

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

研究課題

「異物排出トランスポーターの構造機能解析」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：山口 明人

(大阪大学産業科学研究所 教授)

1 研究実施の概要

異物排出トランスポーターは生物界に広く分布しており、細胞レベルのもっとも基本的な生体防御機構を構成している。変異等により、病原細菌やガン細胞の多剤耐性を引き起こす所から、歴史的には多剤排出タンパクとして認識され、臨床上も大きな問題となっているが、その生理的意義は単なる薬剤排出にとどまるものではなく、細胞の生存戦略や情報伝達、病原性の発現など重要な生理的役割に関与するものと考えられるようになってきている。異物排出トランスポーターには解明すべき大きな3つの課題がある。(1) 異物排出タンパクは化学構造上は一見何の関連性もないように見える多くの化合物を異物として認識し排出するが、このような異物の認識はどのようにして可能なのか？(2) 多くの生物が多数の内在性異物排出遺伝子を染色体上に持っているが、その大部分は通常の条件下では発現していない。いったいこれら多数の異物排出遺伝子はいかなるメカニズムにより発現してくるのか？(3) 異物排出遺伝子の、異物を排出する以外の本来の生理的役割はあるのか？あるとすればそれはいったい何か？

本研究プロジェクトは、異物排出タンパクを巡るこれらの問題を総合的に解明するプロジェクトとして企画され実行された。そのために、膜タンパク質のX線結晶構造解析から、異物排出遺伝子ノックアウトマウス作成までを同一プロジェクトで実施するきわめて包括的な研究プロジェクトとなった。

本研究プロジェクトの成果は、

- (1) 世界で初めて異物排出トランスポーターのX線結晶構造決定に成功し、異物認識と排出の構造的基礎を見事に解明したこと。
- (2) 細菌の異物排出遺伝子のポストゲノム解析を初めて行い、細菌の環境感知応答システムと細胞間情報伝達により発現誘導される仕組みを初めて発見し、そのメカニズムを解明したこと。
- (3) 異物排出遺伝子の本来の生理的役割として、高等生物における分泌輸送介在型情報伝達に初めて注目し、その解析を行ったこと。

これらに加えて、異物排出タンパク質が病原細菌の病原性発現に必須であることを発見し、そのメカニズムの解明を進めている。本プロジェクトの成果に基づいてこれから追求されるべき大きな研究課題としては、

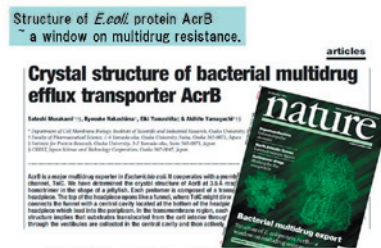
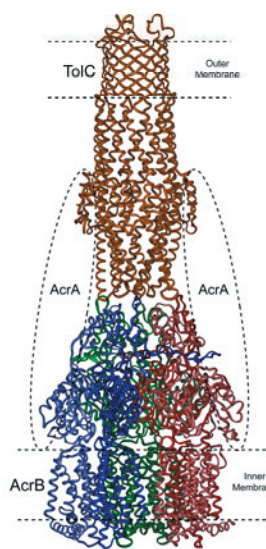
- (A) 異物排出タンパク質の立体構造を元にしたドラッグデザインによる阻害剤の開発。
- (B) 異物排出タンパクと病原性発現やバイオフィルム形成といった細菌の環境適応戦略との関連性とそのメカニズムの解明。
- (C) 高等生物の分泌型情報伝達を担う輸送体はまだほとんど解明されていない。その探索同定と、分泌輸送海瀬鑄型情報伝達の解明。

これらの課題については、本プログラム終了後はそれぞれ独立のプロジェクトとして企画・推進する予定である。

(1) 異物排出タンパク AcrB の構造決定と、異物認識・異物排出の構造的基礎

異物を如何にして認識するかという問題は、突き詰めると排出タンパク質の立体構造の問題である。本プロジェクトが提案された2001年時点では、立体構造が決定されている膜輸送タンパク質は一つもなかった。その意味ではきわめて野心的なプロジェクトであったといえる。私たちが初めてAcrBの結晶を手に入れたのは2001年春のことであった。そのときすでに3Åを切る回折像が得られており、その結果を基に同年、CRESTの申請を行ったが、ヒアリングに呼ばれたものの、構造決定にまで行き着けるかどうか不明であるということでその年は採用されなかった。その構造決定が行われれば、膜輸送体初の構造決定ということで画期的な意義のあることは審査員誰も認めてくれており、実際目の前に、きれいな結晶と回折像があるにも関わらず、20年以上にわたり先人が挑戦して果たせなかった膜輸送体の結晶構造決定が実際にできるんだということを納得して頂くことができなかつたのである。それほどに壁は厚かった。私たちの構造決定ができてみると、その後は堰を切ったようにして相次いで膜輸送タンパク質の構造決定が行われ、信じてもらえなかつた時代はいつのことか、想像だにできないくらいである。それくらい、本プロジェクト期間5年間の膜構造生物学の進歩は著しかった。その中で、私たちのプロジェクトは、確実に一つの時代、すなわち膜輸送体のポストストラクチャー時代を切り開いて来たという自負がある。

2002年に初めて構造決定し、Nature誌に報告した構造は3回対称軸を持つ3量体であった。その2年前に英国のKoronakisらにより報告された外膜チャンネルタンパク TolC と比べることにより、両者は直接ドッキングして内膜→ペリプラズム→外膜を貫通する複合体を形成していることがわかった。それまで、TolCとAcrBの間にサンドイッチされて両者をつなぐ働きをしていると考えられてきたAcrAについては、複合体側面で間接的に補強する役割をしていると考えられるようになった。このモデルは、その後決められたAcrA構造によっても支持されている。AcrB 3量体構造からわかった最も重要な



Nature 419, 587-593 (2002)



Nature 443, 173-179 (2006)

異物排出トランスポーター構造決定

事実、3量体の膜貫通部とペリプラズム頭部の境界付近に側面開口部を持つという事実である。基質はこの側面開口部を通じて、内膜脂質二重層外層から AcrB に取り込まれると考えられる。これまで、多剤排出タンパクの機能モデルとして提出されてきた membrane vacuum cleaner モデルが初めて構造的裏付けを得ることとなった。異物認識の基礎は、薬物・毒物が両親媒性の性質を持ち、脂質二重層を拡散して細胞内に侵入するのを主経路としているのに対し、まさにその脂質二重層から基質を排除するという機能に基礎を置いていることが明らかになった。

2002年の構造決定で積み残された問題は、基質結合部位はどこかという問題である。当初の3回対称型構造からは、中央にあるcentral cavityが最有力候補であった。しかし、様々薬剤との共結晶解析の努力にもかかわらず、結合基質はcentral cavityに発見されなかった。

最終的に、3回対称型結晶はあきらめ、新たに発見された3回対称軸を持たないC2型結晶と薬剤の共結晶を解析した。これは対称型結晶よりも高解像度を与え、より生理的構造に近いと考えられる。電子密度の高い臭素原子で化学修飾した薬剤を用い、差フーリエマップ上で薬剤の位置を特定した。驚くべき事に、central cavityではなく、モノマー頭部のフェニルクラスター領域に結合していた。それも、3つのモノマーのうち、1個のみに結合していた。3個のモノマーは、排出輸送の3つの段階それぞれの中間体構造に対応していることがわかった。すなわち、待機、結合、排出の3つの中間体である。たった一つの結晶構造から、排出機構の動的な解析が可能になった。AcrB分子内部には基質が通過するチャンネルが認められたが結合モノマーでは側面開口部からフェニルクラスターポケットまでの通路が開いており、そのチャンネルの先端に基質が結合しているが、3量体頭頂開口部へ向けての出口がふさがっている。一方、排出モノマーでは、入り口が閉じ、基質結合部は収縮して、頭頂開口部への出口が開いていた。待機モノマーは入り口は開口しているが、基質結合部は収縮したままであった。入り口の開閉は膜貫通ヘリックス先端部のヘリックス(閉)、ランダムコイル(開)構造変化により起こり、出口の開閉は、3量体頭部中央の3本の α ヘリックスのうち排出モノマーの1本が結合モノマーの方に傾いて結合モノマーの出口を塞ぐと共に排出モノマーの出口を開口しているためであった。

これらの一連の構造変化を起こす引き金になるのは、膜貫通領域における2つのAsp残基と1個のLys残基で構成されるイオン対が、プロトン化(排出モノマー)、脱プロトン化(結合・待機モノマー)により、それぞれイオン対が解消または形成されるため、膜貫通ヘリックス4と10が互いに45°ねじれるコンホメーション変化であることがわかった。これら一連の排出機構を、functionally-rotation mechanismと名付け2006年Nature誌に報告した。

非常に幅広い化合物を認識できる分子メカニズムとしては、基質結合部位の特徴的な構造が挙げられる。すなわち、異なる基質が、余裕のある大きな基質結合ポケットの、それぞれ部分的にオーバーラップしているが異なるサイトに結合する、いわゆるマルチサイト結合という機構に依ることが明らかとなった。

(2) 細菌異物排出遺伝子のポストゲノム解析と発現制御機構

私たちは、大腸菌を用いて異物排出遺伝子の網羅的ポストゲノム解析を世界で初めて行った。一般に、未知の遺伝子の機能を決定するには、その遺伝子をノックアウトして形質の変化を調べる。私たちと全く同時に、カナダの研究者たちが大腸菌異物排出遺伝子の網羅的ノックアウトを行った結果、既知の AcrB 以外の遺伝子のノックアウトでは大腸菌の薬剤感受性の変化はほとんど無いという結果を得た。一方、私たちは全く逆に、全ての候補遺伝子をクローニングし、強制的に大量発現させたところ、20種類の遺伝子が何らかの薬剤排出タンパクを発現することを明らかにした。すなわち、大部分の異物排出遺伝子は、通常の条件下では発現していなかったのである。

次に、これらの異物排出遺伝子の発現制御機構解明に取り組み、細菌の環境感知応答システムである二成分情報伝達系によって発現誘導されることを発見した。また、細菌細胞間情報伝達によっても異物排出遺伝子の発現誘導は起こり、これらは二成分系を介する誘導と、それ以外の系を介するものがあった。誘導の引き金となる細胞間情報伝達物質としては新たにインドールを発見した。インドールは大腸菌同士の間での情報伝達だけでなく、サルモネラなどのインドールを産生できない他菌種にもセンシングされて異物排出遺伝子の発現誘導を行うメカニズムが明らかにされた。さらに、異物排出遺伝子の誘導は、カタボライトコントロールや、細菌の成長段階などでも起こっており、異物排出遺伝子の細菌の生理機能との関連を示唆している。異菌種間情報センシングによる異物排出遺伝子発現誘導機構については詳しい分子メカニズムを現在解明中である。

異物排出タンパクの本来の生理的機能については、まず、AcrD, MdtABC が細菌の鉄イオンの恒常性維持に働いていること、そのメカニズムは、鉄キレート体シデロホアを排出することにより環境中の鉄をキレートして取り込みやすくする事によるものであることを解明した。また、サルモネラの MacB がサルモネラの病原性発現に必須の機能を果たしていることを発見し、そのメカニズムを現在研究中である。

(3) 高等生物における分泌輸送介在型情報伝達と異物排出輸送体の役割

情報伝達は高等生物において必須の役割を担っている。神経伝達物質や、インスリンなど一部のホルモンは開口放出によって分泌されるが、ステロイドホルモン、プロスタグランジン、インターロイキン、メラトニン、脂質メディエーターなど、大部分の脂溶性情報伝達物質の分泌経路は全く不明である。私たちは、脂溶性情報伝達物質に予想される分泌機構が、脂質二重層からの分泌であり、異物排出輸送体と全く同じであることから、異物排出輸送体ファミリーのオープン輸送体の中に分泌型情報伝達を担う輸送体があるものと考えてこの研究を開始した。

まず、血小板の分泌する脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸に注目し、その分泌が開口放出に依らず、ABCA 様の膜輸送体によるものであることを明らかにした。そこで次に、ABCA ファミリータンパク質のうち基質未知のものノックアウトマウス作成を系統的に進め、現在、ABCA5 と ABCA7 のノックアウトマウスを得、その解析を進めている。

分泌輸送を担う膜輸送体の同定は本プロジェクトの次のプロジェクトの研究課題として残されたが、分泌輸送介在型情報伝達の存在を明らかにしたことは本プロジェクトの大きな成果である。

以上、本プロジェクトによりこれまで未知であった異物排出タンパクの構造・機能・発現制御とその役割に関して画期的な解明の前進が見られた。異物認識・異物排出の構造的基礎を解明したことは、この分野の研究における新時代を画するものである。同時に、細菌や高等生物の生理機能を密接な関わりのあることが解明され、それらの排出膜タンパク質を標的とする創薬、トランスポーターオリエンテッドの創薬の可能性が大きく広がってきたと言える。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究は、世界で初めて異物排出トランスポーターの構造を解きつつあった実績をベースに、異物排出タンパクの構造・機能・発現制御およびその生理的役割の全面的解明を目指して立案されたものである。グラム陰性細菌主要異物排出タンパク AcrB の構造決定はプロジェクトの初期段階で成功したが、基質結合型構造の決定は難航した。それでも、プロジェクトの期間内に完了し、異物認識と異物排出の機構に関して完全に解明されたのは大きな成果であり、異物排出の研究に画期的な新時代を切り開いた。

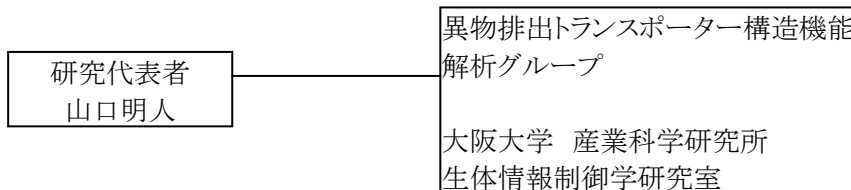
本研究プロジェクトは、すべて大阪大学産業科学研究所山口研究室を中心として行われたものであるが、主に3つの研究グループにより推進された。

(1) 構造解析グループ: 村上聡准教授をグループリーダーとし、中島良介助教、松本崇特別研究員等により、AcrB の構造解析を中心に取り組んだ。AcrB の構造決定、その基質結合型結晶構造の決定には見事に成功したが、膜融合タンパク AcrA 結晶構造決定は残念ながら他の研究者の先行を許すこととなった。また、AcrB と同時に取り組んだ MFS 型薬剤排出タンパク TetA の構造決定については、安定で純度の高い精製膜タンパク質を得る上で大きな前進があったが、依然として結晶は得られていない。最新・最先端の技術を以てしても、結晶が得られるかどうかは、その膜タンパク質が持つ本来の性質に大きく依存するのが現状である。今後の課題としては、RND, MFS, SMR, ABC 全ての種類の異物排出タンパクの構造を網羅的に決定し、異物認識の普遍性と多様性を解明することが挙げられる。AcrB は RND 型に属するが、同じ RND 型に属するものにも、2種類のモノマーからなるものがあり、これがどうやって3量体を形成するのかなど興味深い問題が残されている。また、AcrB は TolC, AcrA と三つ組み複合体として機能する。それぞれ単体での構造決定はなされているが、複合体の構造決定はなされていない。今後に残された大きな課題である。村上准教授はこの業績で文科省の若手科学者賞を受賞した。

(2) 発現制御グループ: 平田助教、西野助教をグループリーダーとし、平川特別研究員および多くの大学院生により遂行された。西野助教は本研究課題で学振特別研究員となり、その費用で途中米国ワシントン大学にて研究を遂行したが、異物排出遺伝子発現制御機構の研究を続け、2005年秋帰国後再び山口研究室に復帰して本プロジェクトを推進した。異物排出遺伝子のポストゲノム解析から始まって、二成分系による発現誘導の発見、細胞間情報伝達と発現誘導など数多くの実績を上げた。西野助教はこの過程で、米国細菌学会の Student Travel Grant Award、日本細菌学会の黒屋奨学賞、Science 誌の Young Scientist Award、Nature 誌の Biotechnology Award など数多くの賞を得た。

(3) 高等動物分泌輸送介在型情報伝達の解明: 西特任助教をチームリーダーとし、久保特別研究員を含む多数の大学院生・技術員により遂行された。血小板からのスフィンゴシン1リン酸排出が ABCA 様排出輸送体によるものであることを証明するなど、大きな成果を得たが、分泌輸送体の同定など、主要な研究課題は今後のプロジェクトに残されることになった。

(2) 実施体制



外部の協力研究者として Spring8 の山下栄樹、サントリー生物有機研の石黒正路の協力を得て、全内容を担当

3 研究実施内容及び成果

3.1 異物排出トランスポーターの構造決定と異物認識・異物排出の構造的基礎

(1) 研究実施内容及び成果

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、異物排出タンパク質は、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、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。

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。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。

外膜チャネルタンパク質 TolC の立体構造は2000年にKoronakisらにより決定された。TolCは三量体で、その形状は内径35Åの中空シリンダーである。全長は140Å、そのうち40Å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バレル構造をしている。ペリプラズムに突き出した100Å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バレル構造であり、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、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、および2006年に報告された。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。

① 最初のAcrB結晶構造

結晶構造解析グループは、2002年にAcrB構造決定を報告することができた。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。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50Å、ペリプラズム頭部は70Å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170Å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。

内部構造モデルを見ると、この central cavity から側面に向かって3箇所の開口部が見られる(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。

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。その位置は、しかし私たちの予想よりは下方で、central cavity よりはむしろ、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、

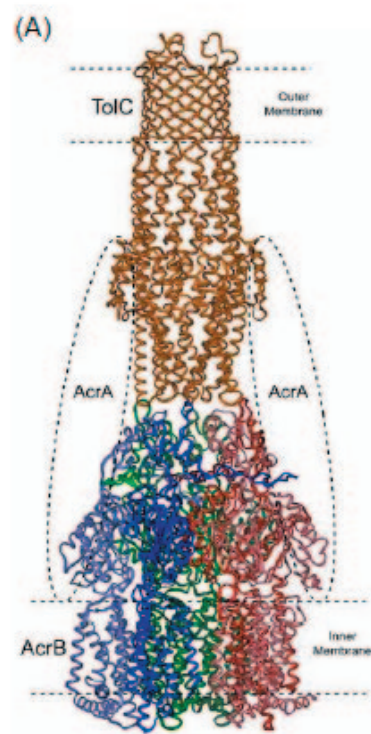


図1. AcrB-TolC 複合体構造

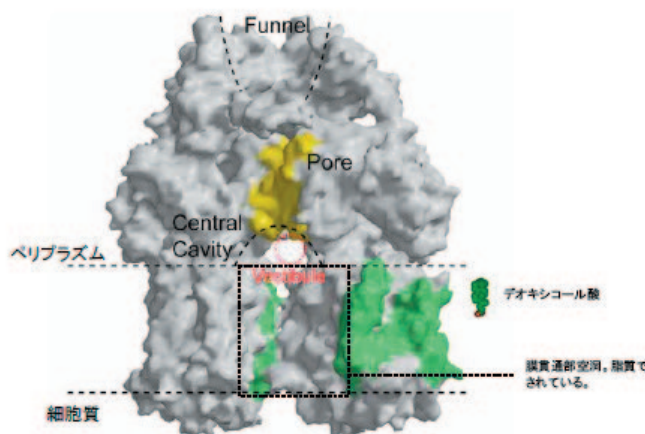


図2. AcrB の内部構造

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。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。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難点があった。

② 基質結合型 AcrB 結晶構造

一方、私たちは、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、基質の電子雲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リー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)。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ー・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。

