総説

多剤排出トランスポーターの結晶構造解析により 明らかになった機能的回転メカニズム

村上 聡 大阪大学産業科学研究所 / JST・さがけ

AcrB is a major multidrug efflux transporter in *Escherichia coli* cooperating with an outer membrane channel TolC and a membrane fusion protein AcrA. Here, I describe crystal structures of AcrB with and without substrates. The AcrB-drug complex consists of three protomers, each of which has different conformation corresponding to one of the three functional states of the transport cycle. Bound substrate was found in the periplasmic domain of one of the three protomers. The voluminous binding pocket is aromatic and allows multi-site binding. The structures show that drugs are presumably exported by a three-step functionally rotating mechanism in which drugs undergo ordered binding change.

membrane transporter / X-ray crystallography / membrane protein / active transport / multi-drug resistance

1. はじめに

細胞膜を介した物質輸送, すなわち膜輸送はきわめて基本的な生理現象である。おもにリン脂質により構成される細胞膜内部は誘電率がきわめて低いので、イオンや、極性分子を透過させない。これらの膜を介した輸送は、チャネル、ポンプやトランスポーターとよばれる膜タンパク質によって行われる。一般に、チャネルとポンプはイオンを輸送し、トランスポーターは栄養素や薬剤などの有機物質を輸送すると類別されている。細胞の生育に必要な糖やアミノ酸など、親水性の有機物質を細胞内に取り込むためのトランスポーターは多く知られている。また、疎水性の有機物質は単純拡散により細胞膜に分配され、その後、細胞質へ拡散してゆくことができるため、細胞にとって異物となるような薬物や毒物のような物質が細胞内に入ってきた場合、それらを細胞質から細胞外へと膜を介して排除するトランスポーターの存在も多く知られている。これらは異物排出トランスポーターとよばれ、今では細菌からヒトの細胞にいたるまで広く生物界に分布する最も基本的な生体防御機構であると認知されている。

このような排出トランスポーターが細胞膜に大量に産生されれば、その細胞は、薬剤や細胞毒性をもつ有機物質に対して抵抗性を示すようになる。これが、薬

剤耐性化の主因である。薬剤耐性化, すなわち治療薬が効かなくなる現象は、化学療法に立脚する現代の医療現場で深刻な問題の1つとなっている。一般には院内感染などに見られる病原性細菌の抗生物質耐性化や、末期がん、再発がんに見られる抗がん剤耐性化として知られている。最近も多剤耐性緑膿菌による院内感染が新聞紙上などでしばしば報じられるなど、いまや社会問題の1つとなっている。薬剤耐性化が起こる要因は薬剤の分解や修飾、ターゲット部位の変化などいくつか知られているが、本稿で述べる薬剤排出トランスポーターによる薬剤の能動的排出が最も強力な耐性化要因である。

この問題が複雑なところは、1種類の薬剤排出トランスポーターが、化学構造の異なる多種多様な薬剤を排出することができる点である。つまり、1種類の薬剤排出トランスポーターの発現により、多くの種類の薬剤がどれもこれも効かなくなるのである。タンパク質科学の常識として、酵素などある特定のタンパク質は、ある特定の基質にのみ作用すると考えられており、それらは時に“鍵と鍵穴”の関係にたとえられる。多剤排出トランスポーターはその例外であり、きわめて広い基質選択性をもつといえる。しかし、何でもかんでも排出してしまうという訳ではなく、細胞にとって異物となる薬剤などは排出するが、糖やアミノ酸などの有用物質を排出することはない、異物のみを見分

Crystal Structure of a Multi-Drug Efflux Transporter Reveal a Functionally Rotating Mechanism

Satoshi MURAKAMI

Department of Cell Membrane Biology, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University / PRESTO, JST

ける厳密さも兼ね備えている。

この多剤排出トランスポーターがどのような仕組みで、作用機序や化学構造の異なる多種多様な薬剤分子を基質として認識し、そして排除するかを理解できれば、タンパク質科学の一般原則から逸脱するユニークな基質認識機構の理解につながるばかりでなく、薬剤排出トランスポーターで排出されないような新薬の開発や、排出トランスポーター阻害剤を開発するなど、多剤耐性化問題に対して本質的な解決策を与えるという応用面での展開も期待できる。

