

## トピックス

## 大腸菌多剤排出トランスポーター AcrB の X 線結晶構造解析

村上 聡<sup>1,2,4</sup>, 中島良介<sup>1</sup>, 山下栄樹<sup>3</sup>, 山口明人<sup>1,4</sup><sup>1</sup>大阪大学・産業科学研究所, <sup>2</sup>科技団・さきがけ,  
<sup>3</sup>大阪大学・蛋白質研究所, <sup>4</sup>科技団・CREST

## Crystal Structure of Bacterial Multi-drug Efflux Transporter AcrB

Satoshi MURAKAMI<sup>1,2,4</sup>, Ryosuke NAKASHIMA<sup>1</sup>, Eiki YAMASHITA<sup>3</sup> and Akihito YAMAGUCHI<sup>1,4</sup><sup>1</sup>Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University,<sup>2</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Corporation,<sup>3</sup>Institute for Protein Research, Osaka University,<sup>4</sup>CREST, Japan Science and Technology Corporation

## Abstract

Multi-drug resistance of pathogenic bacteria often results from the over-expression of the multi-drug efflux system. AcrB is a major multi-drug efflux transporter protein in *E. coli* that exports wide variety of drugs, antibiotics and toxic compounds. It cooperates with a membrane fusion protein, AcrA, and an outer membrane channel, TolC. We have solved the crystal structure of AcrB at 3.5 Å resolution. This is the first crystal structure of drug transporter and also the first atomic-level structure of a secondary transporter which driven by proton motive force across the plasma membrane. Three AcrB monomers are organized as a trimer. Each monomer is composed of 12 trans-membrane  $\alpha$ -helices and a 70 Å protruding hydrophilic region in periplasmic space. There is a funnel like opening at the top of trimer, where TolC might be dock directly into AcrB. A pore, which comprised by three  $\alpha$ -helices from each protomer, exists at the end of the bottom of the funnel. It is connected to the central cavity at the very center of the AcrB molecule. The cavity has three vestibules between each protomers, which lead into periplasm. The structure implies that substrates translocated from the cell interior through the transmembrane region and from the periplasm through the vestibules are collected in the central cavity and then actively transported through the pore into the TolC tunnel.

## 1. はじめに：ポンプ・チャンネル・トランスポーター

細胞膜を介した物質輸送をつかさどる膜タンパク質の御三家として、ポンプ、チャンネル、そしてトランスポーターを挙げることができる。ポンプとチャンネルがイオンを輸送するのに対して、トランスポーターは糖、アミノ酸、ビタミン、脂質、薬剤など、イオンに比べて大きな“分子”を輸送する。またチャンネルが、受動的な輸送（促進拡散）であることに対して、ポンプとトランスポーターはATPの加水分解エネルギーや、プロトン濃度勾配などのエネルギーを用いた能動輸送を行う。トランスポーターのうち、呼吸鎖などのタンパク質により形成されたプロトン濃度勾配や、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ により形成された $\text{Na}^+$ イオン濃度勾配などを利用して能動輸送を行うトランスポーターを二次性トランスポーター（共役輸送系）と呼ぶ。そのうち、イオンの流入と輸送する基質の方向が同じものをシンポーター、逆のものをアンチポーターと呼ぶ。また、ATP加水分解のエネルギーを利用するABC型（ATP-Binding Cassette；ATP結合部位を有する）トランスポーターは、二次性トランスポーターとは異なり単一の基質のみを輸送するので、ユニポーターとよぶ。

## 2. 序論：薬が効かない?!

近年臨床の場に於いて、薬が効かない病原性細菌による感染症が大きな問題となっている。通常感染症では、セフェム系薬剤とペニシリン系薬剤の二剤が奏効してきた。しかし耐性肺炎桿菌や耐性緑膿菌といった複数種の薬剤（多剤）に対して抵抗性を示す多剤耐性菌（単に耐性菌と

も呼ぶ）が出現し、今までは薬が効果を発揮してきた臨床例でさえ、時として危険な状態に陥ることがある。この多剤耐性菌は院内感染や市中感染などで広がりを見せ、今や感染症の数割から半数以上が耐性菌によるものであるとも言われている。この耐性化の重要な要因は、薬剤排出タンパク質の過剰発現によるものであることが知られている<sup>1,2)</sup>。排出タンパク質群の働きにより、薬剤が細胞内の作用点に達する前に菌体内から排出されてしまい効力が失われる。また末期癌や再発癌に見られる抗癌剤耐性も、この多剤排出タンパク質による化学療法剤排出によることが判っている。近年細菌類を始め、多くの生物のゲノム配列が解析されているが、驚くべきことに多剤排出タンパク質遺伝子は原核生物からヒトに至るまで広く分布していることが判ってきた<sup>3)</sup>。大腸菌では、37種もの薬剤排出タンパク質遺伝子が存在することが予想されている。これらは全てが発現しているわけではなく、様々な因子により誘導され、薬剤耐性化することが判ってきた。しかし、大腸菌の持つ主要な多剤排出系として知られるAcrAB-TolC系は、大腸菌体内で常に発現しており、その自然抵抗性の主因であることはゲノム解析以前から知られていた<sup>4)</sup>。この系はResistance-Nodulation-Cell Division (RND)型と呼ばれるファミリーに属し<sup>5)</sup>、ポリトピック型膜タンパク質でトランスポーター本体であるAcrBと、膜融合タンパク質 (Membrane Fusion Protein)<sup>6)</sup>であるAcrA、外膜貫通チャンネルTolC<sup>7)</sup>と三者複合体を形成し機能している<sup>8,9)</sup>。

