

薬剤排出蛋白質の形を見極める試み



研究ノート

名 田 茂 之*

Making an Attempt to See Drug Efflux Proteins

Key Words : transporter, tetracycline, water-filled channel, cysteine-scanning mutant

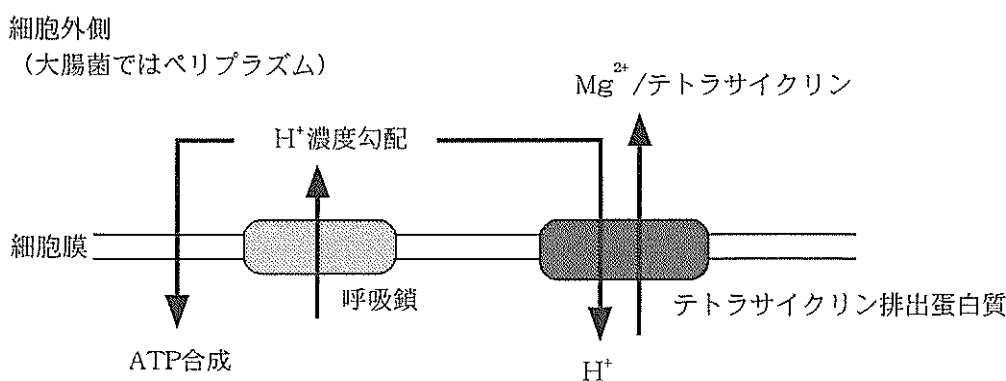


図 1 テトラサイクリン排出蛋白質の働き

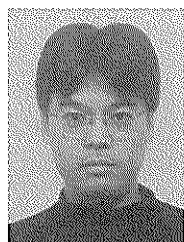
はじめに

抗生物質に対する耐性菌の出現は臨床の場において重要な問題となっています。とりわけ厄介なのが多剤耐性菌と呼ばれるもので、これは同時に複数の抗生物質に耐性となった菌です。例えばメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は病院内感染菌として誰でも一度はその名前を聞いたことがあるでしょう。これまでに病原菌がどのようにしてこのような能力を獲得するのが研究され、その結果この現象の多くが薬剤を病原菌細胞の外へ排出する排出蛋白質(トランスポーター)によることが解ってきました。多剤耐性をもたらす理由が排出蛋白質の基質特異性

の低さによると考えられ、それが化学構造的に似ていない複数種類の基質を認識できる理由であると想像されています。しかし現時点では排出蛋白質の三次元構造は解明されておらず、多様な基質の認識・輸送メカニズムについては殆ど解っていません。私たちは大腸菌のテトラサイクリン排出蛋白質をモデルとし、排出蛋白質の基質認識、輸送機構を分子レベルで解明すべく研究をはじめました。

テトラサイクリン排出蛋白質

テトラサイクリン排出蛋白質(クラスB)は、テトラサイクリンのみを特異的に排出するトランスポーターです。エネルギー源として呼吸鎖の働きによって形成されるH⁺濃度勾配を利用しており(図1)、Mg²⁺/テトラサイクリン(キレート体)を細胞外へと排出します。401アミノ酸からなり、その多くが疎水的な側鎖を持つアミノ酸です。この疎水的なアミノ酸部分が脂質二重層からなる細胞膜に埋め込まれるためには必須です。蛋白質全体で疎水的なアミノ酸がかたまっている場所が12ヶ所あり、そこが細胞膜に埋め込まれる部分(膜貫通領域)であると推定されています。さて、このように細胞膜に埋め

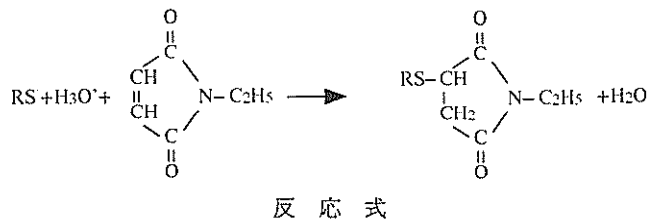


* Shigeyuki NADA
1966年 6月30日生
1989年大阪大学・工学部・醸酵工学科卒業
現在、大阪大学・産業科学研究所・生体情報制御学研究分野、助手、博士(理学)、細胞生物学
TEL 06-6879-8546
FAX 06-6879-8549
E-Mail nada@sanken.osaka-u.ac.jp

