

生物による異物認識についての考察



随筆

山口 明人*

Essay for the recognition of xenobiotics with living organisms

Key Words : multidrug exporter, drug resistance, evolution, membrane transport

はじめに

私はこれまで異物排出タンパクの研究をしてきました。異物排出タンパクというのは、専門外の方には馴染みのない名前かもしれませんが、細菌から人間に至るまでほとんど全ての生物の細胞膜に存在する最も基礎的な膜タンパク質の一つです(図1)。何らかの原因で過剰産生されると多剤耐性菌感染症やがん細胞多剤耐性の原因となるため、一般には多剤排出タンパクという名称で知られています。しかし、薬を排出するために存在しているのではなく、細胞膜の静的透過障壁機能を補う能動的排出ポンプです。細胞膜の基本構造である脂質二重層は水溶性の物質に対しては効果的な障壁として働きますが、疎水性の物質や両親媒性の物質の侵入は防げません。そこで、疎水性や両親媒性物質に対しては能動的な汲み出しポンプを用意しているというわけです。細胞は静的、動的2つの障壁により外部の物質の侵入をまずシャットアウトした上で、必要なものだけを特異的な膜輸送体を介して取り入れているのです。

異物排出タンパクは、本来の機能として、化学構造には無関係に異物を排出しなければなりません。私の専門は大腸菌や緑膿菌などのグラム陰性細菌の異物排出タンパクですが、実際に排出される物質は非常に広範囲にわたっており、その間に化学構造上の共通構造を見つけることができません。分子生物

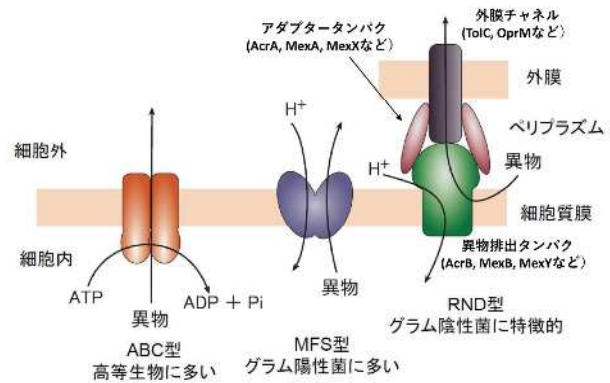


図1 異物排出タンパクの3類型

学的基本原理は鍵と鍵穴の関係に例えられるタンパク質の厳密な基質特異性です。異物排出タンパクはその原理に真っ向から逆らう存在と言えます。

生物による異物認識といえば、免疫を思い浮かべることでしょう。これは、厳密な基質特異性を持つ抗原抗体反応に基礎を置きつつ、遺伝子のシャッフルによって、抗体分子の千億通りにも及ぶバリエーションを作り出すことによって、予想される全ての抗原に対応しようという機構であり、高度で複雑な仕組みがあってはじめて可能になるシステムです。異物排出タンパクのように、単一のタンパクで、単細胞上で実現できるような仕組みではありません。では一体どうやって異物排出タンパクは本来的に無限定な「異物」を認識し排出しているのでしょうか。私が異物排出タンパクに興味を持って研究し始めた動機は純粋な好奇心でした。異物排出タンパク研究者の多くは、なんとかして病原細菌やがん細胞の多剤耐性を克服したいという使命感から研究に入られた方がほとんどなので、その点私は異分子だったかもしれません。

異物排出タンパクの基本構造

異物認識の原理を知るには、やはりタンパク質の



* Akihito YAMAGUCHI

1948年6月生まれ
 東京大学理学部生物化学科卒
 東京大学大学院薬学系研究科博士課程
 大阪大学産業科学研究所教授
 現在、大阪大学名誉教授
 大阪大学産業科学研究所 招聘教授
 TEL : 06-6879-8418
 FAX : 06-6879-8418
 E-mail : akihito@sanken.osaka-u.ac.jp