AcrBは、膜を介したプロトン濃度勾配をエネルギー源として、化学構造や静電的特徴が異なる色素系毒素、界面

活性剤や多くの脂溶性抗生物質など多種多様な薬剤を能動的に排出する、二次性のアンチポーター型トランスポーターである<sup>10,11)</sup>。これは1049アミノ酸残基からなり、12回の膜貫通 $\alpha$ ヘリックスと、2つのペリプラズム側へ突出した親水性領域から構成されている<sup>12)</sup>。AcrAは光散乱による知見から細長い分子であると推定されており、細胞内膜と外膜とを繋ぐか、あるいは融合させると推定されている<sup>13,14)</sup>。基質が結合することによってAcrAB複合体はTolCを誘引し一時的に三者複合体をつくり、両方の膜を貫通するような大きな排出機構を形成すると考えられている。TolCの結晶構造は2000年ケンブリッジ大学のKoronakisらによって解明されたが<sup>15)</sup>、それによると、TolCは、40 Åの厚みを持つ $\beta$ バレルからなる外膜貫通チャンネル部分と100 Åもペリプラズムにつきだした $\alpha$ ヘリックスの束からなるトンネル構造がつながった大きな筒状の構造をしていた。

AcrBの類似タンパク質はグラム陰性細菌だけではなくグラム陽性細菌にも存在し、広く微生物の薬剤耐性を付与している<sup>5,16)</sup>。そればかりか真核細胞でも、生理学的に重

要な役割を果たすRND型膜輸送タンパク質が存在する。それは、リソソーム内にコレステロール蓄積をひきおこす遺伝性疾患Niemann-Pick病の原因タンパク質Niemann-Pick C1である。これはエンドソーム、リソソームからの脂肪酸透過を行うタンパク質と同定された<sup>17)</sup>。

近年、膜を介して物質輸送を行う膜タンパク質のうち、 $K^+$ チャンネル<sup>18)</sup>や、 $Ca^{++}$ ポンプ<sup>19)</sup>の構造が相次いで高分解能で構造解析された。いわゆるトランスポーターとしては、脂質をフリップ・フロップにより輸送するABC型タンパク質であるMsbA<sup>20)</sup>や、ビタミンB12を細胞内に取り込むABC型トランスポーターであるBtuCD<sup>21)</sup>の構造も報告された。しかし、膜輸送タンパク質の中でもっとも大きなグループである、プロトン共役型二次性トランスポーターの高分解能構造はまだ得られていなかった。また、薬剤排出トランスポーター遺伝子発現に関わる多剤結合タンパク質である、BmrR (トランスポーターBmrの制御タンパク質)<sup>22)</sup>やQacR (トランスポーターQacAの制御タンパク質)<sup>23)</sup>の立体構造などは解析されているものの、膜タンパク質である排出トランスポーター本体の構造

Table 1. Data collection and crystallographic analysis

	Native	Derivatives			
		K <sub>2</sub> HgI <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>	OsCl <sub>3</sub>	Se-Met
Space group	R32	R32	R32	R32	R32
Wavelength (Å)	0.9000	0.9000	0.9000	0.9000	0.9795
Resolution (Å)	3.5 (3.63–3.5)	4.3 (4.45–4.3)	4.3 (4.45–4.3)	4.4 (4.56–4.4)	5.0 (5.1–5.0)
Observed reflections	198,425 (13,165)	102,662 (9,465)	87,755 (7,482)	96,176 (9,107)	131,081 (3,590)
Independent reflections	26,406 (2,584)	14,401 (1,406)	13,908 (1,393)	13,510 (1,338)	8,109 (720)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	11.5 (2.6)	6.6 (5.4)	10 (6.5)	8.2 (5.0)	12.7 (6.9)
Averaged redundancy	7.5 (5.1)	7.1 (6.7)	6.3 (5.3)	7.1 (6.8)	16.2 (5.0)
Completeness	98.8 (98.6)	99.7 (100)	94.9 (95.8)	99.3 (100)	87.9 (78.7)
Rmerge	9.0 (36.5)	12 (30)	10.8 (24.6)	11.1 (39.2)	14.2 (33.2)
Riso		14.5	17.2	28.9	16.9
Rcullis		0.81	0.86	0.83	0.96
Phasing Power		0.53	0.43	0.54	0.28
Overall figure of merit	0.32				
Refinement					
Resolution range (Å)	8.0–3.5				
R factor (%)	29.0				
Rfree (%)	35.5				
Bond length (Å)	0.0032				
Bond angles (°)	0.867				
Average B-factor for main-chain atoms (Å <sup>2</sup> )	95				
Average B-factor for side-chain atoms (Å <sup>2</sup> )	117				

全てのデータは大型放射光施設 SPring-8, 大阪大学たんぱく質研究所超分子複合体解析ビームライン BL44XU で100 K で収集した。

解析はおろか、結晶化の報告さえも無かった。

我々は2002年、大腸菌多剤排出トランスポーター AcrB の結晶構造を明らかにした<sup>24,25)</sup>、これは多剤排出トランスポーターとしてだけでなく、二次性トランスポーターとしても世界で初めての結晶構造解析例である。

### 3. 構造決定

構造決定は水銀、白金、オスmiumによる置換体結晶を用いた多重同型置換法 (MIR 法) により行った。初期位相は4.5 Å 分解能で計算し、その後溶媒平滑化等<sup>26)</sup>による位相拡張で3.5 Å 分解能の電子密度図を得た。最初はセレノメチオニンによる多波長異常散乱法 (MAD 法) による位相決定を試みたが、分解能が低かったためか、この方法では残念ながら位相を決めることが出来ず、MIR を行った。3.5 Å 分解能での原子モデリングは困難であったが、MIR による位相決定後、セレノメチオニン誘導体中のセレノ原子42個 (非対称単位中) のうち38個が差フーリエで確認でき、メチオニン残基の位置やトリプトファンなどの嵩高い側鎖の位置を基に確信を持って原子モデルを組む

ことができた。またモノマー内の二回対称性もまた原子モデルを組む際の助けとなった。AcrB は1049個のアミノ酸残基からなるが、N 末端や C 末端の他に、大きく揺らいているループ部分を除き、1006個の側鎖のモデル構築に成功した。構造精密化後の R 値は29%、Rfree 値は35%であった (Table 1)。

