

## 異物排出トランスポーターの構造・機能・制御と生理的役割

Structures, functions, regulations and physiological roles of xenobiotic exporters

山口 明人 (YAMAGUCHI AKIHITO)

大阪大学・産業科学研究所・教授



### 研究の概要

異物排出蛋白における最大の謎は、そのきわめて広い多剤認識の機構である。本研究の第一の目的は、マルチサイト結合機構が、大分子量の薬剤分子にも当てはまるかどうかの検証である。さらに、未発現の内在性異物排出遺伝子がかくも多数存在する理由を探るため、その発現制御機構を詳しく解明する。また、本来の生理的役割を解明する。高等生物における想定される役割として、脂溶性情報伝達物質分泌輸送が上げられるが、その解明も視野に入れる。

研究分野：医歯薬学 I

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：構造生物学

### 1. 研究開始当初の背景

異物排出トランスポーターは、近年臨床で問題となっているがん細胞や病原細菌の多剤耐性の主原因の一つである。私たちは、細菌異物排出蛋白の結晶構造決定に世界で初めて成功し、多剤認識の構造的基礎を明らかにした。また、内在性異物排出トランスポーターの網羅的解析を行い、多数の内在性遺伝子を同定した。本研究は、この成果の上に立ち、異物認識機構のより深い理解と、異物排出トランスポーターの本来の生理的役割を解明するために計画された。

### 2. 研究の目的

異物排出蛋白における最大の謎は、そのきわめて広い多剤認識の機構である。私たちは、基質強結晶構造に基づきマルチサイト結合機構を提唱した。本研究の第一の目的は、この機構が、大分子量の薬剤分子にも当てはまるかどうかの検証である。さらに、未発現の内在性異物排出遺伝子がかくも多数存在する理由を探るため、その発現制御機構を詳しく解明する。また、本来の生理的役割を解明する。高等生物における想定される役割として、脂溶性情報伝達物質分泌輸送が上げられるが、その解明も視野に入れる。

### 3. 研究の方法

大分子量薬物と異物排出トランスポーター共結晶構造の決定。環境因子による異物排出トランスポーター発現制御機構の詳しい解析。宿主細胞との相互作用の解析。分泌トランスポーター欠損マウスの解析。

### 4. これまでの成果

(1)大分子量薬物分子と異物排出トランスポーターAcrBとの共結晶構造決定に成功(未発表)：異物排出トランスポーターの分子機構における最大の謎は、科学構造上全く共通点の認められない、かくも多様な薬物を異物排出トランスポーターは如何にして認識しているのかという問題である。私たちは2006年の*Nature*誌に発表した論文で、分子量500未満のミノサイクリンとドキシソルビシン2つの薬物のAcrBとの結合構造を決定し、互いに部分的に重なり合う複数の結合ポケットを持つマルチサイト結合が多剤認識の基礎であるということを提唱した。タンパク質の構造変化を伴わずに、さらに大きな薬物分子の結合もこのマルチサイト結合で可能かどうか検証するため、分子量が1,000近くのリファンピシン、900近くのエリスロマイシンとの結合構造決定に取り組み、成功した。結果は驚くべきもので、タンパクの構造変化を伴わず、ミノサイクリンなどはオーバーラップしない離れた部位に結合していた。AcrBは側面に開口部を持ち、そこからミノサイクリンなどの低分子量薬物の結合部位であるフェニルクラスタ領域まで分子内チャンネルがつながっている。大分子量薬物は、このチャンネルの途中、フェニルクラスタ領域への入り口のところに結合していた。このことは、異物排出トランスポーターの薬物認識部位が非常に広い範囲にまたがったマルチサイト結合であることを示し

ており、タンパク質の基質との結合機構においてこれまで例がないきわめてユニークな基質認識機構を持つものであることが明らかになった。

(2) **サルモネラ菌 AcrAB 発現調節機構の解明**：AcrAB はグラム陰性細菌の主要異物排出トランスポーターであり、構成的に発現している。ところが、サルモネラ菌では、インドールなどの他菌種が産生した物質や、胆汁酸のような宿主の腸内で分泌される物質により大きく発現誘導されることを見だし、その転写調節が、大腸菌には無い RamAB 系によって仲介されていることを発見し、その機構を詳しく解析した。

