

## 平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	YAMAGUCHI AKIHITO					
①研究代表者氏名	山口 明人			②所属研究機関・部局・職	大阪大学・産業科学研究所・教授	
③研究課題名	和文	細菌異物排出タンパク遺伝子資源のポストゲノム解析と新しい耐性機構の解明				
	英文	Post-Genomic Approach to Bacterial Xenobiotic Exporter Gene Resources and Investigation of Novel Drug Resistance Mechanisms of Bacteria				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	21,000	20,000	20,000	20,000	15,200	96,200
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
山口 明人	大阪大学・産業科学研究所・教授	生体情報制御学	全内容の統括			
村上 聡	大阪大学・産業科学研究所・助教授	タンパク質結晶構造解析	異物排出タンパクの結晶構造解析			
平田 隆弘	大阪大学・産業科学研究所・助手	微生物学	異物排出タンパクの発現制御機構			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>本研究では、大腸菌の推定異物排出タンパク遺伝子強制発現ライブラリをもとに、未知の排出タンパクの基質特異性と分子構造、排出タンパクとしての性質を網羅的に一つずつ詳しく解析する。すでに、グラム陰性菌で初のABC薬剤排出タンパク、複数の内在性膜タンパク質がペリプラズム修飾タンパクと複合体を作った新しい分子構築を持つRND型の排出タンパクなどが見つかり、このライブラリは、新しいタイプの異物排出タンパクを検索同定する宝庫である。また、生化学的な性質を解明した排出タンパクは順次結晶化を行い、結晶構造解析によって立体構造を決定する。もとより膜タンパク質の結晶解析は容易ではなく、一般のストラクチャー計画でも、膜タンパクの構造決定は後回しにされている。しかし、私たちはマルチコンポーネント型排出タンパク結晶化に成功した経験を生かし、真っ正面から、異物排出膜輸送体の網羅的分子構造決定に取り組み、異物認識の仕組みを明らかにしたい。さらに、二成分情報伝達系によるこれら異物排出タンパクの発現制御と多剤耐性化は、臨床的には知られていない新しい多剤耐性化機構であるが、二成分情報伝達系と異物排出系の遺伝子が細菌の中に元々非常に多数存在するという事実を考えると、近い将来、臨床的に大きな脅威になる可能性がある。必要によって、二成分情報伝達系遺伝子のライブラリも構築し、DNAチップ解析法を用いて、どの伝達系がどの一組の排出タンパク遺伝子発現を制御するのかを示すマップを作りたい。これらの研究を元に、将来的には、異物排出タンパクの構造情報に基づいた、異物排出タンパクをターゲットとする、あるいはそれを回避する抗菌薬のドラッグデザインシステム構築を目指す。</p>						

⑦ 研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

### (1) 大腸菌異物排出タンパクの網羅的解析

強制発現クローニングを元に、大腸菌には 20 種類の異物排出タンパクのあることを明らかにした。そのうち、糖やアミノ酸の輸送体と同じファミリーに属する MFS 型が 11 種類、小さい SMR 型が 2 種類、外膜チャネルと共役する RND 型が 5 種類、ATP 加水分解により駆動される ABC 型が 2 種類であった。面白いことに、5 種類の RND 型排出タンパクは全て同じ外膜チャネル蛋白 TolC と共役していることが確かめられた。さらに、ABC 型のうち 1 つと MFS 型のうち 2 つがやはり TolC と共役しており、これらは RND 型と同様に第 3 のファクターとしてペリプラズム蛋白(MFP)を伴っていることが明らかになった。RND 型の最も代表的な異物排出タンパク AcrB の結晶構造解析に成功し、その結果、AcrB は膜貫通部と TolC との直接結合に必要な大きなペリプラズム性頭部を持つ 3 量体であることが明らかになった。そこでまず、ABC 型の MacB について、

