

特集：膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御

大腸菌の異物排出トランスポーター AcrB の構造と異物認識機構

村上 聡, 山口 明人

異物排出トランスポーターは生物界に広く分布している、細胞レベルの生体防御装置である。しかし、がん細胞や病原細菌でしばしば過剰産生され、抗がん剤や抗菌剤に対する多剤耐性を引き起こすため、临床上大きな問題となっている。異物排出トランスポーターは化学構造上ほとんど共通性を見いだせない非常に多様な薬物・毒物を能動的に排出するという特徴がある。筆者らは、世界で初めて、異物排出トランスポーターの結晶構造を決定することに成功し、異物を認識する構造的基礎を解明した。本稿では、筆者らの構造決定した大腸菌異物排出トランスポーター AcrB の構造に基づき、異物の認識機構、排出機構、エネルギー共役機構についての最新の知見を解説する。

1. はじめに

酵素、抗体、受容体、膜輸送体、イオンチャネルなど、タンパク質の機能は多彩であるが、タンパク質と基質との間には鍵と鍵穴の関係に例えられるように、一般に厳密な対応関係が存在する。これがタンパク質の基質特異性である。中には、グラム陰性細菌外膜のポーリンタンパク質のように、基質特異性がなく、分子の大きさだけで選別する分子篩のようなものも存在するが、この場合でも、選別には分子の大きさという明確な基準が存在する。これに対し、本稿で述べる異物排出タンパク質（一般には多剤排出タンパク質という名称で知られている）は、化学構造上はほとんど何の関係もない非常に幅広い毒物や薬物を認識し排出する。それにもかかわらず、糖やアミノ酸といった栄養物質や有用な代謝中間体などは排出しないという明確な区別がある。このような、いわば「異物識別」が如何にして可能なのかということが、この分野の研究の一番大きな謎であり興味の焦点でもあった。特に、本稿で対象として

いる大腸菌の主要異物排出タンパク質 AcrB に関して言えば、排出される基質には、カチオン性、アニオン性、両イオン性、中性全ての化合物が含まれ、芳香族化合物も脂肪族化合物も含まれている。本稿では、最近決定された AcrB の分子構造を元に、如何にして異物が認識され排出されるのかという分子機構に焦点を絞って解説したい。

2. AcrAB-TolC 異物排出システム

AcrB はもともと消毒剤の一種であるアクリフラビン (acriflavin) の耐性因子として発見されたものである¹⁾。その後、緑膿菌のホモログである MexAB などと共に、多剤排出トランスポーターであることが見いだされ^{2,3)}、グラム陰性細菌多剤耐性化の主要な原因であることが報告された^{4,5)}。近年しばしば新聞報道される多剤耐性緑膿菌などの多剤耐性の根幹にも MexAB システムの過剰産生がある。

細胞質膜タンパク質 AcrB は、膜融合タンパク質 AcrA および外膜チャネルタンパク質 TolC と 3 者複合体を形成し、ペリプラズムをバイパスして薬物・毒物を直接菌体外に排出している⁶⁾。エネルギー源はプロトン駆動力である。その膜輸送体としての特徴は、非常に幅広い脂溶性化合物を排出する基質特異性の広さに加えて、菌体内に作用部位を持つ抗生物質だけでなく、ペリプラズムに作用部位を持つβラクタム抗生物質に対しても耐性を与えるという点にある。このことから、細胞内部とペリプラズムの双方に基質取り入れ口を持つ dual entrance model が提唱された²⁾。

大阪大学産業科学研究所 (〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1)

Structural basis of xenobiotic recognition by a bacterial xenobiotic exporter

Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Mihogaoka 8-1, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan)

外膜チャンネルタンパク質 TolC の立体構造は 2000 年に Koronakis らにより決定された⁷⁾。TolC は三量体で、その形状は内径 35 Å の中空シリンダーである (図 1)。全長は 140 Å、そのうち 40 Å は外膜貫通部分で、12 本の β ストランドからなる右巻き β パレル構造をしている。ペリプラズムに突き出した 100 Å は途中で中断を含む 12 本の α ヘリックスからなる左巻きパレル構造であり、ペリプラズム側下端は閉じている。実際に異物を排出するときには、開口すると推定される。

AcrA の役割については、当初、AcrB と TolC の間に存在して両者をつなぐと考えられていた。ところが、成熟 AcrA の C 末端は脂質修飾されて細胞質膜にアンカーしており、また、物理化学的測定などで、非常に細長い形状をしていることがわかったことなどから⁸⁾、AcrB と TolC の複合体の周辺にあって、細胞質膜 (内膜) と外膜を引きつけることで複合体形成を補強する役割をしているのではないかと考えられるようになった。MexA、AcrA の構造はそれぞれ 2004 年^{9,10)}、および 2006 年¹¹⁾に報告された。詳しくは本特集の中江の稿に述べられているとおりが、基本的には TolC-AcrB 複合体を側面から補強するモデルが支持されている。しかし、何分子結合しているか、結合位置は何処かなど、詳細はまだ全くわかっていない。

3. 最初の AcrB 結晶構造

タンパク工学的手法により、AcrB は 12 本の膜貫通ヘリックスと、それぞれ 300 残基程度からなる 2 本の大きなペリプラズム側ループからなるトポロジーを持つと推定された¹²⁾。