#### 3.1 全体構造

AcrB は1049アミノ酸残基から成る単量体が三個絡み合った三量体タンパク質であった (Fig. 1)。三量体は、膜と垂直な三回対称軸を持ち、全体としてはクラゲのような形をしていた。ペリプラズムにある親水性部分であるクラゲの頭と、膜貫通部分を形成しているクラゲの足の部分から成り、各々70 Å と50 Å の厚さを持つ。親水性部分および膜貫通部分の最大径は、各々100 Å、80 Å である。親水性頭部は横から見ると台形をしており、さらに上下二層に分かれている。TolC は結晶構造よりペリプラズムに100 Å 突き出ていることがわかっており<sup>15)</sup>、ペリプラズム側に突き出ている AcrB と合わせると170 Å であり、ペリプラズム空間を横切るのに十分な長さを持つ (Fig. 6A)。

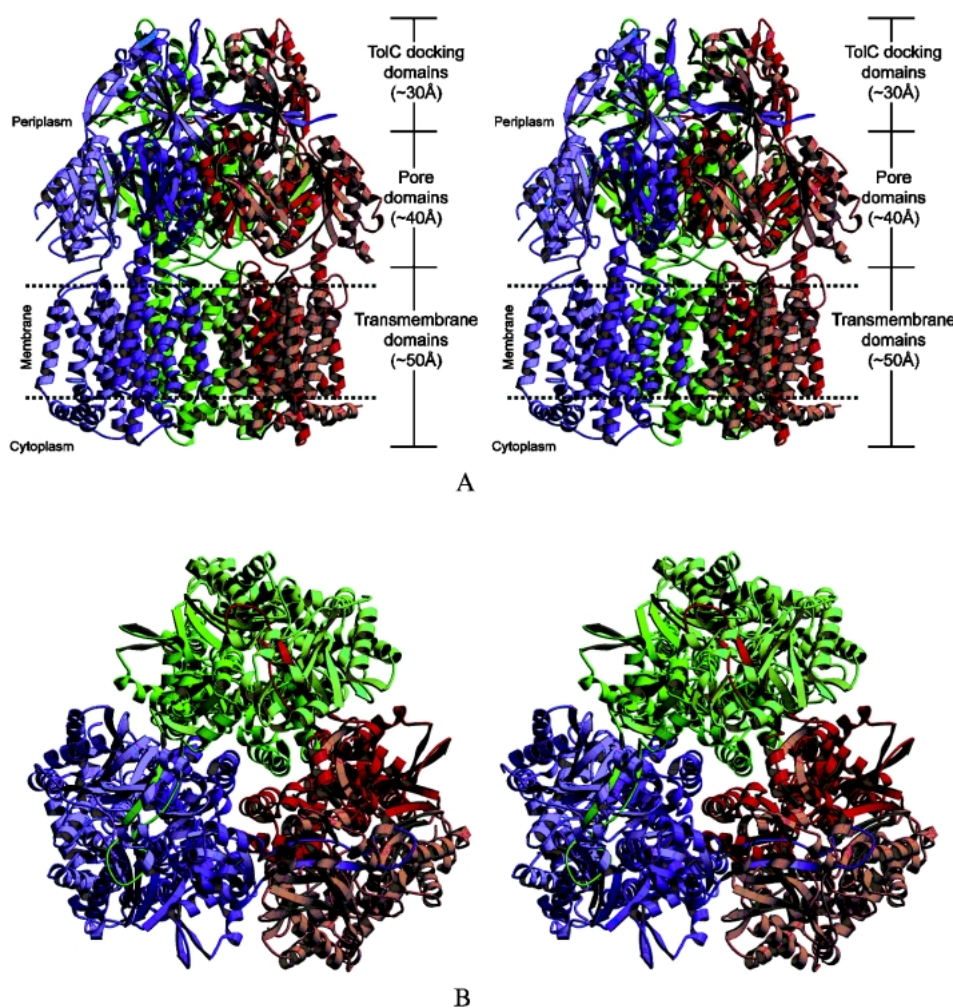


Figure 1. Whole structure of AcrB trimer. A, Side view B, Upper view.

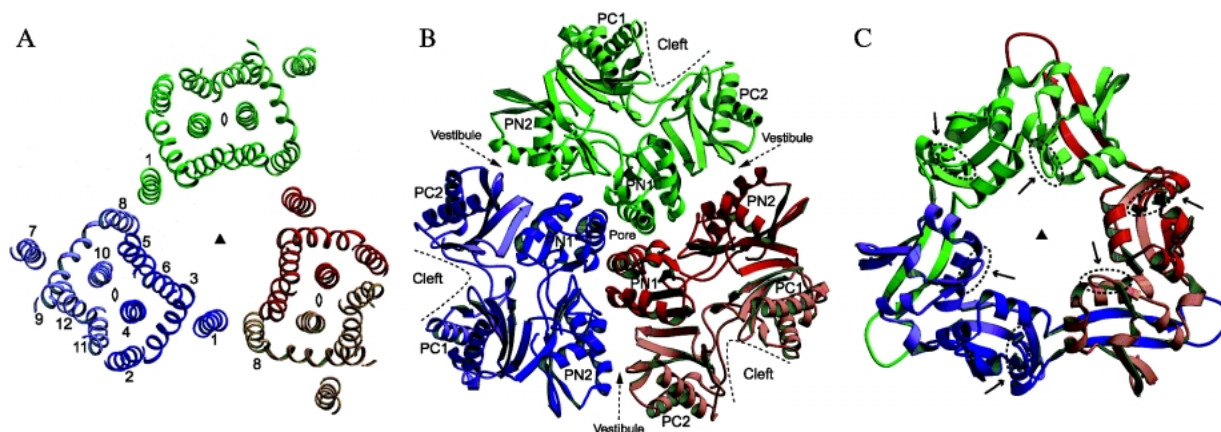


Figure 2. Cut view of AcrB trimer. A, Transmembrane domain B, Pore domains C, TolC docking domain.