部位特異的的化学修飾法により膜貫通トポロジーを決定したところ、4 回膜貫通型であり、細胞質側に大きな ATP 結合ドメイン、ペリプラズム側に TolC とドッキング可能な大きなループドメインを持つハーフタイプ(2 個で RND 型 1 分子に相当)であることがわかった。次に、MFS 型の EmrB について同様の方法でトポロジー決定した。その結果、5 回膜貫通型であり、ペリプラズム側に 2 カ所長い親水性ループが存在する構造が明らかになった。EmrB はプロトンとのアンチポーターなので、細胞質側の ATP 結合ドメインは不要である。

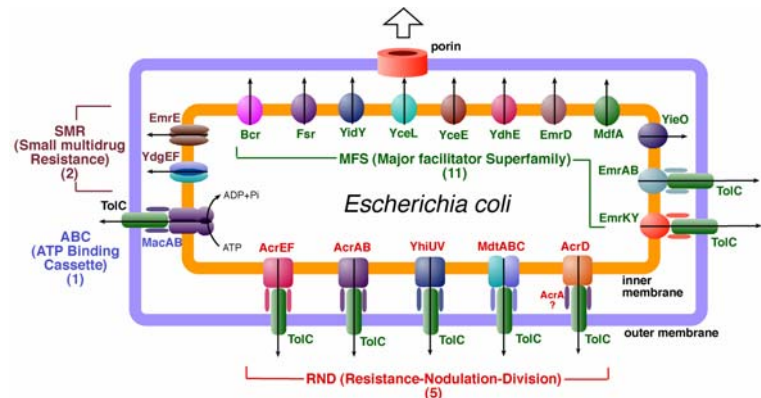


図 1. 大腸菌の異物排出タンパク

### (2) 大腸菌異物排出タンパクの結晶構造解析

本研究期間中に、私たちは世界で初めて異物排出タンパクの立体構造決定に成功した。また、最終年度に、基質結合型立体構造の決定にも成功し、異物排出機構として、全く新しい Functionally rotating binding change mechanism を提唱した。

### (3) 異物排出遺伝子発現制御機構の解明

大腸菌には 20 種類の異物排出遺伝子があるが、実験室条件下で実際に発現しているのは AcrAB などごくわずかに過ぎない。私たちは、細菌の環境感知応答システムである二成分情報伝達系によって異物排出遺伝子が発現誘導される現象を発見し解析した。推定二成分系は大腸菌に 30 種類あまりあるが、その大部分は未だほとんど研究されていない。私たちは二成分系の転写制御因子全てを強制発現クローニングし、異物排出遺伝子を制御するネットワークの存在を明らかにした。中でも、EvgSA, BaeSR 両二成分系は普段ほとんど発現していないが発現すれば広範囲な多剤耐性を示す RND 型の MdtEF, AcrD, mdtABC などを強く発現誘導した。

次いで、どのようなシグナルにより異物排出遺伝子発現が誘導されるかを探索した。最初に見出したのがインドールである。インドールはアミノ酸の代謝産物で毒性があり、菌の発育定常期には培地に排出され蓄積される。インドールにより MdtEF が非常に強く発現誘導された。MdtEF はまたインドールを排出する能力があることも示された。MdtEF はまた、菌の定常期に大きく発現誘導される。この発育期依存的発現誘導は一部インドールに帰せられるが、それ以外に  $\sigma^S$  因子に関わる別の誘導経路があることもわかった。定常期での MdtEF の発現高進は、菌の多剤耐性をもたらすことが示された。従来観察されていた、定常期に菌の示す薬剤抵抗性は少なくともその原因の一つが異物排出タンパクの発現誘導によるものであることが明らかになった。

インドール以外に、カタボライトコントロールによっても一部の異物排出タンパクが誘導されてくるということがわかった。一方、通常が発現が低く抑えられている原因を、トランスポゾンランダム挿入法で調べたところ、鉄代謝に関与する転写制御因子 Fur が AcrD と MdtABC の発現を抑制していることが見出された。これらの異物排出タンパクは従って鉄欠乏条件下で発現誘導され、多剤耐性をもたらす。また、鉄を取り入れるために菌が培地に放出する鉄イオンキレート分子シデロフォア A の排出輸送体として働いていることが示された。これは、異物排出タンパクの本来の生理的役割解明に大きく踏み出す知見の一つといえる。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

