

乳酸菌代謝物輸送に関与する膜輸送体の機能構造解析

田口 厚志

大阪大学 産業科学研究所

研究の目的

薬剤排出ポンプは、細菌が多様な分子を菌体外へ排出する代表的なメカニズムであり、これまで抗菌薬耐性の獲得に関連した研究が盛んに行われてきた。特に大腸菌や緑膿菌などのグラム陰性細菌では、RND 型排出ポンプ(例:大腸菌 AcrAB-TolC)が高度な薬剤耐性に関与していることが示されており、感染症治療法に直結する重要な研究対象となっている。

乳酸菌をはじめとするグラム陽性細菌には、外膜タンパク質を必要とする RND 型排出ポンプは存在しないが、RND 型以外の排出ポンプ (ABC 型・MF 型・MATE 型・DMT 型) がゲノム上に多数コードされている¹⁾。しかし、グラム陽性細菌においては多くの薬剤排出ポンプと抗菌薬耐性との関連性が判然としなかったため、これまで十分な研究が進められてこなかった。

そこで本研究に先立ち、肺炎球菌に存在する 30 種類の薬剤排出ポンプをそれぞれ過剰発現させたライブラリを作製し、各ポンプが抗菌薬感受性に及ぼす影響を網羅的にスクリーニングした。その結果、以前から抗菌薬耐性に関与していることが知られていた ABC 型排出ポンプ PatAB と BceAB に加え、先行研究が存在しなかった ABC 型排出ポンプ FoeAB が抗菌薬ホスホマイシンへの耐性化に寄与することを見出した。ABC 型排出ポンプは、ATP 加水分解反応を駆動力として基質を排出する。FoeAB は FoeA と FoeB から構成されるヘテロ二量体であり、*Streptococcus* 属および *Enterococcus* 属に広く保存されている。

本スクリーニングで 3 種類のポンプしかヒットしなかったことは、薬剤排出ポンプが抗菌薬排出以外の生理的機能を持つ可能性を示唆しているが、その具体的な役割は依然として不明である。FoeAB についても、ホスホマイシンに特化した排出ポンプとして保存されている可能性は低く、細菌の生存や恒常性維持に関与する分子の輸送を担っていると考えられる。ホスホマイシンは、解糖系中間体ホスホエノールピルビン酸 (PEP) のアナログ基質であり、エポキシ基とリン酸基からなる構造を持つ。このことから、FoeAB がリン酸化された代謝物の輸送を担っている可能性が示唆された。

本研究では、乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* 由来の FoeAB の機能構造解析を行い、その基質輸送メカニズムの解明を目指した。また、遺伝子操作が容易な肺炎球菌において FoeAB 欠損株と過剰発現株を作成し、培地上清を比較するメタボローム解析を実施することで FoeAB の生理的基質を特定し、FoeAB の役割の同定を試みた。

方法

C 末端に Twin-Strep タグを付加した *S. thermophilus* FoeA を FoeB とともに大腸菌 C43(DE3)株で共発現させ、膜画分を界面活性剤 n-ドデシル- β -D-マルトシド (DDM) もしくはラウリルマルトースネオペンチルグリコール (LMNG) で可溶化した。その後、アフィニティカラムとゲル濾過カラムを用いて FoeAB を精製した。

構造解析には、DDM で精製した FoeAB サンプルを用いた。目的のコンフォメーション構造を安定化させるため、サンプルにヌクレオチドを添加してグリッドを作製した。これをクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) で撮影し、得られた画像データを用いた粒子解析に基づき 3 次元構造マップを再構成した。

輸送活性の評価には、ホスファチジルコリンを主成分とするリポソームに LMNG で精製した FoeAB を再構成して得られたプロテオリポソームを用いた。基質と GTP を添加して FoeAB 依存的な輸送反応を誘導し、リポソーム外部に残留した基質を除去した後、内部に取り込まれた基質を質量分析により定量した。

さらに、肺炎球菌 FoeAB 欠損株および FoeAB 過剰発現株を人工培地で培養し、その培養上清を対象にメタボローム解析を実施した。両者の代謝産物プロファイルを比較することで、FoeAB が輸送する生理的基質候補の同定を試みた。

結果

ABC 型排出ポンプは、細胞内基質を取り込む内向き構造と、その基質を細胞外へ放出する外向き構造を取る。そこで本研究では、FoeAB による基質輸送メカニズムを分子レベルで解明するため、Cryo-EM を用いて内向き・外向き構造の解析を行い、最終的に 2.8-3.3 Å の分解能で再構成マップを得た。