2. 多剤排出トランスポーターの結晶構造

多剤排出トランスポーターの詳細な立体構造に基づく機能解明のため、その結晶構造解析を試みた。研究を始めた当初、トランスポーターはある程度の大きさをもつ有機物質を輸送するという働きの上から分子ゆらぎが大きいとされ、「結晶化は不可能ではないか？」との悲観論が支配的で、原子レベルでの構造解析例はなかった。著者らは院内感染などで問題となっている緑膿菌やセラチア菌などと同じくグラム陰性細菌であり、諸々の分子生物学的手法が確立している大腸菌をモデル細胞として、大腸菌のもつ最も強力な薬剤排出トランスポーターである AcrB タンパク質に着目し、結晶化および構造解析に着手した。グラム陰性細菌は細胞膜のほかに外膜をもつが、AcrB は抗生物質、抗がん剤、色素性毒素や界面活性剤など構造に関連性のない多種多様な物質を、細胞膜を介したプロトン濃度勾配の駆動力を用いてペリプラズムをバイパスして、外膜の外へと排出する大腸菌のもつ薬剤抵抗力の主因である。

われわれは 2002 年に大腸菌主要多剤排出トランスポーター AcrB の X 線結晶構造解析に成功した^{1), 2)}。アミノ酸 1000 個あまりからなる AcrB 分子はホモ三量体として機能することが明らかになったほか、基質取り込み口の発見、共役するアダプタータンパク AcrA の結合部位の推定など、多くの新しい知見を与えた。また、共役して機能する外膜チャネル TolC³⁾ との直接的相互作用を示唆し、AcrA-AcrB-TolC の新規複合体モデルを提唱した (Fig. 1)。多剤排出トランスポーターとして世界初の構造解析であるばかりでなく、膜を介して分子を輸送する膜輸送体としても世界初の解析例となった (PDB ID: 1IWG)¹⁾。さらに研究を進め、2006 年に AcrB 三量体と基質である抗生物質や抗がん剤とをそれぞれ結合させた状態で構造解析を行うことに成功し、どのような仕組みで AcrB 三量体が多剤を

認識し、そして排出するのかという作動メカニズムを、詳細な立体構造を基に明らかにした⁴⁾。

3. 基質結合状態の構造～多様な薬剤を認識しそれらを輸送させる仕組み

AcrB 三量体構造を詳しく見ると、構成する 3 つの単量体にはそれぞれ少しずつ構造の異なる部分があることがわかった (PDB ID: 2DHH) (Fig. 2)。AcrB 分子はホモ三量体であるが構造は非対称的である。この非対称性は AcrB の機能を考える上できわめて重要で、三量体に含まれる各プロトマーが異なる役割をもって機能することを示唆していた。さらに、AcrB 分子と基質が結合した状態での結晶構造解析として、抗生物質であるミノサイクリン (PDB ID: 2DRD)、抗がん剤であるドキソルビシン (PDB ID: 2DR6) とそれぞれ結合した状態の結晶解析も行った (Fig. 2, 3)。その結果驚いたことに、結合基質はいずれも AcrB 三量体のうち 1 つだけに結合しており、ほかの 2 つのプロトマーもそれぞれが異なる基質結合状態を有していることがわかった (Fig. 2)。

薬剤が結合しているプロトマーを“結合型”と名付けた (Fig. 2, 青)。結合型プロトマーの分子内に比較的大きな空洞状の薬剤結合ポケットがある。このポケットは 4 個のサブドメイン PN1, PN2, PC1, PC2 (Fig. 2c) により形成され、結合型ではそれらが互いに離れることにより、ポケットが他の 2 つのプロトマーのものと比べて拡張し、薬剤を結合させるのに十分な大きさをもっていた。このポケットのもう 1 つの特徴は、内部に多くの芳香族アミノ酸が突き出している、疎水性の高い環境をつくっていることである。このことが疎水性基質との疎水結合に適した環境を作っている。結合型の薬剤結合ポケットは拡張しているので、芳香族アミノ酸の間に隙間ができ、薬剤を結合するのに十分な空間ができるのである。薬剤分子はこの隙間に挟まれる形で、 π 電子の重なりを利用する芳香族-芳香族相互作用をおもに用い、さらに付加的に水素結合を用いて結合するという様式であることが判明した (Fig. 3)。結合が観察できたミノサイクリン、ドキソルビシン、いずれの基質も同じ拡張したポケット内に結合するものの、結合にかかわるアミノ酸の組み合わせは異なっていた。すなわち構造の異なる基質に対しては、同じポケット内の異なるアミノ酸側鎖の組み合わせによりなるいろいろな側面で認識される仕組みである。ポケット内のアミノ酸の複数の組み合わせによる結合部位のバリエーションが、多様な基質結合の