私たちの研究室の村上聡をリーダーとする結晶構造解析グループは、2000 年から AcrB の結晶化に取り組み、2002 年にその構造決定を報告することができた¹³⁾。いわゆる二次性能動輸送体としては初めての構造決定だったが、私たちの構造決定以後、翌年からラクトース輸送体を始めとして続々と二次性膜輸送体の構造決定が報告されるようになった^{14~19)}。研究の同時進行性というか、20 年以上も多くの先達が膜輸送体の結晶化に取り組みその都度挫折してきたのはいったい何だったのかと思える状態であるが、ともあれ、その先鞭を付けることができたのは大変に名誉なことであった。

最初に Nature 誌に報告した AcrB の構造は、結晶学的 3 回対称軸を持つ R32 型結晶を元に解かれ、TolC と同じく三量体であった。トポロジー決定で予測したとおり、12 本の膜貫通ヘリックスと、膜貫通ヘリックス 1 と 2、および 7 と 8 の間に大きなペリプラズムドメインを持つクラゲ様の構造をしていた (図 1)。膜貫通部の厚みは約 50 Å、ペリプラズム頭部は 70 Å あり、正月の二段重ね餅の様な構造をした頭部は、さらに頭頂部の TolC 結合ドメイン

と、ポアドメイン (後にポアードメインと改称) からなっていた。TolC 結合ドメインは頭頂部に向かってロート状に大きく開口しており、開口部の直径は TolC 下端の直径とほぼ一致し、両者の構造はコンピューターグラフィック上でぴったりとドッキングできた (図 1)。TolC と AcrB を直接ドッキングさせると、ペリプラズム部の長さは 170 Å になり、ペリプラズムの厚みを貫通するのにほぼ十分な長さといえる。

頭頂開口部の底、ポアドメインの中央には 3 本の α ヘリックスからなる閉じたポア様構造があり、さらにその下には三量体中央の大きな空洞がある。AcrB 頭部では三量体は相互に密に相互作用して一体化されている。一方、膜貫通部では、各モノマーの 12 本の α ヘリックスはそれぞれ独立のヘリックス束として膜に挿入されており、中間に直径 35 Å にもなる大きな空洞が膜を貫通している。

私たちは、空洞と外側の脂質二重層の双方に接する膜貫通ヘリックスに Cys 走査変異を施し、SH 修飾試薬の反応性を調べることによって、両方の面が同じ疎水的環境の中に埋もれていることを証明した。つまり、この大きな空洞は水で満たされたチャンネルとしては存在せず、脂質二重層により充填されていると考えられる。この空洞の推定脂質二重層上面と、中央ポア様構造の間には高さ 15 Å 程度の空間があり、私たちはこれを central cavity と名付けた。

表面構造モデルを見ると、この central cavity から側面に向かって 3 箇所開口部が見られる (図 2)。これは、半ば脂質二重層に埋もれて開口している。この構造的知見から、基質の排出経路としては、側面開口部 → central cavity → 中央ポア様構造 → 頭頂ロート状開口部 → TolC というルートが推定された²⁰⁾。

私たちの最初の結晶構造には基質が含まれていなかった。構造の上からは、基質結合部位は三量体中央の central cavity ではないかと推測された。翌年、Yu らは、基質結合型 AcrB 結晶構造を決定し、central cavity 近傍に基質が結合していると報告した²¹⁾。その位置は、しかし私たちの予想よりは下方で、central cavity よりむしろ、脂質で充填されていると推定される膜貫通空洞の上端であり、基質と相互作用している残基はほとんど膜貫通ヘリックス上の残基であった。また、結晶が 3 回対称なので、基質も 3 個対称に並んでいた。しかしこれは、基質認識に関する部位が頭部ループにあるという、それまでに蓄積されていた生化学的な知見とは一致しないものだった^{22,23)}。Yu らはその後、生化学的実験の結果を踏まえ、結合部位の再探索を行い、Asn109 → Ala 変異体において、膜貫通部空洞以外に、モノマー頭部の割れ目 (depression or cleft) にも基質結合が認められたと報告した²⁴⁾。この近傍には確かに変異導入で基質特異性の変化する残基が存在するが、彼らの知見では、AcrB 内部での基質の輸送経路が想定できないという