我々は、本研究課題期間中に、大腸菌異物排出タンパクAcrBの結晶構造決定に成功し、2002年のNature誌にArticleとして発表すると共に、表紙をも飾ったが、この構造決定は異物排出タンパクで初めての構造決定であったばかりでなく、プロトンと共役する二次性能動輸送体としても全く初めての構造決定であった。その後、ラクトース輸送体、グリセロール輸送体、グルタミン酸輸送体などが次々と構造決定され、膜輸送体研究分野も一挙にポストストラクチャー時代に突入したが、私たちの研究はまさにその先鞭を付けたものとして高く評価されている。私たちの翌年、Yuらが私たちの構造に基づき、基質結合型AcrB構造を解き、私たちが構造を元に基質結合部位として推定していたcentral cavityにまさに基質が結合しているということをScience誌に発表した。ところが、私たちだけでなく、スイスのPosらも、どうやってもYuの示した場所に基質を発見することができなかつた。苦心の末、ようやく昨年になって、私たちは、ブロム化ミノサイクリンを基質として用い、ブロムの位置を差フリーエ法で決定するという手段により確実な基質結合位置の同定に成功した。その結果はまことに驚くべきものであった。基質は中央のcentral cavityには結合しておらず、3量体モノマーの一つにのみ結合していた。その場所は、モノマー頭部のほぼ中央、フェニルアラニンクラスター領域であった。多剤結合型転写調節因子QacR, BmrRなどの基質結合型結晶構造は既に決定されているが、それらの多剤結合部位もやはりフェニルアラニンクラスター領域であり、芳香環の相互作用を中心とする緩やかな疎水結合と、大きな結合部位へのマルチサイトの結合が多剤認識の分子的基础ではないかと言われている。多剤排出タンパクにおいてもまさにそのフェニルクラスターへのマルチサイト結合が認められた。さらに、3つのモノマーは、基質排出輸送の3つの異なる段階にそれぞれ対応する構想をしていることが明らかになった。基質を結合しているモノマーでは、AcrB側面の入り口から結合サイトまでの通路がオープンしておており、結合サイトは広がって基質との相互作用に適した側鎖の配置を取っている。また、結合サイトから頭頂部への出口は、隣のモノマーから倒れ込んできたcentral helixによってふさがれている。一方、その隣のモノマーは、central helixが倒れて退いたことにより、結合サイトから頭頂部に向かっての出口がオープンする一方、側面入り口からの通路が閉じていた。また、基質結合部位は基質がはまりこめないほどに収縮していた。すなわち、基質を送り出した直後のextrusion状態に対応している。第3のモノマーはその中間的な状態で、出口は閉じ、入り口は開いているが、基質結合部位はまだ収縮したままである。これは、基質の結合を待つaccess状態と考えられる。結晶構造はある瞬間のスナップショットであるため、通常は反応中間体のいくつかの構造を解かない限り正確な反応機構を構造の上で追跡することができない。ところが、基質結合型AcrBの場合まことに幸運なことに、たった一つの結晶で3つの反応中間体の構造が解けたことになる。この機構は、実際には回転しないものの、FoF1-ATPaseにおける反応機構と類似しているため、Functionally rotating binding change mechanismと名付けた。

異物排出タンパクの発現誘導機構についても本研究により画期的に前進したと考えている。異物排出タンパクは普段はほとんど発現していない。また、その大部分は、排出する輸送基質(薬剤・毒物)によっては発現誘導されないということが謎であった。異物排出タンパクが、私たちの研究以前には多剤排出タンパクと言われていた、その名の通り、薬剤を排出するための輸送体であったならば、薬物で発現誘導されなければ役に立たないではないか？私たちの研究はその疑問を解き明かすヒントを与えるものと考えている。すなわち、異物排出タンパクは細菌の環境感知応答システムにより発現誘導された。このことは、それらが、薬物の排出を第一義とする輸送体ではなく、環境の変化に対応するための何らかの役割を担う膜輸送体であることを示している。その一部は、インドールや鉄欠乏により発現誘導され、インドールや鉄キレート分子の排出輸送体であることもわかった。異物排出輸送体の本来の生理的な輸送基質が何であるのかはまだ解明の緒に就いたばかりであるが、excitingな成果が予想される。