またロート状に開口している AcrB 分子頂上部の直径と TolC 底部の直径とはほぼ等しい<sup>15)</sup>。これらのことより、AcrB と TolC は直接結合することが示唆され、そのため、ペリプラズム上層ドメインを TolC 結合ドメインと名付けた。

親水性頭部の下層には、3つの $\alpha$ ヘリックスからなるポアが存在した。このポアは、三量体各々から一本ずつ $\alpha$ ヘリックスを出しあって形成されている。ポアは TolC 結合ドメインにあるロート状開口部の底と連結しており、またポアの下端は細胞膜の界面近くに存在する中央腔の天井まで続いている。今回得られた結晶構造では結合基質が存在しないためか、このポアは閉じていた。ポアの存在するこのペリプラズム下層ドメインをポアドメインと名付けた。

TolC 結合ドメインとポアドメインの界面付近には非常に長い (~35 Å) 特徴あるヘアピン構造が存在する。この構造は各々のプロトマーからつきだして、隣のプロトマーに差し込まれていた。この相互の絡み合い構造により、AcrB 分子の三量体形成を強固なものにしている (Fig. 1B)。

水溶性部分とは対照的に、膜貫通部分の各々のプロトマーは緩くパッキングしていた。3つの膜貫通ドメインプロトマーは中心に直径約30 Åの穴を持つリング状の構造をしていた (Fig. 2A)。この穴は膜を横切り、さらにペリプラズム部分の下側まで達している。もしここが水で満たされているチャンネルであるとすれば、AcrB は膜に30 Åもの穴を空けてしまい、イオン濃度勾配などを破壊する脱共役剤として働くことになり、細胞死を招くことになる。分解能による限界で結晶構造中にリン脂質を観察することはできなかったが、膜貫通部分に存在するこの穴にはおそらくリン脂質が満たされているに違いないと考えている。

### 3.2 膜貫通部分の構造

多くのトランスポーターがそうであるように、膜貫通ド

メインの各プロトマーは12本の膜貫通 $\alpha$ ヘリックスからなる (Fig. 2A)。膜貫通ドメインでのプロトマー間相互作用は、TM1 と TM8 の間のみ局在していた。TM4 と TM10は比較的長く、細胞質側に突出していた。これらは12本のヘリックスの束の中心に位置し、他はそれらを取り囲むような形に存在した。いくつかの例外を除くとN末端側とC末端側は偽対称の関係にあることがよくわかる。TM2もまた長いヘリックスで、膜の境界を横切りペリプラズム側に伸びていた (Fig. 3B)。一方、TM2と対称の関係にあるTM8のペリプラズム側も、どうやら伸びているようではあるものの、非常に温度因子が高く、電子密度が不明瞭な箇所が多かった。ここは、膜貫通部分で捉えられたプロトン濃度勾配エネルギーによる構造変化を水溶性頭部に伝達するなど、動きに富んだ機能上重要な部分ではないかと考えている。AcrBを含む12回膜貫通型トランスポーターは元来6回貫通型のトランスポーターが遺伝子重複により倍の12回貫通型になったと考えられている。遺伝子配列や一次構造だけでなく立体構造もN末端側半分とC末端側半分が対称的であることが今回初めて明らかになった。N末端側半分とC末端側半分との重ね合わせのRMSは2.4 Å程度であり極めて良く重なる。これらが、対称性の例外となる細胞膜の細胞質側に平行に存在するヘリックスI $\alpha$ で繋がっている。

緑膿菌のもつ相同体タンパク質である MexB<sup>27)</sup>や AcrB の部位特異的変異導入実験の結果、膜貫通部分には機能上極めて重要な3つの電荷性機能残基が存在することが知られている<sup>14)</sup>。Asp407, Asp408, そして Lys940である。これらが他のアミノ酸に置き換わった変異体は薬物耐性化能をほぼ完全に失う。これらの残基はTM4とTM10の中程に存在することが構造から明らかになり、塩基対を形成しているようである。これらはプロトン透過経路の重要な部分であることが示唆される (Fig. 4)。膜貫通部分に存在する荷電性アミノ酸のうち、近縁種のタンパク質間で保存性が高いものを全て、部位特異的変異導入により、