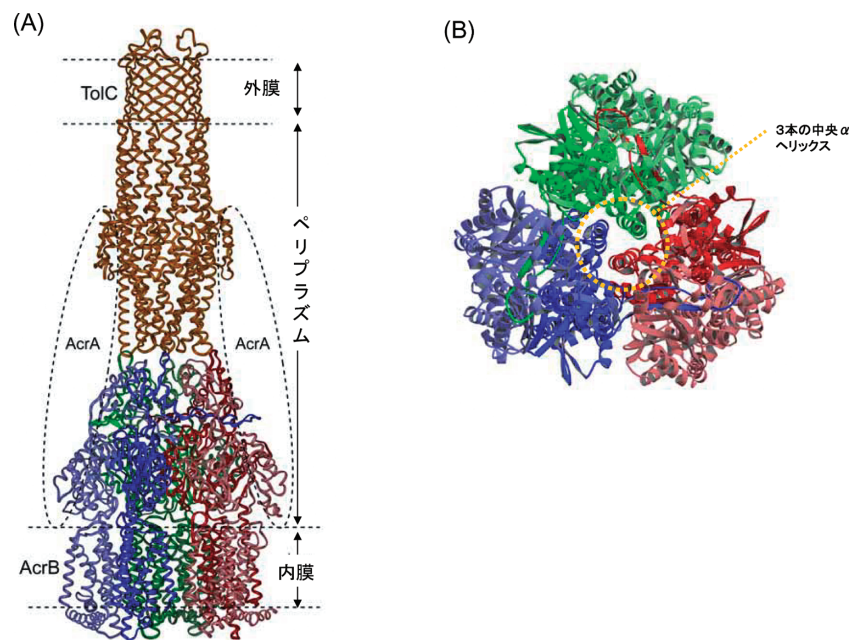


図1 AcrB-TolC 複合体 (A) と, AcrB をペリプラズム側から見た構造 (B)
TolC, AcrB はいずれも三量体. 両者の接触面は完全に一致する. AcrB 頭部中央には3本の α ヘリックスからなる閉じたポア様構造があるが, 後にこれはポアとして働くのではないことが判明した.

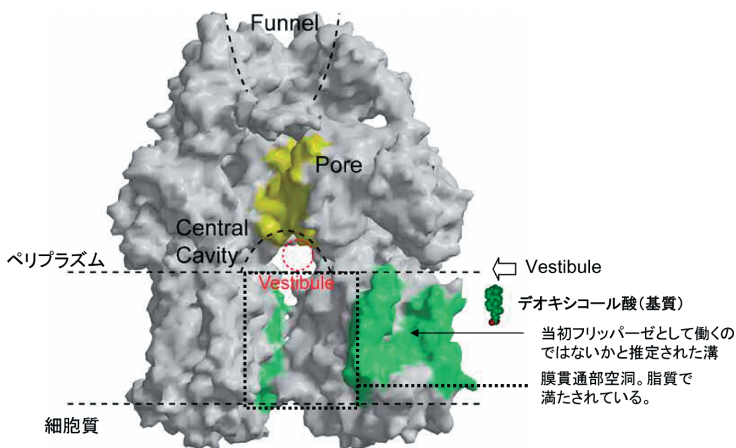


図2 AcrB 表面構造モデル

内部が見えるよう, 手前のモノマーを1個取り除いてある. 黄色は3本の α ヘリックスからなる閉じたポア様構造を, 緑は膜貫通部側面の, フリッパーゼとして働く可能性のある溝を示す. 中央の穴 (vestibule) (破線赤丸), 左側モノマーの水平の溝 (白抜き矢印) が基質の入り口を示す. もう一つの入り口は, 取り除いた手前のモノマーにあるので, この図では見えない. 中央の, 膜貫通部空洞 (破線枠内) は脂質で満たされている. その上に central cavity, 閉じたポア様構造 (後にポアでないと判明), さらにその上に頭頂部のロート状開口部がある. 基質は, 入り口の位置関係から, 脂質二重層外表層から取り込まれると考えられる.

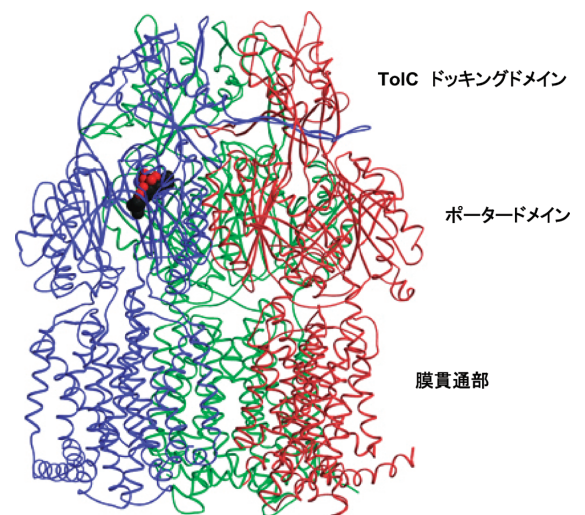


図3 非対称 C2 型結晶から得られたミノサイクリン結合型 AcrB 構造

ミノサイクリンは空間充填モデルで表示している. 基本的な構造は対称型 R32 型結晶のものと変わらないが, 三量体に対し1個のみ基質の結合が認められる.