(3) **高等生物における分泌輸送介在型情報伝達を担う脂溶性情報伝達物質排出輸送体の発見**：異物排出輸送体は多剤耐性細胞のみならず、高等生物から細菌まですべての細胞に存在する内在性の遺伝子にコードされている。多剤耐性は外部からの排出遺伝子の獲得によってではなく、これら内在性の排出遺伝子の高発現によってもたらされる。いったいこれらの内在性排出遺伝子は、薬物の排出のためにあらかじめ用意されているのか、それとも何か他の本来の生理的役割を持っているのかが問題である。薬剤は本質的に両親媒性の分子であるため、異物排出トランスポーターは一般に両親媒性（脂溶性）分子の排出輸送体である。そこで、私たちは、これらのトランスポーターが、脂溶性情報伝達物質排出輸送を担っているのではないかと考えてその探索を続けてきた。細胞間情報伝達は、情報伝達分子の出し手と受け手の両方がある初めて成立する。受け手としての受容体の研究は近年急速に進み、分子標的創薬のターゲットとしても最も重要な地位を占めている。他方、情報の出し手である情報伝達物質分泌輸送体はほとんど研究されていない。私たちは昨年、偶然から、ゼブラフィッシュにおいて脂溶性情報伝達物質スフィンゴシン 1 リン酸の分泌輸送体 Spns2 を発見し、*Science* 誌に発表した。これは、基質特異性の甘い ABC 型輸送体ではない、情報伝達物質特異的な分泌輸送体として初めての発見である。このことにより、これまで生物学の大きな missing link であった排出輸送介在型情報伝達の解明に向けて展望が大きく開けてきた。現在は、Spns2 ノックアウトマウスを確立し、その生理的役割の解明を進めている。

(4) **構造に基づく阻害剤スクリーニング系の確立**：AcrB 結晶構造を元に、300 万検体の化合物のバーチャルスクリーニングを行い、蛍光基質を用いた排出活性測定法で阻害剤候補化合物を絞り込んだ。現在、候補化合物と AcrB との共結晶構造の決定を行っている。構造が決定すれば、それに基づき、より強力な阻害剤を分子設計する。

## 5. 今後の計画

(1) リファンピシン、エリスロマイシン結合構造の精密化と論文出版。

(2) 環境センシングによる、サルモネラ菌異物排出トランスポーター発現制御機構のさらに詳しい解明。

(3) サルモネラ菌病原性発現における異物排出トランスポーター MacAB の役割について解析する。

(4) 脂溶性情報伝達物質分泌トランスポーター Spns2 ノックアウトマウスの解析と、Spns2 ファミリーの生理的機能を解析する。

## 6. これまでの発表論文等

### 【論文】

1.Characterization of the ATP-dependent sphingosine-1-phosphate transporter in rat erythrocytes, Kobayashi N., Kobayashi N., Yamaguchi A., Nishi T., *J. Biol. Chem.* **284**, 21192-21200, (2009)

2.The Sphingolipid Transporter Spns2 Functions in Migration of Zebrafish Myocardial Precursors, Kawahara A., Nishi T., Hisano Y., Fukui H., Yamaguchi A., Mochizuki N., *Science*, **323**, 524-527, (2009)

3.AcrAB Multidrug Efflux Pump Regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in Response to Environmental Signals, Nikaido E., Yamaguchi A., Nishino K., *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 24245-24253, (2008)

### 【招待講演】

Yamaguchi A., Identification of the transporter that export sphingosine 1-phosphate from the cells, 11th International Conference - Cancun, Mexico, October 25-28, 2009

Yamaguchi A., Novel Aspects of Mechanisms of Antibacterial Resistance Revealed by Crystal Structure, 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Sep. 17-20, 2007, McCormick Place, Illinois USA)

### 【受賞】

山口明人、日本薬学会賞 2008 年度「異物排出トランスポーターの構造・機能とその制御に関する研究」

山口明人、日本細菌学会・浅川賞 2008 年度「細菌異物排出タンパクの構造・機能とその発現制御に関する研究」

山口明人、文部科学大臣賞科学技術賞（研究部門）2010 年度「異物排出タンパク構造・機能・制御と生理的役割に関する研究」

ホームページ等

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/cmb/>