

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	Burkholderia pseudomallei 由来RND型多剤排出輸送体のX線結晶構造解析
Title(English)	
著者(和文)	加藤 堯彬
Author(English)	Takaaki Kato
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12614号, 授与年月日:2023年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:村上 聡,石井 佳誉,北尾 彰朗,福居 俊昭,和地 正明
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12614号, Conferred date:2023/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論文要旨

(和文2000字程度)

Dissertation Summary (approx. 2000 characters in Japanese)

報告番号 For administrative use only	乙 第	号	氏 名 Name	加藤 堯彬
(要 旨) 本論文は「<i>Burkholderia pseudomallei</i> 由来RND型多剤排出輸送体のX線結晶構造解析」と題し、4章より構成されている。 第1章「序論」では、まず、グラム陰性桿菌<i>Burkholderia pseudomallei</i>が持つ多剤耐性が類鼻疽病治療の妨げとなっていることについて述べ、多剤耐性化に主に寄与するRND型輸送体BpeB、BpeFが臨床的、重要な標的であることについて述べた。これまでに報告された相同蛋白質の結晶構造からRND型輸送体は機能的回転機構によって基質輸送を行うことが明らかになっているものの、詳細な分子機構は未だ十分に理解されていないことについて記述し、本研究の目的と意義について述べている。 第2章「BpeBのX線結晶構造解析」では、BpeBの発現系構築から結晶構造を解明するまでの過程、そして得られたBpeBの構造について述べた。BpeBと構造が既知である相同蛋白質の一次配列を用いて多重配列アライメントを行ったところ、BpeBのC末端領域は特に長いことが明らかになった。天然変性領域予測プログラムDisopredによると、BpeBのC末端領域32残基は天然変性領域であると予測された。そこで、結晶構造解析に適した標品の調製を目的として、BpeBのC末端を数残基ごとに切除した変異体を5種作成し、野生型と並行して精製、結晶化を行った。BpeBは大腸菌発現系を用いて調製し、金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) とゲル濾過クロマトグラフィー (SEC) により精製し、結晶化した。基質の排出活性測定を行いC末端切除変異体の排出活性が野生型とほとんど差がないことを確認した。各変異体の結晶を用いてX線回折実験を行った結果、C末端を21残基切除したBpeB変異体(以下BpeB Δ C21) の結晶が分解能3.4 Åであり、最も優れていた。その後、BpeB Δ C21の結晶を改善する目的で精製、結晶化に用いる界面活性剤を検討した。最終的にn-Undecyl-β-D-maltoside (UDM) を用いて調製した結晶より分解能2.9 ÅでBpeBの構造を明らかにした。BpeBの構造は取込型、結合型、排出型で構成された非対称な三量体構造であった。非対称な三量体の構造は、BpeBが機能的回転機構に基づいて基質輸送を行うことを裏付けた。BpeBと相同蛋白質である大腸菌由来AcrB、緑膿菌由来MexB (一次配列の相同性はそれぞれ66%、63%) の構造を比較したところ、取込型BpeBのポータードメインにある基質取入口と排出口は閉じられており、取込型と排出型の間状態の構造をしていた。一方、取込型BpeBの膜貫通ドメインは排出型の構造と似ていた。これら構造比較より、取込型BpeBの構造はRND型輸送体の排出型と取込型の間状態であると考えられた。また、結合型BpeBには、AcrBで報告された2つの基質結合ポケットへまたがるようにUDMが結合していた。 第3章「BpeFのX線結晶構造解析」では、BpeFの発現系の構築から結晶構造を決定するまでの過程、そして得られた結晶構造について述べた。BpeFも大腸菌発現系を用いて調製し、IMACとSECを用いて精製した。BpeF精製標品をSECによって分析したところ、三量体が単量体化してしまうことが明らかになった。精製に用いる緩衝液のpH、界面活性剤の種類を検討し三量体の安定化を試みたが、いずれの条件も改善がみられなかった。そこで、BpeFを脂質二重膜から可溶化させるときの界面活性剤n-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM) の濃度を2%から1%へ変更したところ、単量体化が抑えられた。結晶化条件を最適化しBpeFは、分解能3.0 Åで構造を明らかにした。BpeFの構造は結合型のみで構成された対称な三量体構造であった。また、BpeFの基質結合ポケット内にはDDMと思われる電子密度が存在していた。このことから、BpeFの対称な三量体は界面活性剤の結合が原因であると考えられた。 第4章「総合討論」では、本研究から得られた知見を総括し今後の展望について述べている。 以上を要するに、本論文はBpeBの構造からRND型輸送体の構造変化の過程と界面活性剤輸送機構の詳細を、BpeFの構造から機能的回転機構のために必要な単量体間の協働性は相同蛋白質間で異なることを明らかにしたものであり、理学的に貢献するところが大きい。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。				

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論文要旨 (英文)

(300語程度)

Dissertation Summary (approx. 300 words in English)

報告番号 For administrative use only	乙 第	号	氏 名 Name	Takaaki Kato
(要 旨) (Summary) This paper, "X-ray crystallography analysis of an RND multidrug efflux transporter from <i>Burkholderia pseudomallei</i>", comprises four chapters. Chapter 1, "Introduction," overviews the RND transporters, BpeB and BpeF, as the primary contributors to multidrug resistance in the Gram-negative bacteria <i>Burkholderia pseudomallei</i>. We describe that the substrate transport mechanism of RND transporters has yet to be fully understood and discuss the purpose and significance of this study. Chapter 2, "X-ray Crystallography analysis of BpeB," We purified five C-terminal truncation mutants in parallel with the wild-type BpeB. BpeB was overexpressed in <i>E. coli</i> and purified via ion metal affinity chromatography (IMAC) and size exclusion chromatography (SEC). The mutants were screened by sample monodispersity, substrate efflux activity and resolution. Finally, the crystal structure of BpeB, a mutant with a C-terminal truncation of 21 residues, was determined at 2.94 Å resolution. BpeB is an asymmetric trimer consistent with this transporter type's widely accepted functional rotation mechanism. The structure comparison with homologous proteins suggested that the access BpeB conformation represents an intermediate state between RND transporters' access and extrusion states. Additionally, n-Undecyl-β-D-maltoside (UDM) bound in the previously undescribed binding site. Chapter 3, "X-ray Crystallography Analysis of BpeF," BpeF was also overexpressed in an <i>E. coli</i> and purified. Notably, the BpeF trimer monomerized during purification. The concentration of n-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM), used for solubilizing BpeF from the lipid bilayer, was reduced from 2% to 1%, effectively preserving the trimer conformation. Finally, the crystal structure of BpeF was determined at 3.0 Å resolution. BpeF is a symmetric trimer comprising three "binding"-state monomers. Within the binding pocket of BpeF, an electron density of DDM was present. Chapter 4, "Discussion," summarized this study's insights and provided a perspective on future directions. In summary, this paper contributes to understanding the functional mechanisms of RND transporters by the structures of BpeB and BpeF, and scientific contributions are significant. Therefore, this thesis is accepted as a sufficiently valuable thesis for the Doctor of Science.				

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.