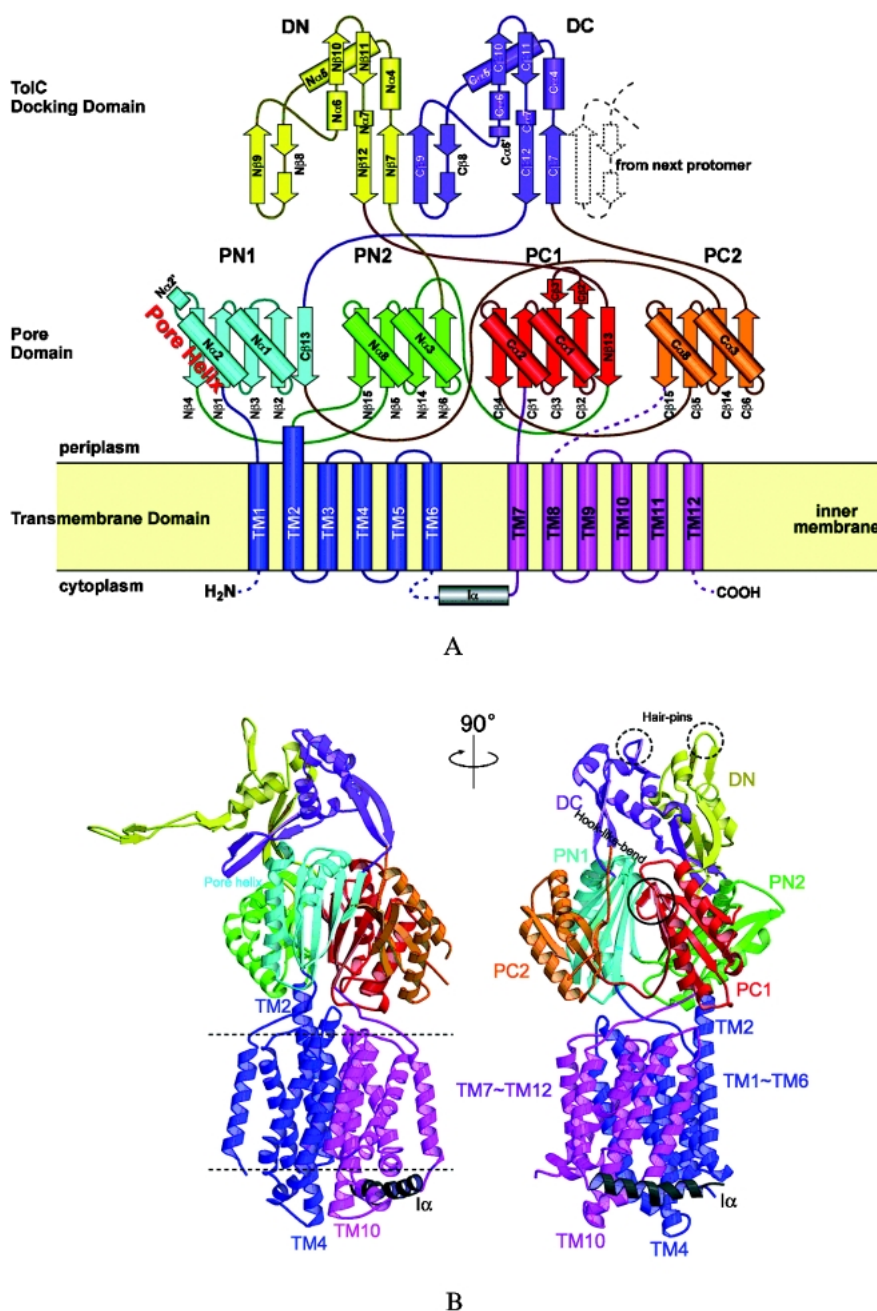


Figure 3. Structure of single monomer. A, Topology diagram of AcrB monomer. B, Ribbon representation of AcrB monomer.

荷電を持たないアラニン残基に置換したところ、上記の3アミノ酸以外に、Arg971もAcrBの薬剤排出活性に極めて重要であることが判った。Arg971は、上記のトリプレットの真下にあたり、プロトン輸送経路の一部をなすと考えられた (Fig. 4B)。分解能の制限から、水素結合ネットワークをペリプラズム側から、細胞質側までたどることは出来なかったが、分解能を向上させることにより、プロトンの輸送経路が明らかになると期待できる。

### 3.3 ポアドメインの構造

ポアドメインはPN1, PN2, PC1, PC2 という4つのサ

ブドメインから構成されている (Fig. 2B)。PN1とPN2はTM1とTM2の間に、PC1とPC2はTM7とTM8の間に存在する。これら全てのサブドメインは特徴ある構造モチーフを持っている。それは2つの、 $\beta$ ストランド- $\alpha$ ヘリックス- $\beta$ ストランドというモチーフが直接繰り返され、 $\alpha$ ヘリックスを外側に、 $\beta$ シートを内側にして、お互いをサンドイッチし存在している。この構造モチーフは、Dali データベース<sup>28)</sup>によるモチーフ検索で、カルボキシペプチダーゼ G2<sup>29)</sup>と相同であることが判ったが、この酵素との関係は不明である。PN2とPC2の前半 $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ モ

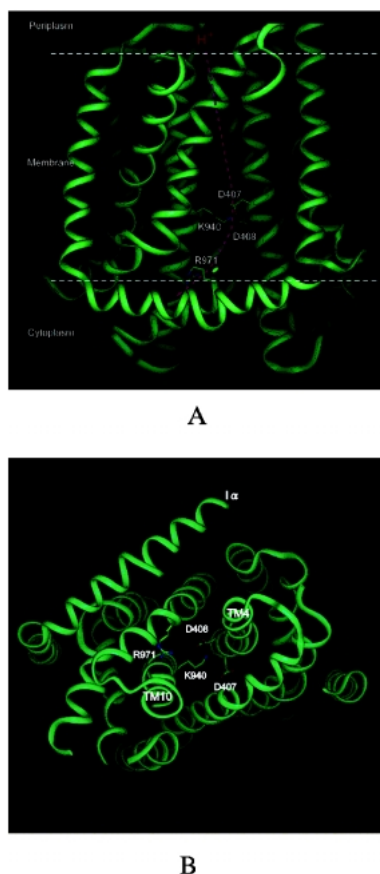


Figure 4. Functionally essential charged residue in TM4 and TM10.

チーフと後半のその間に、TolC 結合ドメインのポリペプチドが挿入されている (Fig. 3A)。ポアを形成しているヘリックスは PN1 中の Na2 である (Fig. 3A)。

PC1 と PC2 の間には膜に垂直な深い溝が存在する (Fig. 2B および Fig. 3B 右)。長さが約 40 Å で、幅 20 Å、深さ 15 Å である。この溝は分子の外側を向いており、ここに、細長い形と予想されている AcrA<sup>13)</sup> が結合すると推定している。この溝の底には、PC1 の短いヘアピン構造 Cβ2'-Cβ3' があり、フックのような形をしている (Fig. 3B の○部)。この部分は、溝の底面を形成するような役割を担っているようである。この部分は上記モチーフからはずれる例外的な特徴有る部分である。

### 3.4 TolC 結合ドメインの構造

TolC 結合ドメインは、2 つの DN と DC というサブドメインを含んでいる (Fig. 3A)。それぞれのサブドメインには、4 本平行-逆平行混成 β シートが存在する。2 つの逆平行 β シートは、単量体の隣の半分、もしくは隣のプロトマー (Fig. 3A の破線矢印部分) と平行になるヘアピン構造を作る。約 35 Å の長いヘアピン構造は、サブドメイン DN から隣の DC へ向けくちばしのように突き出し、隣のプロトマーに挿入されている。また、同様のヘアピン構造は単量体内部にも存在し、DC から DN へ向けて

