

課題番号	LS045
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	多剤耐性化の克服を目指した薬剤排出トランスポーターの構造機能解析
研究機関・ 部局・職名	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
氏名	村上 聡

1. 当該年度の研究目的

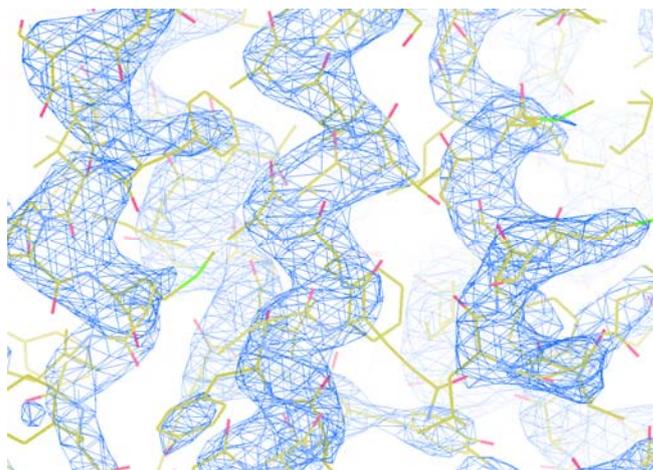
当初計画していた達成すべき内容について概要を記すと、①病原性細菌の高分解能構造解析②化合物ライブラリーを利用した阻害剤の探索③新規トランスポーターファミリーの結晶解析④薬剤排出トランスポーター発現制御転写因子の構造機能解析⑤これら達成の為に技術開発と啓蒙、である。

いずれをとっても確かに前進してはいる。しかし、24 年度報告段階ではどれも論文発表などに見える形には達していない。従ってその評価は低い。しかし、この一年間で大変大きな進歩があった。とりわけ③については、新規の薬剤排出トランスポーターファミリーの構造解析が狙える高分解能まで(現在 2.6 Å)回折を示す結晶を遂に得ることに成功した。これについては必ずや今年度中に構造解析を完了させ、最低評価を大逆転のうちに納め本研究を終了させたい。その解析は単なるホモログ解析などではなく全く新規の構造解析となるので実験的に位相を求める必要があり、現在それに取り組んでいる。必要に応じて水溶性部分のみの構造解析を企てるかもしれない。さらに①でも大きな進歩があった。難治院内感染の主要なものである緑膿菌由来の多剤排出トランスポーターと基質の構造解析に成功している。これは現在機能解析のデータを付けて論文執筆の準備中である。これも完了させる。③については一昨年度微量の化合物消費により他種類の基質に対する阻害をアッセイする方法を確立し薬 800 種類の化合物に対して一次スクリーニングを行った。現在さらに化合物の種類を増やしてアッセイしているが、これを完了させる。何かヒットしてくるかどうかは、スクリーニングであるが故に不明であるが、一次～二次と進める過程で我々は幾らかの弱いながらもヒット化合物を得ている。その知見は成果として纏めることができると考えている。④について、本年はゲノム破壊を含めたより積極的なアプローチを取ることを考える。最終年度でこれを論文化するにあたり、必要な構造解析については既に構造精密化計算も 24 年度中に完了している。

以上述べた通り、全ての計画は遅れてはいるものの、大きな成果に向けて前進しているので、当初計画通り進めるという基本ラインはあえて崩さずに行きたい。纏めると①は機能解析を付けて緑膿菌トランスポーターの構造機能解析を完了させる、②25 年度中にあと 1800 種ほどの化合物のスクリーニングを行う、③新規トランスポーターファミリーの結晶解析を完了させる(25 年度メインテーマとしたい)、④多剤排出トランスポーター発現制御転写因子の遺伝子破壊を含め、機能を明らかにし、結晶解析結果と共にシナリオを完結させる、⑤既に部分的に始めているが、蛋白質科学アーカイブへの投稿など、幾らか本研究で得た知見や技法を、積極的に発表してゆく。