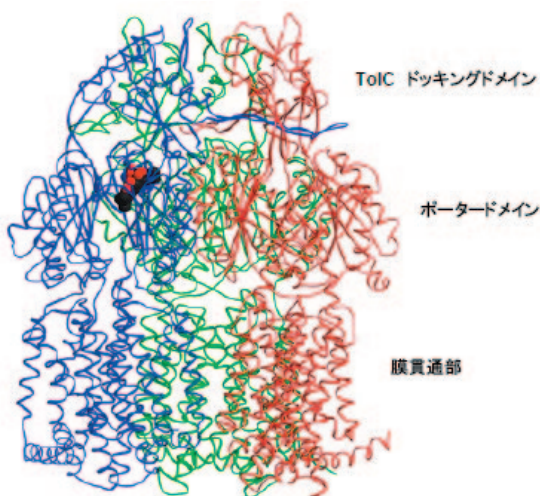


図3. 基質結合型 AcrB 結晶構造

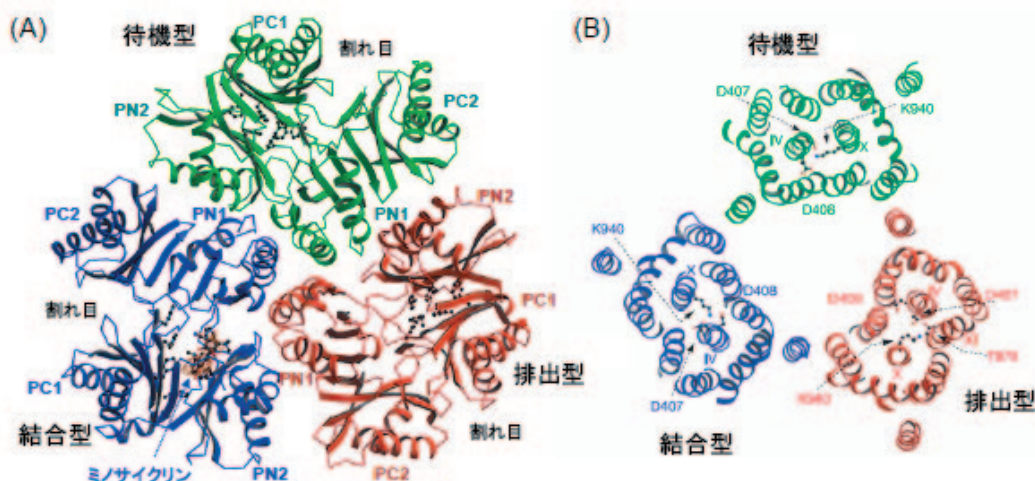


図4. 基質結合型 AcrB 結晶構造のペリプラズム側頭部(A)および膜貫通部(B)断面

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

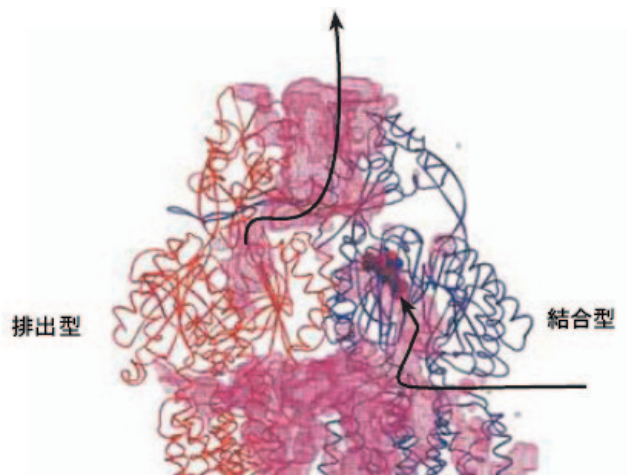


図5. AcrB 分子内部のチャンネル

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

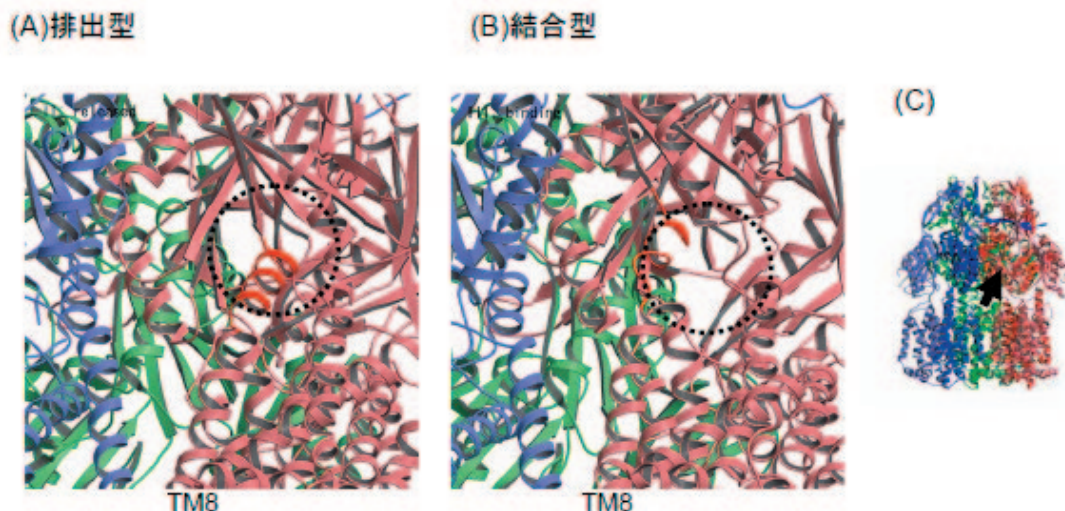


図6. 基質入り口の開閉。(C) 矢印の方向から見た、排出型(A), 結合型(B) 入り口付近の構造。丸い破線で囲った内部が α ヘリックスかランダムコイルかで開閉が起こる。

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。

③ 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過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どころがなく、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, 図7)。部位特異変異導入で、これらの残基は機能

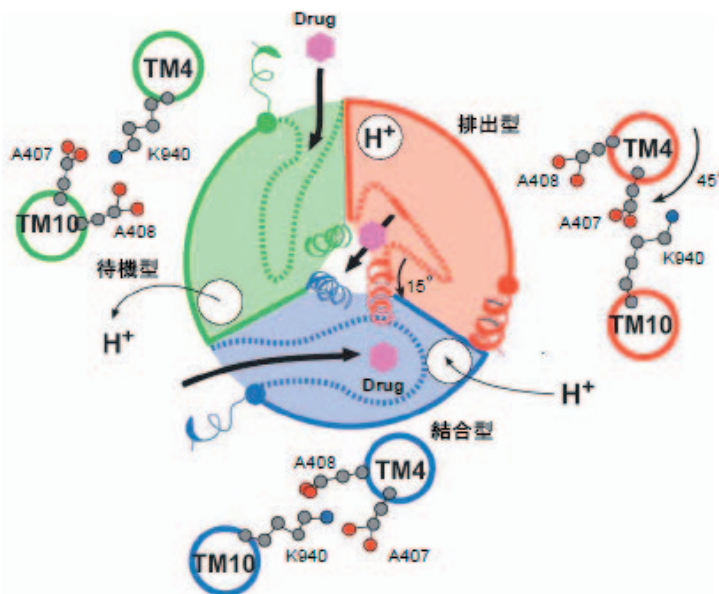


図7. 膜貫通部のイオン対に起こる変化と機能的回転輸送

に必須であることが確かめられており、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)。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ものか、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。

④ 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8)。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、さらに、細菌の多剤排出タンパク質 LmrA および LmrP 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。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。

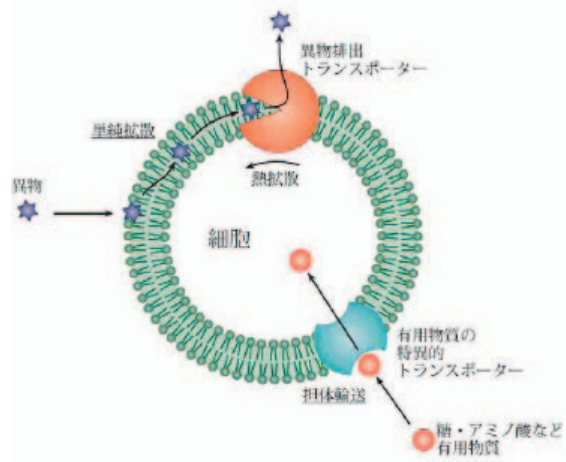


図8. 異物識別の原理: membrane vacuum cleaner model

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でしょうか。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ビ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9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 とはドキシソルビシンは全く接触しておらず、逆にドキシソルビ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⁾。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。



図9. ミノサイクリン(橙)とドキシソルビシン(紫)のマルチサイト結合

⑤ 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10)。

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 側鎖がはねとばされ、 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。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。

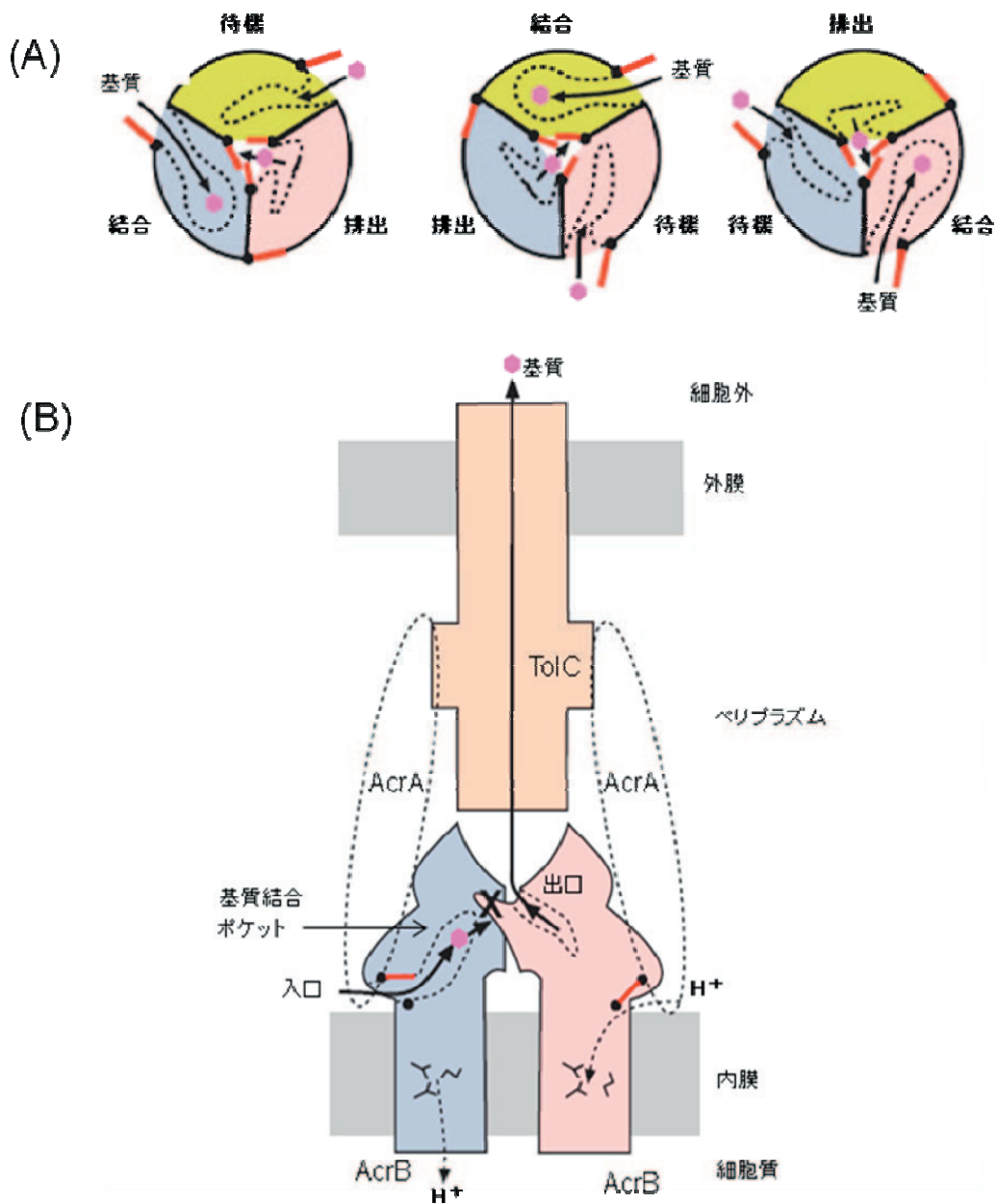


図10. 機能的回転輸送機構

(2)研究成果の今後期待される効果

細菌の異物排出タンパクは病原細菌の多剤耐性の主原因の一つである。特に最近、院内感染等で大きな問題となっている多剤耐性緑膿菌は多剤耐性には、AcrB のホモログである MexB が関与している。ところが、細菌異物排出タンパク阻害剤の開発は、国内外の製薬会社で精力的に行われたが、どういわけか、未だに医療に使える阻害剤は見いだされていない。本研究により、基質結合部位の構造が明らかになったことで、タンパク質構造に基づくドラッグデザイン(SBDD)の可能性が開けてきた。構造に基づく阻害剤のバーチャルスクリーニングとリード化合物を元にしたSBDD に関する新しい別のプロジェクトが、本年度から本研究代表者らにより開始されており、阻害剤開発の系統的手法が確立できれば大きな社会的インパクトが期待される。

3. 2 異物排出トランスポーター発現制御機構

(1)研究実施内容及び成果

①研究のねらい

ゲノム解析によると、異物排出トランスポーターはほとんど全ての生物に存在するばかりでなく、一つの生物に多数の異物排出トランスポーター遺伝子が存在すると推定されている。しかしながら、これらの遺伝子の内、実際に薬剤耐性に寄与していると確認されているものはごく一部にすぎず、残りの遺伝子が本当に薬剤耐性に関与しているかどうかは興味深い点である。大腸菌の全ゲノム配列は1997年に決定された。大腸菌の4.6M塩基対の染色体上には約4300個のORFが同定されているが、そのうち約270個(約6%)が膜輸送体遺伝子であり、この中で約14%にあたる37個が薬剤排出蛋白質遺伝子であると推定された。このうち、実際になんらかの薬剤耐性に関与することが報告されているものは10個に過ぎず、残る27個は全く未知の遺伝子である。これら推定異物排出トランスポーター遺伝子が薬剤耐性に関与しているかどうかをクローニングして調べた結果、なんと20個も遺伝子が耐性に関与していることが明らかとなった(図1)。ところが、普通はその大部分が発現していないか、非常に発現レベルが低い。これらが、いったいどのような条件下で発現してくるのかということを知ることは、多剤耐性の化学療法にとっても重要であるばかりでなく、これらの異物排出タンパクの生理的役割を知る上でも極めて重要なことである。そこで、本プロジェクトでは、大腸菌を例にとって、すべての異物排出タンパクを対象としてその発現制御機構を網羅的に解析することを目標とした。

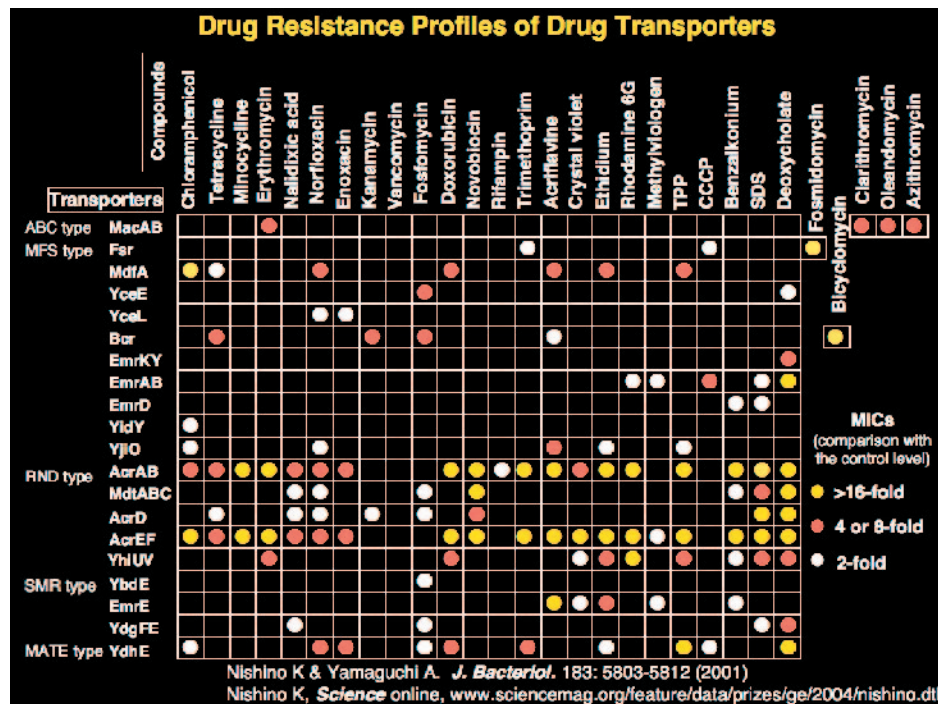


図1. 大腸菌異物排出トランスポーターの基質。各トランスポーターを強制発現させたときの薬剤最小発育阻止濃度上昇度を図に示す。

②研究実施方法

本プロジェクト開始以前に、上記に述べたように、私たちは大腸菌の全異物排出遺伝子候補の強制発現ライブラリを構築し、37個中20個が実際に何らかの薬物・毒物を排出する輸送体であることを突き止めていた。本プロジェクトでは、そのライブラリを元に、さらに、大腸菌の環境感知応答システムである二成分情報伝達系(32種類)すべての発現ライブラリも用意し、さらに、これら遺伝子の欠損変異株セットの構築、マクロアレイ法、定量的RT-PCR法、レポーター遺伝子法、DNAシーケンサーを用いたフットプリント法などを駆使して、異物排出遺伝子の発現制御機構と制御シグナルの解明を行った。

③これまでの研究結果

大腸菌には 20 種類の異物排出遺伝子のあることが私たちの研究で明らかになったが、そのうち、実際に発現して、大腸菌の薬剤抵抗性に寄与しているのは *acrAB*, *mdfA*, *emrE* の3つに過ぎない。それらの発現レベルも決して高くない。しかしながら、その発現機構についてはほとんど知られていなかった。最も良く研究されていたのは *AcrAB* であったが、その遺伝子上流に転写抑制遺伝子 *AcrR* の存在が知られていたが、肝心の *AcrAB* 排出基質(薬剤)による誘導は認められていなかった。*AcrR* はいったい何を感知して *AcrAB* 発現を制御しているのか？そもそも *AcrR* は *AcrAB* 発現を制御しているのか？*AcrR* 以外に転写抑制遺伝子が存在するのは *AcrEF* に対する *AcrS*, *EmrAB* に対する *EmrR* の3例しかない。*AcrAB* にはさらに、*marA*, *soxS*, *rob* といった global activator の存在が報告されていた。

③-1 二成分情報伝達系EvgASシステムによる薬剤耐性発現制御機構の解析

二成分情報伝達系の基本機構 二成分情報伝達系は細菌において、主要な環境感知・応答システムとして機能している。これまで多剤排出蛋白質による薬剤耐性に二成分情報伝達系が関与しているという報告はなかった。しかし、薬剤排出蛋白質の役割が環境からの生体防御にあると考えると、この系によって発現制御される排出蛋白質が存在してもよいのではなかろうか。このような考えに基づき著者は薬剤排出蛋白質と二成分情報伝達系の関係を調べることにした。まずその基本機構について述べる。二成分情報伝達系は環境感知センサー(ヒスチジンキナーゼ)と細胞内制御因子(レスポンスレギュレーター)から構成される(図2)。センサーはそれぞれに特異的な環境シグナルを感知すると、自己リン酸化反応により分子内の特定のヒスチジン残基をリン酸化する。次いで、このリン酸基はレスポンスレギュレーターの特異的なアスパラギン酸に転移される。レギュレーターは様々な生体反応に関わる活性をもつが、一般的にはDNA結合ドメインを保持する転写制御因子であることが多い。リン酸転移を受けたレギュレーターは活性化され、それぞれ目的の遺伝子発現を促進もしくは抑制する。このように二成分情報伝達系にみられる情報伝達機構の基本反応はHis-Aspリン酸転移である。現在では、細菌のみならず酵母や高等植物においても二成分情報伝達系が見い出されており、その普遍性が注目されている。