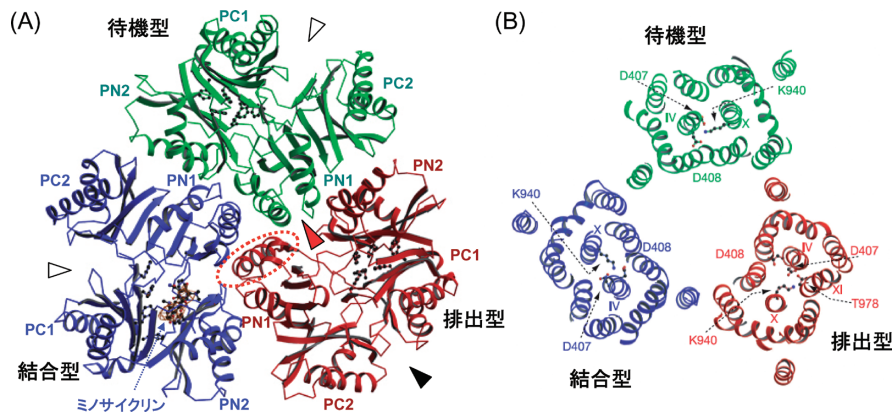


図4 基質結合型 AcrB 結晶構造のポータードメイン (A) および膜貫通部 (B) の断面

(A) ポータードメインの各モノマーは PN1, PN2, PC1, PC2 という四つのサブドメインから構成され、これらの相互位置関係はモノマーごとに変化している。基質結合に関する残基、膜貫通部でイオン対を形成する残基の側鎖は ball & stick モデルで表されている。ミノサイクリン分子は茶メッシュで示されている。基質は結合型モノマーにのみ存在する。3本の中央αヘリックスのうち、排出型モノマーのものだけが、結合型モノマー方向に15°傾いている(赤い破線で囲ってある)。このヘリックスの傾きにより、結合型モノマーでは基質出口が閉じ、排出型モノマーでは開く(赤い矢尻)。結合型、待機型両モノマーのPC1とPC2の間にある割れ目(白い矢尻)は、排出型モノマーでは、ほとんど消失している(黒い矢尻)。(B) 膜貫通部では、結合型と待機型両モノマーで、二つの Asp 側鎖 (D407, D408) の中央にある Lys 側鎖 (K940) が、排出型モノマーでは45°時計回りに回転し、両 Asp 側鎖の外に出て、Thr 側鎖 (T978) と相互作用している。

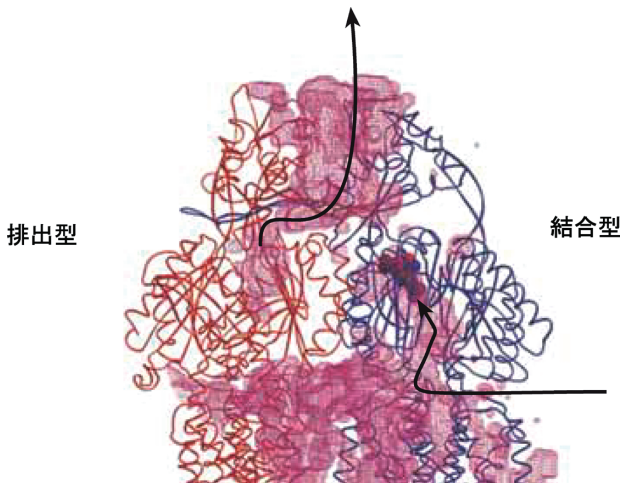


図5 AcrB 分子内部のチャンネル
 溶媒分子がアクセスできる内部のチャンネルを紫色のメッシュで示す。ただし、下方膜貫通部の垂直チャンネルは、実際には脂質で充填されていることが生化学的実験により確かめられている。ミノサイクリン分子は空間充填モデルで表示されている。矢印は、推定基質輸送経路を示す。

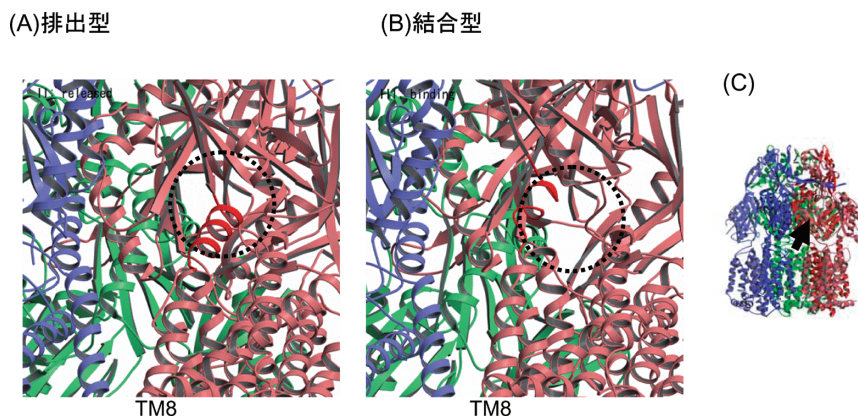


図6 基質入り口 (vestibule) の開閉

(C) AcrB 全体構造。(A), (B) は (C) 図中の矢印方向から見た、排出型 (A), 結合型 (B) 入り口付近の構造。破線円は入り口を示す。赤いリボンは TM8 上端部のαヘリックス→ランダムコイルというコンホメーション変化する部位を示す。

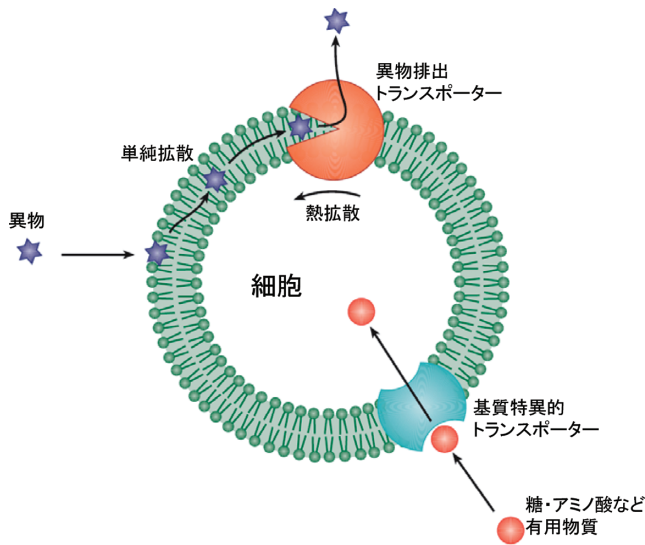


図7 異物識別の原理
異物排出トランスポーターは脂質二重層の掃除機 (membrane vacuum cleaner) として働く。AcrB の場合は脂質二重層外層から、MDR、LmrP、LmrAなどは脂質二重層内層から排出すると考えられる。