## 2. 研究の実施状況

膜蛋白質である多剤排出トランスポーター蛋白質の結晶解析、機能解析さらには、その生理的役割の解析からの阻害剤開発まで、多くを提案した本研究ではあったが、最終年度にあたる本年度ついに大きな進展があった。①病原性細菌由来の高分解能構造解析については、臨床現場で問題となっているバクテリア由来のうちより親水性の高い治療薬を特異的に選択する新規トランスポーターの 2.9 Å 分解能での結晶構造解析に成功した。現在構造精密化計算中である。さらに、③新規トランスポーターファミリーの結晶解析にも進展があった。これも、臨床現場でしばしばアウトブレイク事例が報告されるバクテリア由来のトランスポーターであるが、我々がこれまで主に研究を進めてきた AcrB など RND 型のトランスポーターではない全く新奇のトランスポーターファミリーに属するものであり、その 3.3 Å 分解能での構造解析が完了した。これも現在構造精密化計算中であるが、大きなインパクトを以て世に問うことが出来る成果が得られた。これらの、2 種のトランスポーターの結晶構造情報は、これまで知られていた多剤排出トランスポーターの構造に基づく機能解析の理解を大幅に広げる新しい知見となる。我々が世界で初めて多剤排出トランスポーターの結晶構造解析に成功したのが 2002 年であり、それから 10 年以上が経つが、一向に構造に基づく創薬研究が結実しないのは、構造のフレキシビリティに対して、多様な構造情報が利用出来ないことにも一因があることも上記の成果から見てきた。様々な基質多様性をうみだす、多様な構造を沢山並べて観察して理解できるものであると思われる。本研究で得られた知見は、その事を想起させる結果であった。現在のところ未だ論文としての公表には至っていないが、間もなく完了する構造精密化計算の後に最先端・次世代研究の成果として発表したい。また、②化合物ライブラリーのスクリーニングについては、数種類のヒット化合物を得た。しかし、上記の通り不動の結晶構造を的にした SBDD では限界があることも浮き彫りとなった。④については、遺伝子破壊が完了するなど解析が進められている。研究期間中に完了させることが出来なかったが、遠くない将来これも完了させたい。また、関連して、機能解析における基質認識機構、とりわけペニシリン剤の基質特異性拡大についてのメカニズム解明に成功し、J. Biol.Chem.に掲載された(責任著者)。



構造解析に成功した新規トランスポーターファミリー(未発表)の膜貫通部分の電子密度図およびモデル

<p>雑誌論文 計 10 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 10 件</p> <p>Naoki Kobayashi, Norihisa Tamura, Hendrik W. van Veen, Akihito Yamaguchi, and <b>Satoshi Murakami</b> β-Lactam Selectivity of Multidrug Transporters AcrB and AcrD Resides in the Proximal Binding Pocket <i>J. Biol. Chem.</i> 289 (15) 10680-90 (2014)</p> <p>Hiroshi Y. Yoshikawa, Ryota Murai, Hiroaki Adachi, Shireru Sugiyama, Mihoko Maruyama, Yoshinori Takahashi, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, <b>Satoshi Murakami</b>, Hiroshi Masuhara, and Yusuke Mori Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding <i>Chem. Soc. Rev.</i> 43 2147-2158 (2014)</p> <p>Paolo Ruggerone, <b>Satoshi Murakami</b>, Klaas M. Pos, and Attilio V. Vargiu RND efflux pumps: structural information translated into function and inhibition mechanisms <i>Curr. Top. Med. Chem.</i> <b>13 (20)</b> 3079-100 (2013)</p> <p>Mika Hirose, Shigeru Sugiyama, Hanako Ishida, Mayumi Niiyama, Daisuke Matsuoka, Toshiaki Hara, Eiichi Mizohata, <b>Satoshi Murakami</b>, Tsuyoshi Inoue, Shigeru Matsuoka, and Michio Murata Structure of the human-heart fatty-acid-binding protein 3 in complex with the fluorescent probe 1-anilinonaphthalene-8-sulphonic acid <i>J. Synchrotron Rad.</i> <b>20</b> 923-928 (2013)</p> <p>Tsutomu Yamane, <b>Satoshi Murakami</b>, and Mitsunori Ikeguchi Functional rotation induced by alternating protonation states in the multidrug transporter AcrB: all-atom molecular dynamics simulations <i>Biochemistry</i> <b>52(43)</b> 7648-58 (2013)</p> <p>Li-Wei Hung, Heung-Bok Kim, <b>Satoshi Murakami</b>, Goutam Gupta, Chang-Yub Kim, and Thomas C. Terwilliger Crystal structure of AcrB complexed with linezolid at 3.5 Å resolution <i>J. Struct. Funct. Genomics</i> <b>14 (2)</b> 71-75 (2013)</p> <p>Toby W. Hurd, Edgar A. Otto, Eikan Mishima, Heon Yung Gee, Hana Inoue, Masato Inazu, Hideomi Yamada, Jan Halbritter, George Seki, Masato Konishi, Weibin Zhou, Tsutomu Yamane, <b>Satoshi Murakami</b>, Gianluca Caridi, Gianmarco Ghiggeri, Takaaki Abe, and Friedhelm Hildebrandt Mutation of the Mg<sup>2+</sup> transporter SLC41A1 results in a nephronophthisis-like phenotype</p>
------------------------	--