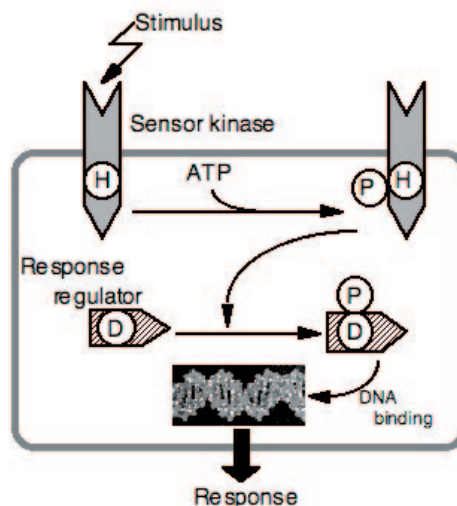


図2. 二成分情報伝達系の基本構造

EvgASシステムによる大腸菌多剤耐性化 大腸菌染色体上には薬剤排出蛋白質遺伝子の隣に二成分情報伝達系の遺伝子が存在している箇所がある。その一つがEvgASシステムである。*evgAS*は大腸菌染色体上53.5min付近に存在しており、推定薬剤排出蛋白質遺伝子 *emrKY* に隣接している(図3)。*evgAS*は1994年に同定された二成分情報伝達系で、少なくとも *emrKY* の発現制御に関係することが分かっていた。著者はこの領域が大腸菌薬剤感受性に及ぼす影響を調べるため、これら4つの遺伝子をまとめてマルチコピーベクターにクローニングし、プラスミドを構築した。このプラスミドを保持する大腸菌はエリスロマイシン、塩化ベンザルコニウム、ドキシソルビシン、ローダミン 6G、デオキシコール酸、臭化エチジウム、その他色素等、構造的に関連性のない多くの化合物に耐性を示した。そこで、これら4つの遺伝子の中でどれが多剤耐性化に関与しているのかを調べたところ、この多剤耐性化はEvgAレスポンスレギュレーター発現のみで得られ、EvgA発現株においては薬剤排出能が上昇していることを見出した(図3)。一方で、EvgAによって制御される推定薬剤排出蛋白質 *EmrKY* を発現させた大腸菌はデオキシコール酸のみにしか耐性を示さなかった(図1)。このことは、EvgAが *emrKY* 以外にも何らかの薬剤排出蛋白質遺伝子発現制御に関係していることを示すものである。そこで、先に調べた薬剤排出蛋白質の基質(図1)を調べたところ、EvgAおよびRND型排出蛋白質 *YhiUV* を発現させた際の大腸菌耐性化パターンが見事に一致した。そこで、

*yhiUV*欠損株を構築して調べると、この株においてはEvgAを発現させても多剤耐性化も薬剤排出能の上昇も起こらないことが分かった(デオキシコール酸は除く)(図3)。

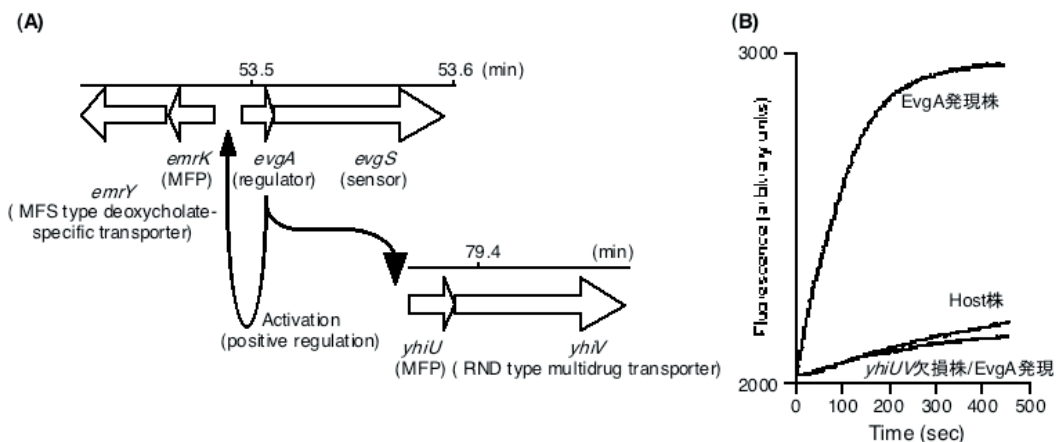


図3. 二成分情報伝達系EvgSAによる薬剤耐性。(A)*evgSA-emrKY*ならびに*yhiUV*の遺伝子マップ。(B)EvgAレギュレーター発現が大腸菌のrhodamine6G排出に与える影響。

ノザンプロット法や定量的リアルタイムRT-PCR法を用いた解析の結果、EvgA発現株においては多剤排出型*yhiUV*と単剤排出型*emrKY*遺伝子発現量が上昇していることが分かった。また、ゲルシフトアッセイ法によりEvgAはこの両遺伝子のプロモーター領域に結合することが分かった。これらの結果より、EvgAレギュレーターは異なる2つのタイプの排出蛋白質遺伝子の発現を上昇させることで、大腸菌を多剤耐性化させることが明らかとなった。二成分情報伝達系による排出蛋白質発現制御は、全く新しい多剤耐性制御メカニズムである。

EvgA発現株を用いたアレイ解析 EvgAはこれら薬剤排出蛋白質遺伝子以外にはどのような遺伝子の制御に関与しているのであろうか。それを知るために、ほぼ全ての大腸菌遺伝子がスポットされたアレイを用いて、EvgA発現株とホスト株での遺伝子発現パターンの違いを調べた。EvgAを発

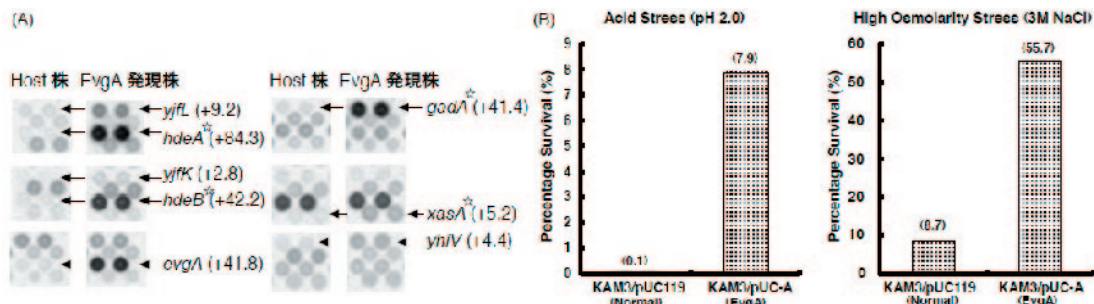


図4. EvgAレギュレーター発現株のアレイ解析と、EvgA発現による大腸菌の酸・高浸透圧抵抗性への影響。(A) EvgA発現株とHost株からtotal RNAを抽出し、逆転写により³³PでラベルしたcDNAを作成した後、大腸菌のほぼ全ての遺伝子がスポットされているアレイにハイブリダイズさせた。結果の一部を図で示す。☆は大腸菌の酸耐性に関与することが分かっている遺伝子。(B) [左] pH 2.0の環境下で大腸菌を2時間放置した時の生存率を示す。EvgA発現により、その生存率は80倍にまで上昇した。[右] 3M NaCl存在下で大腸菌を1時間放置した時の生存率を示す。EvgA発現により生存率は6.5倍となった。

現させることで、約60個もの遺伝子発現量が2倍以上増加し、約30個が1/2以下に減少した。その結果の一部を図4-Aに示す。EvgA発現株では、薬剤排出蛋白質遺伝子のみならず、数多くの酸耐性に関与している遺伝子発現量が増加している。大腸菌において酸耐性は重要な機構である。それは、口から侵入した大腸菌が小腸や大腸といった部位にたどり着くには、必ず胃というpHが低い環境を通過しなくてはならないからである。EvgAS二成分情報伝達系は薬剤耐性のみならず、酸

耐性の発現制御にも関与していると考えられる。実際にEvgA発現株は宿主株に比べて、酸への抵抗性が増す(図4-B)。また、EvgA発現株においては浸透圧ショックで誘導されるような遺伝子の発現量も上昇しており、EvgA発現株は高浸透圧に対しても抵抗性が増した(図4-B)。このことから、薬剤排出蛋白質発現制御と大腸菌恒常性維持との間には、密接な関係があると考えられる。

③-2 二成分情報伝達系BaeSRシステムによる薬剤耐性発現制御機構の解析

BaeSRシステムによる大腸菌多剤耐性化 大腸菌染色体上にはもう一ヶ所、薬剤排出蛋白質遺伝子と二成分情報伝達系遺伝子が隣接している場所がある。BaeSRシステムである。BaeSRシステムは1993年に発見されたが、その機能についてはあまり分かっていなかった。著者らはBaeRを発現させると大腸菌は、ノビオシン、デオキシコール酸、コール酸、タウロコール酸といった化合物に対して耐性化することを見い出した。*baeSR*の上流には推定薬剤排出蛋白質遺伝子*mdtABCD*が存在している(図5-A)。これらの遺伝子をクローニングし、調べると、MdtABCを発現させた大腸菌もBaeRを発現させた際と同様に多剤耐性化した。この多剤耐性化にMdtDは不必要で、この排出蛋白質は他の機能を担っていると考えられる。また、MdtABだけの発現では完全な耐性化は得られず、薬剤耐性化にはMFPであるMdtAに加え、RND蛋白であるMdtBとMdtC、さらにOMFのToICが必要であることが分かった。RND型排出蛋白質において、機能に2つの異なる内膜サブユニットが必要であるという報告は今までになく、MdtABC-ToICシステムは新しいタイプの薬剤排出蛋白質である。ノザンプロットや定量的リアルタイムRT-PCRを用いた解析により、BaeR発現株では*mdtABCD*の転写が促進されていることが分かった(図5-B)。また、*mdt*欠損株においてはBaeRを発現させても薬剤耐性化は起こらない。これらの結果から、二成分情報伝達系BaeSRは薬剤排出蛋白質MdtABCの発現制御を行うことで大腸菌を多剤耐性化させることが明らかとなった。

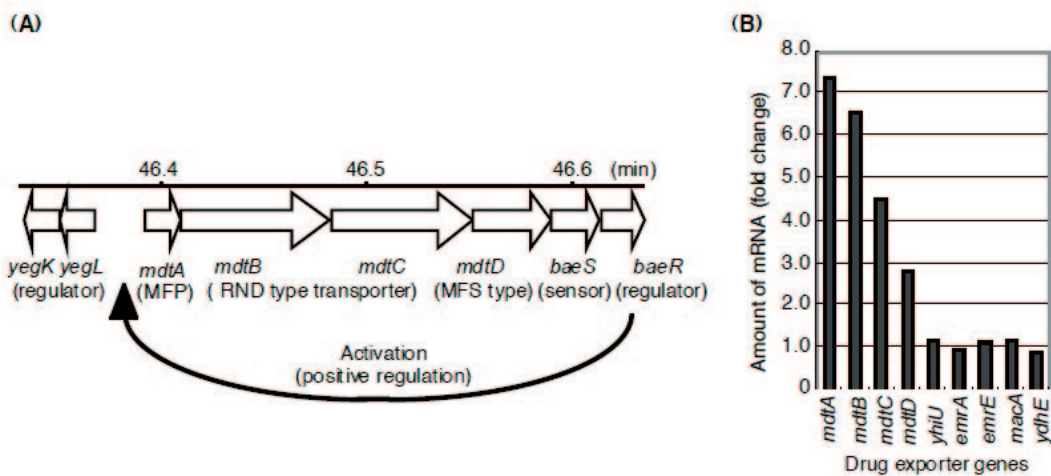


図5. 二成分情報伝達系BaeSRによる薬剤耐性(A)大腸菌ゲノム46.4-46.6min付近に存在する遺伝子群 (B) BaeR制御因子発現による各薬剤排出系mRNA量の変化

③-3 推定二成分情報伝達系遺伝子の全クローニングと解析

私たちは上に述べたように、EvgASシステムおよびBaeSRといった2つの二成分情報伝達系が大腸菌薬剤耐性化を制御していることを明らかにした。大腸菌の染色体上には、ゲノム解析をもとに約30種類の二成分情報伝達系が存在していると推定されている。具体的にはセンサーが30個、レギュレーターが32個である。EvgAS、BaeSR以外にも薬剤耐性に関与する二成分情報伝達系は存在するのだろうか。著者らはゲノム配列から推定された32個のレギュレーターを全て、強制発現ベクターにクローニングした。そして、それぞれのレギュレーターを大腸菌で発現させた上で、様々な抗菌薬・毒物等のMIC値を調べた。いずれかの化合物に対して耐性を付与したレギュレーターを図6に列挙した。32個中なんと、17個ものレギュレーターが何らかの耐性に関与していた。

Regulators	Compounds																															
	Erythromycin	Kanamycin	Fosfomycin	Doxorubicin	Novobiocin	Crystal violet	Ethidium	Rhodamine 6G	Methylviologen	TPP	Benzalkonium	SDS	Deoxycholate	Ampicillin	Oxacillin	Cephalothin	Cephaloridine	Cefmetazol	Cefamandole	Cefuroxime	Cefotaxime	Ceftazidime	Flomoxef	Aztreonam	Imipenem	Amikacin	Carbencillin	Cloxacillin	Carmonam			
BaeR	1	1	1	1	32	1	1	1	1	1	1	1	16	32	1	32	1	1	2	4	2	2	4	1	8	1	8	16	8			
CheY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CltB	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CpxR	1	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	32	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	4	4					
CreB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1						
DcuR	2	1	1	1	4	2	1	1	1	1	1	2	16	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	4							
EvgA	8	1	1	32	4	4	2	16	1	4	8	8	32	2	16	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	8					
FimZ	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	☆	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1								
KdpE	1	4	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
NarL	1	2	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1							
NarP	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
OmpR	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	32	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1							
RcsB	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	16	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	8								
RstA	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1								
TorR	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
YedW	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1							
YehT	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2								

図6. 大腸菌二成分情報伝達系レスポンスレギュレーターによる薬剤耐性化
大腸菌の32個の推定レスポンスレギュレーターをクローニングし、薬剤耐性化への関与を調べた。図は各レギュレーターを大腸菌KAM3株で発現させた時の各化合物MIC値が、KAM3株に対する値に比べて、どれだけ上昇したのかを比で示したものである。☆FimZを発現させた大腸菌は宿主株と同様に、デオキシコール酸1,250 μg/mlで一旦生育が阻止されるが、10,000 μg/mlで再び発育する。少なくとも、40,000 μg/mlまでは発育可能。

化合物別に見ると、薬剤排出蛋白質の場合と同様に、デオキシコール酸耐性に関与しているレギュレーターが最も多く、9個がこの耐性に関与している。これは大腸菌が生存する環境にはデオキシコール酸が存在していることを裏付けている。腸内細菌は全般的に他の菌に比べ、胆汁酸に耐性であるが、このような耐性も二成分情報伝達系によって制御されているのかもしれない。レギュレーター別に見ると、最も多くの種類の化合物に対しての耐性に関与しているものはEvgAであり、その次がBaeRであった。今回、新たに分かったことは、この2つのレギュレーターはβラクタム剤耐性にも関与しているというこ

Response Regulator	Drug Transporter Gene (Fold increase)
BaeR	acrD (15) mdtA (530)
CpxR	acrD (4.1)
EvgA	emrK (15) yhiU (250)
OmpR	acrD (10) emrA (6.5) emrE (6.7)
RcsB	macA (4.6)

図7. レスポンスレギュレーター発現により発現量が増加した薬剤排出蛋白質遺伝子とその上昇度

とである。やはり、薬剤耐性という観点からみると、EvgASおよびBaeSRシステムが重要な役割を担っていると考えられる。また、各々のレギュレーター発現が薬剤排出蛋白質遺伝子転写活性に与える影響を調べたところ、5つのレギュレーターが排出蛋白質遺伝子発現量を上昇させていた(図7)。さらに、これら発現が上昇していた薬剤排出蛋白質を用いた結果、BaeR, CpxR, EvgAの3つのレギュレーターによる大腸菌薬剤耐性化は、排出蛋白質発現が上昇してもたらされていることが明らかとなった。

③-4 大腸菌ヒストン様蛋白質H-NSによる薬剤排出蛋白質発現制御機構の解析

細菌は種々の環境に適応し、生存するために、様々な遺伝子の発現を調節している。大腸菌ヒストン様蛋白質であるH-NSはDNA結合蛋白で、染色体コンパクト化に関与していると考えられているが、近年、H-NSが保持する転写制御機能が注目されている。H-NSは莢膜や線毛といった病原因子だけでなく、酸抵抗性や高浸透圧抵抗性因子の発現を調節(抑制)している。しかしながら、H-NSの薬剤耐性化への関与は未知であった。そこで、著者はH-NSが大腸菌薬剤感受性に及ぼす影響について調べることにした。

著者は、大腸菌薬剤感受性株(W3104 Δ *acrAB*)から *hns* 遺伝子を破壊することで大腸菌が、Oxacillin, Erythromycin, Novobiocin, Doxorubicin, Acriflavine, Crystal violet, Ethidium bromide, Rhodamine 6G, SDS, Benzalkonium, Deoxycholate 等の化合物に高度耐性を示すことを見出した(表1)。また、*hns* 欠損は、菌体内薬剤蓄積量を低下させた。これより、*hns* 欠損株では薬剤排出が亢進されていることが予想された。大腸菌には外膜蛋白 TolC を機能に必要とする複数の薬剤排出蛋白が存在するが、*hns* 欠損による多剤耐性化は *tolC* 破壊により、完全に消失した(表1)。そこで先に著者が明らかにした TolC 依存型薬剤排出蛋白それぞれの基質と照合した結果、*hns* 欠損による多剤耐性パターンは排出蛋白 AcrEF によるものと一致した。*hns* 欠損株からの *acrEF* 破壊は、*hns* 欠損による多剤耐性化を中程度にまで引き下げた。この中程度耐性パターンは排出蛋白 YhiUV による耐性パターンと類似する。*hns* 欠損による高度耐性化は *acrEF* と *yhiUV* 両遺伝子破壊で完全に消失した(表1)。このことから、H-NSは、AcrEF と YhiUV の2つの多剤排出蛋白質の発現を調節していることが明らかとなった。