構造を知らねばなりません。阪大産研に着任して早々に、村上聡君、中島良介君という2人の優秀なX線結晶解析学者を仲間に加え、90年代末に細菌異物排出タンパク結晶構造解析研究に取り掛かった時、膜タンパク質の結晶解析はまだ緒についたばかりで、膜輸送タンパク質の構造はまだ一つも決まっていませんでした。私たちのグループも、約5年間、なんの研究成果もないという苦しい状態を経て、村上-中島ペアがついに大腸菌異物排出タンパク AcrB の結晶構造決定に成功し、2002年に *Nature* 誌に報告することができました。膜輸送体としてはじめての結晶構造決定で、著名な結晶学者の岩田想博士と膜輸送体研究の権威 Kaback 博士によるラクトース輸送体構造決定 (2003) よりも1年先んじることができました。

この構造によってわかったことは、異物排出タンパクは、細胞膜表層から側面開口部を通じて排出する基質を取り入れているということでした。疎水性や両親媒性の物質は細胞膜の脂質二重層に溶け込んで細胞内に侵入します。そこで、細胞内に溶け込んだ (溶け込もうとする) 状態の異物を、直接その場から輸送体に取り込み排出するというのは極めて合理的な仕組みと言えます。細胞膜の掃除機として働いているということが構造的に裏付けられました (図2)。

でも、この段階では、取り入れる基質をどうやって選別しているか (選別していないか) はまだわかりませんでした。基質結合型構造の決定に向けて努力を開始しましたが、これがまた極めて難しかった。共結晶を得ても、基質結合が見えないのです。やはり足掛け5年かかってようやく2006年に AcrB の基質結合型結晶構造を *Nature* 誌に報告することができました (図3)。異物排出タンパク基質結合構造のはじめての決定でした。この時決定したのは、ミノサイクリンとドキシソルピシンという2つの抗生物質との結合構造です。AcrB はホモ3量体ですが、基質が結合しているのはその中の一つだけで、他の2つには基質結合がありません。3つのモノマーの構造はそれぞれ異なっていて、基質結合モノマーは細胞膜表層開口部から基質結合部まで分子内チャンネルが通じており (inside open)、その隣のモノマーは開口部からのチャンネルが消えていて、結合部位 (だったところ) が収縮し、3量体頭頂開口部までのチ

