という新しい薬剤耐性機構が出現してきていることを発見した。これは、「多剤排出蛋白」という、薬剤を細胞外へ能動的に排出する膜輸送蛋白質が発現しているためであった。まもなく、これらの排出蛋白は、薬剤耐性細菌や耐性ガン細胞だけでなく、一般の細菌や細胞にもともと存在するものであることがわかってきた。しかも、一つの細胞がいくつもの種類の排出蛋白をそろえていることがわかった。一方、薬理学の領域では、解毒機構の研究が進んでいた。毒物・異物は細胞の中にはいると、まずチトクロームP450によって酸化を受け、次いでグルタチオンやグルクロン酸との包合体を形成することにより段階的に弱毒化される。80年代までは、形成された包合体は自然に細胞外に漏れ出るものと想像されていた。ところが、この包合体の能動的な排出系が解毒の第3段階としてあると

ということが90年代に入ってわかってきた。包合体排出を担う膜輸送担体であるMRP, cMOATなどは、多剤排出蛋白であるMDRと同じファミリーに属す膜輸送体であることもわかってきた。そこで、多剤排出蛋白の研究者と、包合体排出の研究者たちが「異物排出蛋白」という共通の土俵で研究を展開する気運が高まり、生まれたのが今回紹介するプロジェクト研究である。この研究は、科学技術振興財団による戦略的基礎研究「生体防御のメカニズム」の中で、東京大学薬学部杉山教授を研究代表者として平成9年秋に採択されたものであり、阪大産研山口が異物排出蛋白分子構造解析の立場から共同研究者として参画している。

2. 異物排出蛋白の問題点

前述したように、異物排出蛋白は生物界に普遍的に存在しており、一つの細胞の中にも多数の異物排出蛋白が存在する。輸送機構の面から分類すると、ATP加水分解を輸送エネルギーとして利用するABC(ATP binding cassette)輸送体と、プロトン駆動力をエネルギー源とするアンチポーターとがある。アンチポーターにはさらに、糖やアミノ酸の輸送体などと共通の構造を持つMFS(major facilitator superfamily)、その三分の一の大きさで、三量体として働くSMR、外膜成分を含むいくつかのサブユニットからなるRNDファミリーなどに分かれる。輸送する基質特異性の面からは、ある薬剤や化合物に特異的な輸送体と、化学構造式上共通性のまったく認められない多数の化合物を同時に認識し排出する多剤排出蛋白がある。昨年、全ゲノム配列が決定された大腸菌を例にとると、異物排出蛋白遺伝子をコードすると推定されるORFは全部で34個あった。結核菌やヘリコバクターピロリなどでも20個以



* Akihito YAMAGUCHI
1948年6月25日生
1977年東京大学大学院薬学研究科
博士課程修了
現在、大阪大学産業科学研究所・
生体情報制御学研究分野、教授、
薬学博士、生体情報制御学
TEL 06-6879-8545
FAX 06-6879-8549
E-Mail akihito@sanken.osaka-
u.ac.jp

上ある事がわかっている。なぜこのように多数の異物排出蛋白質がもともと用意されているのだろうか。解毒や耐性とといった、細胞にとって重要な防御機構を担っていることは明らかになりつつあるが、それ以外に重要な生理的役割を持っているかどうかは、残念ながら今のところわかっていない。もともと、栄養物質などを取り込むための膜輸送系に比べて、排出系そのものの研究が立ち遅れているのである。筆者たちは、ホルモンなどの生体制御に関する情報伝達物質の分泌など、さまざまな生理作用において異物排出蛋白系およびそのファミリーが重要な役割を担っているものと考えて研究を進めている。

異物排出蛋白における第二の問題は、「いかにして異物を異物として認識しているのか」という問題である。異物は本質的に不特定なものである。その排除のために1:1で排出輸送体を用意することは到底不可能である。実際、多剤排出蛋白と呼ばれる異物排出蛋白では、一種類の輸送担体が、非常に広範な化合物を異物として排除している。この問題の解明は、生物体の自己認識という問題とも関連していると思われるが、いずれにしても明確な解答を得るためには、基質認識部位の立体構造を解明せねばならない。