表1. *hns* および薬剤排出蛋白質遺伝子欠損が大腸菌薬剤感受性におよぼす影響

Deletion strain	Minimum inhibitory concentration (μ g/ml)										
	OXA	EM	NOV	DXR	ACR	CV	EBR	R6G	SDS	BENZ	DOC
親株 (Δ <i>acrAB</i>)	1	8	32	4	8	2	8	4	64	4	5000
Δ <i>yhiUV</i>	1	8	32	2	8	2	8	4	32	4	5000
Δ <i>acrEF</i>	1	8	32	4	8	2	8	4	64	4	5000
Δ <i>tolC</i>	0.5	4	2	2	8	2	4	4	16	4	156
Δ <i>hns</i>	64	64	128	>128	64	128	256	256	>512	32	>40000
Δ <i>hns</i> Δ <i>tolC</i>	0.5	4	2	2	8	2	4	2	32	4	156
Δ <i>hns</i> Δ <i>yhiUV</i>	64	32	128	128	64	32	256	128	>512	16	>40000
Δ <i>hns</i> Δ <i>acrEF</i>	4	16	32	32	16	8	64	64	128	8	10000
Δ <i>hns</i> Δ <i>acrEF</i> Δ <i>yhiUV</i>	1	4	16	2	16	2	8	2	64	4	2500

③-5 インドールによる異物排出蛋白質発現制御機構の解析

大腸菌の異物排出遺伝子のほとんどは、それらが輸送する基質によって発現誘導されることがない。その発現シグナルについてはほとんどわかっていなかった。二成分系で制御されていることがわかっても、二成分系そのものの入力シグナルがわかっているものはごく少ない。異物排出系を強く制御する EvgSA, BaeSR などは何を感知しているのか全くわかっていなかった。そこで次に、入力シグナルの解析に取り組んだ。

最初に見つかったのがインドールである。インドールはトリプトファンの代謝過程で生じる有害な老廃物であるが、いくつかのアミノ酸代謝に関連する遺伝子の発現調節に関与することが知られていた。インドールを倍地中に加えると、いくつかの異物排出蛋白の発現を誘導することがわかった。中でも特に強く誘導されたのは *mdtEF* である。先に述べたように、*mdtEF* は二成分系 EvgSA で誘

導されることを見つけた異物排出タンパク遺伝子である。ところが、*evgSA* をノックアウトしても、インドールによる誘導は全く影響を受けなかった。インドールは菌の生育が定常期に入ると培地中に蓄積される。そこで、菌の生育段階と *mdtEF* 発現誘導の関係を調べると、まさしく、定常期で *mdtEF* が大きく発現誘導されることがわかった(図8)。ちなみに、他の異物排出タンパクにはそのような傾向は全くなかった。定常期での細菌細胞間情報伝達を担う物質としては、ホモセリンラクトンが著名である。ホモセリンラクトンによるクオラムセンシングは病原性のトリガーとしても注目されている。大腸菌にはしかしホモセリンラクトンが存在しない。私たちの結果は、大腸菌ではホモセリンラクトンに代わってインドールが定常期のクオラムセンシングリガンドとして働いている可能性を示すものである。そこで、インドールと腸管出血性大腸菌の病原性との関係を調べたところ、毒素の分泌を誘導することがわかった。

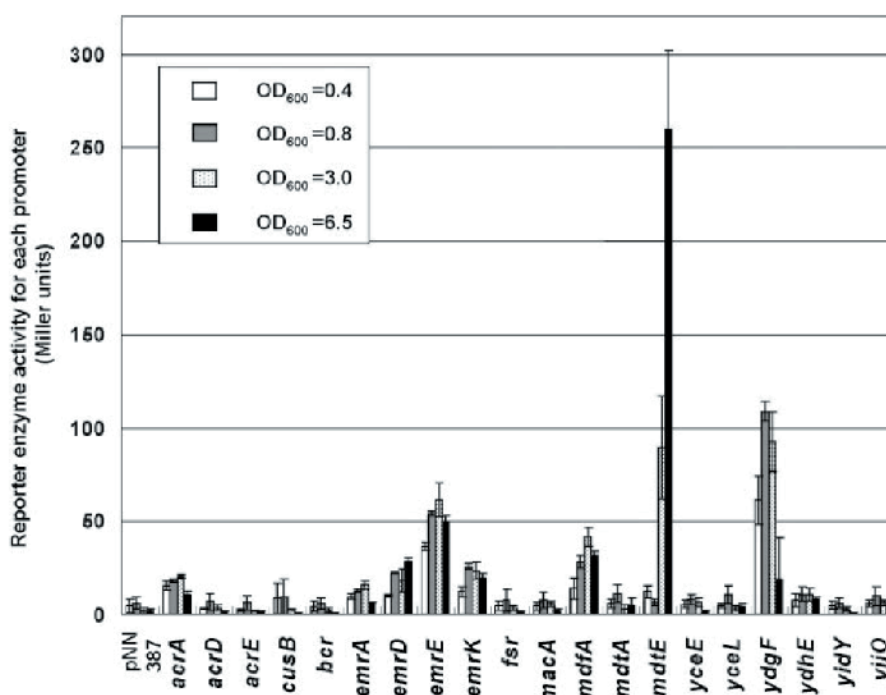


図8. 各増殖段階における異物排出トランスポーター発現レベル。大腸菌に存在する20個の異物排出トランスポーター発現レベルを調べた。その結果、*mdtE* が定常期において発現誘導されることが分かった。

③-6 N-アセチルグルコサミンによる異物排出蛋白質発現制御機構の解析

mdtEF が複数の経路で独立に発現制御されているところから、*mdtEF* を発現誘導する物質を改めてランダムスクリーニングしてみたところ、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が *mdtEF* のみを強く発現誘導することが見出された。しかも、この系は上に述べた EvgSA, インドールいずれの系とも全く別の経路であった。その後の研究で、これが Catabolite control によるものであることがわかった。実際、GlcNAcだけでなく、グルコースやグルコサミンなども *mdtEF* の発現を誘導した。また、この誘導は PTS 経路に依存しており、cAMP によって抑制された。catabolite control を担う CRP-cAMP 複合体が *mdtEF* 遺伝子上流域に直接結合することも確かめられた。これは、通常の catabolite control とは逆に、catabolite repression ではなく catabolite induction である。*mdtEF* は従って少なくとも3つの全く独立の経路により発現調節を受けていることがわかった。二成分情報伝達系、インドールおよび成長期依存的制御、catabolite control である(図9)。しかも、後2者は見かけ上相反する調節のように思われる。なぜなら、catabolite control はむしろ対数増殖期に受ける調節である。MdtEF は AcrAB, AcrEF に次ぐ幅広い基質特異性を持つ異物排出トランスポーターではあるが、その異物排出機能だけでは、このように複数経路による厳密な発現調節を受けている理由を説明

することは到底できないように思われる。インドールを排出しているのではないかと試してみたが、全く無関係とは言い切れないものの、少なくとも主たる排出経路ではないようだ。従って、*mdtEF*には他に何か菌の環境適応に重要な物質の輸送に決定的な役割を果たしているものと推定している。

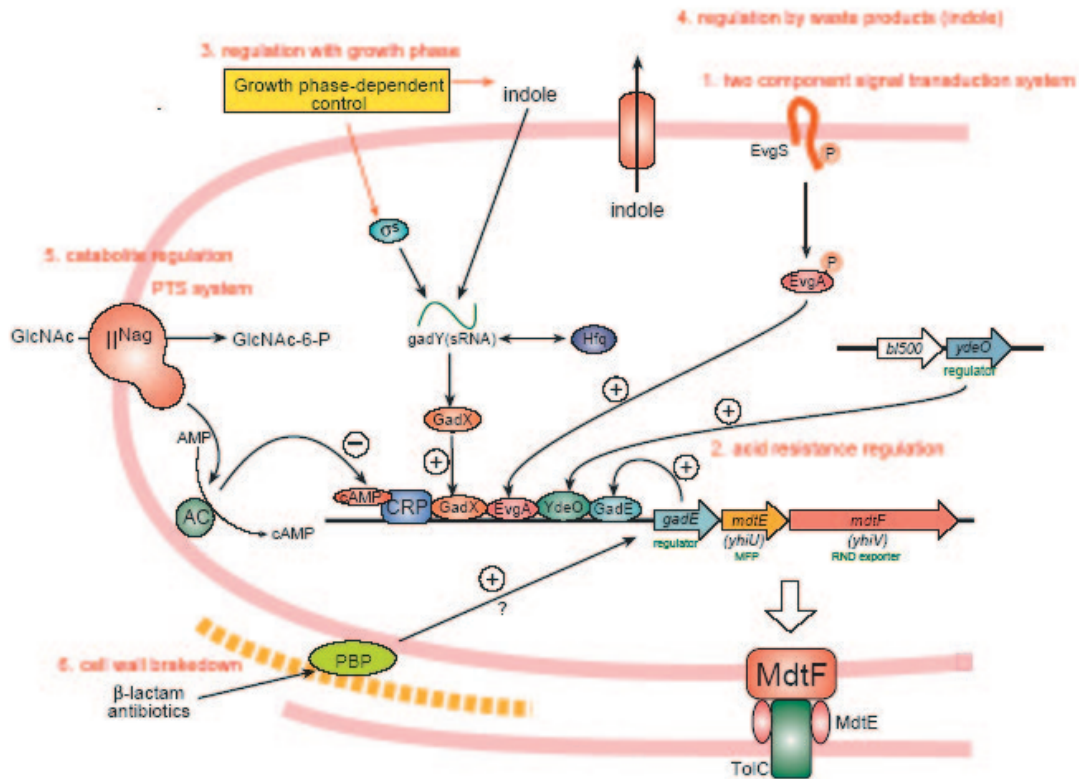


図9. MdtEF 発現の多彩な制御機構

類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

異物排出タンパク発現制御機構について:ゲノム解析を網羅的解析にどう生かすかは大きな課題である。一般的には、網羅的ノックアウトを行って、その遺伝子の役割を探るというのが少なくとも細菌では最も一般的な手法であろう。しかし、この方法は、普段そのほとんどが発現していない異物排出タンパク遺伝子のような場合には有効でないものと推測される。実際、大腸菌の推定異物排出遺伝子37個の網羅的ノックアウトが Sulavik らにより2001年に敢行されたが、結果は、異物排出遺伝子では *AcrAB* のみが大腸菌の薬剤抵抗性に寄与しているが、他はノックアウトしても菌の薬剤感受性にはほとんど変化はないというものであった。私たちは同じ年に、網羅的発現クロニングを敢行し、20種類が実際に何らかの薬物・毒物の排出輸送体であることを突き止めた。さらに、私たちは異物排出遺伝子が二成分情報伝達系により制御されていることを、EvgSA による *mdtEF* 遺伝子制御において初めて発見した。その後、Masuda らは、酸耐性調節因子の一つである YdeO が *mdtEF* 遺伝子を制御していること、EvgA は直接 *mdtEF* 遺伝子を制御しているのではなく、YdeO を介して制御しているとする説を提出した。その根拠は、*ydeO* をノックアウトすると、EvgA はもはや *mdtEF* 遺伝子発現を促進することはできないという事実だった。これは、私たちが前年報告した、EvgA は *mdtEF* プロモーター領域に直接結合して発現を制御しているということと矛盾するように思われた。ところが、さらに翌年、Masuda らは続報を報告し、逆に *evgSA* ノックアウトでも *ydeO* による誘導が起らないことから、両者はどちらが primary というのではなく、共に *mdtEF* 上流に結合し、両者が結合することで初めて誘導が起こることが証明された。このように、異物排出タンパクの発現制御は注目されつつあるが、同時に、異物排出タンパクによる病原性の制御についても関心が高

まっている。この機作としては、一つは病原性に必要な毒素や関連する物質の分泌を異物排出タンパクが担っているということ。これは、緑膿菌の異物排出タンパクで最近立証された。もう一つは、菌が実験室で生育するには、薬剤を与えない限り異物排出タンパクは必要ないが、宿主の体内で生育するためには、たとえ抗生物質が投与されていなくても異物排出タンパクが必要であるということである。後者については、当初の本プロジェクトメンバーであった西野が渡米し、留学先で、サルモネラの virulence と異物排出タンパク遺伝子との関連性について網羅的解析を行い、深い関係を証明した。いくつかの RND 型排出タンパクをノックアウトすると、全く virulence を消失することが示された。しかも、virulence に重要な排出タンパクは、構成的に発現している AcrB ではなかった。このことは、宿主の中での異物排出遺伝子の発現誘導が重要な役割を果たしていることを示すものである。まさに、私たちの異物排出遺伝子発現調節機構の網羅的解析がますます重要性を帯びてくると言える。Nature 誌の CEO David Swinbanks 博士および Science 誌の編集長 Donald Kennedy 博士からも、私たちのポストゲノム解析は異物排出トランスポーターの解明にとって画期的に重要な仕事であるばかりでなく、医療分野にも大きくインパクトを与える研究であるとの評価をいただき、両誌より表彰された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

ゲノム配列の情報をもとに、私たちは推定異物排出蛋白質遺伝子と二成分情報伝達系遺伝子を網羅的にクローニング・解析することで、数多くの薬剤耐性因子を同定した。また、大腸菌ヒストン様蛋白質 H-NS が大腸菌薬剤排出蛋白質発現を制御していることも見出した(図10)。私たちは、二成分情報伝達系によって薬剤排出蛋白質の発現が制御されるという新たな耐性機構を発見したが、最近になって、二成分情報伝達系による薬剤耐性化が相次いで報告されている。肺炎連鎖球菌の VncSR システムや腸球菌の VanSR システムはバンコマイシン耐性に関与していることが報告されている。また、黄色ブドウ球菌の AriSR システムは多剤排出蛋白 NorA の発現制御に関与していることが報告された。いずれにせよ二成分情報伝達系による薬剤耐性制御は、新しいメカニズムであり、薬剤耐性研究者の注目を集めるものとなることは間違いない。おそらく、このような機構は他の菌においても普遍的に存在していると考えられる。二成分情報伝達系の阻害剤がいくつか報告されているが、このような薬剤と既存の抗菌剤を併用すれば耐性菌の出現頻度を減らし、効果的な治療が可能になるかもしれない。

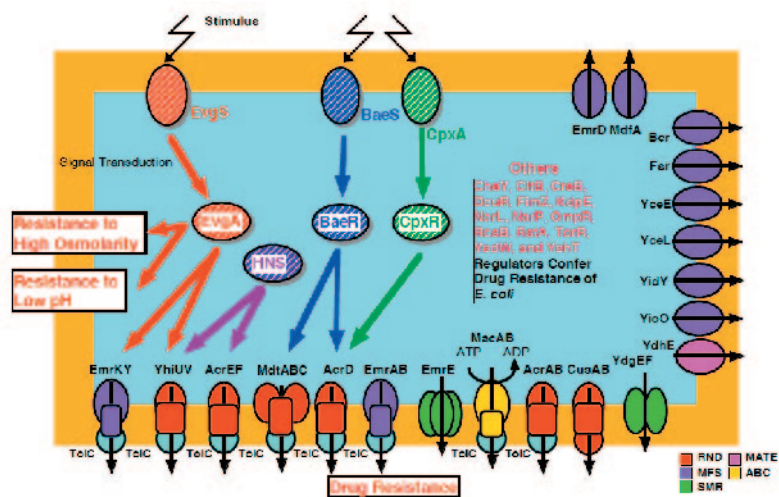


図10. 薬剤排出蛋白質とその発現制御機構

ゲノム情報に基づく研究の結果、20個の異物排出蛋白質と17個の二成分情報伝達系、そして H-NS 蛋白質が薬剤耐性に関与していることが明らかになった。また、二成分情報伝達系および H-NS 蛋白質は薬剤排出蛋白質発現を増大させ大腸菌を多剤耐性化させることが分かった。

本研究は、細菌の全ゲノム配列が決定されたという事実の上から、ポストゲノムの薬剤耐性研究をいかに進めていくかという方向性を示したものである。細菌の遺伝子資源を全体として分析すれば、薬剤耐性戦略の今日ばかりでなく未来の姿まであらかじめ予測し、いわゆる抗生物質開発の耐性菌サイクルを脱却する可能性を見出すことができるのではないかとというのが著者らの目標である。遺伝子を目指す従来の手法とは逆に、遺伝子から出発するポストゲノム手法は、薬剤耐性研究においても研究の様相を一変させるパワーを秘めていると言える。

今後も本成果をもとに、さらに研究を進めていくことが、「異物排出トランスポーター」の性質解明といった新規基礎研究分野を開拓するのに貢献するだけでなく、耐性菌感染症の予防や対策のためにも必要であり、得られた研究成果をトランスレーショナル・リサーチへ発展させることで、人類の福祉に貢献を果たし、安全・安心な社会を構築できるものと考えている。これから日本は本格的に高齢化社会に突入し、免疫力が低下した患者が増加することで、感染症に悩まされる患者数が増加の一途をたどることが危惧されている。特に、多剤耐性菌による感染症は化学療法が困難であり、これら耐性菌への対応は国を挙げて取り組まなければならない大きな問題であると考えられる。我が国として安全・安心な社会の構築に資するために、本成果をもとにさらに研究を進めていくことが必要であり、本研究が耐性菌感染症の予防や対策に貢献できるものと確信している。

(3) 高等生物における生理的機能の解明

(1) 研究実施内容および成果

神経伝達やホルモンによる恒常性維持など、高等生物において細胞間情報伝達物質は我々の生存に必須な役割を担っている。その分泌機構を解明することは生命機能の本質を理解するのに欠かせないばかりでなく、遺伝病をはじめとするさまざまな疾患の治療法を確立する上でも大きな意義がある。生体の情報伝達は、情報分子の分泌と受容の両方がある初めて成り立つ。近年、受容体の解析は格段に進み、それらをターゲットとする薬剤は、現在開発されつつある全ての薬剤の半数にもものぼるといわれている。一方、情報伝達分子の分泌に関しては、アセチルコリン、グルタミン酸、インスリン等多数の親水性分子は、シナプス小胞や分泌小胞にいったん蓄えられた後、開口放出により分泌される。しかしながら、他方、ステロイドホルモン、プロスタグランジン、脂質メディエーターなど、非常に多くの疎水性もしくは両親媒性の情報伝達分子の分泌経路についてはほとんどわかっていない(図1)。これはまさに、現在の生物学における大きな失われた環 (missing link) である。これらの分泌輸送体を同定し、従来の開口放出型情報伝達に加えて、分泌輸送介在型情報伝達という全く新しい学問分野を創造することは、今日の生物学、医学にとってきわめて重要な研究課題である。一方、ゲノム解析の進展は、リガンド未知のオーファン輸送体が多数存在することを明らかにしている。オーファン受容体については系統的な研究方法が確立され、そのリガンドの探求、アゴニスト、アンタゴニスト