た状態で実際にテトラサイクリンが蛋白質のどの部分に結合するのか、分子ポンプとしてどのような形の変化がテトラサイクリンを細胞膜の内側から外側へ輸送することにつながるのか、これらは全く解かっていません。例えば、テトラサイクリンと結合した状態のテトラサイクリン排出蛋白質を大量に精製し、蛋白質の結晶を作ってX線結晶構造解析をすれば、これらの疑問を解明することができるでしょう。しかし、このような細胞膜に埋もれた膜蛋白質というのは大量精製が難しいうえに、結晶化も極めて困難であると言われています(私たちの経験でもあります)。そこで、生化学的手法で可能なかぎりテトラサイクリン排出蛋白質の立体構造にせまる方法を考えることにしました。

膜貫通領域の決定と親水性部位マッピング

12ヶ所の膜貫通領域が推定されていますが、実際に細胞膜に埋もれている領域がどの部分にあたるのかをシステインのSH基とマレイミド試薬の反応性をモニターすることによって調べることにしました。これは、システインのSH基の周りに水分子が存在する環境では、¹⁴C-N-ethylmaleimide(¹⁴C-NEM)がSH基と共有結合を形成するという性質を利用し



たものです(反応式)。加えてマレイミド試薬としてAMSを用いることにより、SH基が細胞膜の内側にあるのか、外側にあるのかを見分けることができます(図2)。さて、この方法を利用するには、調べたい部位がシステイン残基になっている必要があります。テトラサイクリン排出蛋白質にはもともと1個のシステイン残基がありますが、そのままではその一ヶ所しか調べることができません。そこで、テトラサイクリン排出蛋白質の遺伝子コードを操作し、401個あるアミノ酸のうち最初のメチオニン(これを変異させると蛋白質合成が始まらなくなる)を除く400ヶ所について順番にシステインを導入した変異体を作製しました。この一連のシステイン変異体を用いることにより、最初のメチオニン部位を除く全てのアミノ酸部位について、側鎖が親水的あるいは疎水的環境にあるのかを決定し、テトラサイクリン