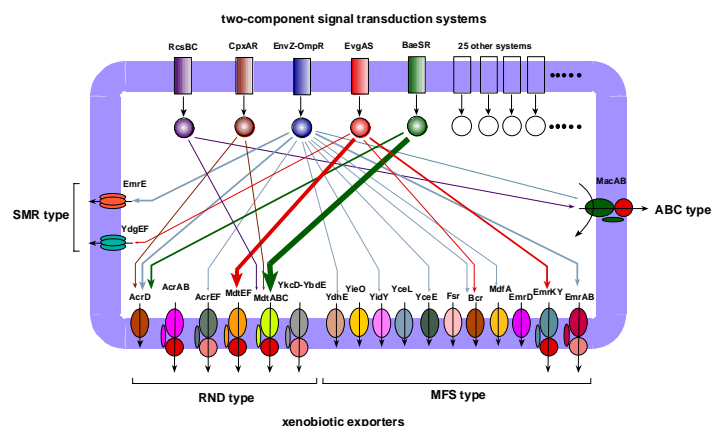


図2. 二成分情報伝達系による異物排出遺伝子発現制御ネットワーク

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

## 論文

1. Shigeyuki Nada, Satoshi Murakami, Shizuka Okamoto, Yoshiyuki Kubo and Akihito Yamaguchi, Monoclonal antibody that binds to the central loop of the Tn10-encoded metal tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli*, J. Biolchem (Tokyo), 129, 87-91(2001)
2. Kunihiro Nishino and Akihito Yamaguchi, Overexpression of the response regulator *evgA* of the two-component signal transduction system modulates multidrug resistance conferred by multidrug resistance transporters, J. Bacteriol., 183, 1455-1458(2001)
3. Norihisa Tamura, Satoko Konishi, Shinobu Iwaki, Tomomi Kimura-Someya, Shigeyuki Nada and Akihito Yamaguchi, Complete cysteine-scanning mutagenesis and site-directed chemical modification of the Tn10-encoded metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter, J. Biol. Chem., 276, 20330-20339(2001)
4. Takaaki Akasaka, Mayumi Tanaka, Akihito Yamaguchi and Kenichi Sato, Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance, Antimicrob. Agents Chemother., 45, 2263-2268(2001)
5. Nobuyoshi Kobayashi, Kunihiro Nishino and Akihito Yamaguchi, Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 183, 5639-5644(2001)
6. Kunihiro Nishino and Akihito Yamaguchi, Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 183, 5803-5812(2001)
7. Erika Fujihira, Norihisa Tamura and Akihito Yamaguchi, Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB in *Escherichia coli*, J. Biolchem. (Tokyo), 131, 145-151(2002)
8. Kunihiro Nishino and Akihito Yamaguchi, EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 184, 2319-2323(2002)
9. Satoshi Nagakubo, Kunihiro Nishino, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC, J. Bacteriol., 184, 4161-4167(2002)
- ⑩ Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi, Crystal structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB, Nature, 419, 587-593(2002)
11. Hidetada Hirakawa, Kunihiro Nishino, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 185, 1851-1856(2003)
12. Kunihiro Nishino, Yoshihiko Inazumi and Akihito Yamaguchi, Global analysis of genes regulated by EvgA of the two-component regulatory system in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 185, 2667-2672(2003)
13. Mari Sasaki, Yoshiyuki Kubo, Shigeyuki Nada and Akihito Yamaguchi, Cloning of rat ABCA7 and its preferential expression in platelets, Biochem. Biophys. Res. Commun., 304, 777-782(2003)
14. Nobuyoshi Kobayashi, Kunihiro Nishino, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter MacB in *Escherichia coli*, FEBS Letter, 546, 241-246(2003)
15. Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, Multidrug-exporting secondary transporters, Curr. Opin. Struct. Biol., 13, 443-452(2003)
16. Kunihiro Nishino, Junko Yamada, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta-lactams, Antimicrob. agents Chemother., 47, 3030-3033(2003)
17. Norihisa Tamura, Satoko Konishi and Akihito Yamaguchi, Mechanisms of drug/H<sup>+</sup> antiport: complete cysteine-scanning mutagenesis and the protein engineering approach, Curr. Opin. Chem. Biol., 7, 570-579(2003)