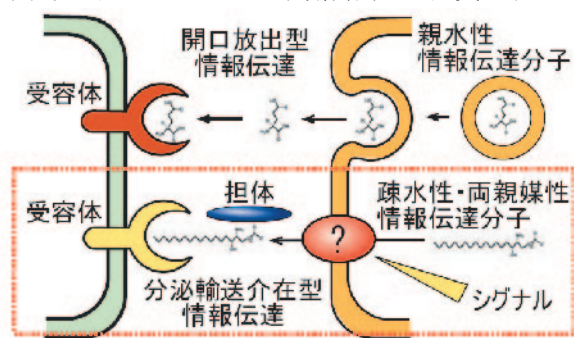


図1. 情報伝達分子の分泌と受容

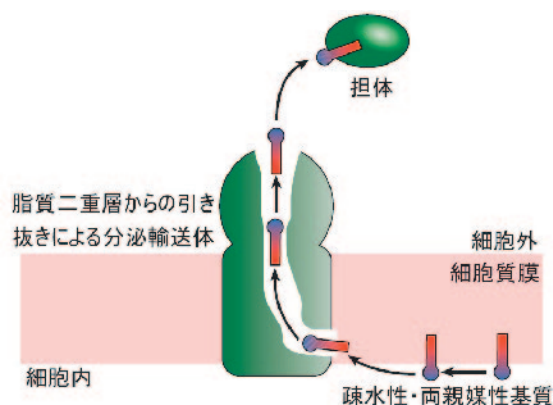


図2. 異物排出と両親媒性情報伝達分子推定排出機構の類似性

の合成は創薬の大きな原動力になっている。しかし、オーファン輸送体についてはまだその明確な概念すらなく、研究は緒についたばかりである。オーファン輸送体の中には、いわゆる異物排出輸送体ファミリーが多く含まれている。我々は、異物排出輸送体の X 線結晶構造解析に初めて成功し、その結果、異物排出蛋白は、分子の側面に開口部を持ち、細胞質膜の脂質二重層から基質を取り込んで排出していることを明らかにした。この輸送機構は、両親媒性情報伝達分子の想定される輸送機構とまさに同じである(図2)。このことから、異物排出輸送体ファミリーの中で、基質未知のオーファン輸送体の中に両親媒性情報伝達分子分泌輸送体があるという着想が生まれた。実際、細菌では、異物排出輸送体は薬剤排出のためだけでなく、多彩な生理活性物質の排出を通して、菌の生存戦略に寄与している。一方、高等生物では、生理活性物質の排出輸送に関する研究は立ち後れている。ABC タンパク質が情報伝達分子を排出輸送するという報告がいくつか出されているが、それらはMDRやMRPといった、多剤排出に関わる基質特異性の低い輸送体であり、実際の生理的な重要性の解明には至っていない。高等生物ゲノムの中には多くの膜輸送タンパク質がオーファン輸送体として残されている。従って、異物排出輸送体ファミリーのオーファン輸送体には両親媒性情報伝達物質分泌輸送体が多数含まれている、すなわち両者は共通のファミリーである可能性がきわめて高い(図3)。本研究では、ゲノム解析によるオーファン輸送体と、両親媒性情報伝達物質分泌組織の両方から出発して、両者の接点に、全く新たな情報伝達物質分泌機構とその輸送体を同定することを目指した。

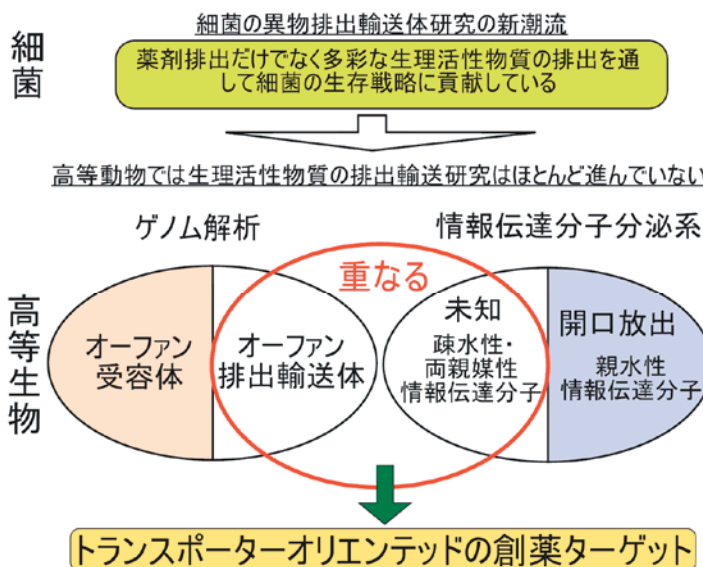


図3. 情報伝達物質輸送体の同定

②研究方法

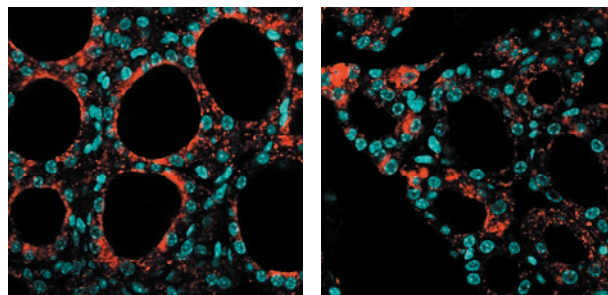
ゲノム情報から得られるオーファン輸送体は非常に多数であるため、実際に情報伝達物質の輸送にかかわる輸送体を絞り込むためにまず、情報伝達物質を良く分泌する組織を選び、他の組織に比べてそこに良く発現している ABC, RND 等のオーファン輸送体を RT-PCR 等で特定する。それらの遺伝子をクローニングし、培養細胞で発現させる傍ら、ノックアウトマウスを作成し、輸送体の強制発現や欠失に伴う細胞やマウス固体の形質の変化や両親媒性情報伝達物質の輸送活性などを解析する。一方、情報伝達物質を分泌している臓器または細胞から分泌される情報伝達物質の輸送機構を生化学的に調べることで、輸送体の性質を特定し、生化学的手法およびプロテオーム的手法で膜タンパク質の中から目的の基質を輸送する輸送体を、再構成系等を使って絞り込む。

③これまでの研究結果と現在の研究進捗状況

情報伝達物質を良く分泌する組織として、脳と血小板を選び、他の組織に比べて、これらに良く発現しているオーファン ABCA 輸送体を探索したところ、脳では ABCA5 が、血小板では ABCA7 が見つかった。これらはいずれも基質が全く未知であった。ABC 輸送体の A サブファミリーには ABCA1 や ABCA4 といったコレステロールやリン脂質などの特定の脂質やその代謝物といった、我々が標的にしている両親媒性情報伝達物質に構造的に類似のものを運んでいる。また、このフ

ファミリーは最も多くの ABC 輸送体が含まれるが、実際に基質が同定されているものが数個であることから、基質の分かっていない輸送体の中に我々の目指す輸送体が含まれている可能性がある。脳においてまず同定した ABCA5 に対して特異的な抗体を作成し、その組織発現を調べた。その結果、ABCA5 ははじめに同定した脳以外に、肺、精巣、甲状腺などの脂質やその類似物質を放出する器官にも発現しているが、肝臓や消化器官などの臓器にはほとんど発現していなかった。さらにその細胞内局在を組織を用いた蛍光抗体法で調べたところ、細胞膜ではなく細胞内の顆粒に存在することが分かった。さらに、培養細胞を用いて各オルガネラのマーカーとの共染色により ABCA5 はリソソームに局在することが分かった。ABCA5 の機能を明らかにするためにこの輸送体機能に必須と考えられる 2 つある ATP 結合ドメインの C 末側のドメインの Walker 配列を欠損させたノックアウトマウスを作成した。ノックアウトマウスは ABCA5 が精巣に強く発現しているにもかかわらず正常に分娩され、大きな異常を示さずに育つが、12 週齢を過ぎた頃から、いくつかのマウスが心不全により死亡することを見出した。ABCA5 の発現が見られる脳には形態的な以上は認められなかった。マウスの病態を細かく観察すると、心臓において血栓や拡張型心筋症様の病態が見られ、肝臓において鬱血が見られた。しかし、心臓ではわずかに発現が見られるが、肝臓では ABCA5 を発現していない。そのため、実際の ABCA5 の欠損による異常は他の組織、細胞で起こり、その影響で 2 次的に病気が起こっている可能性が考えられた。しかし、拡張型心筋症を起こしている心臓の細胞を電子顕微鏡により観察すると心筋細胞のリソソームが異常な多層構造を示しており、これはリソソーム病で見られる病態に似ていた。このことと ABCA5 が主にリソソームに局在していることとあわせて考えると、ABCA5 は心臓でのリソソームの正常な機能の維持に重要な役割を担っていることが考えられる。これまでの結果をまとめて Molecular & Cellular Biology に論文発表した。

また、一部の ABCA5 ノックアウトマウスでは眼球の以上突出が見られた。これはバセドー氏病に見られる症状で、ノックアウトマウスでは甲状腺ホルモン量の低下と甲状腺の濾胞の崩壊が見られた。ABCA5 は甲状腺のろ胞細胞のろ胞側細胞質膜のすぐ内側にある顆粒に集中して局在していた。甲状腺ホルモン(T4/T3)は Thyrogloblin として濾胞に蓄えられた後、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、リソソームで分解を受けて生成される。マウスを甲状腺刺激ホルモンで刺激すると、ABCA5 が局在する小胞が濾胞側の細胞膜直下から細胞全体へとその局在を変化させた(図4)。これらの結果から ABCA5 はエンドサイトーシス後の小胞のリソソームへの融合もしくはリソソームでの甲状腺ホルモンの生成に関与している可能性を考えている。



ろ胞側細胞質膜近傍に局在 甲状腺刺激ホルモンTSH投与
図4. 甲状腺ろ胞細胞におけるABCA5の局在と甲状腺刺激ホルモン投与による変化

すでに述べたように、ABCA5 の主要発現臓器である脳において、ABCA5 の欠損により顕著な形態の以上は見られなかった。脳には神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなどの機能的に異なる細胞が多数存在している。そこでまず脳のどの細胞において ABCA5 が発現しているかをそれぞれの細胞に対する特異的なマーカー蛋白質の抗体と ABCA5 抗体の共染色により調べた。その結果、ABCA5 は大脳ではオリゴデンドロサイトと神経細胞の一部に、小脳ではプルキンエ細胞に発現が見られた。しかし、最もよく発現が見られたのは延髄や視床下部で神経細胞体が集まっている橋の部分であった。一般に神経細胞といってもその分泌する神経伝達物質によって細胞が異なっている。異なる神経細胞に対するマーカーを用いて検

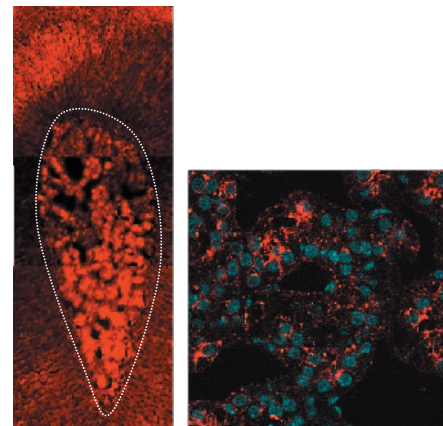


図5.副腎髄質におけるABCA5の発現

討したところ、ABCA5 を発現している細胞はコリン作動性神経であることが分かった。コリン作動性神経からはエピネフリンやノルエピネフリンが分泌されており、同じようにエピネフリンやノルエピネフリンを分泌する細胞に副腎髄質の細胞が良く知られている。もし、ABCA5 がこれらの分泌に関与しているのであれば、副腎髄質においてもその発現が観察されるはずである。副腎の切片を用いた蛍光抗体染色によって確かに副腎髄質の細胞において ABCA5 が特異的に発現しており副腎皮質には発現が見られないことを明らかにした。これらの結果は、ABCA5 のエピネフリン分泌もしくは生成への関与を示すものであり、現在ノックアウトマウスの解析中である。

一方、血小板の cDNA から新たに同定した ABCA7 は、その特異的な抗体を作成して組織での発現を調べたところ、血小板に特異的な発現を示した。その機能を明らかにするために培養細胞に発現させたところ、一部は細胞膜に局在したが、ほとんどの蛋白質の局在は細胞内に認められた。これは ABCA5 が細胞内膜系、とくにリソソームに局在するという点とは異なり、もともとは細胞膜に局在するものであるが、大量発現を行ったため細胞膜に行けずに細胞内小胞系に蓄積してしまったためである。ABCA7 はそのアミノ酸配列がコレステロールの細胞外 ApoA1/HDL への受け渡しに関与する ABCA1 と高い相同性を示す。ABCA1 も細胞膜への局在を示すことから、その機能が良く似ている可能性がある。そこで構築した ABCA7 大量発現細胞を用いて、輸送基質の網羅的なスクリーニング系の構築を進めた。東北大学の寺崎研究室では、ABC タンパク質のうち生化学的によく研究が進んでいる多剤耐性に関与する MRP4 を発現させた細胞から調整した反転膜ベシクルを用いて、多種類の薬物排出輸送を同時に、きわめて高感度かつ高効率に測定する系を LC-MS/MS を用いて開発している(カクテル法)。LC-MS/MS は脂質や疎水性生理活性物質の測定にも適しており、私たちも、この方法を用いて ABCA7 発現細胞から調整した反転膜を用いて 20 種類の基質候補のカクテル法による測定を行った。その結果、数種類の化合物が反転膜内に ABCA7 依存的に取り込まれることを予備的に見出している。今後、さらに条件検討を行うとともに、細胞を用いたカクテル法による細胞外への放出を見ることで輸送基質を明らかに出来ると考えている。また現在、ABCA7 についてはノックアウトマウスの作成を行い、最近、ホモマウスを得ることが出来た。しかし、129 の ES 細胞を用いて作成したため遺伝的バックグラウンドがまだ均一ではないので、正確な解析が出来ていないが、ホモマウス同士の交配でもマウスは正常に生まれ、現在のところ顕著な異常は認められない。このマウスを用いて血小板の機能、プロテオーム、メタボローム解析によって ABCA7 の生理機能と輸送基質が明らかになるはずである。

さらに、我々は他の ABCA サブファミリーメンバーについても解析を進めた。ABCA サブファミリーはそのアミノ酸配列の相同性から ABCA1 と ABCA5 の 2 つのサブグループに分けることができる(図6)。そのうち ABCA5 サブグループに属するものはその機能がまったく分かっていない。そこでこれまでと同じようにまず特異的な抗体を作成し、組織における発現を確認した。その結果、ABCA6 は肝臓に、ABCA9 は脳、心臓、腎臓に発現していることを明らかにした。さらに

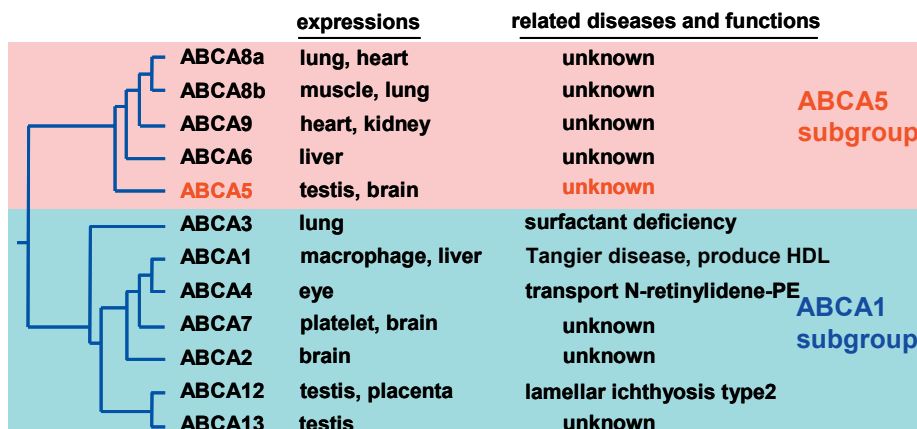


図6.ABCA サブファミリー

ABCA6 は肝細胞の血管側の細胞膜とその直下のベシクルに局在していることが明らかとなった。ABCA6 を HEK293 細胞に発現させると、細胞内のエンドソームと思われるベシクルに局在することから、ABCA6 は細胞膜ではなく細胞内小胞、おそらくエンドソームに局在していると考えている。これは、ABCA1 サブグループの ABCA1 や ABCA7 が細胞膜に局在するのとは対照的で、ABCA5 サブグループのメンバーは細胞内に局在して機能していることが推定される。

さて、遺伝子からのアプローチとは異なるもう一つの方向性、輸送基質や組織に着目した方法として、特に血小板からのスフィンゴシン1リン酸の排出輸送機構を解析した。血小板は非常に多くの生理活性物質を放出することが知られており、そのうちの代表的な脂質メディエーターがスフィンゴシン1リン酸 (S1P) である。S1P は、スフィンゴミエリン、セラミドを経てスフィンゴシンのリン酸化によって生じ、血小板の関与する様々な生理的作用の情報伝達を担っている。他の細胞ではリン酸化酵素であるスフィンゴシンキナーゼの活性が低く、リアーゼ

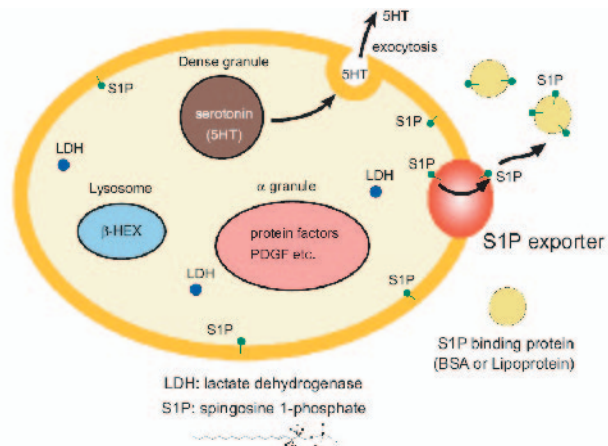


図7.スフィンゴシン 1 リン酸は開口放出によっては放出されない

やホスホヒドラーゼの活性が高いため、その細胞内濃度は非常に低いが、血小板ではキナーゼ活性が高く、リアーゼが欠損しているため細胞内に S1P が高濃度に蓄積されており、トロンビンなどの血小板活性化刺激によって放出されることが知られているが、その分泌経路については全くわかっていなかった。血小板から放出される生理活性物質のほとんどは細胞内にある 3 種類の分泌小胞に蓄えられ、刺激依存的に放出される。私達はまず、細胞膜にのみ開けることのできる SLO を用い、小胞内に蓄積する生理活性物質が出てこない条件で、S1P は細胞質のマーカであるラクトースデヒドロゲナーゼとともに細胞外の漏出することを示した。さらに、SLO よりも小さい穴を開けることのできる α -toxin を用いて、S1P の漏出は無いが細胞内のイオンや ATP を枯渇させたセミンタクト細胞を作ることで、血小板からの S1P の放出が開口放出によるものではなく、ATP および Ca^{2+} によってそれぞれ単独で活性化される膜輸送体によるものであることを証明した (図8)。さらにこの ATP 依存的な放出が ABCA1 の阻害剤として知られている Glybride によってのみ阻害され、他の ABC 輸送体である MDR や MRP の阻害剤であるサイクロスポリンや MK571 などによっては阻害されないことを明らかにした。これらの結果から、ABCA サブファミリーの輸送体が S1P の輸送に関与している可能性を示した (図8)。また、 Ca^{2+} 依存的な放出はリン脂質のスクランブラーゼとして知られている PLSCR の阻害剤である R5421 によって阻害された。これはスクランブラーゼも S1P の輸送に関与している可能性を示唆する結果である。しかし、血小板が活性化を受けるトロンビンなどの刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は一過性で、スクランブラーゼを活性化するには十分ではないことが分かっており、生理的に S1P の輸送にかかわっているのは ABCA 輸送

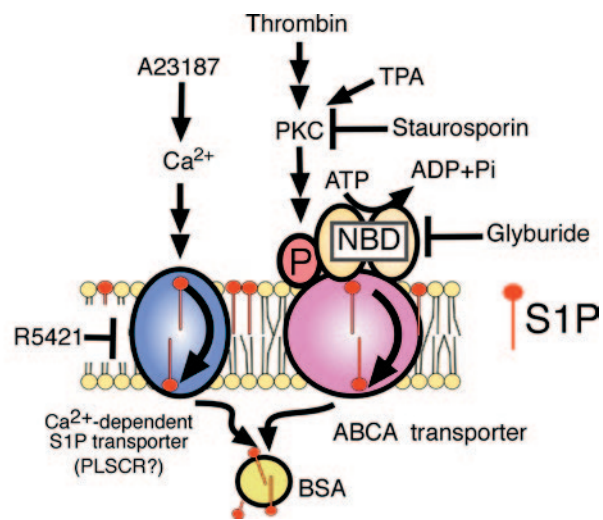


図8.S1P は輸送体を介して放出される

体であると考えている。現在、血小板全タンパク質のプロテオーム解析からスフィンゴシン1リン酸分泌輸送体の同定を目指している。前で述べた血小板特異的に発現している ABCA7 がその輸送体である可能性も大きい。それについては、ノックアウトマウスの血小板からのスフィンゴシン1リン酸放出を測定することにより決着させられるはずである。