3. 異物排出蛋白立体構造解明に向かって

蛋白質立体構造解明のためには、X線結晶構造解析が現在のところ最も有効な方法である。ところが、周知のごとく、膜蛋白質の結晶化は大変難しい。すでに5000種類以上の蛋白質結晶構造がデータベースに登録されている時代において、膜蛋白で結晶構造が決定されたものは10指に満たないのが現状である。1985年に、光合成反応中心が膜蛋白として初めて結晶解析されて以来、次の膜蛋白が結晶構造解析されるまでには10年の歳月を必要とした。幸いにも、95年に呼吸鎖のcytochrome C oxidaseが構造解析されて以来、ポリリン蛋白、バクテリオロドプシン、cytochrome bc₁ complex、K⁺チャンネルなどが次々と構造解析されるようになった。それでも、異物排出蛋白を含む膜輸送体では、まだ結晶構造解析の報告例が一つもない。筆者たちも、本プロジェクトで、異物排出蛋白の3次元結晶のX線解析、2次元結晶の電顕解析に全力を挙げていることは言うまでもない。しかしながら、結晶解析の結果が出るまで分子構造に関する思考を停止してしまうわけ

にはいかない。筆者たちは、膜蛋白質立体構造を決定する別の道を模索し、一定の成果を上げている。それを今回は報告したい。

これまで結晶構造が決定された膜蛋白質の膜貫通部分は比較的単純な構造をしている。すなわち、膜を貫通する何本かの α ヘリクスが束ねられた構造である。ペプチド主鎖というのは意外に親水性の高いものであり、疎水的な膜を貫通するためには主鎖の水素結合を飽和する必要がある。 α ヘリクス構造は一本のペプチド鎖内部ですべての主鎖水素結合を飽和できる構造であるので、これが選ばれるであろう。とすれば、膜蛋白立体構造決定の第一段階は、膜貫通ヘリクスの精確な同定である。このために、私たちはシステイン残基とSH試薬の反応性が利用できることを示した。SH試薬の一つであるNEM(N-エチルマレイミド)は、細胞質膜を自由に透過するが、システインのSH基と反応するためには水分子を必要とする。したがって、システイン残基をあらかじめ変異によって取り除いた膜蛋白質の任意の位置に変異によってシステイン残基を導入し、NEMと反応するかどうかを調べることによってその位置が膜表面に露出しているか、疎水性内部に埋もれているかを検定することができる。このようにして、膜を貫通する部分と、表面に露出した部分を精確に同定することが可能になった^{2,3)}。この検定法を用いて、テトラサイクリン排出蛋白の構造を調べたところ、膜貫通領域の中に、NEMと反応できる位置、すなわち水分子が存在する部位がある事がわかった⁴⁾。おそらく、これらは基質の透過経路を構成しているのであろう。さらに膜不透過性のSH試薬で生菌体を前処理してからNEMと反応させることにより、システイン残基を導入した位置が膜の内側にあるか、外側にあるかを精密に決定できることも明らかになった⁵⁾。

次に、これらの膜貫通ヘリクスが膜面内でどのように配置しているかを決定する必要がある。これには、任意に2個のシステイン残基を導入し、酸化剤処理によりS-S架橋が架かるかどうかを検定することによって、ヘリクス間の距離を推定すればよい。この仕事はまだ継続中であるが、この結果、12本のヘリクスのうち、最初と最後のヘリクスの位置は互いに近いことが明らかになった。すなわち、12本のヘリクスはぐるっと輪上に一周して配置されているらしい。