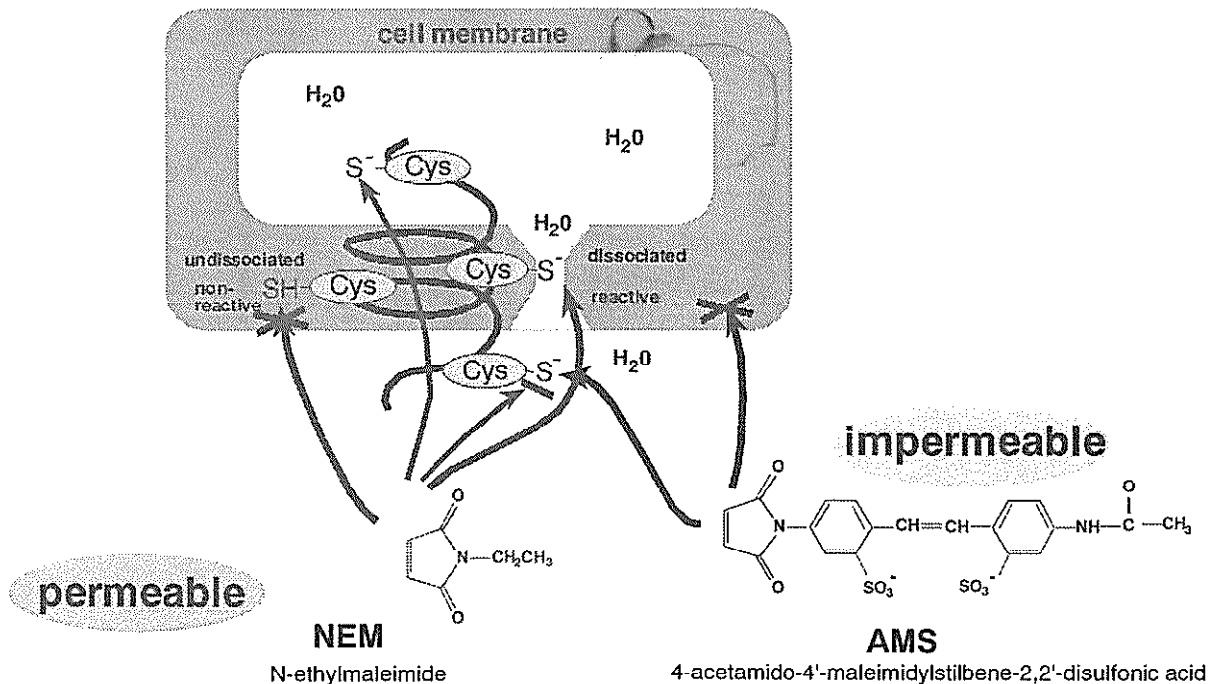


図2 膜透過性マレイミドと膜不透過性マレイミドによるトポロジー決定方法の原理
膜透過性マレイミドNEMは細胞膜の内外に関わらず、親水的環境にあるSH基と反応する。一方AMSは、細胞膜を透過することができないので、細胞外側からアクセスできる親水的なSH基にのみ反応する。

排出蛋白質の完全なトポロジーマップを作ることができました(図3)。

推定されていた12ヶ所の膜貫通領域は、多少のずれはあるものの、いずれも実際に疎水的環境、すなわち細胞膜に埋め込まれていることが実験的に示されました。しかしながら、膜貫通領域2, 5, 8, 11では、約半数のアミノ酸側鎖が親水的環境にあることも観察されました。ペプチドが細胞膜を貫通するときには、ペプチド主鎖が α -helixと呼ばれるコイル状の構造を取ることが知られています。コイル一巻きは約3.6個のアミノ酸からなり、各アミノ酸側鎖はこのコイルの外側に向けて突き出された状態となっています。膜貫通領域2, 5, 8, 11では、ほぼ2個のアミノ酸毎に親水的/疎水的であることから、これらの膜貫通領域は全体を通して細胞膜に埋もれつつも、一側面が水に面しているという結論に至りました。もちろんこのような膜貫通領域は一本あるだけでは理論的に成り立ちません。おそらく2, 5, 8, 11の4本の膜貫通領域の親水的側面が集合して水で満たされたトンネルを形成しているのでしょう。さらに膜貫通領域1, 7では細胞外側の半分に、膜貫通領域4, 10では細胞内側の半分に同様の親水性側面が見られ、結局膜貫通領域全体を通して6本の

α -helixによって1本の水トンネルができていると考えられるようになりました。

ところで、細胞膜に水溶性物質が通れる穴が開いているというのは、トランスポーターの機能を考えれば都合のいいものですが、そもそも細胞が生きていくうえでは非常に都合の悪いものでもあります。せっかく周りから集めた栄養分もエネルギーも、この穴を通して全て失われることになってしまうからです。テトラサイクリン排出蛋白質について、細胞の外側からAMSがアクセスできる水トンネルの深さを調べてみましたところ、各膜貫通領域のほぼ中央部分まではAMSが到達できましたが、それより奥へは入っていくことができないことがわかりました(図3)。やはり、テトラサイクリン排出蛋白質の水トンネルには狭まったところがあり、この水トンネルが水溶性物質を自由に通す単なる穴ではないことが示されました。

おわりに

以上の研究は、薬剤排出蛋白質の基質認識・輸送機構の解明を将来的な目標として、テトラサイクリン排出蛋白質の構造・機能相関を見極めようとしたものです。その後の研究で、水トンネルにはテトラ