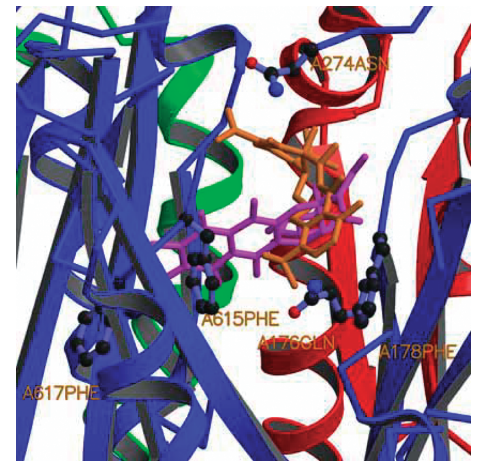


図8 マルチサイト結合
ミノサイクリン (橙) とドキソルビシン (紫) の結合部位をスーパーインポーズしたもの。両者は一部重なるが、相互作用する側鎖に大きな違いがある。図で基質と相互作用する残基はball & stickモデルで示している。

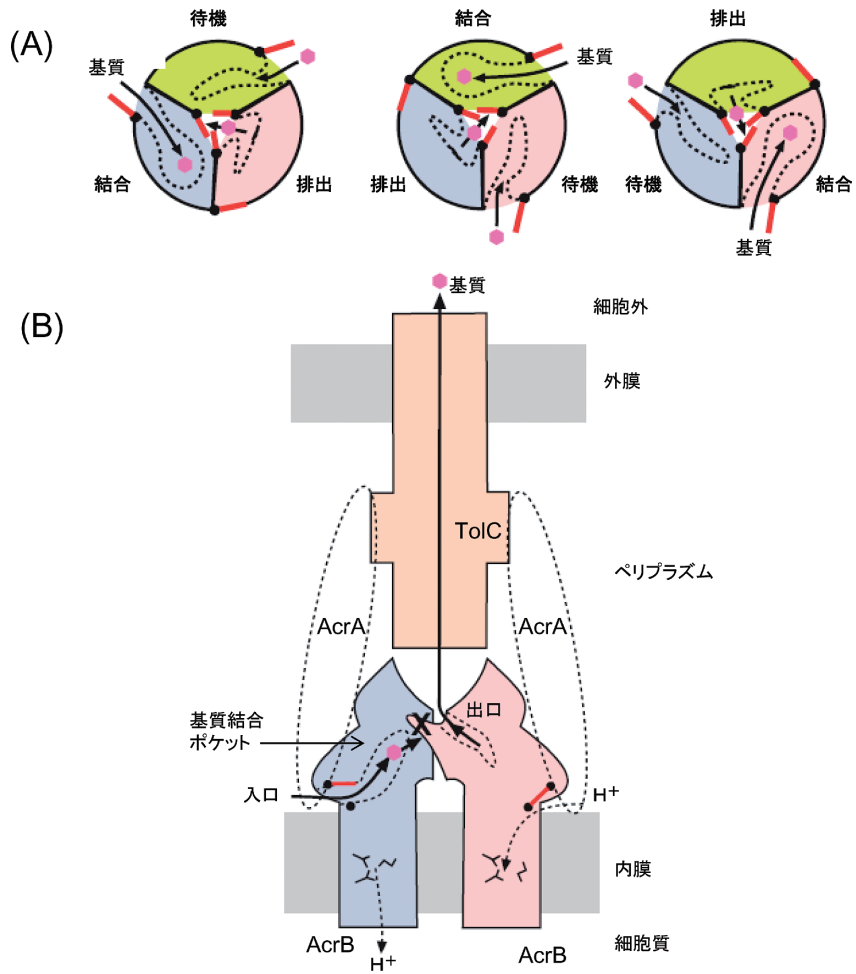


図9 機能的回転輸送機構
中央ヘリックスの倒れ込みによる出口の開閉と、TM8先端部のαヘリックス→ランダムコイル変化による入り口の開閉、および基質結合部位の収縮・拡張が三つのモノマーで互いに協調しつつ順に生じることで、待機→結合→排出が繰り返され、基質は輸送される。頭部でのこの変化は、膜貫通部でのアスパラギン酸残基の脱プロトン化→プロトン化に伴う Asp-Lys イオン対の形成→解消による膜貫通ヘリックスのねじれ運動と連動している。(A)は頭部での三つのモノマーへの基質の出入りを、(B)は側面から見た基質の動きとプロトンの動きの共役を示している。