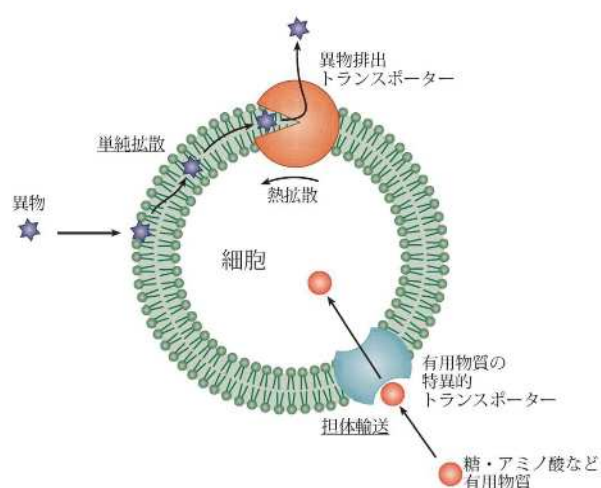


図2 異物排出タンパクは細胞膜の掃除機

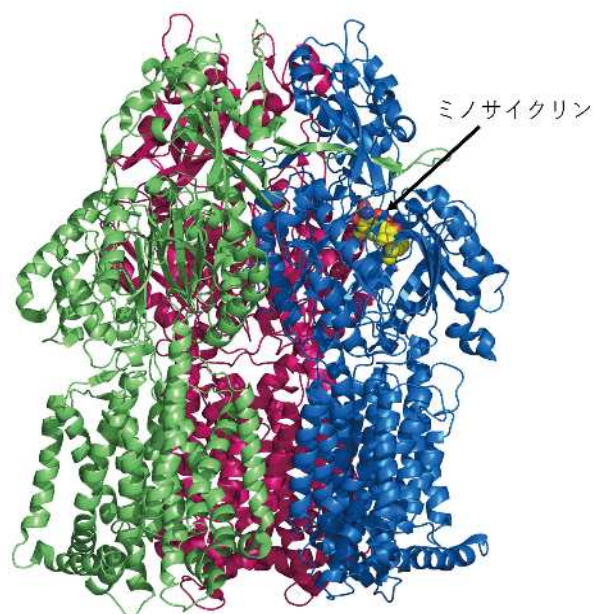


図3 異物排出タンパク AcrB の基質結合構造

ャネルが通じている (outside open) (排出モノマーと命名)。3つ目は基本的に結合モノマーと似た構造だが、基質結合部位がまだ収縮している (待機モノマーと命名)。つまり、それぞれのモノマーが交互に待機→結合→排出という構造変化を繰り返すことで排出輸送が行われるという機能的回転輸送機構が明らかになりました (図4)。

タンパク質が構造の異なる多数の基質を認識する方法として考えられるのは、結合部位の構造を柔軟に変えて基質の構造に合わせる induced-fit です。ところが、ミノサイクリンとドキシソルピシンの結合構造を比較すると、タンパク質側の構造にはほとん

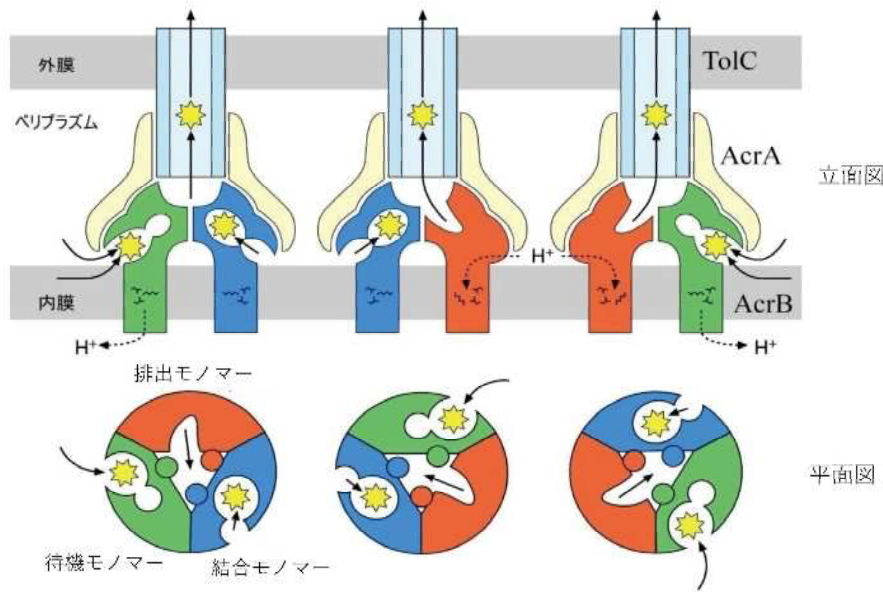


図4 機能的回転輸送機構

ど違いはありませんでした。ミノサイクリンとドキシソルピシンの結合位置は部分的にしかオーバーラップしておらず、空間的に余裕のある基質結合ポケットの中でそれぞれ違う部位で認識されていることがわかりました。基質の異なる部分構造を認識する複数の部位の組み合わせで多数の構造の異なる基質が認識される「マルチサイト結合」が多剤認識の基礎ではないかと示唆されました。

