

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)	要約
Type(English)	Outline

Burkholderia pseudomallei 由来 RND 型多剤排出輸送体の X 線結晶構造解析

生命理工学院 生命理工学コース

加藤 堯彬

要約

本論文は「*Burkholderia pseudomallei* 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 *Burkholderia pseudomallei* 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 が臨床上、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込口と排出口は閉じられており、取込型と排出型の中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中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。