Fig. 1

Proposed model of the AcrB-AcrA-TolC. Structure models of TolC³⁾ and AcrA⁶⁾ are manually docked to AcrB. This molecular complex penetrates two membranes, the cytoplasmic membrane and the outer membrane, and extrudes drugs acting in the cytoplasm and the periplasmic space. This model was proposed by the author in 2002.

本質であることがわかった。この様式は「マルチサイト型」認識とよばれるもので、黄色ブドウ球菌由来の多剤結合型転写因子 QacR などにも見られる多基質認識メカニズムであった⁵⁾。

このポケットは、三量体を形成するいずれのプロトマーにも存在するが、先に述べたとおり、結合型のもつもののみが拡張した構造を有しており、基質に対し

高い親和性をもつと考えられる。これ以外のプロトマーの基質結合ポケットは構造変化により収縮していることがわかる。この構造変化で内部にある芳香族アミノ酸は今度は基質との間ではなく、それら同士がスタッキングする。これは一般の水溶性タンパク質の疎

Fig. 2

Structure of the AcrB-substrate (minocycline) complex. Three protomers are individually coloured (blue, red, green). (a) Ribbon representation viewed from the side parallel to the membrane plane. The minocycline molecule is shown in CPK representation, with the position of the C, N, O atoms indicated by yellow, blue and red balls, respectively. The extra-membrane (periplasmic) headpiece is at the top and the transmembrane region is at the bottom. (b) Top view of a ribbon representation. The inclined helix (dotted oval) of the "Extrusion" (red) makes drug binding pocket of "Binding" (blue) closed. (c) Cut view of the porter domain from the distal side of the cell. Phenylalanine residues including those in the substrate binding pocket (dotted circle) are shown in the ball-and-stick representation. The difference Fourier map ($F_{(drug)} - F_{(native)}$) of bound minocycline is depicted by an orange coloured cage contour at 3σ . An X sign indicates an exit closed by the inclined helix from "Extrusion" protomer (red). Arrow indicates the substrate translocation pathway from shrunk pocket to the exit of AcrB, which connects to the outer membrane channel, TolC.

水性コア部分にもしばしばみられる安定なコンホメーションである。しかし、この場合は基質を結合させる隙間はなく、基質に対する低親和性状態であると考えられる。すなわち、基質結合ポケットはマルチサイト型認識により多様な基質を結合させることができ、親和性調節については、ポケットの拡張・収縮という単純な構造変化により行うことができる。このメカニズムが多剤認識およびその運搬の本質である。

4. 基質輸送経路

先に述べた通り、“結合型”（青）のもつ結合ポケットは拡張することで高親和性のコンホメーションを

Fig. 3 Close up view of the drug binding site. Drug molecules and key residues for substrate binding are shown in a ball-and-stick representation. Bound drug molecules are coloured as same as Fig. 2. Chemical bonds for drug binding are drawn as dotted lines. (a) AcrB-minocycline complex. (b) AcrB-doxorubicin complex.

取る。ところが拡張しているがゆえに、サブドメイン間に隙間が生じ、ポケットにはころびができる。この隙間は基質輸送経路の中で出口となる部分である。そこへ三量体に含まれる隣のプロトマー（赤）のヘリックスがふさぐような形で倒れ込み立体障害を与えている。この助けにより結合型プロトマー（青）の薬剤結合ポケットは閉じたコンホメーションを取りうる（**Fig. 2c**, ×印）。ポケットが拡張し高親和性のコンホメーションを取ることと、出口がふさがれることが結合型プロトマーに基質がとどまる理由である。同時に、このように隣のプロトマー（赤）のもつヘリックスが、結合型（青）に向けて斜めになることは、そのヘリックスをもつプロトマー自身（赤）の薬剤結合ポケットの出口付近を大きく開けることにもなる（**Fig. 2c**, 矢印）。そしてこの単量体の薬剤結合ポケットは結合型のものと比べ収縮して、基質に対し低親和性の状態にある。これらの事実を考えあわせると、このプロトマー（赤）は、まさに薬剤を放出した後の状態に相当すると考えられるため、それを“排