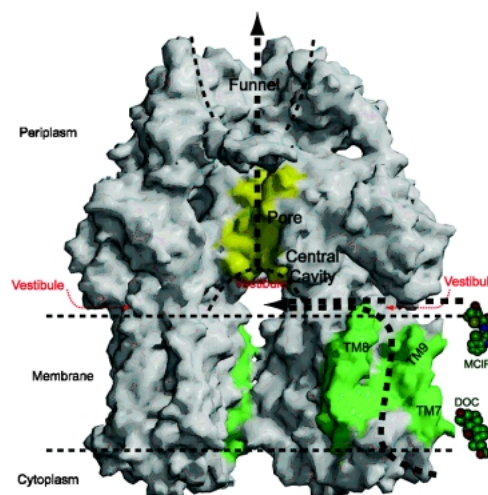


Figure 5. Surface representation of AcrB.

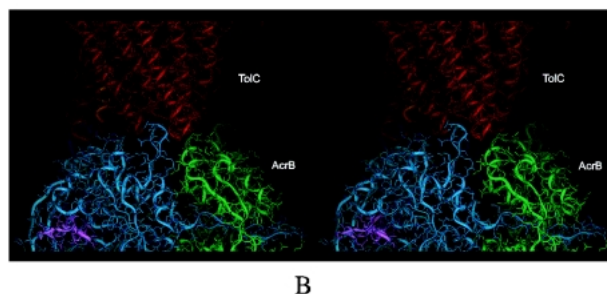
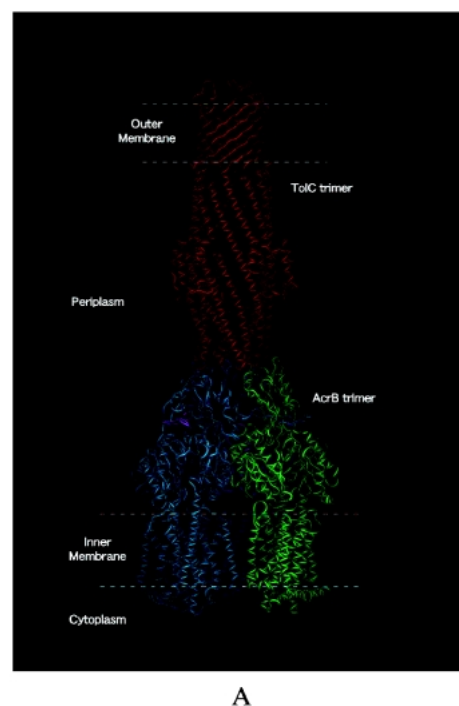


Figure 6. Proposed model of AcrAB-TolC complex.

挿入されている。これとは別に、分子の頂上部分には膜面に対して垂直なヘアピン構造が単量体あたり 2 本存在する (Fig. 2C の破線楕円部および Fig. 3B の破線○部)。

TolC 下端にも同様に2本のヘアピン構造が存在し、AcrB 分子先端にある縦向きヘアピン構造と対応し、密着した結合部を形作ると考えられる (Fig. 6B)。また TolC 結合ドメイン先端の直径と、TolC 下端の直径とはほぼ等しく、これらを並べてみると歯車のように相補的にかみ合う (Fig. 6B)。基質排出過程でこの両者が一時的に結合し、基質分子の受け渡しのための閉じたジョイントを形作るのだから。

#### 4. 基質輸送メカニズム

Fig. 5 に AcrB の溶媒接触表面を示す。内部の構造を示すために三量体のうち紙面手前側にある単量体を取り除き描いた。頭頂部のロート状開口部の底は狭くなり、そしてポアへと接続する様子がわかる (図中の黄色の部分)。ポア下端は分子中央部に存在する空洞へと続く。空洞は膜貫通部分三量体の中央にあるリン脂質で満たされている穴の上にあたる。すなわち、膜面と、ポアの下端との間に現れる空洞で、約15 Å の高さを持つ。この空洞へペリプラズム空間から通ずる開口部があり、そこを“玄関”と名付けた。Fig. 5 においては手前のプロトマーが取り除いて描かれているため図中の二量体中央に1つの玄関しか見ることができないが、各々のプロトマー間に合計3個存在する。ペリプラズム、あるいは脂質二重膜外葉に存在する基質はこれらの玄関より分子内に入り、通路を通して分子中央の空洞へと到達するのだから。これをペリプラズムからの基質の取り込み経路であろうと考えている。また AcrB はペリプラズムで働く基質を排出するだけでなく、明らかに細胞質側からも基質を排出する。では膜中あるいは、細胞質からの基質の輸送についてはどうだろうか？各プロトマーの膜貫通部分の膜に露出した表面に位置する

TM7 と TM8 (Fig. 5 の緑色部分) の間には比較的深い溝が存在する。この溝は膜貫通部分全体を横切るようにして上から下へと伸びている。溝の底の部分は TM9 により形成されている。TM9 は傾いているので、細胞質側ではこの溝は浅く、ペリプラズム側では深くなっている。この溝の上端は構造が揺らいでいる部分を経由して空洞につながっている。この接合部は、上述の玄関近くにあたる。この溝はリン脂質二重膜中にある脂溶性基質が膜中を輸送されるための通路で、おそらくはフリップ・フロップによる輸送で脂質二重膜内葉から外葉へと運ばれ、玄関へと導かれると考えている。細胞質側では浅く、ペリプラズム側では深いという溝の形状も、細胞質側からペリプラズム側へとフリップ・フロップされるのに好都合であると考えられる。このように AcrB には明らかに2つの異なる基質の透過経路が存在することが、我々の結晶構造から明らかになった (Fig. 5 の点線の経路)。