全てにマルチな異物排出タンパク

ここまでの研究を主導してくれた村上聡君が東工大教授として栄転し、新たに櫻井啓介君が加わって、中島良介君を中心に構造グループを再編成しました。新しいグループで、マルチサイト結合が本当に多剤認識の基礎なのかどうかを確かめるため、さらに様々な基質との結合構造を決める研究に進進しました。ところが、案に相違してこれがほとんど決まらない。いくら共結晶を作っても、結合位置に基質が特定できないのです。ようやく、2011年になってエリスロマイシンとリファンピシンという2つの大分子量抗菌薬の結合構造が決まり *Nature* 誌に報告できました。決まった構造を眺めてびっくり。結合モノマーには基質がない。基質は待機モノマーに結合していました。結合位置は分子内チャンネルのより基質入り口に近いところに位置していました。そこで、入り口に近い結合ポケットを近位ポケット (proximal

pocket PBP)、奥の方のポケットを遠位ポケット (distal pocket DBP) と名付けました (図5)。両ポケットの間には後にスイッチンググループ (SL) と名付けられた β ターン構造が仕切りとなっていて、これが待機→結合への構造変化の際に前後にスイングすることで基質の送り出しを助けています。PBPとDBPは交互に膨張と収縮を繰り返すという蠕動運動 (peristaltic motion) により基質を送っていることが明らかになりました。

でも、結合モノマーで基質が消えてしまえば、排出できません。これをどう考えるか、最初は頭を抱えてしまいましたが、よく考えると、PBPに結合した基質は分子量が大きいので、一旦蠕動運動でDBPに送られてしまうと、DBPの中では特定位置に結合していなくてももう戻ることができない。すなわちDBPの中では単なる囲われ状態 (occluded form) として存在しているだけ。これだと、X線解析では電子雲として観察されません。その後、ドイツのグループが、ドキシソルピシンは結合モノマーのDBPに結合する以外に、待機モノマーのPBPにも2箇所結合しているということを報告し、マルチサイト結合というのがいよいよ確からしくなりました。実際には同時に何箇所にも結合しているのではなくて、一つの基質が結合ポケットの中の結合サイトの間を振動しているということなので、X線解析で電子雲が薄くなり、ドキシソルピシンは当初PBP

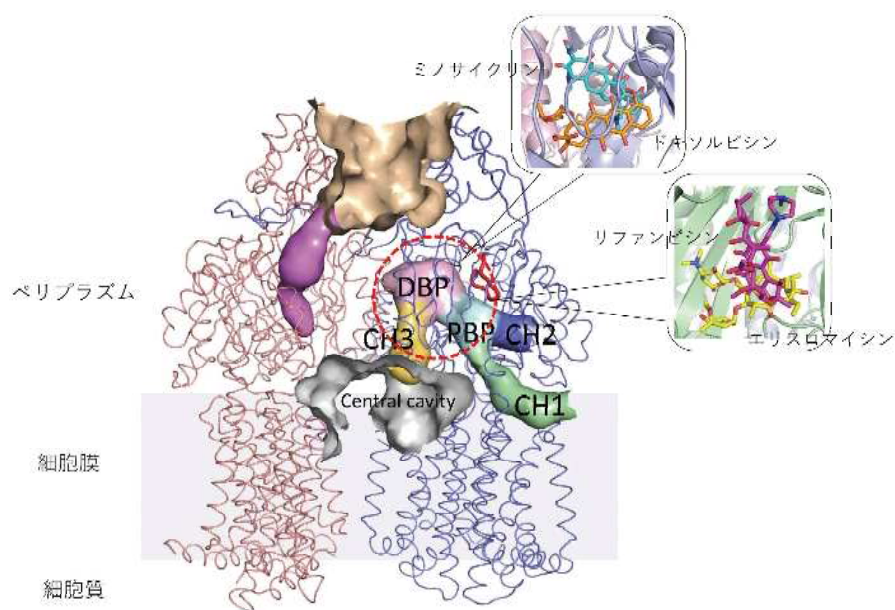


図5 マルチエントランス・マルチポケット・マルチサイト結合
この図では結合・排出モノマーのみを表示。リファンピシン、エリスロマイシンが結合しているのは待機モノマーですが、ここでは便宜的に結合モノマーのPBPの位置に示している。