Fig. 4 The novel drug translocation pathway for AcrB. The chicken-wire presentation coloured in magenta is the solvent accessible inner cavity of the AcrB molecule. For clarity the “access” protomer is removed. Bound minocycline in the “binding” protomer is shown in a CPK representation. Substrate can gain access from periplasmic space or outer leaflet of the membrane (arrow ①). On the “binding” protomer, there is a channel to the binding pocket (arrow ②). Expanded binding pocket can bind substrates. Pathway from this pocket is not connected to the exit (③). On the “extrusion” protomer, pathway from shrunk pocket to the exit is connected (arrow ④), but there is no channel from inside of the cell (⑤). “Binding” protomer and “extrusion” protomer are correspond to the inward-facing form and outward-facing form, respectively.

出型”と名付けた (Fig. 2, 赤)。

2002年の構造解析の際、AcrB 三量体の中心に存在する“中央ヘリックス”はチャンネル様の構造をもっていたため、この間を通して基質が輸送されるという仮説を提唱し、それが広く受け入れられた¹⁾。ところが今回の構造解析の結果、中央ヘリックスはチャンネルではなく、基質結合ポケットから出口へと向かう基質輸送経路を開閉させる“弁”であることが判明した。基質輸送経路を示す分子内の溶媒接触領域は、結合型プロトマーでは分子の出口とは分断されているが、排出型プロトマーでは出口とつながっている (Fig. 4)。

もう1つ注目すべきは、細胞の内側や、ペリプラズムからの基質の“入口”である。排出型プロトマーにおいて基質結合ポケットから基質が解離する際、出口だけでなく入口も開いていたとするならば、排出すべき基質が細胞質側へ逆流する可能性が残る。AcrBには基質の取り込み口に当たる部分にもう1つの“弁”が存在し、基質輸送の方向性を確保している (Fig. 5)。排出型の基質取り込み口は閉じた構造をもち、基質取り込み口から基質結合ポケットへいたるチャンネルが消失する一方で、出口のみが開いた状態となり、基質結合ポケットから出口へといたるチャンネルができる。この機構により一方向への基質輸送が達成されるのである (Fig. 4)。逆に、結合型プロトマーではこの入り口の弁は開いていて、基質結合ポケットから細胞膜側、ペリプラズム空間への経路がつながっているが、出口への経路は排出型からの斜めになったヘリックスで閉ざされているのは前述の通りである (Fig. 5)。

残る1つのプロトマー (Fig. 2, 緑) は、結合型と排出型との中間的な構造を有している。開かれた基質取り込み口と、未だ閉じている基質結合ポケットをもつ。そのため、基質の排出のあと、次なる結合をさせる前に、基質を取り込むための段階にあると考えられ、“取込型”と名付けた。

このように、それぞれの構造的特徴が、基質の結合および、輸送状態を決め、協調的に働いている巧妙な仕組みが明らかとなった。すなわち、①細胞の内側方向から AcrB 内部に薬剤を取り込むためのパーツである“取込型” (緑)、②薬剤を結合するための状態で、実際に薬剤が観測されたパーツである“結合型” (青)、③薬剤を細胞外に排出するための状態をもつパーツである“排出型” (赤) が存在することが判明した。さらに、この3つのパーツの役割はいつも同一ではなく、薬剤を取り込んだ後に、それを結合させ、その後、それを排出する、といったように、構造変化に伴

いお互い役割を変化させることにより、細胞の内側より、外側への能動輸送を達成させているという仕組みが示唆された (Fig. 6)。

5.