#### 5. まとめ

我々は、AcrB 結晶構造に基づく多剤輸送の分子メカニズムを世界で初めて提案した<sup>24)</sup>。構造から AcrB と TolC が直接相互作用する可能性を示唆した。基質が輸送される時、AcrB は TolC を誘導して結合し、細胞質から細胞外環境までを直接繋ぐようなダクトを形成するのだから (Fig. 6)。AcrB に基質が入ってくる時は2つの入り口が推定される。細胞質あるいは脂質二重膜の内葉に存在する基質は、膜貫通部分の分子表面に存在する溝を通して膜を横切る。それから玄関を通りペリプラズム側に開いた通路を通して、三量体中央の空洞に集められると考えている (Fig. 5)。脂質二重膜の外葉に存在する基質は、玄関より入り空洞に集められる。空洞に集められた基質は、ポアを

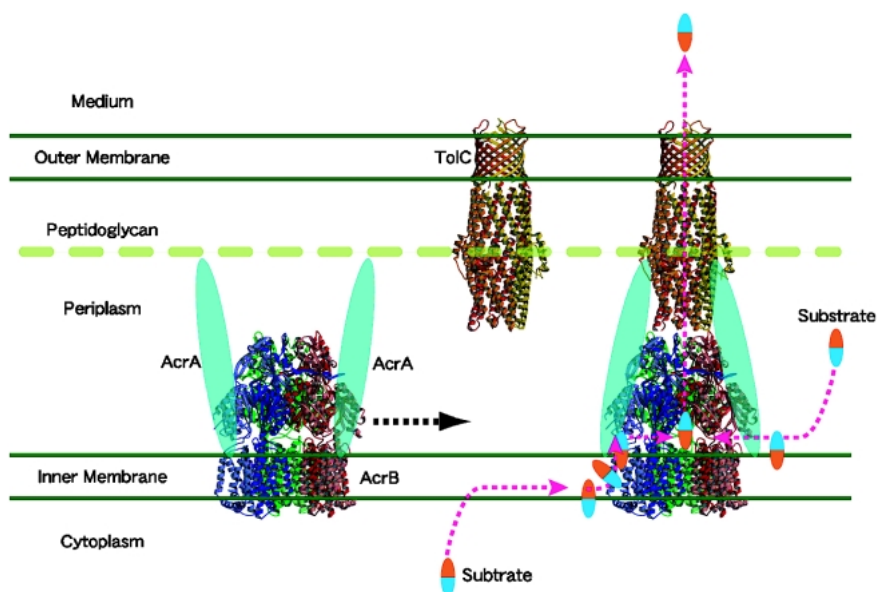


Figure 7. Schematic hypothesis of transport mechanism mediated by AcrAB-TolC system.

抜け、漏斗状開口部を経て、それから TolC へと輸送されているのだろう (Fig. 5, および Fig. 7)。Asp407, Asp408, そして Lys940 の間のイオン対は、膜貫通プロトン輸送経路の候補だろう。これらのアスパラギン酸がプロトン化したら、イオンペアが壊れ、それがきっかけとなり、TM4, および TM10 の構造変化が起こり、遠隔構造変化伝搬によりポア部分が最終的に開くのだろう。

AcrAB-TolC 系は化学構造が異なる多種多様な薬剤を基質とし、また  $\beta$ -ラクタム系抗生物質に対しても耐性化を付与する特徴を持つ<sup>30,31</sup>。  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の標的は、細胞壁の生合成に関わるペリプラズム酵素である。AcrB のような二次性トランスポーターは内膜を介する水素イオン濃度勾配をエネルギー源にしているから、内膜の外側であるペリプラズムに存在する基質に対して能動輸送を行う事は出来ないとこれまで考えられていた。しかし、AcrB や緑膿菌 MexB など RND 型トランスポーターはこれらペリプラズムで働く抗生剤に対してもはっきりと耐性を与える。ではどのようにして RND 型トランスポーターはペリプラズムから薬物を能動輸送できるのだろうか？ カリフォルニア大学バークレイ校の二階堂らは、1994年に AcrB には2種類の口があるに違いないという Dual-Entrance Model を提唱した。このモデルでは、脂質二重膜の内葉と外葉の両方から基質を取り込むのではないかとされていた<sup>32</sup>。前述のように、AcrB のペリプラズム側方に開く通路が発見され、ペリプラズムと脂質二重膜の外葉に存在する基質を直接分子内に取り込む可能性が明らかになった。また、AcrB には細胞質あるいは脂質二重膜の内葉からペリプラズムへ基質を輸送する経路も存在した。これらの構造は AcrB の多剤輸送について二階堂らの Dual-Entrance Model を支持するものであった (Fig. 5)。驚くべき事に、能動的膜輸送は、膜貫通部分でなく水溶性ドメインのポアで起こっていた。しかし、細胞質に存在する基質だけでなく、ペリプラズムに存在する基質もまた等しく排出する事実を鑑みるとこれはむしろ自然であると考えられることもできる。

ペリプラズム空間にはペプチドグリカン層という多糖類で出来た細胞壁が存在する (Fig. 7)。ペリプラズムに100 Å も突き出た TolC の水溶性のトンネル部分は、おそらくこのペプチドグリカン層によってトラップされることにより側方拡散を抑制され、AcrAB 複合体の方のみが側方拡散が可能であるように思われる。AcrAB-TolC 系の詳細な反応機序は不明であるが、AcrAB 複合体が基質を結合するかプロトン濃度勾配のエネルギーを受けるかして構造変化を起こし、ペプチドグリカン層から足を覗かせている TolC 分子を捜して一時的に結合し、細胞内膜から外膜を一気に貫く巨大な超分子複合体を形成するのであろう (Fig. 7)。基質の受け渡しが終わるとこれらは解離して、新たな基質を求めて、細胞膜中を拡散するのだろう。