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

18. Hidetada Hirakawa, Kunihiro Nishino, Junko Yamada, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, beta-Lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*, J. Antimicrob. Chemother., 52, 576-582(2003)
19. Satoshi Murakami, Norihisa Tamura, Asami Saito, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Extramembrane central pore of multidrug exporter AcrB in *Escherichia coli* plays an important role in drug transport, J. Biol. Chem., 279, 3743-3748(2004)
20. Kunihiro Nishino and Akihito Yamaguchi, Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 186, 1423-1429(2004)
21. Takahiro Hirata, Asami Saito, Kunihiro Nishino, Norihisa Tamura and Akihito Yamaguchi, Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escherichia coli* to Tigecycline (GAR-936), Antimicrob. Agents Chemother., 48, 2179-2184(2004)
22. Hiroaki Adachi, Satoshi Murakami, Ai Niino, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Akihito Yamaguchi and Takatomo Sasaki, Membrane protein crystallization using laser irradiation, Jpn. J. Appl. Phys., 43, L1376-L1378(2004)
23. Hidetada Hirakawa, Yoshihiko Inazumi, Takeshi Masaki, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*, Mol. Microbiol., 55, 1113-1126(2005)
- ②4 Kunihiro Nishino, Takeshi Honda and Akihito Yamaguchi, Genome-Wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system, J. Bacteriol., 187, 1763-1772(2005)
25. Yoshiyuki Kubo, Sayaka Sekiya, Megumi Ohigashi, Chiemi Takenaka, Kyoko Tamura, Shigeyuki Nada, Tsuyoshi Nishi, Akitsugu Yamamoto and Akihito Yamaguchi, ABCA5 resides in lysosomes, and ABCA5 knockout mice develop lysosomal disease-like symptoms, Mol. Cell. Biol., 25, 4138-4149(2005)
26. Norihisa Tamura, Satoshi Murakami, Yoshiaki Oyama, Masaji Ishiguro and Akihito Yamaguchi, Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking, Biochem., 44, 11115-11121(2005)
27. Nobuyoshi Kobayashi, Tsuyoshi Nishi, Takahiro Hirata, Akio Kihara, Takamitsu Sano, Yasuyuki Igarashi and Akihito Yamaguchi, Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner, J. Lipid Res., 47, 614-621(2006)
- ②8 Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. and Yamaguchi, A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. Nature 443, 173-179 (2006)

#### 国際会議、学会での発表

1. Sunghi Ryu, Shigeyuki Nada, Akihito Yamaguchi, Identification of basic residues involved in drug export function of human multidrug resistance associated protein 2, 4<sup>th</sup> Sanken International Symposium, Mar. 2001, Osaka University, Japan
2. Yoshiyuki Kubo, Shigeyuki Nada, Akihito Yamaguchi, Novel ABCA Genes in Brain and Neural Cells ~ Toward the Elucidation of Physiological Roles of ABC Transporters ~, 4<sup>th</sup> Sanken International Symposium, Mar. 2001, Osaka University, Japan
3. Kunihiro Nishino and Akihito Yamaguchi, Complete Library of Putative Drug Transporter Genes and Two-Component Signal Transduction System that Regulates Multidrug Resistance Transporters in *Escherichia coli*, 4<sup>th</sup> Sanken International Symposium, Mar. 2001, Osaka University, Japan
4. Satoshi Nagakubo, Kunihiro Nishino, and Akihito Yamaguchi, Putative Response Regulator, BaeR, Modulates Multidrug Resistance of *Escherichia coli* via Novel Multidrug Exporter System, YegMNOB, 4<sup>th</sup> Sanken International Symposium, Mar. 2001, Osaka University, Japan