他のコンポーネントとの共役による複合体作動メカニズム

AcrB と共役して機能するアダプタータンパク AcrA⁶⁾ の AcrB への結合サイトは、AcrB のペリプラズムに突き出た部分の側面に存在する V 字型のクレフトであると考えられているが¹⁾、そのコンホメーションにも非対称性があることがわかった (Fig. 2c)。排出型プロトマーのクレフトはほとんど消失している。このような AcrB の構造変化は AcrA に非対称的性質を伝達するのだろう。その後、AcrA はレバーのように働くことで外膜を貫通し、“煙突”の役割を担う TolC 分子に AcrB の構造変化を伝えると考えられる。2000年に Koronakis らによって構造解析された TolC もホモ三量体で、その構造は対称的であった³⁾。しかし、それは結晶学的な対称である。AcrA の構造変化は非対称的に起こるだろうから、TolC に含まれる各プロトマーも非対称的に構造変化する可能性を著者は想像しているが、異なる結晶形で構造解析を待つしかない。あるいは、AcrA-AcrB-TolC 複合体の構造解析がより直接的に解を与えるだろう。

6.

プロトンエネルギーとの共役機構

先述のすべての構造変化は、細胞膜を介して存在する水素イオン濃度勾配によって駆動されることが知られている。われわれの構造解析は、どのようなメカニズムでこの水素イオン濃度勾配をとらえ、構造変化のエネルギーとして利用しているかのヒントも与えた。AcrB の細胞膜貫通部分には機能上きわめて重要な荷電性アミノ酸が存在する (Fig. 7)。これらは、2つのアスパラギン酸 D407, D408 と1つのリシン K940 からなる。これらは膜貫通部分のほぼ中央に位置し、近接して存在する。結合型と取込型では、これら3つのアミノ酸が互いに静電的に結合する配置をとっているが、排出型ではこの結合がはずれ、リシン K940 はヘリックス TM11 にあるチロシン T978 残基と結合している (Fig. 7)。その場合2つのアスパラギン酸 D407, D408 に配位する塩基性アミノ酸はなく空っぽになる。結晶解析で水素イオンを観察するにはきわめて高い解像度が必要であり、今回の結果からはそれは望めないが、おそらくは水素イオン

Fig. 5

Entrance valves. Close up views of the vestibules in three different transport states, viewed from slightly diagonally below to the side of the molecule. Three protomers are superposed. The flexible region above TM8 and PC2 sub-domain are represented by a deep colour corresponding to the colours in Fig. 2, and the remaining main chain tracings are more transparent. The entrance for substrates is indicated as dotted circle. A helix from “extrusion” (red) is moved onto the entrance to close it.

がそこに結合していると考えられる。すなわち膜貫通部位に存在するこれらの荷電性アミノ酸がプロトン化を受けたときに、“中央ヘリックス”に傾斜したヘリックスをもち、AcrA 結合サイトが消失しているユニークな構造を有する排出型プロトマーへと構造変化する。また、リシン側鎖が、2つのアスパラギン酸の間に割って入り、このプロトンを蹴り出し、それが細胞質側へと放出されるときに取込型のコンホメーションに変化する。このプロトン化・脱プロトン化により、リシン残基を含む第 10 ヘリックスを中心としてヘリックスの配置が変化する。それらがきっかけとなり、先述のペリプラズムドメインでの種々の構造変化として伝搬すると考えられる。構造変化がどこをどのように伝わってゆくのかは今後の詳細な分子解剖に委ねられている。

7. 機能的回転メカニズムによる薬剤の排出する仕組み～機能的回転

上述のような秩序だった状態の転移は、それぞれ 1 つずつ位相をずらしながら回帰的に進行するので、あたかも回転しているように見える (Fig. 6)。このよう

Fig. 6

Schematic illustration of the proposed “functionally rotating ordered multidrug binding change mechanism” mediated by AcrB. (a) The top view from the distal side of the cell. Colours and arrangements in the left panel are corresponding to those in Fig. 2. (b) View from the side parallel to the membrane plane. Entrance and exit within each protomer are depicted as red flaps. The drug binding pocket and translocation pathway are represented as a dotted line. Drugs are illustrated as hexagons.

Fig. 7

Structure with a slab (~23 Å) of the transmembrane domain viewed from the periplasmic side. The side chains of three functionally essential charged residues, Asp407, Asp408 and Lys940, and functionally important residue Thr978 are shown in a ball-and-stick representation. Colours of the protomers are also the same as in Fig. 2. The label Roman numbers indicate the transmembrane helix numbers.