難点があった。

4. 基質結合型 AcrB 結晶構造

一方、村上らは、3回対称軸を持たない C2 型 AcrB 結晶を得ていた。C2 型結晶は、R32 型結晶よりも高解像度の電子密度が得られる。そこで、以後の解析の対象を C2 型結晶に絞り、基質結合部位の同定に取り組んだ。

比較的低い 3 Å 前後の解像度では、基質の電子密度を特定することは難しい。そこで、電子密度の高い臭素原子を付加した臭化ミノサイクリンを基質として用い、基質結合のあるなしによる差フーリエマップ上で臭素原子の位置をまず特定し、基質結合位置を特定した。

基質は、三量体に対し 1 個だけ結合していた (図 3)²⁵⁾。その位置は central cavity ではなく、モノマー頭部ポータードメインの PN2 と PC1 サブドメインの β シートに挟まれた芳香族アミノ酸に富む領域、いわゆるフェニルクラスタ・ポケットであった (図 4A)。基質を結合したモノマーのその部分は、基質の結合に好適なように拡張しており、他方、基質を結合していない他の二つのモノマーでは、PN2 と PC1 が互いに接近し、ポケットは収縮して、芳香族側鎖は基質と結合する代わりに互いに相互作用して安定化していた。

重要な構造変化が、三量体中央の、最初ポアを構成していると推定していた 3 本の α ヘリックスに生じていた。すなわち、基質結合モノマーの拡張した基質結合部位から頭頂ロート状開口部へ向かう出口に、隣のモノマーの α ヘリックスが倒れ込み、出口を塞ぐ形になっていた。逆に、隣のモノマーでは、出口のヘリックスが避けた形になり、収縮した基質結合サイトからの出口は大きく開口していた。すなわち、基質をまさに絞り出した形である。そこで、このモノマーを「排出型」と名付けた。

結合型と排出型の構造の違いは、基質取り入れ口の付近でも観察された。図 5 は、AcrB 分子内部の溶媒分子がアクセスできるチャンネルを紫色のメッシュで表している。結合型モノマーでは、脂質二重層に向かって開口した側面開口部から central cavity へ向かって水平に伸びるチャンネルが、途中から上方へ向かって分岐し、フェニルクラスタ・ポケットに至っている。そのチャンネルの先端部に基質分子が結合している。そこから、頭頂開口部への通路は中断している。一方、排出型モノマーでは、側面開口部からフェニルクラスタに至るチャンネルが消失し、頭頂開口部へ向かっての出口がつながっている。入り口の開閉は、主として膜貫通ヘリックス 8 (TM8) の上端の構造変化による (図 6)。すなわち、結合型モノマーでは、TM8 上端部がヘリックス 2 巻分ほどほどけてランダムコイルになり、通路を確保しているのに対し、排出型モノマーでは TM8 先端部が α ヘリックス構造をとり、入り口に立ち塞がる形に

なっている。同時に、ポータードメインの PC1 と PC2 サブドメインが互いに接近するようにコンホメーション変化することで、入り口からのチャンネルを解消している。

5. エネルギー共役

基質排出のエネルギー源はプロトン駆動力である。プロトン駆動力は細胞質膜の呼吸鎖により生み出されるもので、基本的にはペリプラズムから細胞内へとプロトンを押し込もうとする力として働いている。この力が、ペリプラズムから外膜を通して菌体外へと異物を排出する力として利用されているわけだから、プロトンの流れと異物の流れは交わるところがなく、両者の共役は遠隔コンホメーション共役となる。

膜貫通部には、プロトンの透過経路と推定される 2 個のアスパラギン酸 (Asp407, 408) と、リジン (Lys940) からなるイオン対が存在する (図 4B)。部位特異変異導入で、これらの残基は機能に必須であることが確かめられており²⁶⁾、また、これら以外には膜貫通部に荷電残基は存在しない。結合型、待機型では、イオン対は確かに形成されているが、排出型では Lys940 側鎖が約 45° 回転し、両 Asp 残基の間から離れて、TM11 の Thr978 と水素結合する位置に移動する (図 4B)²⁵⁾。これは、Asp 残基がプロトン付加したために生じると考えられる。このため、Asp 残基のある TM4 に対し、Lys940 のある TM10 はねじれ運動することになる。このねじれの生じているモノマーの頭部で、中央 α ヘリックスの倒れ込みを始めとする一連の構造変化が起きているわけである。これらの構造変化の引き金が、膜貫通部のイオン対に生じたねじれによると考えるのは合理的と思われるが、残念ながら、現時点では、構造変化がどのように伝わっているのかまでは読み取ることができない。

6. 多剤認識の構造的基礎

これまで明らかになった構造から、異物認識の機構はどのように考えられるだろうか。AcrB が、側面開口部を介して、基質を脂質二重層外層から取り入れるという知見は、この膜タンパク質が膜の掃除機 (membrane vacuum cleaner) として働くことを示している (図 7)。この考え方は、P-糖タンパク質の異物認識機構を説明するモデルとして最初に提唱され²⁷⁾、さらに、細菌の多剤排出タンパク質 LmrA²⁸⁾ および LmrP²⁹⁾ で生化学的に証明されたものだが、構造的に初めてその正しさが確認された。これは、糖やアミノ酸のような有用物質は、それぞれ対応する特異的な膜輸送体によって細胞内に取り込まれるために、一般には脂質二重層と接触しないが、異物は、脂質二重層を拡散することによって細胞内に侵入するので、脂質二重層から排出する輸送体は異物を容易に識別できるというものであ