さらに最近我々は血小板以外で赤血球においても同じように輸送体依存的な S1P の放出が起こることを見出した。しかし、赤血球では血小板とは異なり、輸送体は常に活性化されて細胞外へ S1P を放出していた。最近、血液中には常に一定量の S1P が存在しており、この血液中リンパ液との S1P の濃度勾配がリンパ球がリンパ管から血管へ出てくるのに必須であること、この血液中の S1P の維持に赤血球からの S1P の放出が係わっていることが他のグループによって見出されている。そのため、赤血球では血小板とは異なる制御機構で放出が行われていると考えられる。この赤血球の輸送は血小板と同じように Grybridge によってのみ抑えられたことから、類似の輸送体が S1P の輸送に関与している可能性が考えられた。これまで生細胞やセミインタクト細胞を用いた系を用いて解析を進めてきたため、輸送体の生化学的な解析ができず、また、本当に輸送体による輸送であることを証明することができていなかった。そこで、赤血球では反転膜を作成することが容易であるという利点を生かし、S1P の反転膜小胞内への取り込みを測定できる系を構築した。基質が両親媒性であるために条件検討に時間がかかったが、ATP 濃度依存的に S1P の取り込みを測定することが可能となった。

④類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

高等生物における異物排出たんぱくとして最も著名なのは ABC 輸送体である。異物や、解毒の副産物としての抱合体の排出に関わる以外に、コレステロールや脂質の誘導体の排出にも関わるとされている。クローニングして培養細胞で発現させたときに両親媒性情報伝達物質を輸送できるという報告もいくつかあるが、ABC 輸送体は元々基質特異性が幅広いものが多く、培養 *in vitro* で輸送する物質を生体の中でも実際に輸送しているという事は即断できない。現在の所、生理的に情報伝達物質の分泌輸送を担っていると言うことが報告されているのは、MRP1(ABCC1)によるロイコトリエン C4(LTC4)の分泌だけといえる。これは、ノックアウトマウス等により検証されている。LTC4 は以前は輸送体により分泌されているとは考えられていなかった。同様に、他の、ステロイドホルモンやプロスタグランジン、一部のペプチド性ホルモンなど、分泌経路未知の膜輸送体の多くが、膜輸送体により分泌されていることを強く示唆するものと思われる。もともと、異物排出輸送体は、私たちの構造決定により明らかになったとおり、脂質二重層の中から基質を取り込み細胞外に排出する機構を持っている。この点で、脂質メディエーターなどの両親媒性情報伝達物質の分泌輸送体として好適な条件を備えている。今後、こうした分泌輸送体が次々と発見されてくることは間違いない。本研究では、そういった流れを先導する結果が得られてきている。

(2)研究成果の今後期待される効果

我々はこれまでほとんど明らかになっておらず、あまり注目されていなかった、両親媒性情報伝達物質の輸送体とオーファン輸送体という異なる2つ研究から1つの共通の新しい概念である分泌輸送介在型情報伝達というものを明らかにすべく研究をすすめてきた。これまでに、特に血小板を中心に S1P と ABCA7 輸送体を中心に分泌輸送体介在情報伝達の存在を明らかにし、今後の類似の情報伝達物質の輸送体の解析のモデルとなる結果を残してきた。残念ながら、当初の計画であった網羅的に輸送体とその生理的な輸送基質を確定するところまでは期限内に到達できなかったが、研究は着実に進んでおり、近い将来に両親媒性情報伝達物質の輸送体を明らかに出来ると考えている。これは、膜を自由に透過すると考えられてきた両親媒性物質に輸送体が存在するということを明らかにすることで、これまでの通念を覆す基礎科学的にも画期的な成果になると思われる。これまでのレセプターオリエンテッドの創薬において注目されてきた情報伝達物質のトリガーとなる放出に係わる輸送体を明らかにすることで、新しいトランスポーターオリエンテッドの創薬というものを実現させるための第一歩になる。特に、現在精力的に同定を進めているスフィンゴシン 1 リン酸輸送体を明らかにし、その阻害剤を開発できれば、これまでとはまったく異なる作用点を持つ副作用の少ない新しい免疫抑制剤を開発できる可能性があり、非常に成果に期待ができると考えている。

4 研究参加者

①異物排出トランスポーターの構造機能解析グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
山口 明人	大阪大学産業 科学研究所	教授	全内容の総括	平成14年11月～平成 20年3月
村上 聡	大阪大学産業 科学研究所	准教授	結晶構造解析	平成14年11月～平成 20年3月
平田 隆弘	大阪大学産業 科学研究所	助手	蛋白工学的解析	平成14年11月～平成 19年3月
中島 良介	大阪大学産業 科学研究所	助教	結晶構造解析	平成14年11月～平成 20年3月
西 毅	大阪大学産業 科学研究所	特任助教	動物細胞排出蛋白	平成17年4月～平成 20年3月
西野 邦彦	大阪大学産業 科学研究所	助教	発現制御機構	平成17年11月～平成 18年9月
西野 邦彦	大阪大学微生物 病研究所	学振特別 研究員	発現制御機構	平成15年4月～平成 17年10月
西野 邦彦	大阪大学微生物 病研究所	大学院生	発現制御機構	平成14年11月～平成 15年3月
松本 崇	大阪大学産業 科学研究所	CRES 研 究員	結晶構造解析	平成14年11月～平成 20年3月
松本 佳巳	大阪大学産業 科学研究所	CRES 研 究員	創薬スクリーニング	平成18年11月～平成 19年6月
平川 秀忠	大阪大学産業 科学研究所	CRES 研 究員	発現制御機構	平成19年2月～平成 19年5月
伊勢 琴子	大阪大学産業 科学研究所	CREST 技 術員	結晶構造解析	平成17年4月～平成 20年3月
佐藤 玲子	大阪大学産業 科学研究所	技術補佐 員	動物細胞排出蛋白	平成17年4月～平成 19年3月
佐藤 玲子	大阪大学産業 科学研究所	CREST 技 術員	結晶構造解析	平成16年4月～平成 17年3月
西田 真理	大阪大学産業 科学研究所	事務補佐 員	実験資料の整理	平成15年2月～平成 19年5月
山下 栄樹	大阪大学蛋白 質研究所	助教	結晶構造解析	平成14年11月～平成 20年3月
石黒 正路	サントリー生物 有機研究所	部長 研究 員	分子設計	平成14年11月～平成 20年3月
久保 義行	大阪大学産業 科学研究所	COE 研究 員	動物細胞排出蛋白	平成15年4月～平成 16年3月
久保 義行	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成14年11月～平成 15年3月
戸塚 昌子	大阪大学産業 科学研究所	CREST 技 術員	ノックアウトマウス作 成	平成15年4月～平成 16年3月

田村 京子	大阪大学産業 科学研究所	CREST 技 術員	動物細胞排出蛋白	平成 15 年 4 月～平成 16 年 3 月
村上 千佳子	大阪大学産業 科学研究所	CREST 技 術員	結晶構造解析	平成 15 年 4 月～平成 16 年 3 月
竹中 ちえみ	大阪大学産業 科学研究所	CREST 技 術員	動物細胞排出蛋白	平成 15 年 4 月～平成 17 年 8 月
米光 愛子	大阪大学産業 科学研究所	技術補佐 員	動物細胞排出蛋白	平成 16 年 10 月～平成 17 年 3 月
田村 憲久	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	蛋白工学的解析	平成 14 年 11 月～平成 17 年 3 月
小林 伸好	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 14 年 11 月～平成 18 年 3 月
平川 秀忠	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	発現制御機構	平成 14 年 11 月～平成 18 年 3 月
橋本 聡文	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 15 年 4 月～平成 20 年 3 月
小林 直木	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	蛋白工学的解析	平成 15 年 4 月～平成 20 年 3 月
宮崎 洋光	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	結晶構造解析	平成 14 年 11 月～平成 15 年 3 月
齋藤 麻美	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	蛋白工学的解析	平成 14 年 11 月～平成 15 年 3 月
佐々木 真理	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 14 年 11 月～平成 15 年 3 月
斉藤 恵亮	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月
関谷 明香	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月
大川 裕子	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	蛋白工学的解析	平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月
山田 純子	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	発現制御機構	平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月
石橋 史旭	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	蛋白工学的解析	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月
稲角 嘉彦	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	発現制御機構	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月
大東 穂	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 16 年 4 月～平成 20 年 3 月
岩田 歩	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	蛋白工学的解析	平成 16 年 4 月～平成 20 年 3 月
正木 猛	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	発現制御機構	平成 16 年 4 月～平成 18 年 3 月
柴田 紗貴子	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 16 年 4 月～平成 18 年 3 月

小林 あすか	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	発現制御機構	平成 16 年 4 月～平成 18 年 3 月
久野 悠	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
千田 靖子	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	発現制御機構	平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月
二階堂英司	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	発現制御機構	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
尾上麻実子	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
宮田 耕資	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	動物細胞排出蛋白	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
王 麗媛	大阪大学産業 科学研究所	大学院生	発現制御機構	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月

5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 28 件)

Kyohei Higashi, Hiroyuki Ishigure, Risa Demizu, Takeshi Uemura, Kunihiko Nishino, Akihito Yamaguchi, Keiko Kashiwagi and Kazuei Igarashi

Identification of a spermidine excretion protein complex (MdtJI) in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 190, 872-878 (2008)

Kunihiko Nishino, Yasuko Senda and Akihito Yamaguchi

The AraC-family regulator GadX enhances multidrug resistance of *Escherichia coli* by activating expression of the *mdtEF* multidrug efflux genes

J. Infect. Chemother. (in press)

Kunihiko Nishino, Eiji Nikaido and Akihito Yamaguchi

Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

J. Bacteriol. 189, 9066-9075 (2007)

Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita, Takashi Matsumoto and Akihito Yamaguchi

Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism
Nature 443, 73-79 (2006)

Hidetada Hirakawa, Yoshihiko Inazumi, Yasuko Senda, Asuka Kobayashi, Takahiro Hirata, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi

N-acetyl-D-glucosamine induces the expression of multidrug exporter genes, *mdtEF*, via catabolite activation in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 88, 585–5858 (2006)

Asuka Kobayashi, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi
Growth phase-dependent expression of drug exporters in *Escherichia coli* and its contribution to drug tolerance

J. Bacteriol. 88, 5693–5703 (2006)

Nobuyoshi Kobayashi, Tsuyoshi Nishi, Takahiro Hirata, Akio Kihara, Takamitsu Sano, Yasuyuki Igarashi and Akihito Yamaguchi

Sphingosine γ -phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner
J. Lipid Res. 47, 64–62 (2006)

Norihisa Tamura, Satoshi Murakami, Yoshiaki Oyama, Masaji Ishiguro, Akihito Yamaguchi
Direct Interaction of Multidrug Efflux Transporter AcrB and Outer Membrane Channel TolC Detected via Site-Directed Disulfide Cross-Linking.

Biochemistry 44,11115–11121 (2005).

Yoshiyuki Kubo, Sayaka Sekiya, Megumi Ohigashi, Chiemi Takenaka, Kyoko Tamura, Shigeyuki Nada, Tsuyoshi Nishi, Akitsugu Yamamoto, Akihito Yamaguchi.

ABCA5 resides in lysosomes, and ABCA5 knockout mice develop lysosomal disease-like symptoms.

Mol Cell Biol. 25, :4138–4149 (2005)

Kunihiko Nishino, Takeshi Honda and Akihito Yamaguchi

Genome-Wide Analyses of *Escherichia coli* Gene Expression Responsive to the BaeSR Two-component Regulatory system.

J. Bacteriol. 187, 1763–1772 (2005)

Hidetada Hirakawa, Yoshihiko Inazumi, Takeshi Masaki, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi,
Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*.

Mol. Microbiol. 55, 1113–1126 (2005)

Hiroaki Adachi, Satoshi Murakami, Ai Niino, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Akihito Yamaguchi and Takatomo Sasaki

Membrane Protein Crystallization Using Laser Irradiation.

Jpn. J. Appl. Phys. 43, No. 10B, L1376–L1378 (2004)

Takahiro Hirata, Asami Saito, Kunihiko Nishino, Norihisa Tamura and Akihito Yamaguchi

Effects of Efflux Transporter Genes on Susceptibility of *Escherichia coli* to Tigecycline (GAR-936).
Antimicrob. Agents Chemother. 48, 2179–2184 (2004)

Satoshi Murakami, Norihisa Tamura, Asami Saito, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi

Extramembrane Central Pore of Multidrug Exporter AcrB in *Escherichia coli* Plays an Important Role in Drug Transport.

J. Biol. Chem. 279, 3743–3748 (2004)

Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi

Role of Histone-Like Protein H-NS in Multidrug Resistance of *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 186, 1423–1429 (2004)

Hidetada Hirakawa, Kunihiko Nishino, Junko Yamada, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
beta-Lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*.
J. Antimicrob. Chemother. 45, 256–261 (2003)

Kunihiko Nishino, Junko Yamada, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta-lactams.
Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3030–3033 (2003)

Norihisa Tamura, Satoko Konishi and Akihito Yamaguchi
Mechanisms of drug/H⁺ antiport: complete cycteine-scanning mutagenesis and the protein engineering approach.
Curr. Opin. Chem. Biol. 7, 570–579 (2003)

Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi
Multidrug-exporting secondary transporters
Curr. Opin. Struct. Biol. 13, 443–452 (2003)

Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima and Eiki Yamashita
Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB
FASEB J. 17, suppl. A1185 (2003)

Nobuyoshi Kobayashi, Kunihiko Nishino, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter MacB in *Escherichia coli*.
FEBS Lett. 546, 241–246 (2003)

Kunihiko Nishino, Yoshihiko Inazumi and Akihito Yamaguchi
Global analysis of genes regulated by EvgA of the two-component regulatory system in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 185, 2667–2672 (2003)

Hidetada Hirakawa, Kunihiko Nishino, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 185, 1851–1856 (2003)

Mari Sasaki, Ayako Shoji, Yoshiyuki Kubo, Shigeyuki Nada and Akihito Yamaguchi
Cloning of rat ABCA7 and its preferential expression in platelets.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 304, 777–782 (2003)

Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi
Crystal structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB
Nature 419, 587–593 (2002)

Satoshi Nagakubo, Kunihiko Nishino, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC
J. Bacteriol. 184, 4161–4167 (2002)

Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi
EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 184, 2319–2323 (2002)

Erika Fujihira, Norihisa Tamura and Akihito Yamaguchi
Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB in *Escherichia coli*.
J. Biolchem (Tokyo) 131, 145-151 (2002)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

西野邦彦
病原性発現と薬剤耐性化における排出ポンプの役割
化学療法の領域, (in press)

西野邦彦
細菌多剤耐性化と病原性発現における薬剤排出ポンプの役割に関する研究—多剤耐性化と病原性を軽減させる新薬ターゲットの解析—
Japanese Journal of Antibiotics (in press)

村上聡
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
生物物理 47, 309-316 (2007)

村上聡
多剤排出トランスポーターの構造と機能
表面科学 28, 184-191 (2007)

山口明人
異物排出タンパクのメカニズム
感染・炎症・免疫 37, 106-115 2007

村上聡、山口明人
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
生化学 79, 542-549 (2007)

村上聡
多剤排出トランスポーターの構造と機能 結晶構造から明らかになった機能的回転メカニズム
蛋白質核酸酵素 52, 406-414 (2007)

西野邦彦
—新時代の基礎・臨床研究—「薬剤耐性と病原性発現における異物排出トランスポーターの役割」
日本臨床 新感染症学 上巻 65, 407-414 (2007)

村上聡
タンパク質結晶構造解析入門—ブラックボックスの中身—(3)モデリングの中身をのぞいてみよう 位相改良による電子密度図のリファイン
日本結晶学会誌 48, 381-386 (2006)

村上聡
薬剤耐性化のなぞにせまる—多剤排出トランスポーターの薬剤認識・排出機構
Bionics 3, 38-43 (2006)

村上聡
細菌に薬がきかなくなる最大の“カラクリ”
Newton **26**, 109 (2006)

西毅
サブユニットアイソフォームによる V-ATPase の機能の制御
生化学 **77**, 354-358 (2005)

村上聡(他分担執筆)、タンパク質のかたちから生命の謎を解く 生物マシーナリー構造生物学の最前線(編集者:田之倉優, 総ページ数:232 頁)、株式会社クバプロ, pp.178-190. (2005)

山口明人(他分担執筆)、「異物排出タンパク質、ABC トランスポーター」、タンパク質科学 構造・物性・機能(編集者:後藤祐児、桑島邦博、谷澤克行、総ページ数 579 頁)、化学同人、505-517. (2005)

村上聡、山口明人
薬剤排出タンパク質の構造と機能 ～薬剤耐性化の克服を目指して
バイオサイエンスとインダストリー 62, 11-16 (2004)

村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
大腸菌多剤排出トランスポーターAcrB の結晶構造解析
日本結晶学会誌 45, 256-261 (2003)

村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
大腸菌多剤排出トランスポーターの X 線結晶構造解析
放射光 16, 204-212 (2003)

村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
多剤排出トランスポーターAcrB の結晶構造解析
生物工程. 81, 155-160 (2003)

村上聡、山口明人
異物排出トランスポーターの結晶構造、ついに決まる。
蛋白質・核酸・酵素 48, 26-32 (2003)

村上聡、山口明人
多剤排出トランスポーターAcrB の結晶構造解析
細胞工学 21, 1520-1521 (2002)

西野邦彦、山口明人
細菌ゲノムに潜む薬剤耐性因子
日本細菌学雑誌 57, 453-464 (2002)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 18 件、国際会議 15 件)

○西野 邦彦

細菌薬剤耐性化と病原性発現における薬剤排出トランスポーターの役割

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会(2007年12月11-15日、横浜)

○西野 邦彦

細菌多剤耐性化と病原性発現における薬剤排出ポンプの役割に関する研究 -多剤耐性化と病原性を軽減させる新薬ターゲットの解析-
第9回日本抗生物質学術協議会奨励賞授賞式および受賞講演(2007年11月8日、東京)

○Akihito Yamaguchi

Novel Aspects of Mechanisms of Antibacterial Resistance Revealed by Crystal Structure
47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (17-20 Sep. 2007, McCormick Place, Illinois USA)

○Satoshi Murakami

Structure and mechanism of AcrAB bacterial multi-drug efflux pump
AstraZeneca Membran Protein Day(Seminar) (20 Aug. 2007, Alderley Park, Macclesfield, UK)

○Satoshi Murakami

Session1 Multi-Protein complex
Structural studies of multi-drug efflux transporter
9th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation (13-17 Aug. 2007, Manchester, England)

○村上聡

膜タンパク質精製への新しいアプローチ
GE Healthcare, Challenging Protein Purification Seminar(2007年7月19日、大阪)

○村上聡

膜タンパク質精製への新しいアプローチ
GE Healthcare, Challenging Protein Purification Seminar(2007年7月17日、東京)

○Satoshi Murakami

Crystal structures of a bacterial multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism
32nd FEBS Congress, Molecular Machines (7-12 July 2007, Vienna, Austria)

○村上聡

多剤排出トランスポーターの結晶構造に基づく機能解明
第34回 生体分子科学討論会(2007年6月22-23日、仙台)

○村上聡

多剤排出トランスポーターの結晶構造から明らかになった多剤認識および排出機構
日本薬学会 第127年会(2007年3月28-30日、富山)

○山口明人、西毅、大東穂、久野悠、尾上麻実子

ABCタンパク質の構造と機能—生理機能制御から疾患まで—
日本薬学会 第127年会(2007年3月28-30日、富山)

○Satoshi Murakami

Crystal structure of multi-drug transporter reveal a functionally rotating mechanism
Seminar (2007/3/23, Department of Physiology, UCLA)

○Satoshi Murakami

Crystal structure of a bacterial multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism

Seminar (2007/2/8, University of Cambridge, UK)

○Satoshi Murakami

Crystal structure of a bacterial multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism
Seminar (2007/1/10, BOSE INSTITUTE, Kolkata, India)

○Satoshi Murakami

Crystal structure of a bacterial multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism
Seminar (2007/1/8, Dept. of Crystallography and Biophysics Univ. of Madras, Chennai, India)

○Satoshi Murakami

Crystal structure of a bacterial multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism
94th Indian science congress, Symposium IV: Structure and Functional Relationship of
Macromolecules(2007/1/4-7, Chidambaram, Tamilnadu, India, Annamalai Univ.)