な回転を伴って機能するタンパク質として、ATP 合成酵素に見られる回転触媒説がよく理解されている。この ATP 合成酵素も AcrB と同様、 α サブユニットと β サブユニットからなる組が 3 個組み合わせた疑似三回対称性をもつ 6 量体が機能単位である。1982 年にアメリカの生化学者 Boyer は、「ATP はどの組にも結合するが、ある瞬間を観ると 1 つだけに結合する。」という観測から、この酵素による回転触媒機構を提唱した⁷⁾。その後の結晶解析と⁸⁾、1 分子観察により回転が実証され⁹⁾、Boyer らは 1997 年ノーベル化学賞を受けた。両者とも 3 つのユニットが秩序だって構造変化を転位させるが、ATP 合成酵素では中央の軸状の γ サブユニットに物理的な力が伝わり、それが回転運動に変換される。AcrB については γ サブユニットに相当する回転軸がないため、物理的な回転運動を伴うことはないと考えられ、著者は AcrB によるこの作動メカニズムを、機能的回転メカニズムと名付けた⁴⁾ (Fig. 6)。AcrB では構造変化が隣のプロトマーの構造および状態に直接影響を与える。機能や構造は大きく異なるが、同じく疑似三回対称性をもつこの両者には、類似したメカニズムを使い回しているという分子進化上の共通性を感じる。

8. 相互アクセスモデルが構造から明らかになった

Jardetzky は 1960 年代にトランスポーターとは、I; タンパク質分子の内部に基質が通りうる経路が存在し、II; この経路が細胞膜を隔てて細胞質側に開いている状態と、細胞外側に開いている状態の 2 つの異なるコンホメーションが存在すること、そして、III; その経路の途中に基質の結合部位が存在すること、と定義している¹⁰⁾。これは現在、「相互アクセスモデル」として広く受け入れられている。今回の AcrB の構造解析で、このモデルが立体構造をもとにはじめて証明された。すなわち、結合型ではペリプラズム、細胞質側へと通じる経路が開くとともに、細胞外への経路は閉じ、基質結合ポケットが基質に対して高い親和性をもつ (Fig. 4, 6)。そして、排出型では、TolC を経て細胞外へ通じる経路が開き、細胞質側への経路は閉じ、基質結合ポケットが縮み、基質への親和性を低下させる (Fig. 4, 6)。これらは、相互アクセスモデルという、内向き構造と、外向き構造にそれぞれ対応する。AcrB では、三量体の中に同時にこの 2 つの状態と、取り込み型も組み合わせり、お互いが協調的に状態を規定しつつ相互作用し、かつその役割が順序よく転移してゆくことで、方向性をもった基質輸送が可能

であることが判明した。

さらに、AcrB ではこの相互アクセスにかかわる輸送経路や、基質結合部位が細胞膜中ではなく、ペリプラズム領域に突き出た水溶性ドメインの中に存在する。これは膜を介した物質輸送にかかわるトランスポーターとしては異例のことと思われるが、AcrB がペニシリンなどペリプラズムで薬効を発揮する β ラクタム系薬剤をも取り込みそれを排出することができる活性をもつことを考えれば、むしろ自然な仕組みであることに気がつく。AcrB 分子がペリプラズム、細胞膜二重層の外葉のあたりから薬剤分子を取り込み、基質結合ポケットへ結合させ、続いてそこから細胞外へと続くチャネルタンパク質へと薬剤を送り出す一連の運動が原子レベル立体構造から説明できた。しかし、細胞質で薬効を発揮する薬剤の細胞質からの排除、あるいは細胞膜を介した基質輸送メカニズムについてはいまだ不明な点があり、今後の研究課題である。あるいは、細胞膜外葉中の薬剤濃度を本トランスポーターが積極的に低下させれば、それと平衡にある細胞質の薬剤濃度も減少する。そう考えれば細胞膜を介した基質輸送メカニズムは考えなくてもよいのかもしれない。膜貫通部分は単にプロトン濃度勾配のエネルギーを能動輸送のエネルギーに変換するために存在するのかもしれない。