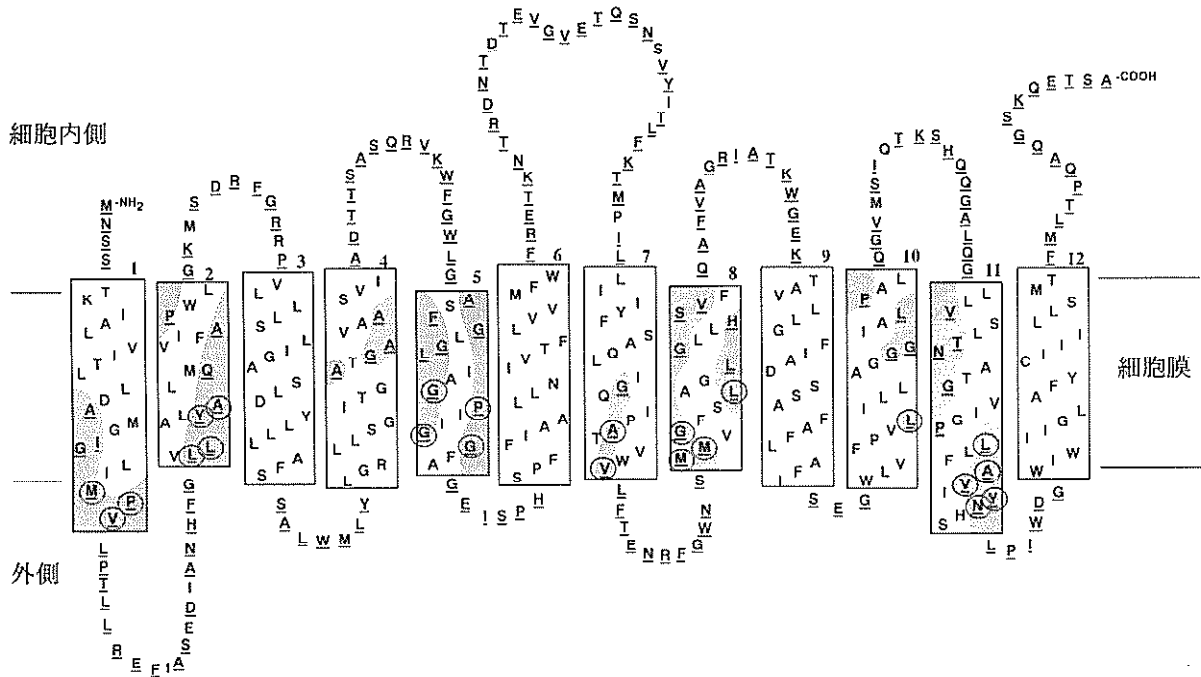


図3 テトラサイクリン排出蛋白質のトポロジーマップ
親水的環境にあるアミノ酸をアンダーラインで、膜貫通領域を四角で囲んで現わしている。膜貫通領域中のAMSでアクセス可能なアミノ酸部位を丸で囲み、親水的環境を灰色のバックグラウンドで示した。

サイクリンの結合部位があることが示され、今後は基質の認識機構についての研究も展開されるでしょう。また、2つシステインを導入した変異体を作製して分子内S-S結合を形成させることにより、各膜貫通領域の3次元的な配置を探っています。これらの研究は、トランスポーターの阻害剤開発などの応用面での展開も視野に入れたものでありますが、まだまだ地道な努力の積み重ねが必要なのが現状であります。ここで紹介しました成果は、私の研究室のポストであります山口明人先生が先頭にたって押し進めてきたものであります。ヒトからバクテリアまで様々な生物のゲノム情報が利用できるようになり、革新的な技術進歩の続く生物学研究の分野にあって、一つの遺伝子につき400個を越える変異体を作製することは余程の情熱なしには成し得ません。その結果として、X線結晶構造解析が極めて困難なトランスポーターであっても、生化学的な方法によりここまで詳細な構造解析が可能であったということ

も、私にとっては新たな発見でした。

参 考 文 献

- Iwaki S, Tamura N, Kimura-Someya T, Nada S, Yamaguchi A. (2000) Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segments 4 and 5 of the Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter reveals a permeability barrier in the middle of a transmembrane water-filled channel. *J Biol Chem.* 275, 22704-12.
- Kimura-Someya T, Iwaki S, Konishi S, Tamura N, Kubo Y, Yamaguchi A. (2000) Cysteine-scanning mutagenesis around transmembrane segments 1 and 11 and their flanking loop regions of Tn10-encoded metal-Tetracycline/H⁺ antiporter. *J Biol Chem.* 275, 18692-7.