ヌクレオチド非存在下、および ATP アナログ AMP-PNP 存在下では、FoeAB が内向き構造を示した。内向き構造において、輸送基質は膜貫通ドメインに認識される可能性が高い。そこで、ホスホマイシンを添加したサンプルで基質結合型の構造解析に取り組んだが、ホスホマイシンと一致する電子密度は観測されなかった。その代わり、膜貫通ドメイン内部にリン酸イオンあるいは硫酸イオンに由来すると考えられる電子密度が確認されたことから、この分子の存在が観測条件下で FoeAB へのホスホマイシン結合を阻害している可能性がある (図 1)。

この電子密度の周辺には、リシンやアルギニンなどの塩基性残基が存在しており、ホスホマイシンのリン酸基がこれらの残基と相互作用することが想定された。実際、これらの残基をアラニン置換した変異体を発現させた大腸菌株は、ホスホマイシン

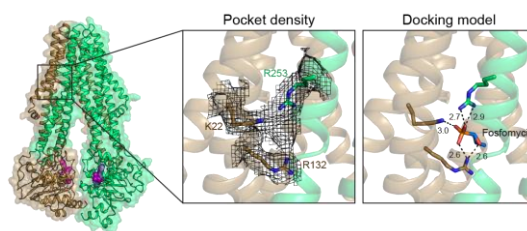


図 1. FoeAB の内向き構造における基質結合領域周辺の電子密度と分子ドッキングによるホスホマイシン結合モデル。

耐性を喪失したことから、ホスホマイシンはこの結合ポケットに認識されることが示唆された。また、分子ドッキング解析からも、ホスホマイシンがこのポケットに安定して結合し得ることが確認された。

続けて、FoeB の Walker B グルタミン酸をグルタミンに置換した FoeAB 変異体を作製し、ATP を添加して外向き構造の解析を行った。外向き構造においては、内向き構造で観測された膜貫通ドメイン内部の電子密度は確認されず、基質放出に対応する構造変化が生じたことが示唆された。基質結合領域を比較すると、内向き構造では FoeA の Arg136 が FoeB の Arg256 の配置を安定化し、Arg256 を含む塩基性残基群による基質リン酸基の認識に寄与していた。一方、外向き構造ではこの安定化作用が失われ、この構造変化が基質の放出を促進していると考えられる。

次に、FoeAB のヌクレオチド加水分解活性および輸送活性を評価するため、FoeAB をホスファチジルコリン主体のリポソームに再構成した。再構成 FoeAB は ATP 加水分解活性を示し、リポソーム中でも機能が保持されていることが明らかとなった。さらに、FoeAB は ATP 加水分解活性よりも GTP 加水分解活性が高く、FoeAB が菌体内で GTP を選択的に加水分解する可能性が示唆された。

輸送活性は、リポソーム外部に添加したホスホマイシンが FoeAB 依存的に内部に取り込まれた量を指標として評価した。野生型 FoeAB ではホスホマイシンの輸送が確認された一方、構造解析から基質認識に関与することが示唆された FoeA の Arg132 をアラニンに置換した変異体では輸送が認められなかった。また、ホスホマイシン耐性能が向上する FoeA の G126D 変異体では輸送活性が増強され、FoeAB によるホスホマイシン輸送が耐性化に直接対応していることが示された (図 2)。

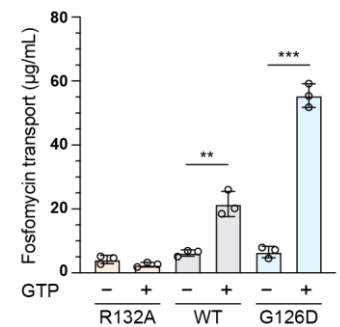


図 2. FoeAB 野生型と変異体におけるホスホマイシン輸送活性の比較。

FoeAB の機能構造解析から、リン酸基を持つ代謝物の輸送に関与する可能性が示された。そこで、肺炎球菌 FoeAB 欠損株および FoeAB 過剰発現株が培地中に放出した代謝物をメタボローム解析で網羅的に比較した。その結果、解糖系中間体でリン酸基を有する解糖系中間体が、FoeAB 過剰発現株培地でのみ検出されたことから、この分子が FoeAB の生理的基質である可能性が示唆された。

結論

本研究では、*S. thermophilus* FoeAB の内向き構造および外向き構造を明らかにし、この ABC 型排出ポンプが抗菌薬ホスホマイシンを菌体外へ輸送する仕組みを解明した。また、メタボローム解析により FoeAB が輸送する可能性のある代謝物候補を抽出した。今後は、本研究で確立した FoeAB の輸送活性評価系を活用し、候補代謝物に対する基質特異性を精査することで FoeAB の機能的役割を明らかにし、細菌の薬剤排出ポンプの生理的意義を一層明確にしていく予定である。

文献

(1) Du, D. et al. (2018) Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol* **16**: 523–539.