今後、分解能を上げることにより、より詳細なメカニ

ムの解明を目指すほか、薬剤との複合体の構造解析を行い、化学構造が異なる多種多様な基質を認識する、多剤認識機構を解明したいと考えている。また、他の構成成分 (AcrA や TolC) との複合体の構造解析を行うことにより、多剤の認識とそれに続く排出メカニズムの本質的理解に迫りたいと考えている。これらの知見は、多剤耐性の特效薬となる阻害剤や回避剤開発などの応用に繋げることも可能であり興味を持たれる。

## おわりに

筆者は放射光を用いた膜タンパク質複合体の結晶構造解析に大学院生の頃から携わってきた。当時は良い結晶も出せなかったので、回折データをそろえるのにたいへん苦労した。最終的には国際的な構造解析競争で苦杯をなめた。そのため、薬剤排出トランスポーターの結晶構造解析は筆者にとって最後のチャンスといっても過言では無かった。トランスポーターに携わって約5年間を要したが、やったこともなかったモデル構築や構造精密化まで自らの手で行い構造解析を完了させたことは感無量であった。興味有るテーマに巡り会えたことを上司や、恩師に感謝するとともに、共に闘う仲間を持てたことに感謝したい。この成果は皆の頑張りの成果である。

## 謝辞

本研究は、阪大蛋白研の月原富武教授、中川敦史教授の支援と協力によるものです。また多くの方々の協力によるものです。著者らは深く感謝の意を捧げます。

## 参考文献

- 1) H. Okusu, D. Ma and H. Nikaido: AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* **178**, 306 (1996).
- 2) D. Ma, D. N. Cook, J. E. Hearst and H. Nikaido: Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **2**, 489 (1994).
- 3) I. T. Paulsen, L. Nguyen, M. K. Sliwinski, R. Rabus and M. H. Saier: Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J. Mol. Biol.* **301**, 75 (2000).
- 4) M. C. Sulavik, C. Houseweart, C. Cramer, N. Jiwani, N. Murgolo, J. Greene, B. DiDomenico, K. J. Shaw, G. H. Miller, R. Hare and G. Shimer: Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1126 (2001).
- 5) T.-T. Tseng, K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau and M. H. Saier Jr.: The RND permease superfamily: An ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 107 (1999).
- 6) T. Dinh, I. T. Paulsen and M. H. Saier, Jr.: A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**, 3825 (1994).
- 7) I. T. Paulsen, J. H. Park, P. S. Choi and M. H. Saier: A fami-



- ly of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs, and heavy metals. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 1 (1997).
- 8) H. Nikaido: How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram-negative bacterial cells? *Trends Microbiol.* **8**, 481 (2000).
  - 9) H. I. Zgurskaya and H. Nikaido: Bypassing the periplasm: Reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7190 (1999).
  - 10) H. Nikaido and H. I. Zgurskaya: AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 215 (2001).
  - 11) D. G. Thanassi, L. W. Cheng and H. Nikaido: Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 2512 (1997).
  - 12) E. Fujihira, N. Tamura and A. Yamaguchi: Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB, in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **131**, 145 (2002).
  - 13) H. I. Zgurskaya and H. Nikaido: AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J. Mol. Biol.* **285**, 409 (1999).
  - 14) A. J. Avila-Sakar, S. Misaghi, E. M. Wilson-Kubalek, K. H. Downing, H. Zgurskaya, H. Nikaido and E. Nogales: Lipid-layer crystallization and preliminary three-dimensional structural analysis of AcrA, the periplasmic component of a bacterial multidrug efflux pump. *J. Struct. Biol.* **136**, 81 (2001).
  - 15) V. Koronakis, A. Shaff, E. Koronakis, B. Luisi and C. Hughes: Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914 (2000).
  - 16) K. Poole: Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 255 (2001).
  - 17) J. P. Davis, F. W. Chen and Y. A. Ioannou: Transmembrane Molecular Pump Activity of Niemann-Pick C1 Protein. *Science* **290**, 2295 (2000).
  - 18) D. A. Doyle, J. Morais-Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon: The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69 (1998).
  - 19) T. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura and H. Ogawa: Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**, 647 (2000).
  - 20) G. Chang and C. B. Roth: Structure of MsbA from *E. coli*: A homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) Transporters. *Science* **293**, 1793 (2001).
  - 21) K. P. Locher, A. T. Lee and D. C. Rees: The *E. coli* BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**, 1091 (2002).
  - 22) E. E. Heldwein and R. G. Brennan: Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature* **409**, 378 (2001).
  - 23) M. A. Schumacher, M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray and R. G. Brennan: Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* **294**, 2158 (2001).
  - 24) S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita and A. Yamaguchi: Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587 (2002).
  - 25) 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 (2003).
  - 26) B. C. Wang: Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Methods Enzymol.* **115**, 90 (1985).
  - 27) L. Guan and T. Nakae: Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 1734 (2001).
  - 28) L. Holm and C. Sander: Mapping the protein universe. *Science* **273**, 595 (1996).
  - 29) S. Rowsell, R. A. Pauptit, A. D. Tucker, R. G. Melton, D. M. Blow and P. Brick: Crystal structure of carboxypeptidase G2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. *Structure* **5**, 337 (1997).
  - 30) R. Srikumar, X. Z. Li and K. Poole: Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**, 7875 (1997).
  - 31) A. Mazzariol, G. Cornaglia and H. Nikaido: Contributions of the AmpC beta-lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1387 (2000).
  - 32) H. Nikaido, M. Basina, V. Y. Nguyen and E. Y. Rosenberg: Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those b-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J. Bacteriol.* **180**, 4686 (1998).



村上 聡\*

大阪大学産業科学研究所

〒567-0047

大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1

TEL ; 06-6879-8547

FAX ; 06-6879-8549

E-mail : mura@sanken.osaka-u.ac.jp

専門 : 構造生物学, 蛋白質結晶学

## 略歴 :

1968年 兵庫県神戸市生まれ

1997年 大阪大学大学院理学研究科高分子化学専攻修士理学博士

1998年 大阪大学産業科学研究所 生体応答科学研究部門 生体情報制御学研究分野 助手

2002年 科学技術振興事業団・戦略的創造研究推進事業(さきがけ研究) 併任