○村上聡

「膜タンパクの精製と解析」に対する疑問を解決しませんか？

日本分子生物学会 2006 フォーラム、ランチョンワークショップ「最前線研究ツールの問題点:その
打開策と未来を考える」(2006年12月6-8日、名古屋国際会議場)

○Kunihiko Nishino

Biological functions of bacterial multidrug efflux pumps
10th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Fukuoka, Japan
(2006/12/3-6)

○西野邦彦

異物排出トランスポーターによる細胞機能制御の解明
電気学会研究会 バイオ・マイクロシステム研究会(2006年10月30日、大阪)

○Satoshi Murakami

A functionally rotating mechanism revealed in crystal structures of the multidrug transporter,
AcrB, with bound substrates
SLS seminar (September 20, 2006, Swiss)

○Satoshi Murakami

A functionally rotating mechanism revealed in crystal structures of the multidrug transporter,
AcrB, with bound substrates
Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology 2006 (17-19 September 2006, Brunnen,
Switzerland)

○Satoshi Murakami

A functionally rotating mechanism revealed in crystal structures of the multidrug transporter,
AcrB, with bound substrates
Astbury Seminar (12 September, 2006, University of Leeds, UK)

○山口明人

細菌異物排出トランスポーターの構造・機能とその発現制御
第211回 薬学研究科セミナー(2007年7月25日、東北大学)

○村上聡

Crystal structure of the substrate binding form of multidrug exporter AcrB
第 79 回日本細菌学会総会 (2006 年、3 月 29-31 日、石川県金沢市)

○村上聡

多剤排出トランスポーター AcrB の立体構造に基づく機能解析
第 28 回日本分子生物学会年会 (2005 年 12 月 7-10 日、福岡)

○Kunihiko Nishino

Modification of the cell membrane and avoidance of metal toxicity
Washington University School of Medicine, Molecular Microbiology & Microbial Pathogenesis
Program 2005 at Rend Lake Conference Center, October 1, 2005, Whittington, IL, U. S. A.

○Satoshi Murakami

Structure and mechanism of multi-drug efflux transporter AcrB
International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8-10, 2005, Awaji
Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○村上聡

多剤排出トランスポーターの結晶構造に基づく多剤排出機構の解析
第 5 回日本蛋白質科学会 (平成 17 年 6 月 30 日~7 月 2 日、福岡国際会議場)

○Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi

Structure and Mechanism of a Multidrug Exporter
Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience"
International Symposium 2005, Oku-Biwako Makino Prince Hotel, Shiga, Japan, March 9-10,
2005.

○Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi

Structure and mechanism of multidrug efflux transport nano-machine
Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004 (SISSIN-2004),
ISIR, Osaka Univ., Osaka, Japan Dec. 6-7, 2004.

○Akihito Yamaguchi

Structure, function and regulation of bacterial xenobiotic exporters
Gordon Research Conferences (Bacterial Cell Surfaces), Colby-Sawyer College New London, NH,
June 27-July 2, 2004.

○Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita and Akihito
Yamaguchi

Symposium, "Macromolecular assemblies"
Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB
The Sixth Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA'04), Hong Kong
University of Science and Technology, Hong Kong, China, June 27-30, 2004.

Satoshi Murakami, ○Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi

Crystal structure of bacterial efflux protein AcrB
International Workshop on Structural Chemical Biology of Membrane Protein Complex Functions.
Center for Advanced Science and Technology, Hyogo, Japan, April 19-20, 2004.

② 口頭発表 (国内会議 153 件、国際会議 22 件)

○村上 聡

多剤排出トランスポーターによる多基質認識と輸送機耕を考える
第 45 回生物物理学会年会(2007 年 12 月 21-23 日、横浜)

○仲田 昌義、西野 邦彦、二階堂 英司、松本 佳巳、榊原 昇一、竹内 昌治、山口 明人、
野地 博行

Single cell measurement of efflux activity of multidrug transporters enclosed in femtoliter chamber
array

第 45 回生物物理学会年会(2007 年 12 月 21-23 日、横浜)

○坂田 博樹、山口 明人

サルモネラ菌異物排出トランスポーター EmrAB の機能解析

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、
横浜)

○二階堂 英司、山口 明人

サルモネラ菌異物排出トランスポーター AcrAB 発現誘導機構の解析

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、
横浜)

○王 麗媛、平川 秀忠、西野 邦彦、山口 明人

大腸菌バイオフィーム形成機構に関与する新規遺伝子産物に関する研究

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、
横浜)

○村上 聡

Molecular mechanism of multidrug efflux transporter

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、
横浜)

○東 恭平、出水 梨沙、植村 武史、戸井田 敏彦、柏木 敬子、西野 邦彦、山口 明人、五
十嵐 一衛

大腸菌における新規ポリアミン排出蛋白質の同定

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、
横浜)

○二階堂 英司、山口 明人

細菌代謝物によるサルモネラ菌異物排出トランスポーター AcrAB-TolC システム発現制 御機構
の解析

第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2007 年 11 月 26-27 日、仙台)

○西野 邦彦、松本 佳巳

サルモネラ菌多剤排出トランスポーターの生理機能解明

第 55 回日本化学療法学会西日本支部総会(2007 年 10 月 29-31 日、神戸国際会議場)

○松本 佳巳、西野 邦彦

フェムトリッターチャンバーを用いた薬剤排出ポンプの活性測定
第 55 回日本化学療法学会西日本支部総会(2007 年 10 月 29-31 日、神戸国際会議場)

○山口 明人
ライフサイエンスの新展開
平成19年度産研テクノサロン(第3回例会)(2007 年 10 月 24 日、大阪大学接合科学研究所)

○村上 聡
蛋白質 X 線構造解析技術 ～発現からデータ処理まで～
膜タンパク質を含むターゲット蛋白質の精製千里ライフサイエンス技術講習会 第 47 回 (平成
19 年 10 月 23 日、大阪)

○村上 聡
Structural aspects of drug recognition and transport by bacterial multidrug efflux transporter
財団法人 応用微生物学研究奨励会設立 50 周年記念 東京大学創立 130 周年記念 第 12 回
分生研シンポジウム(2007 年 10 月 11 日、東京)

○Ryota Iino, Masayoshi Nakata, Eiji Nikaido, Syuichi Sakakihara, Syoji Takeuchi, Akihito
Yamaguchi and Hiroyuki Noji
Rapid detection of drug efflux from single bacterial cells enclosed in femtoliter chamber array
The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences(Oct.
7-11, 2007, Paris, France)

○二階堂英司、西野邦彦、坂田博樹、中濃知志、田中真奈美、山口明人
細菌代謝物によるサルモネラ菌異物排出トランスポーターAcrAB 発現誘導機構の解析
第 19 回微生物シンポジウム(2007 年 9 月 7-8 日、東京大学)

○松本佳巳、西野邦彦、飯野亮太、榊原秀一、仲田昌義、野地博行、山口明人
フェムトリッターチャンバーを用いた薬剤排出ポンプの研究
第 19 回微生物シンポジウム(2007 年 9 月 7-8 日、東京大学)

○Kunihiko Nishino, Eiji Nikaido, Hiroki Sakata, Tomoyuki Nakano, Manami Tanaka and Akihito
Yamaguchi
Regulatory network of multidrug transporters reveals their physiological role in Salmonella
virulence
7th The Awaji International Forum on Infection and Immunity (Sep. 1-5, 2007, Awaji Yumebutai
International Conference Center)

○村上聡
多剤排出トランスポーターの結晶構造と薬剤排出メカニズム
サントリー生有研フォーラム 小分子を運ぶトランスポーター機能制御と機構解明に向けて(2007
年 9 月 3-4 日、京都)

○Satoshi Murakami
Structure and mechanism of bacterial multi-drug efflux transporter
24th European Crystallographic Meeting(22-27 Aug. 2007, Marrakech, Morocco)

○Satoshi Murakami
Structure and mechanism of AcrAB bacterial multi-drug efflux pump

Seminar(21 Aug. 2007, Imperial College London, London, England)

○Satoshi Murakami

多剤排出トランスポーターによる薬剤認識および排出機構

Multidrug recognition and transport mechanism of a multidrug efflux transporter

5th JHUPPO Conference

日本ヒトプロテオーム機構第5回大会～プロテオミクス生物学から医科学研究へ向かう新たな潮流～(2007年7月30-31日、日本科学未来館、東京)

○平田隆弘、北村昭夫、西野邦彦、山口明人

大腸菌異物排出蛋白質 MacAB の極への局在

第4回21世紀大腸菌研究会(2007年7月18-19日、静岡)

○村上聡

膜タンパク質の結晶育成～膜輸送体の結晶構造

第6回国際バイオフィोरラム(2007年6月20-22日、東京)

○西野邦彦

多剤耐性感染症を克服する新規治療の確立

第6回産学官連携推進会議(2007年6月16-17日、京都)

○松本佳巳、西野邦彦、飯野亮太、榊原昇一、仲田昌義、二階堂英司、山口明人、野地博行、竹内昌治

フェムトリッター(fL)チャンバーを用いた薬剤排出ポンプ阻害薬の評価法

第55回日本化学療法学会総会(2007年6月1-2日、仙台)

○西野邦彦、山口明人

細菌オーファン輸送体の生理機能解明

第55回日本化学療法学会総会(2007年6月1-2日、仙台)

○Satoshi Murakami

Structure and mechanism of AcrAB bacterial multi-drug efflux pump

Seminar (25 May 2007, Scripps Inst., SanDiego)

○Satoshi Murakami

Structure and mechanism of AcrAB bacterial multi-drug efflux pump

Seminar (24 May 2007, TakedaSD, SanDiego)

○Satoshi Murakami

Structure and mechanism of AcrAB bacterial multi-drug efflux pump

Seminar (23 May 2007, Mpex Pharmaceuticals, Inc., SanDiego)

○Satoshi Murakami

Structure and mechanism of AcrAB bacterial multi-drug efflux pump

Seminar (21-22 May 2007, UCSF, USA)

○二階堂英司、西野邦彦、山口明人

異種細菌分泌物によるサルモネラ菌多剤排出トランスポーター発現制御機構の解析

日本薬学会 第127年会(2007年3月28-30日、富山)

○西野邦彦、二階堂英司、坂田博樹、山口明人
オーファントランスポーター生理機能解明
日本薬学会 第 127 年会 (2007 年 3 月 28-30 日、富山)

○二階堂英司、西野邦彦、山口明人
異種細菌間センシングによるサルモネラ菌異物排出トランスポーター発現制御の解析
第 80 回 日本細菌学会総会 (2007 年 3 月 26-27 日、大阪)

○西野邦彦、二階堂英司、山口明人
オーファン輸送体による細菌多剤耐性および病原性制御機構の解明
第 80 回 日本細菌学会総会 (2007 年 3 月 26-27 日、大阪)

○Satoshi Murakami
Crystal structure of multi-drug transporter AcrB reveal a functionally rotating mechanism
SANKEN Workshop on Nano-Bioscience at Berkeley (Mar 21-22, 2007, University of California Berkeley, USA)

○Kunihiko Nishino
Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux pumps
SANKEN Workshop on Nano-Bioscience at Berkeley (Mar 21-22, 2007, University of California Berkeley, USA)

○山口明人
異物の認識と排出
東京大学生産技術研究所・大阪大学産業科学研究所 研究所間ワークショップ (2007 年 3 月 12 日、大阪)

○山口明人
異物認識の構造的基礎
文部科学省 21 世紀 COE プログラム 新産業創造指向インターナノサイエンス成果報告会 (2007 年 3 月 8 日、東京)

○西野邦彦
異物排出トランスポーターの発現制御と生理的役割
「新産業創造物質基盤技術研究センター」平成 18 年度成果報告会 (2007 年 3 月 2 日、東京)

○西野邦彦、山口明人
細菌ゲノム生存戦略のレジストーム研究
第 5 回感染症沖縄フォーラム (2007 年 2 月 22-24 日、沖縄)

○西野邦彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌の薬剤耐性獲得に関する分子制御機構解明
人獣共通感染症の制圧のための技術開発研究推進評価会議 (2007 年 2 月 13-14 日、筑波)

○西毅
オーファン輸送体の生理機能解明に基づく医薬標的としての情報伝達分子輸送体の同定
新産業創造物質基盤技術研究センター (MSTeC) 2006 年度 産業科学研究所 研究成果発表会
(2007 年 1 月 31 日、大阪)

○西野邦彦

異物排出トランスポーターによる細胞機能制御の解明

新産業創造物質基盤技術研究センター(MSTeC)2006年度 産業科学研究所 研究成果発表会
(2007年1月31日、大阪)

○Akihito Yamaguchi

Structure and function of bacterial xenobiotic exporters

Second SANKEN- CNU Joint Symposium on Nanoscience and Nanotechnology SANKEN and
SANKEN 21st Century COE “Towards Creating New Industries Based on
Inter-Nanoscience”(2007/1/25-26, Osaka Univ.)

○村上聡

多剤排出トランスポーター・基質複合体の結晶構造に基づく基質認識機構および、その輸送メカニ
ズムの解明

プロテオミクス講演会、脳科学に於けるプロテオミクスと構造解析研究の現状と将来展望(2007年
1月13-14日、自然科学研究機構、岡崎)

○Kunihiko Nishino

Regulatory Networks of Multidrug Transporters Reveal Their Biological Functions in Cellular
Physiology

Commemorative Workshop of Opening Sanken USA Branch in San Francisco -Towards Creating
New Industries Based on Inter-Nanoscience-, San Francisco, USA (2006/12/16)

○村上聡

多剤排出トランスポーター・基質複合体の結晶構造に基づく基質認識機構および、その輸送メカニ
ズムの解明

日本生体エネルギー研究会第32回討論会「様々なエネルギー代謝」(2006年12月14-15日、
日本工業大学)

○千田靖子、平川秀忠、平田隆弘、西野邦彦、山口明人

PTS system による大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF 発現誘導機構

日本分子生物学会 2006 フォーラム(2006年12月6-8日、名古屋国際会議場)

○二階堂英司、西野邦彦、山口明人

大腸菌分泌物によるサルモネラ菌異物排出トランスポーター発現制御機構の解明

新産業創造物質基盤センター医療基盤研究 G3 グループ研究会(松島)(2006年12月1日)

○西野邦彦

異物排出トランスポーター生理機能の解明

新産業創造物質基盤センター医療基盤研究 G3 グループ研究会(松島)(2006年12月1日)

○千田靖子

The induction of bacterial xenobiotic exporter, MdtEF, by N-acetyl-D-glucosamine is mediated via
PTS system in *Escherichia coli*

大阪大学産業科学研究所 第62回 学術講演会「高度産業科学と国際連携」(2006年11月24
日、産業科学研究所)

○久野悠

Topological analysis of EmrB, a TolC-coupled multidrug efflux protein in *Escherichia coli*
大阪大学産業科学研究所 第 62 回 学術講演会「高度産業科学と国際連携」(2006 年 11 月 24 日、産業科学研究所)

○西野邦彦

細菌の病原性及び薬剤耐性制御機構の解析と創薬に関する研究
大阪大学産業科学研究所 第 62 回 学術講演会「高度産業科学と国際連携」(2006 年 11 月 24 日、産業科学研究所)

○Satoshi Murakami

A functionally rotating mechanism revealed in crystal structures of the multidrug transporter, AcrB, with bound substrates
AsCA'06/CrSJ: Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan (2006 年 11 月 20-23 日、つくば)

○Satoshi Murakami

Crystal structure of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism
EABS & BSJ 2006: Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Nov. 12-16, 2006, Okinawa, Japan)

○村上聡

多剤耐性を引き起こす薬剤排出トランスポーターの結晶構造に基づく機能解明
関西学院大学環境調和型高分子研究センター・ナノ界面創生研究センター合同シンポジウム、第 1 回関学 SPring-8 シンポジウム(2006 年、11 月 11 日、関西学院大学梅田キャンパス)

○村上聡

多剤排出蛋白質群の X 線結晶構造解析
Spring8 シンポジウム(平成 18 年 11 月 1-2 日、兵庫県)

○村上聡

多剤排出蛋白質の薬剤認識機構の解析
「附置研究所間アライアンス分科会シンポジウム: ナノ分子メカニクス・バイオメカニクス」(平成 18 年 10 月 27 日、北海道大学)

○千田靖子

カタボライト活性化による大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF 発現誘導
21 世紀 COE ナノバイオグループシンポジウム(2006 年 10 月 13 日、産業科学研究所)

○二階堂英司

細菌間情報伝達によるサルモネラ菌異物排出トランスポーター発現制御
21 世紀 COE ナノバイオグループシンポジウム(2006 年 10 月 13 日、産業科学研究所)

○千田靖子、平川秀忠、西野邦彦、平田隆弘、山口明人

大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF 発現誘導のカタボライト活性化機構
第 3 回「21 世紀大腸菌研究会」(2006 年、10 月 3 日、滋賀)

○平田隆弘、千田靖子、正木猛、二階堂英司、西野邦彦、山口明人

大腸菌、サルモネラ菌の異物排出蛋白質の発現制御と多様な生理的役割
第 3 回「21 世紀大腸菌研究会」(2006 年、10 月 3 日、滋賀)

○Akihito Yamaguchi

Bacterial multidrug exporters –From the molecular structure to the biological function
The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity (Sep 4-7, 2006, The Hyogo Prefectural Awaji Yumebutai International Conference Center)

○二階堂英司、西野邦彦、平田隆弘、山口明人

異種細菌間情報伝達による異物排出トランスポーター発現制御
第 18 回 微生物シンポジウム(2006 年、9 月 1-2 日、岡山大学)

○西野邦彦、千田靖子、二階堂英司、坂田博樹、平田隆弘、山口明人

細菌ゲノムに潜む異物排出トランスポーターとその生理機能の解明
第 18 回 微生物シンポジウム(2006 年、9 月 1-2 日、岡山大学)

○村上聡

膜タンパク質の結晶育成～膜輸送体の結晶構造
第 5 回国際バイオ EXPO/国際バイオフィォーラム(2006 年、5 月 17-19 日、東京ビッグサイト)

○山口明人

異物排出タンパクの構造・機能・制御と生理的役割
第 54 回日本化学療法学会総会(2006 年、5 月 18-19 日、京都)

○西野邦彦

抗菌薬耐性および病原性発現における多剤排出トランスポーターの役割
第 54 回日本化学療法学会総会(2006 年、5 月 18-19 日、京都)

○村上聡

多剤排出トランスポーターの構造と機能
第 6 回 日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「超分子タンパク質複合体の分子機構」(2006 年、4 月 24-26 日、京都国際会館)