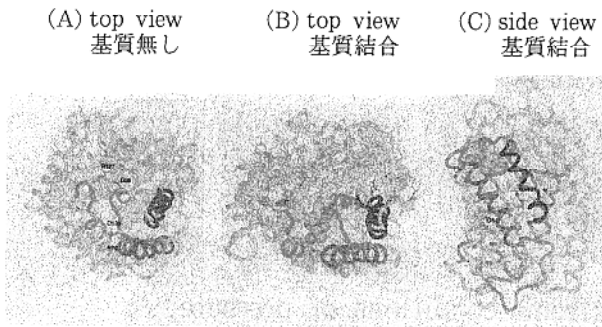


図1 テトラサイクリン排出蛋白の立体構造モデル。サントリー生物有機化学研究所石黒正路氏による。結合したテトラサイクリンは空間充填モデルで表示

そこで、この構造を基本にして、自由エネルギーが最小になる立体構造を計算によって求めたものが図1である。結合したテトラサイクリン分子が空間充填モデルとして示されている。テトラサイクリン分子が結合していない状態と比較すると、排出蛋白の細胞質側がcloseからopen状態へコンホメーション変化していることがわかる。また、側面から眺めると、細胞質側の基質入り口が、細胞質に向かってではなく、側面の脂質層の方に開口している。

このことは、異物認識構造を考える上でとても大事なことを示唆している。異物の認識は場の認識であるという説がある(図2)。生体に有用な物質はそ

れぞれ専用の膜輸送体を介して膜透過する。一方、異物はまず細胞膜の脂質二重層に溶け込む(異物分子の多くは分子の一部又は全部が疎水的である)。排出蛋白は、一部または全部が脂質層に溶け込んだ分子を認識して側面から取り込み、細胞の外側に排出するというのである。私たちが決定した膜貫通領域とヘリクスの配置に関する情報に立脚して計算によって求めた立体構造は、このようなモデルによって予想される構造と驚くほどよく一致していた。もとより、これはまだ推定構造であり、さらに精密な実験の追加によって検定することが必要であるが、今後の実験設計のためのワーキングモデルとして有用なものであるばかりでなく、阻害剤等のドラッグデザインのための出発点としても役立てたいと考えている。

なお、ここではMFS型アンチポーターに属するテトラサイクリンは移出蛋白をモデルとして示したが、細菌や動物細胞の多剤排出蛋白には同様の12回膜貫通構造を持つものが多く、それらの膜蛋白構造を考える上でのたたき台としても活用できるものと考えている。本プロジェクトはまだ始まったばかりであるが、異物は移出蛋白の分子構造を明らかにし、異物を認識する仕組みを解明するとともに、本来の生理的役割の解明に向けて役立てていきたいと考えている。

参考文献

- 1) 山口明人, 植田和光, 鈴木洋史, 杉山雄一, 石川智久: 特集 薬物輸送ポンプの分子生物学, 蛋白質核酸酵素 42, 1251-1295 (1997)
- 2) Kimura, T., Suzuki, M., Sawai, T., and Yamaguchi, A.: *Biochemistry* 35, 15896-15899, (1996)
- 3) Kimura, T., Suzuki, Y., Sawai, T., and Yamaguchi, A.: *J. Biol. Chem.* 273, 5243-5247 (1998)
- 4) Kimura-Someya, T., Iwaki, S. and Yamaguchi, A.: *J. Biol. Chem.* 273, in press (1998)
- 5) Kimura, T., Ohnuma, M., Sawai, T., and Yamaguchi, A.: *J. Biol. Chem.* 272, 580-585 (1997)

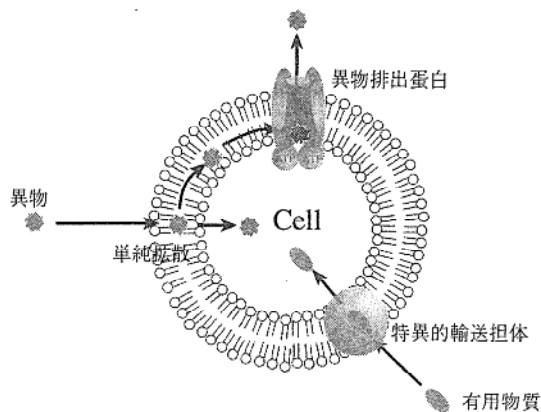


図2 異物の認識は場の認識; 有用物質は特異的担体によって輸送されるため脂質二重層に滞留しない。異物は脂質二重層を単純拡散によって透過。その間に薬剤排出蛋白に認識され排出される。