る。AcrBの特異な点は、脂質二重層の中でも、外層の掃除機である点である³⁰⁾。LmrA, LmrPの場合は内層の掃除機であることが生化学的に証明されている。外層の掃除機という機構は、侵入する異物を水際で阻止するのにきわめて適した機構と言える。しかし、細胞質内部からの経細胞質膜輸送を仲介しているかどうかについてはまだ確たる証拠はない。

次に、非常に幅広い基質を排出できる多剤認識の基礎はどうなっているのだろうか。多数の基質結合結晶の中で、ミノサイクリン以外にドキシソルピシンの結合を同定することができた。両者の結合を比較すると興味深い事実がわかる。図8は両者の結合をスーパーインポーズしたものである。両者は例えば、Phe178, Gln176と共通に相互作用しているが、ミノサイクリンと相互作用しているAsn274とはドキシソルピシンは全く接触しておらず、逆にドキシソルピシンが相互作用しているPhe617とはミノサイクリンは相互作用していない。すなわち、基質によって相互作用する残基が異なる、いわゆるマルチサイト結合を示している。マルチサイト結合は、多剤結合型転写調節因子であるQacRの結晶構造解析で発見されたもので、タンパク質が幅広い基質を結合する一つのスタイルである³¹⁾。多剤排出タンパク質遺伝子の発現調節因子と、多剤排出タンパクとが共通の多剤認識原理を持っているというのは興味深いことである。

7. 機能的回転輸送機構

非対称AcrB結晶は、一つの結晶構造の中に、排出輸送の三つの中間体の構造を含んでいた。一般に、結晶構造解析はタンパク質の機能解明に最も有力な手段であるが、その最大の弱点は、決定された構造はある瞬間のスナップショットに過ぎず、その前後にどう構造変化することで機能を遂行するかは推測するしかないということが挙げられる。厳密には、全ての反応中間体の構造決定をして初めて動的に機能を把握できる。私たちは、とても幸運なことに、たった一つの構造決定で、三つの主要中間体全ての構造を手にすることができ、その結果、排出輸送を動的に理解することが可能になった(図9)。

待機型から出発すると、入り口は開いているが、基質結合部位は収縮している。基質が入ってくると、PN2とPC1のβシートに挟まれたポケットが拡張し、基質が結合する。しかし、隣のモノマーから倒れ込んできたヘリックスによって出口は塞がれているので基質は結合部位に留まっている(図4A)。次いで、膜貫通部のAsp-Lysイオン対においてAsp残基のプロトン化によりLys側鎖がねじられ、45°回転する(図4B)。このねじれが頭部に伝わり、中央ヘリックスを倒れさせて出口を開け、PN2がPC1に接近して基質を絞り出す。同時にPC2もPC1に接近し、

かつTM8上端部のランダムコイルが2巻ほど巻き戻してヘリックスになることにより、入り口を塞ぐ。重要なことは、こうした変化が三つのモノマーでばらばらに起こるのではなく、互いの変化は隣のモノマーの変化と連関しつつ、順繰りに繰り返していることである。

三つの環状に並んだ触媒部位による連続反応はF1-ATPaseにおいて良く知られている^{32,33)}。ATPaseの場合は、この連続反応により中央に挿入されたγサブユニットの物理的回転を触媒しているのだが、AcrBの場合は、γサブユニットに相当するものはなく、おそらく物理的回転は伴わない。そこで私たちは、この触媒機構を機能的回転モデルと名付けた。全く違う反応を触媒するタンパク質が類似の反応機構を利用しているということは生物の普遍性を考える上でとても面白い。

8. 残された課題

異物の認識と排出の大筋はこれで理解できた。しかし、残された問題がないわけではない。一番大きな問題の一つは、TolCとAcrBの相互作用に関わる問題である。両者は恒久的な複合体として存在しているのではなく、おそらくは必要ときだけ一時的に複合体形成すると考えられている。なぜなら、一つには、TolCはAcrB以外にも非常に多種類の排出システムと相互作用するマルチファンクショナルなタンパク質であるにもかかわらず、その存在量はAcrBなどと比べて特に多いわけではなく、AcrBだけに占有されていると不都合であるからである。また、ペリプラズムにはペプチドグリカンという堅い網目構造が存在し、AcrB-TolC複合体はこの網目構造を突き抜けているため、複合体のままでは横方向への移動が制限されており、細胞質膜のクリーナーとして動き回することはできず、効率が悪くなることもその根拠になる。

TolCとの結合と解離は何が決めているのかといえば、最も可能性の高いのは基質との結合であろう。ところが、基質との結合によって構造変化するのは主としてポータードメインであり、TolCと直接結合すると考えられる頭頂部にはほとんど変化がない。とすれば、変化はおそらくAcrAを介して伝えられるのであろう。結合型から排出型が変わるとき、ポータードメイン外側面の割れ目が消失する。もし此処がAcrA結合部位であれば、はじき出される形の変化は、あたかもピアノの鍵盤をたたいたような形でTolCに次々に伝わるに違いない。けれども、現在の段階では、AcrA結合部位の特定はできていないし、また何個のAcrAが結合しているのかすらも同定できない状況である。複合体の結晶構造解析を待たねばならない。