多剤排出トランスポーターが薬剤分子のどのような部位の、どのような特徴を識別し、そして排出するのかが原子レベルで理解できた。これらの知見を応用することで、排出されない新薬や、逆に結合部位に固く結合する阻害剤の設計・開発が期待できる。構造に基づく合理的設計など応用面での展開も見込める本成果は、大いに注目を集めている。

おわりに

ここに述べたメカニズム解明は、実は 2002 年に行った同タンパク質の構造解析結果を顧みてやり直すことで得られたものである。2002 年の結果は結晶学的三回対称性をもつ結晶を使った解析から得られた対称的な構造に基づくものであった。さまざまなデータから AcrB が三量体で機能することは明らかであったが、対称的な結晶解析からは化学量論的解釈や、オリゴマータンパクにしばしばみられる協調的相互作用に関する解釈が一切できない致命的な欠点があることに気がついた。そこで結晶学的三回対称をもたず、3 つのプロトマーの間で構造の差違があるならば、それを観察することが可能な結晶学的対称性の低い結晶を得

るために結晶化をやり直し、構造解析をやり直そうと考えた。その結果、本稿で述べた AcrB が非対称性を巧みに利用する基質輸送メカニズムの解明へいたった。結局やり直してよかったということになるのだが、同時に、世にあるオリゴマータンパク質の結晶構造解析結果のもつ対称性が結晶学的対称であるか否かに気を配るべきであろう、という考えにもいたった。対称的な構造が示されていても、それが単に結晶学的対称なのか、意味のある生物学的対称なのかを問うべきである。結晶格子がもちうる対称軸と生物学的対称軸とが一致する可能性のある、ホモ二量体、ホモ三量体、ホモ四量体、ホモ六量体の場合は注意を払うべきである。論文や構造データをきちんとみて判断するか、近くにいる（であろう）結晶屋に聞いてみるとよいだろう。構造情報は機能を理解するための大きな助けになるが、結晶化の分子パッキングの際に歪められた構造からは、間違った解釈をする危険性がある。警鐘の意味を込め本稿の終わりに述べておきたい。

本研究は、大阪大学産業科学研究所（阪大産研）の中島良介助手、松本崇研究員、大阪大学蛋白質研究所（阪大蛋白研）の山下栄樹助手との共同研究として、阪大産研の山口明人教授の研究室にて行われた。大型放射光施設 SPring-8, BL41XU, BL44XU の利用は本研究の要であり、関係諸先生がたに感謝したい。また、ディスカッションに参加してくださった東京大学分子細胞生物学研究所の豊島近教授、阪大蛋白研の月原富武教授にも深く感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. and Yamaguchi, A. (2002) *Nature* **419**, 587-593.
- 2) Murakami, S. and Yamaguchi, A. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 443-452.
- 3) Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. and Hughes, C. (2000) *Nature* **405**, 914-919.
- 4) Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. and Yamaguchi, A. (2006) *Nature* **443**, 173-179.
- 5) Schumacher, M. A. and Brennan, R. G. (2003) *Res. Microbiol.* **154**, 69-77.
- 6) Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H. I. and Ghosh, P. (2006) *Structure* **14**, 577-587.
- 7) Boyer, P. D. (1989) *EASEB J.* **3**, 2164-2178.
- 8) Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994) *Nature* **370**, 621-628.
- 9) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinoshita, K. (1997) *Nature* **386**, 299-301.
- 10) Jardetzky, O. (1966) *Nature* **211**, 969-970.

村上 聡

村上 聡（むらかみ さとし）

大阪大学産業科学研究所生体情報科学研究分野准教授

1997 年大阪大学大学院理学研究科修了（高分子学専攻）、博士（理学）。同大学蛋白質研究所物理構造部門出身。神奈川科学技術アカデミー研究員、大阪大学産業科学研究所助手を経て 2004 年より現職。02 年より科学技術振興機構さきがけ研究者兼任。04 年より創晶プロジェクトに参画、05 年より（株）創晶技術顧問。

研究内容：タンパク質とりわけ膜タンパク質の構造生物学。このところは膜輸送体の構造と機能の研究と、膜タンパク質の結晶成長。

連絡先：〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1

E-mail: mura@sanken.osaka-u.ac.jp