様式19 別紙1

	<p><i>J. Am. Soc. Nephrol.</i> <b>24 (6)</b> 967-977 (2013)</p> <p>Xin-Qui Yao, Nobuhiro Kimura, <b>Satoshi Murakami</b>, and Shoji Takada Drug uptake pathways of multidrug transporter AcrB studied by molecular simulations and site-directed mutagenesis experiments <i>J. Am. Chem. Soc.</i> <b>135 (20)</b> 7474-85 (2013)</p> <p>Mayumi Niiyama, Shigeru Sugiyama, Mika Hirose, Sae Ishikawa, Hideyuki Tomitori, Kyohei Higashi, Tomoko Yamashita, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, <b>Satoshi Murakami</b>, Michio Murata, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Keiko Kashiwagi, Hiroyoshi Matsumura and Kazuei Igarashi Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of spermidine acetyltransferase from <i>Escherichia coli</i> <i>Acta Crystallogr.</i> <b>F69</b> 884-887 (2013)</p> <p>丸山美帆子、中村真利子、佐崎 元、高橋義典、吉村政志、吉川洋史、杉山 成、安達宏昭、松村浩由、井上 豪、高野和文、村上 聡、森 勇介 溶液流れ下におけるタンパク質の結晶成長 <i>日本結晶成長学会誌</i> <b>40</b> 72-82 (2013)</p> <p>(掲載済み－査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 2 件</p>	<p>専門家向け 計 2 件 村上聡、タンパク質の結晶化のかんどころ、熊本大学、2013 年 10 月 12 日-13 日、日本結晶学会</p> <p>Satoshi Murakami, Structure and Dynamics of the multi-drug efflux transporter, AcrB、東京、2013 年 5 月 30 日-31 日、Gratama Workshop、大阪大学・工技院大阪工業技術研究所・デルフト工科大学・ユトレヒト大学およびオランダ王立科学芸術アカデミー</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図 書 計 1 件</p>	<p>鈴木孝仁監修・新過程・高校生物・「フォトサイエンス・生物図録」・数研出版 2014 年、総頁 281 ISBN978-4-410-28145-7 細胞膜の研究</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計 1 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 1 件 電気泳動可視化装置、電気泳動槽、電気泳動可視化システム、電気泳動可視化方法、分離対象混合物の分析方法、分離対象混合物の分離方法および分離物の製造方・村上聡、森勇介、安達宏昭、東京工業大学、法特願 2013-119320 、平成 25 年 6 月 5 日出願、国内</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>村上研究室ホームページ <a href="http://www.xtal.bio.titech.ac.jp/top-j.html">http://www.xtal.bio.titech.ac.jp/top-j.html</a></p>

様式19 別紙1

国民との科学・技術対話の実施状況	スーパーサイエンスハイスクールへの出前講義 生物特別授業 2013年11月16日 東京都立戸山高等学校 参加者 44名
新聞・一般雑誌等掲載計0件	
その他	テレビ番組出演 BSフジ、ガリレオ X、計算+化学 コンピュータが描く生命現象, 12月22日放映 <a href="http://web-wac.co.jp/program/galileo_x/gx131222">http://web-wac.co.jp/program/galileo_x/gx131222</a>

4. その他特記事項