では特定できなかったわけです。すなわち、多剤認識は multisite-oscillation 結合であるということですね。

その後、中島良介君のグループが大分子量界面活性剤 LMNG の結合構造を決めました。これは本年、2019年の *Scientific Report* 誌に報告されましたが、これも驚いたことに、大分子量であるにも関わらず結合モノマーの DBP に結合していました。これは大きいですから、DBP ポケット全体を占拠していましたが、基質分子の大きさ自体は結合ポケットを決める決定的な要素ではないということがわかりました。

さらに、基質結合ポケットがマルチであったばかりでなく、基質の入り口もマルチだということがわかりました (図5)。内部チャネルの開口部は細胞膜表層 (CH1) 以外に、ペリプラズム (CH2) と排出タンパク3量体中央空洞 (CH3) の3箇所に開口していたのです。その後、オランダから阪大大学院に留学してきていたマーティン・ズオーマー君が詳しく研究したところ、CH1とCH2はPBPで合流し、CH3はDBPに直接接続していることがわかりました。しかも、排出される基質によってどの開口部を通るかに違いがあったのです。まだすべて解明されたわけではありませんが、DNAにインターカレートする

ことで細胞内に蓄積する性質のあるエチプロ (EtBr) の類いはCH3を通ることで細胞内から細胞外へ直接排出される、βラクタム薬のようにペリプラズムに作用点のある薬剤はCH2を通してペリプラズムから取り入れられ排出される (periport)、両親媒性の薬剤は細胞膜を通して、侵入しようとする直前にCH1から排出される (membrane vacuum cleaner)、という基質の物理的性質に応じた3つの入り口が用意されているということです。この成果は昨年 (2018)、*Nature Communication* 誌に発表されました。すなわち、異物排出タンパクはマルチエントランス・マルチポケット・マルチサイト結合という全てにマルチな、物理的性質と化学構造式の大きく異なる化合物に対応した形態を備えた排出輸送体であることが明らかになりました。

それでも特異的な異物排出タンパク

異物排出タンパクは幅広い基質を結合・排出しますが、阻害剤に対しては厳密な特異性があります。ピリドピリミジン誘導体 ABI-PP は、大腸菌の AcrB、緑膿菌の MexB を阻害しますが、緑膿菌の MexY を阻害しません。中島君のグループは2013年に、初めて異物排出タンパクとその阻害剤の結合構造を決めることに成功しました (*Nature* 2013)。DBP

の中に極めて疎水的なピットがあって、ABI-PP分子の疎水的な官能基が挿入され強固に結合することで排出活性を阻害していました。MexYではピット中央にトリプトファン残基が突出しており、立体障害でABI-PP分子の挿入ができず、阻害されないこともわかりました。異物排出タンパクは、特定の位置に強く結合する分子に対しては厳密な特異性を示すということです。

先に述べた、LMNGですが、実はこの分子の官能基の一つもこの阻害剤結合ピットに挿入されています。そのため、LMNGも弱いながら阻害剤としても働くのですが、MexBのピットのフェニルアラニン残基をトリプトファンに変えた変異MexBでは、LMNGの官能基がピットに挿入できません。それでもDBPには結合しており、LMNGは変異MexBによって排出されますが、阻害能はなくなっていました。これは、排出される基質の認識にかなりの融通が利くということと、阻害能には厳密な特異性が必要ということを示証するものです。