9. ま と め

私達とほぼ同時に、Posらが同じく非対称結晶構造を決

定し報告した³⁴⁾。その構造は、基質が結合していないということ以外は私達のものとは基本的には変わらない。対称か非対称かを決めるのは基質の結合ではないようである。非対称型が自然な形であり、対称型は、対称な結晶格子に無理矢理充填されてきた形ではないかと考えられる。非対称型の AcrB 構造はさらに別の所からも報告された³⁵⁾。彼らの構造も基質を結合していないが、膜貫通領域でのイオン対の回転を観察している。3箇所ですべて、基本的には全く同じ非対称 AcrB 結晶構造が、結晶化の方法論的にも全く別の方法で得られた結晶から決定されたということは、結晶構造解析の危うさが問題になっている昨今、本非対称構造の正しさを十分証明するものといえる。

文 献

- 1) Nakamura, N., Hachiya, N., & Tojo, T. (1978) *J. Bacteriol.*, **134**, 1184–1187.
- 2) Ma, D., Cook, D.N., Hearst, J.E., & Nikaïdo, H. (1994) *Trends Microbiol.*, **2**, 489–493.
- 3) Poole, K., Krebes, K., McNally, C., & Neshat, S. (1993) *J. Bacteriol.*, **175**, 7363–7372.
- 4) Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaïdo, H., & Hearst, J.E. (1995) *Mol. Microbiol.*, **16**, 45–55.
- 5) Okusu, H., Ma, D., & Nikaïdo, H. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 306–308.
- 6) Zgruskaya, H.I. & Nikaïdo, H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 163–169.
- 7) Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., & Hughes, C. (2000) *Nature*, **405**, 914–919.
- 8) Zgruskaya, H.I. & Nikaïdo, H. (1999) *J. Mol. Biol.*, **285**, 409–420.
- 9) Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A., & Nakae, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 25939–25942.
- 10) Higgins, M.K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9994–9999.
- 11) Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgruskaya, H.I., & Ghosh, P. (2006) *Structure*, **14**, 577–587.
- 12) Fujihira, E., Tamura, N., & Yamaguchi, A. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)*, **131**, 145–151.
- 13) Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., & Yamaguchi, A. (2002) *Nature*, **419**, 587–593.
- 14) Abramson, J., Sminova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., & Iwata, S. (2003) *Science*, **301**, 610–615.
- 15) Huang, Y., Lemieux, M.J., Song, J., Auer, M., & Wang, D-N. (2003) *Science*, **301**, 616–620.
- 16) Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., & Gouaux, E. (2004) *Nature*, **431**, 811–818.
- 17) Pornillos, O., Chen, Y-J., Chen, A.P., & Chang, G. (2005) *Science*, **310**, 1950–1953.
- 18) Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., & Michel, H. (2005) *Nature*, **435**, 1197–1202.
- 19) Yin, Y., He, X., Szwedczyk, P., Nguyen, T., & Chang, G. (2006) *Science*, **312**, 741–744.
- 20) Murakami, S. & Yamaguchi, A. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 443–452.
- 21) Yu, E.W., McDermott, G., Zgruskaya, H.I., Nikaïdo, H., & Koshland, D.E. Jr. (2003) *Science*, **300**, 976–980.
- 22) Elkins, C.A. & Nikaïdo, H. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 6490–6498.
- 23) Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S., Satou, T., Nishino, T., Gotoh, N., & Lomovskaya, O. (2002) *Mol. Microb.*, **46**, 889–901.
- 24) Yu, E.W., Aires, J.R., McDermott, G., & Nikaïdo, H. (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 6804–6815.
- 25) Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., & Yamaguchi, A. (2006) *Nature*, **443**, 173–179.
- 26) Guan, L. & Nakae, T. (2001) *J. Bacteriol.*, **185**, 1734–1739.
- 27) Mulder, H.S., Grondelle, R., Westerhoff, H.V., & Lankelma, J. (1993) *Eur. J. Biochem.*, **218**, 871–882.
- 28) Bolhuis, H., van Veen, H.W., Molenaar, D., Poolman, B., Driessen, A.J.M., & Konings, W.N. (1996) *EMBO J.*, **15**, 4239–4245.
- 29) Bolhuis, H., van Veen, H.W., Brands, J.R., Putman, M., Poolman, B., Driessen, A.J.M., & Konings, W.N. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 24123–24128.
- 30) Elkins, C.A. & Nikaïdo, H. (2003) *Drug. Resist. Updat.*, **6**, 9–13.
- 31) Schumacher, M.A., Miller, M.C., Grkovic, S., Brown, M.H., Skurray, R.A., & Brennan, R.G. (2001) *Science*, **294**, 2158–2163.
- 32) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinoshita, K. Jr. (1997) *Nature*, **386**, 299–302.
- 33) Kinoshita, K. Jr., Yasuda, R., Noji, H., Ishiwata, S., & Yoshida, M. (1998) *Cell*, **93**, 21–24.
- 34) Seeger, M.A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K., & Pos, K.M. (2006) *Science*, **313**, 1295–1298.
- 35) Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O., & Grutter, M.G. (2007) *PLoS Biol.*, **5**, 106–113.