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

5. Kunihiro Nishino, Satoshi Nagakubo, Nobuyoshi Kobayashi, Hidetada Hirakawa, and Akihito Yamaguchi, Construction of the complete expression library of putative drug transporters in *E. coli* and the discovery of the novel efflux-based multidrug resistance mechanism controlled by two-component signal transduction systems, 21st Century COE program International symposium, Dec. 2001, Osaka Univ., Japan
6. Norihisa Tamura and Akihito Yamaguchi, The Topogenic Contribution of Each Transmembrane Helix in Metal-Tetracycline/H<sup>+</sup> Antiporter, 21st Century COE program International symposium, Dec. 2001, Osaka Univ., Japan
7. Kunihiro Nishino and Akihito Yamaguchi, Two-component signal transduction system that regulates multidrug transporters in *Escherichia coli*, American Society for Microbiology 102nd General Meeting, May 2002, Salt Lake City, USA
8. Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, and Eiki Yamashita, Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB, The 1st JBS biofrontier symposium on Membrane Transporter: Structure and Function Relationship -Insights into ABC Transporter-, Jun. 2002, Oita, Yufuin, Japan
9. Mari Sasaki, Ayako Shoji, Yoshiyuki Kubo, Shigeyuki Nada, Akihito Yamaguchi, Identification of a novel rat ABC transporter preferentially expressed in platelet, The 1st JBS biofrontier symposium on Membrane Transporter: Structure and Function Relationship -Insights into ABC Transporter-, Jun. 2002, Oita, Yufuin, Japan
10. Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, and Eiki Yamashita, Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB, Gordon Research Conference (Membrane Transport Proteins), Jul. 2002, Connecticut College, USA
11. Takahiro Hirata, Kunihiro Nishino, Asami Saito, Norihisa Tamura and Akihito Yamaguchi, Characterization of a Novel Tetracycline Derivative, Tigecycline (GAR-936) as a Substrate for Efflux Proteins: Potential for Developing Resistance in *E. coli* Strains, The 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sep. 2002, San Diego, USA
12. Takahiro Hirata, Kunihiro Nishino and Akihito Yamaguchi, Overproduction of EvgA, a response regulator of two-component signal transduction system, confers the multidrug-resistance and acid-resistance in *Escherichia coli*, Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2002, Dec. 2002, Osaka University, Japan
13. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi, Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB, Membrane Structure and Function-PSB workshop, Feb. 2003, European Synchrotron Radiation Facility, France
14. Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima and Eiki Yamashita, Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB, Gordon Research Conferences (Multi-Drug Efflux Systems), Mar. 2003, Four Points Sheraton, USA
15. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi, X-ray crystallographic analysis of bacterial multidrug efflux transporter AcrB, Gordon Research Conferences (Multi-Drug Efflux Systems), Mar. 2003, Four Points Sheraton, USA
16. Kunihiro Nishino, Hidetada Hirakawa and Akihito Yamaguchi, Comprehensive Analysis of Drug Resistance Modulated by Drug Efflux and Two-Component Regulatory Systems in *Escherichia coli*, Gordon Research Conferences (Multi-Drug Efflux Systems), Mar. 2003, Four Points Sheraton, USA
17. Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima and Eiki Yamashita, Crystal Structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB, ASBMB 2003 Annual Meeting, Apr. 2003, the San Diego Convention Center, USA

- ⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）
18. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi, Crystal Structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB, International Symposium on Diffraction Structural Biology 2003, May 2003, Tsukuba International Congress Center, Japan
  19. Hidetada Hirakawa, Kunihiro Nishino, Jyunko Yamada, Yoshihiko Inazumi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Comprehensive Analysis of Two-component Signal Transduction System Induced Multidrug Resistance in *Escherichia coli*, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 103rd General Meeting, May 2003, WASHINGTON CONVENTION CENTER, USA
  20. Asami Saito, Takahiro Hirata, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, Identification of Functional Amino Acids in AcrB Multidrug Transporter of *Escherichia coli*, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 103rd General Meeting, May 2003, WASHINGTON CONVENTION CENTER, USA
  21. Kunihiro Nishino, Takahiro Hirata, Takeshi Honda and Akihito Yamaguchi, Histone-like Protein H-NS Controls the Expression of AcrEF and YhiUV Multidrug Transporters in *Escherichia coli*, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 103rd General Meeting, May 2003, WASHINGTON CONVENTION CENTER, USA
  22. Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima and Eiki Yamashita, Crystal structure of multidrug efflux transporter AcrB and its functional implications, Gordon Research Conferences (Molecular & Cellular Bioenergetics), Jun. 2003, Kimball Union Academy, USA
  23. Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Asami Saito, Norihisa Tamura and Eiki Yamashita, Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB and its functional implications, 2003 FASEB Summer Conferences "Perspectives in Transport Biology", Jul. 2003, Tucson, Arizona, USA
  24. Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, Structure and function of Multi-drug efflux transporter, International Symposium on the Creation of Novel Nanomaterials, Jan. 2004, Osaka University, Osaka, Japan
  25. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi, Crystal structure of bacterial efflux protein AcrB, 21st Century COE program, "International Workshop on Structural Chemical Biology of Membrane Protein Complex Functions", Apr. 2004, Center for Advanced Science and Technology, Hyogo, Japan
  26. Hidetada Hirakawa, Yoshihiko Inazumi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Regulation of Drug Exporter Genes by Intercellular Signal Molecules in *Escherichia coli*, American Society for Microbiology 104th General Meeting, May 2004, Ernest N. Morial Convention Center, LA, USA
  27. Yoshihiko Inazumi, Hidetada Hirakawa, Kunihiro Nishino, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Up-Regulation of a Drug Exporter Gene, *mdtEF*, by N-acetyl-D-glucosamine in *Escherichia coli*, American Society for Microbiology 104th General Meeting, May 2004, Ernest N. Morial Convention Center, LA, USA
  28. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi, Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB, The Sixth Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA' 04), Symposium, "Macromolecular assemblies", Jun. 2004, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China
  29. Akihito Yamaguchi, Structure, function and regulation of bacterial xenobiotic exporters, Gordon Research Conferences (Bacterial Cell Surfaces), Jun.-Jul. 2004, Colby-Sawyer College New London, NH, USA
  30. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi, X-ray crystallographic analysis of multi-drug efflux transporter, The 8th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), Symposium, "Membrane Proteins", Sep. 2004, the Egret Himeji, Hyogo, Japan

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

31. Stoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, Structure and mechanism of multidrug efflux transport nano-machine, Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004 (SISSIN-2004), Dec. 2004, Osaka University, Osaka, Japan
32. Norihisa Tamura, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected by site-directed disulfide cross-linking, Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004 (SISSIN-2004), Dec. 2004, Osaka University, Osaka, Japan
33. Naoki Kobayashi, Norihisa Tamura Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, Studies on the substrate-recognition site of multidrug efflux transporter AcrB using AcrB/AcrD chimera, Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004 (SISSIN-2004), Dec. 2004, Osaka University, Osaka, Japan
34. Yoshihiko Inazumi, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, N-acetylglucosamine as an inducer for the expression of bacterial multidrug exporter genes, Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004 (SISSIN-2004), Dec. 2004, Osaka University, Osaka, Japan
35. Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Indole signaling induces the expression of xenobiotic efflux nano-machine via two-component system-dependent and independent pathways, Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004 (SISSIN-2004), Dec. 2004, Osaka University, Osaka, Japan
36. Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, Structure and Mechanism of a Multidrug Exporter, Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium 2005, Symposium "Nano-Bio Group", Mar. 2005, Oku-Biwako Makino Prince Hotel, Shiga, Japan
37. Takahiro Hirata, Asuka Kobayashi, Hidetada Hirakawa, Manabu Horikawa, Masamichi Ishiguro and Akihito Yamaguchi, Miniaturized Quorum-Sensing Assay of *Pseudomonas aeruginosa* LasR-LasI in *Escherichia coli* system and the Evaluation of 3-oxo-C<sub>12</sub>-Homoserine Lactone Analogues, Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium 2005, Symposium "Nano-Bio Group", Mar. 2005, Oku-Biwako Makino Prince Hotel, Shiga, Japan
38. Syoko Kawasaki-Nishi, Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi, Analysis of the Mechanism of Proton Translocation through the Integral Vo Domain of the Vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases, Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium 2005, Symposium "Nano-Bio Group", Mar. 2005, Oku-Biwako Makino Prince Hotel, Shiga, Japan
39. Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Takahiro Hirata, Hajime Nitta, Nobuo Kato and Akihito Yamaguchi, Indole Sensing Mechanisms that Control Growth phase-dependent Expression of Xenobiotic Exporter Genes, Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium 2005, Symposium "Nano-Bio Group", Mar. 2005, Oku-Biwako Makino Prince Hotel, Shiga, Japan
40. Takahiro Hirata, Asuka Kobayashi, Hidetada Hirakawa, Manabu Horikawa, Masaji Ishiguro and Akihito Yamaguchi, Small-Scale and Efficient Reporter Assay of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing System and the Evaluation of 3-oxo-C<sub>12</sub>-Homoserine Lactone Analogues, American Society of Microbiology, 105th General Meeting, Jun. 2005, Atlanta, Georgia, USA
41. Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Indole sensing mechanisms that control growth phase-dependent expression of xenobiotic exporter genes, American Society of Microbiology, 105th General Meeting, Jun. 2005, Atlanta, Georgia, USA



- ⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）
42. Akihito Yamaguchi, Bacterial xenobiotic exporter world: From molecular structure to physiological implications, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  43. Megumi Ohigashi, Chiemi Takenaka, Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi, Characterization of ABCA5 protein with its specific monoclonal antibody and knockout mice, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  44. Sakiko Shibata, Chiemi Takenaka, Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi, Identification of ABCA7 protein expression in mouse platelet, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  45. Nobuyoshi Kobayashi, Tsuyoshi Nishi, Takahiro Hirata, Akio Kihara, Takanitsu Sano, Yasuyuki Igarashi and Akihito Yamaguchi, Distinct secretion mechanism of sphingosine 1-phosphate, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  46. Satofumi Hashimoto, Yoshiyuki Kubo, Tsuyoshi Nishi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Localization of novel RND-type proteins in culture cells and mice tissues, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  47. Naoki Kobayashi, Norihisa Tamura, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, Identification of the residues involved in substrate recognition in RND-type multidrug efflux transporter, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  48. Ayumi Iwata, Naoki Kobayashi, Norihisa Tamura, Yuko Ohkawa, Fumiaki Ishibashi, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi, Molecular design of the super carbenicillin resistance AcrB, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  49. Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Toshio Kodama, Takeshi Honda, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Regulation of *E. coli* drug resistance and pathogenicity by indole signaling, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  50. Asuka Kobayashi, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Regulation mechanisms of the growth phase-dependent expression of xenobiotic exporters in *Escherichia coli*, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  51. Takeshi Masaki, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Fur (Ferric uptake regulator) controls the expression of AcrD and MdtABC, multidrug efflux transporters in *Escherichia coli*, International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, Aug. 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan
  52. Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Toshio Kodama, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Regulation of Xenobiotic Exporter Gene Expressions by Environmental Response systems in *Escherichia coli*, Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems, Aug.-Sep. 2005, Magdalen college, Oxford, UK
  53. Syoko Nishi, Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi, Analysis of the Mechanism of Proton Translocation through the Integral Vo Domain of the Vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases, 4th 21st Century COE program "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International symposium, Nov. 2005, Toba, Mie, Japan

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

54. Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi, Regulation of Xenobiotic Exporter Gene Expression and Multidrug Resistance in *Escherichia coli*, 4th 21st Century COE program "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International symposium, Nov. 2005, Toba, Mie, Japan
55. Hidetada Hirakawa and Akihito Yamaguchi, Regulation of Xenobiotic Exporter Gene Expression by Environmental Response Systems in *Escherichia coli*, The 1st CNU-SANKEN Joint Symposium on Advanced Materials Science, Nov. 2005, Chungnam National University Daejeon, Korea

特許

出願人 : 高木博史、中森茂、山口明人、西野邦彦  
名称 : L-システイン生産菌及びL-システインの製造法  
出願番号 : 2004-103652  
出願日 : 平成16年3月31日  
発明者 : 高木博史、中森茂、山口明人、西野邦彦  
出願国 : 日本