異物排出タンパクの進化

異物排出タンパクは下等なものから高等なものまで様々な生物に普遍的に存在します。では、進化によって、異物排出タンパクの基質認識にはどのような変化が生じたのでしょうか。普通に考えれば、進化によって認識できる異物の範囲が広がったのではないかと思います。前出のマーティン君はこの疑問に答えるべく、インフルエンザ菌と大腸菌のAcrBを比較してみました。どちらも同じAcrBと命名されていますが、大腸菌のAcrBは進化的に新しいグループに属し、インフルエンザ菌のAcrBは古いグループに属します。さて、排出される基質の範囲を比較すると、大きな差がないのです!! 進化によって基質特異性が広がったという事実はない。では何も違いがないのかというと、違いはありました。大腸菌のAcrBは、自分の生育環境である大腸に多く存在する生育阻害物質である胆汁酸の排出能力がインフルエンザ菌よりもはるかに強力になっていました。つまり、自分の生育環境に合わせて、進化により特定の基質の排出能力が強化されていたということです。

さらに大きな違いは、インフルエンザ菌のAcrBはABI-PPによって阻害されませんでした。ピット

の構造を見ると、大腸菌ではフェニルアラニン残基が集中していて極めて疎水的なのですが、インフルエンザ菌ではピットにフェニルアラニン残基が一つしかなく、疎水的ではありませんでした。ABI-PPによって阻害されるようになることが大腸菌の生育にとって有利であるかどうかはなんとも言えませんが、進化により特異的認識が強化されたことによる副次的な結果であるとは言えます。

このことは一体何を意味しているのでしょうか。異物排出タンパクが細胞膜の動的異物侵入阻止を担う必須な装置であるためには、異物全般を認識できなければ役に立たない。異物の認識は進化によって後天的に獲得したものではなく、初めから組み込まれていたということです。マルチサイト結合が多様な薬物を認識する基本原理ではないかと言いましたが、これは、特定の薬物に対して強化された認識構造だけを見ていたのかもしれない。実は、結合位置が特定された薬物・基質は、異物排出タンパクの構造が決められてからもう20年近くになるのにまだ10指に満たないのです。私たちは、将来必ず結合構造が決められると思って研究してきたわけですけど、実は、異物排出タンパクの本来の基質認識の方法は、結合ではないのかもしれない。多様な入り口から物理的性質の異なる化合物を特に認識せずに取り入れ排出する。結合ポケットの中では、単なる囲われ状態 (occluded form)、あるいは緩やかな複数の結合サイト (というより粘着サイト?) の間を振動 (oscillation) しながら緩やかに保持されているだけ。ポケットの蠕動運動によって順繰りに送られていくことで結果的に排出される。グルコースやアミノ酸が排出されないのは、物理的性質が異物排出タンパクの入り口に近づけさせないのか、または、強力な特異的取り込み系が、排出されないうちに細胞内に取り込んでしまうのか、その両方が働いているということでしょう。

おわりに

異物認識の原理を求めて、異物排出タンパクの異物結合構造の決定に懸命に努力してきた果てに、じつは結合なんかしてなかったのかもしれないという結論に至る。なんともはや切ない結論ですが、人間の浅知恵にとって摩訶不思議な「化学構造式に全く共通点のない異物を一体どうやって全て認識して排

出できるのか」という命題を、生物はその発生の当初からいとも易々と解決していた。「認識しない」という解決方法を。生物とはじつに奥深いものです。

参考文献

1. 山口明人：異物排出蛋白質—すべてがマルチなマルチドラッグ排出蛋白質、*医学の歩み* Vol.267 No.13, 1123-1129 (2018)
2. Zwama, M. and Yamaguchi A.: Molecular mechanisms of AcrB-mediated multidrug export. *Res. Microbiol.* 169, 372-383 (2018)
3. Zwama M et al: Multiple entry pathways within the efflux transporter AcrB contribute to multidrug recognition. *Nature Commun.* 9, 124 (2018)
4. Yamaguchi A. et al: Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb, 2015.00327 (2015)
5. Nakashima R. et al: Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature* 500, 120-126 (2013)
6. Nakashima R. et al: Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature* 480, 565-569 (2011)
7. Murakami S. et al: Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443, 173-179 (2006)
8. Murakami S. et al: Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587-593 (2002)

