

## 超分子構造解析学研究室

<スタッフ> 中川 敦史（教授） 山下 栄樹（准教授） 松田真（助教）

<研究のキーワード>

- （１）生体超分子複合体 （２）タンパク質 （３）X線結晶構造解析  
（４）シンクロトロン放射光 （５）クライオ電子顕微鏡 （６）分子間相互作用

<令和6年度の主な研究活動概要>

生体内ではタンパク質を中心とした数多くの生体高分子が、互いに相互作用しながら働いている。本研究室では、X線結晶構造解析法やクライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いた様々な生体高分子の構造生物学研究と放射光を利用した構造解析法の開発を進めている。

緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は、水中や土中などの自然環境に広く分布しており、健康な人の腸管などに保菌されていることも知られている。健常者には、通常、病原性を示さない弱毒細菌の一つであるが、一方で、感染防御能力の低下した患者においては病原性を発揮して、日和見感染症を引き起こす原因菌として問題となる。特に、複数の抗生物質に耐性を持つ多剤耐性緑膿菌による院内感染症の発生は、しばしば大きな社会問題となっている。緑膿菌の薬剤耐性化機構の1つとして、RND（Resistance-Nodulation-Division）型の多剤排出トランスポーターの過剰発現が知られている。RNDトランスポーターは、内膜に存在して基質（異物）認識と薬剤排出を担うRND、外膜に存在しチャンネルとして働くOuter Membrane Factor (OMF)、ペリプラズムに存在しRNDとOMFをつなぐ役割を担うMembrane Fusion Protein (MFP)からなる三者複合体である。これまでの研究で、緑膿菌でもっとも多く発現し、研究が進んでいるMexAB-OprMの構造決定に成功しているが、さらにRNDトランスポーターファミリーにおける基質（異物）認識機構の特異性の解明を目指し、各種RNDタンパク質の構造解析を目指した研究を進めている。

令和6年度は、多剤耐性緑膿菌において主に発現している4種類のRNDトランスポーターのうち、(1)緑膿菌でもっとも多く恒常的に発現するMexBと各種化合物との相互作用解析および(2)アミノグリコシド系薬剤を排出する唯一のRNDトランスポーターであるMexYの構造解析に関する研究を進めた。

### (1) MexB と化合物との相互作用解析

緑膿菌でもっとも多く恒常的に発現するMexAB-OprM複合体の中心で働くRNDトランスポーターMexBと薬剤・阻害剤との相互作用解析を目的として、等温滴定型カ

ロリメトリー（Isothermal Titration Calorimetry: ITC）法を用いた相互作用解析を試みた。これまでの研究で MexB との結合構造が得られている3種類の阻害剤（ABI-PP、EPI、Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide: PAN）、MexB によって排出されないアミノグリコシド系抗生物質 Kanamycin: KM、MexB によって排出されることが知られている6種類の抗生物質（Minocycline:

MINO、Rifampicin: RFP、Norfloxacin: NFLX、Levofloxacin: LVFX、Piperacillin: PIPC、Cefoperazone: CPZ）について、ITC測定を行った。一般的に膜タンパク質のITC測定は、化合物と界面活性剤との相互作用により測定が難しいとされている。MexB においても、EPIについて再現よく熱量測定を行う事ができたが、EPI以外は信頼性の高いデータを得ることができていない。

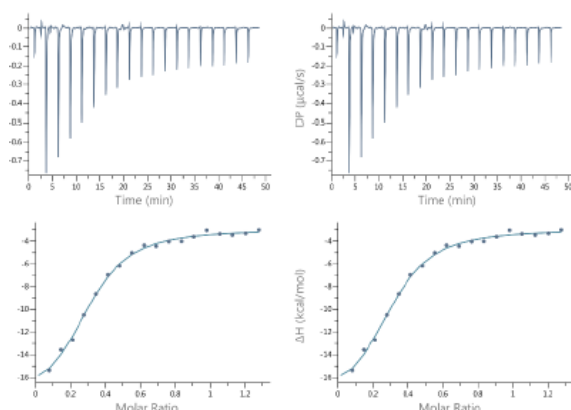


図1 MexB-EPI の ITC の結果

## (2) MexY 三量体の構造解析

緑膿菌中には12種類のRND型薬剤排出トランスポーター複合体が存在しており、それぞれが多様な薬剤を排出する。それらの中でも MexXY-OprM は臨床試験で多用されているアミノグリコシド系薬剤を含む数種類の薬剤を排出することができる唯一のRND型トランスポーター複合体である。MexXY-OprM の薬剤認識の根幹を担う MexY に関しては、これまで結晶化の過程で機能体である三量体が解離した単量体としての結晶構造しか得られていない。そこで MexY の三量体構造及び薬剤結合型構造を解明することで薬剤の結合様式を明らかにすることを目的として研究を進めた。様々な条件で可溶化・精製を試みたが、野生型 MexY が三量体を形成する条件を見つけないことができず、三量体を安定化する Foldon との融合タンパク質を用いることで、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により MexY 三量体の構造を決定に成功した。現在、薬剤・阻害剤との複合体の構造解析を目指して研究を進めている。

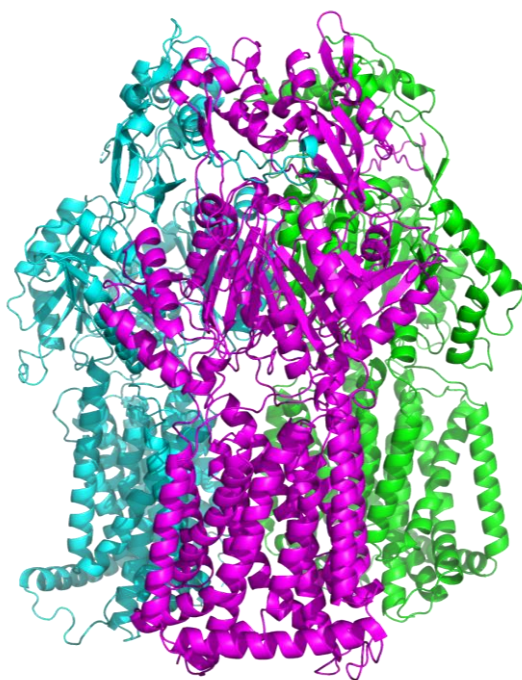


図2 MexY-Fofoldon 三量体の構造