○西野邦彦、山口明人

LPS 修飾調節による細菌の Fe(III)および Al(III)耐性機構
第 79 回日本細菌学会総会(2006 年、3 月 29-31 日、石川県金沢市)

○平川秀忠、児玉年央、小林あすか、本田武司、山口明人

トリプトファン代謝物による腸管出血性大腸菌(EHEC:O157)の病原因子の発現調節
第 79 回日本細菌学会総会(2006 年、3 月 29-31 日、石川県金沢市)

○千田靖子、小林あすか、平川秀忠、平田隆弘、山口明人

PTSsystem を介した GlcNAc による大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF の発現誘導機構の解析
第 79 回日本細菌学会総会(2006 年、3 月 29-31 日、石川県金沢市)

○西野邦彦

How Bacteria Resist Killing by Fe(III) and Al(III)
第 8 回日韓微生物シンポジウム(3 月 29-30 日、石川県金沢市)

○西野邦彦

薬はなぜ効かなくなるかー病原細菌における異物排出蛋白質の役割ー

21 世紀 COE ナノバイオグループシンポジウム(2006 年、3 月 3-4 日、兵庫県 淡路夢舞台国際
会議場)

○千田靖子、小林あすか、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
Catabolite control による大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF の発 現誘導機構の解析
21 世紀 COE ナノバイオグループシンポジウム(2006 年、3 月 3-4 日、兵庫県 淡路夢舞台国際
会議場)

○Satoshi Murakami
Crystal structure of the substrate binding form of multidrug exporter AcrB and the binding change
mechanism for the multidrug export
Sanken International Symposium 2006 on Advanced Science and Technology for Materials, Biology,
and Information by Quantum Beams, Feb. 8-9, 2006

○平川秀忠、児玉年央、小林あすか、本田武司、山口明人
大腸菌の病原性と薬剤耐性 におけるインドールシグナルの役割
日本生体エネルギー研究会 第 31 回討論会 (名古屋大学 2005 年 12 月 19-21 日)

○岩田歩、小林直木、村上聡、山口明人
カルベニシリン高度耐性型多剤排出蛋白質 AcrB の分子設計
日本生体エネルギー研究会 第 31 回討論会 (名古屋大学 2005 年 12 月 19-21 日)

○小林あすか、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
環境感知応答による大腸菌異物排出タンパク質発現調節機構の解析
日本生体エネルギー研究会 第 31 回討論会 (名古屋大学 2005 年 12 月 19-21 日)

○正木猛、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
大腸菌異物排出蛋白質 AcrD, MdtABC の発現制御機構と生理的意義の解明
日本生体エネルギー研究会 第 31 回討論会 (名古屋大学 2005 年 12 月 19-21 日)

○大東穂、西毅、山口明人
マウス ABCA5 の機能解析
第 28 回日本分子生物学会年会(2005 年 12 月 7-10 日 福岡)

○Hidetada Hirakawa and Akihito Yamaguchi
Regulation of Xenobiotic Exporter Gene Expression by Environmental Response Systems in
Escherichia coli
The 1st CNU-SANKEN Joint Symposium on Advanced Materials Science, November 1-2, 2005,
Chungnam National Univ. Daejeon, Korea

○村上聡、山口明人
多剤排出トランスポーターAcrB の結晶構造に基づく機能解析
生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2005 年 11 月 28-29 日 京都)

○小林伸好、西毅、平田隆弘、山口明人
Mechanism of sphingosine 1-phosphate secretion
生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2005 年 11 月 28-29 日 京都)

○大東穂、竹中ちえみ、西毅、山口明人

Characterization of mouse ABCA5 protein in thyroid gland
生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2005年11月28-29日 京都)

○柴田紗貴子、竹中ちえみ、西毅、山口明人
Studies on the ABCA7 expressed in platelets
生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2005年11月28-29日 京都)

Syoko Nishi, ○Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi
Analysis of the Mechanism of Proton Translocation through
the Integral Vo Domain of the Vacuolar (H⁺)-ATPases
4th 21st Century COE program "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience"
International symposium, November 18, 2005, Toba, Mie, Japan

○村上聡
薬剤耐性化問題の克服を目指した多剤排出蛋白質の薬剤認識機構の解明
CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」、さきがけ「生体分子の形と機能」
2005年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム(平成17年11月15-16日、東京)

○山口明人
異物排出トランスポーターの構造機能解析
CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」、さきがけ「生体分子の形と機能」
2005年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム(平成17年11月15-16日、東京)

○橋本聡文、久保義行、西毅、平田隆弘、山口明人
新規マウスRND型膜タンパク質の発現部位解析
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

○小林伸好、平田隆弘、西毅、佐野孝光、木原章雄、五十嵐靖之、山口明人
ラット血小板からのスフィンゴシン1リン酸放出機構の解明
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

○正木猛、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
Fur(Ferric uptake regulator)による大腸菌異物排出蛋白質 AcrD, MdtABC の発現抑制
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

○平川秀忠、児玉年央、小林あすか、本田武司、平田隆弘、山口明人
インドールシグナルによる大腸菌の薬剤耐性と病原性の調節
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

○Satoshi Murakami
Structure and function of bacterial multi-drug efflux transporter
Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems, August 28～September 2, 2005,
Magdalen college, Oxford, UK

○平川秀忠、児玉年央、小林あすか、本田武司、山口明人
インドールシグナルによる大腸菌の薬剤耐性と病原性の調節
第17回微生物シンポジウム -微生物科学の発展と感染症対策- (平成17年9月2日～9月3日、JTB フォレスト)

○小林あすか、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
大腸菌における生育段階依存的異物排出タンパク質発現誘導機構
第17回微生物シンポジウム－微生物科学の発展と感染症対策－（平成17年9月2日～9月3日、JTB フォレスト）

○Akihito Yamaguchi
Bacterial xenobiotic exporter world: From molecular structure to physiological implications
International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8-10, 2005, Awaji
Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○平川秀忠、児玉年央、小林あすか、本田武司、平田隆弘、山口明人
インドールシグナルによる薬剤耐性と病原性の調節
第2回21世紀大腸菌研究会-2005-（平成17年6月23日-平成17年6月24日、メルパール伊勢志摩）

○村上聡
膜タンパク質の結晶育成－結晶構造からみた薬剤耐性
第4回国際バイオ EXPO（平成17年5月18日～5月20日、東京ビックサイト）

○平川秀忠
腸菌細胞間情報伝達と異物排出タンパク発現制御
21世紀 COE プログラム学生・若手研究者セミナー（平成17年3月21-22日、兵庫）

○橋本聡文
新規マウス RND 型膜タンパク質の検索と発現解析
21世紀 COE プログラム学生・若手研究者セミナー（平成17年3月21-22日、兵庫）

○小林直木
大腸菌異物排出タンパク質 AcrB/AcrD キメラを用いた基質認識部位の探索
21世紀 COE プログラム学生・若手研究者セミナー（平成17年3月21-22日、兵庫）

○小林伸好
Transporter-mediated secretion of sphingosine 1-phosphate from the platelet
21世紀 COE プログラム学生・若手研究者セミナー（平成17年3月21-22日、兵庫）

○山口明人、村上聡、平田隆弘、中島良介
異物排出トランスポーターの構造機能解析
2004年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム（平成16年12月22-23日、東京）

○村上聡、山口明人
シンポジウム「エネルギーを使って膜を介して物を運ぶタンパク質」
大腸菌多剤排出トランスポーターの結晶構造と機能解析
日本生体エネルギー研究会（平成16年12月16-18日、大阪）

○正木猛、平川秀忠、稲角嘉彦、小林あすか、千田靖子、平田隆弘、山口明人
シンポジウム「エネルギーを使って膜を介して物を運ぶタンパク質」
大腸菌異物排出蛋白質 AcrD, MdtABC に対する発現抑制性因子の探索
日本生体エネルギー研究会（平成16年12月16-18日、大阪）

○石橋史旭、田村憲久、村上聡、山口明人
シンポジウム「エネルギーを使って膜を介して物を運ぶタンパク質」
大腸菌多剤排出蛋白質 AcrB 推定プロトン共役部位への部位特異的変異導入
日本生体エネルギー研究会(平成 16 年 12 月 16-18 日、大阪)

○村上聡
シンポジウム「構造から見た膜輸送」
大腸菌異物排出トランスポーターAcrB の結晶構造と異物認識・輸送機構
日本生物物理学会第 42 回年会(平成 16 年 12 月 13-15 日、京都)

○村上聡、山口明人
大腸菌異物排出トランスポーターの結晶構造解析と機能解析
第 26 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 16 年 11 月 25-26 日、東京)

○田村憲久、村上聡、山口明人
大腸菌異物排出タンパク質 AcrB と TolC の相互作用部位の同定
第 26 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 16 年 11 月 25-26 日、東京)

○石橋史旭、田村憲久、村上聡、山口明人
大腸菌異物排出蛋白質 AcrB の部位特異的変異導入法による異物輸送機構の解析
第 26 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 16 年 11 月 25-26 日、東京)

○小林直木、田村憲久、村上聡、山口明人
異物排出蛋白質 AcrB/AcrD キメラを用いた基質認識部位の探索
第 26 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 16 年 11 月 25-26 日、東京)

○稲角嘉彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF の N-アセチルグルコサミンによる発現誘導機構
第 26 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 16 年 11 月 25-26 日、東京)

○橋本聡文、平田隆弘、山口明人
新規マウス RND 型膜蛋白質の検索と発現解析
第 26 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 16 年 11 月 25-26 日、東京)

○村上聡
シンポジウム「膜蛋白質・生体超分子複合体の最前線」
大腸菌多剤排出トランスポーターの結晶化と構造機能解析
日本結晶学会年会(平成 16 年 11 月 16-17 日、大阪大学)

○村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
多剤排出蛋白質群の X 線結晶構造解析
Spring8 Symposium(平成 16 年 10 月 18 日-平成 16 年 10 月 19 日、Spring-8 放射光普及棟)

○稲角嘉彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
Investigation of compounds that induce MdtEF, a multidrug exporter of *E. coli*
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○橋本聡文、平田隆弘、久保義行、山口明人
新規マウス RND 型膜蛋白質の検索と発現解析

第 77 回 日本生化学会大会 (平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○平川秀忠、稲角嘉彦、正木猛、平田隆弘、山口明人

Analysis of the regulation mechanisms of xenobiotic exporters induced by indole in *Escherichia coli*

第 77 回 日本生化学会大会 (平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi

Symposium, "Membrane Proteins"

X-ray crystallographic analysis of multi-drug efflux transporter

The 8th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation(BSR2004), the Egret Himeji, Hyogo, Japan, Sep. 7-11, 2004.

○山口明人

トランスポーターの結晶化と機能解析

第 3 回創薬ビジョンシンポジウム:薬学・創薬・医薬品産業の将来を考える。(平成 16 年 1 月 15-16 日、昭和大学)

○山口明人、村上聡

大腸菌排出タンパク質の構造と機能

第 77 回 日本細菌学会総会 (平成 16 年 4 月 1-3 日、大阪)

○Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi

Structure and function of Multi-drug efflux transporter

International Symposium on the Creation of Novel Nanomaterials (平成 16 年 1 月 22-24 日、大阪大学)

○村上聡

多剤耐性化を引き起こす薬剤排出タンパク質

「大学と科学」公開シンポジウム-タンパク質のかたちから生命のなぞを解く

○久保義行、山口明人

高等動物における排出蛋白の missing link を探る

日本生体エネルギー研究会 (JBEG) 第 29 回討論会「膜と輸送とエネルギー」(平成 15 年 12 月 15-17 日、東京)

○平川秀忠、山口明人

細菌の細胞間情報伝達と異物排出蛋白の発現制御

日本生体エネルギー研究会 (JBEG) 第 29 回討論会「膜と輸送とエネルギー」(平成 15 年 12 月 15-17 日、東京)

○田村憲久、大川祐子、石橋史旭、村上聡、山口明人

X 線結晶構造に基づく大腸菌多剤排出タンパク質 AcrB の解析

日本生体エネルギー研究会 (JBEG) 第 29 回討論会「膜と輸送とエネルギー」(平成 15 年 12 月 15-17 日、東京)

○村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人

大腸菌多剤排出膜輸送体の X 線結晶構造解析

第 26 回日本分子生物学会年会(平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸)

○山田純子、西野邦彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
異物排出トランスポーターによる β -ラクタム耐性と発現制御機構の解析
第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 15 年 11 月 13 日、金沢)

○関谷明香、久保義行、山口明人
新規 ABC 膜輸送体 ABCA5 の細胞生物学的解析
第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 15 年 11 月 13 日、金沢)

○山口明人
細菌の異物排出トランスポーター:構造と解析
第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 15 年 11 月 13 日、金沢)

○山口明人
細菌の多剤排出システムの構造と基質認識メカニズム
2003 年度 第 50 回日本化学療法学会東日本支部会、第 52 回日本感染症学会地方会、第 86 回日本細菌学会関東支部会の合同学術集会(平成 15 年 10 月 30 日、横浜)

○西野邦彦、山田純子、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
Role of the TolC-dependent multidrug exporters in beta-lactam antibiotic resistance of *E. coli*
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)

○大川裕子、田村憲久、村上聡、平田隆弘、山口明人
Random Mutagenesis of Multidrug Efflux Transporter AcrB in the Transmembrane Region
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)

○平川秀忠、稲角嘉彦、西野邦彦、平田隆弘、山口明人
Studies on Regulatory Networks of Multidrug Exporter Genes Induced by Indole in *Escherichia coli*.
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)

○村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
Crystal Structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)

○山口明人、久保義之、佐々木真理、関谷明香、名田茂之
Studies on the Physiological Roles of Novel ABCA Subfamily Transporters
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)

○村上聡
X-ray crystallographic analysis of multidrug efflux transporter AcrB
Japan-UK Membrane Protein Structure Biology –Towards high-throughput membrane protein crystallography and related technology–(SPring-8 Public Relation Hall;September 11-12, 2003)

○平川秀忠、稲角嘉彦、山田純子、西野邦彦、正木猛、平田隆弘、山口明人
二成分情報伝達系を介した大腸菌異物排出蛋白質発現制御ネットワークの解析
第 16 回微生物シンポジウム(平成 15 年 9 月 5-6 日、京都)

○平川秀忠、稲角嘉彦、山田純子、西野邦彦、正木猛、平田隆弘、山口明人
大腸菌異物排出蛋白質による薬剤耐性制御ネットワークの解析
第 32 回薬剤耐性菌シンポジウム(平成 15 年 8 月 29-30 日、東京)

○Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Asami Saito, Norihisa Tamura and Eiki Yamashita
Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB and its functional implications
2003FASEB Summer Conferences "Perspectives in Transport Biology" (Tucson, Arizona, USA; July 5-10, 2003)

○村上聡
生体異物排出トランスポーターの立体構造の解明
「膜輸送ナノマシンの構造・作動機構とその制御」公開シンポジウム(平成 15 年 7 月 25 日、東海大学)

○Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryoichi Nakashima and Eiki Yamashita
Crystal structure of multidrug efflux transporter AcrB and its functional implications
Gordon Research Conferences(Molecular&Cellular Bioenergetics) (Kimball Union Academy,USA; June 22-29, 2003)

○山田純子、西野邦彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
大腸菌 TolC 共役型異物排出トランスポーターの β -ラクタム剤耐性
第 50 回日本生化学会近畿支部例会(平成 15 年 5 月 31 日、大阪)

○関谷明香、久保義行、名田茂之、山口明人
脳に発現する新規 ABC 蛋白 ABCA5 ノックアウトマウスの解析
第 50 回日本生化学会近畿支部例会(平成 15 年 5 月 31 日、大阪)

○石橋史旭、田村憲久、平田隆弘、村上聡、山口明人
大腸菌主要異物排出トランスポーターAcrB ペリプラズム頭部へのランダム変異導入
第 50 回日本生化学会近畿支部例会(平成 15 年 5 月 31 日、大阪)

○大川裕子、田村憲久、村上聡、平田隆弘、山口明人
大腸菌多剤排出蛋白 AcrB ランダム変異導入による基質認識部位の検索
第 50 回日本生化学会近畿支部例会(平成 15 年 5 月 31 日、大阪)

○Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi
Crystal Structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB
International Symposium on Diffraction Structural Biology 2003(Tsukuba International Congress Center; May 28-31, 2003)

○Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima and Eiki Yamashita
Crystal Structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB
ASBMB 2003 Annual Meeting (the San Diego Convention Center; April 12-16, 2003)

○平川秀忠、西野邦彦、山田純子、平田隆弘、山口明人
大腸菌二成分情報伝達系による薬剤耐性化機構の解析
第 76 回日本細菌学会総会(平成 15 年 4 月 1-3 日、熊本)

○山田純子、西野邦彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
β-ラクタム剤を輸送する大腸菌多剤排出蛋白質の検索と解析
第76回日本細菌学会総会(平成15年4月1-3日、熊本)

○西野邦彦、小林伸好、平川秀忠、平田隆弘、本田武司、山口明人
大腸菌ヒストン様蛋白質 H-NS による薬剤排出蛋白質発現制御機構の解析
第76回日本細菌学会総会(平成15年4月1-3日、熊本)

○村上聡、山口明人
多剤排出膜輸送体タンパクの結晶構造、ついに決まる
第76回日本細菌学会総会(平成15年4月1-3日、熊本)

○Satoshi Murakami
Visualization of the Whole Structure of Drug-Resistance Nanomachine
International Symposium on 21st century COE program -Towards creating new industries based on inter-nanoscience(平成15年3月12日、大阪大学)

○Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi
Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB
Membrane Structure and Function-PSB workshop (ESRF, FRANCE; Feb. 10-11, 2003)

○村上聡
異物排出トランスポーターAcrBの結晶構造解析
九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクト「九大における構造生物学の教育・研究環境の整備確立」公開セミナー(平成15年2月7日、九州大学)

○村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
異物排出タンパク質 AcrB の結晶構造解析
生物マシーナリー(平成15年1月7日-8日、千里ライフサイエンスセンター サイエンスホール)

○Satoshi Murakami
Structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB
CRC Seminar(平成14年11月22日、ケンブリッジ大学、英国)

○Satoshi Murakami
Structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB
Seminar(平成14年11月21日、ダラム大学、英国)

○Satoshi Murakami
Structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB
Workshop - Structural biology of macromolecular assemblies and membrane proteins. (平成14年11月18日~11月19日、マンチェスター大学、英国)

○村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
大腸菌多剤排出トランスポーターAcrBの結晶構造
日本生物物理学会第40回年会(平成14年11月2日~11月4日、名古屋大学)

○山口明人、村上聡、中島良介、山下栄樹

大腸菌異物排出トランスポーターAcrBの結晶構造
第24回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成14年11月7-8日、名古屋)

○山口明人
異物排出タンパクと薬剤耐性
フォーラム2002:衛生薬学・環境トキシコロジー(平成14年10月24日~10月25日、広島大学)

○Takahiro Hirata, Kunihiko Nishino, Asami Saito, Norihisa Tamura and Akihito Yamaguchi
Characterization of a Novel Tetracycline Derivative, Tigecycline(GAR-936) as a Substrate for Efflux Proteins: Potential for Developing Resistance in E.coli Strains
The 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy(平成14年9月27-30日、サンジェゴ)

○Satoshi Murakami
Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB
SLS Seminar(平成14年9月5日、ポール・シェラー研究所 / スイス放射光施設、スイス)

○山口明人
大腸菌多剤排出トランスポーターAcrBの結晶構造
第31回薬剤耐性菌シンポジウム(平成14年8月30-31日、群馬)

○西野邦彦、平川秀忠、山田純子、稲角嘉彦、小林伸好、平田隆弘、山口明人
二成分情報伝達系による薬剤耐性発現機構
第31回薬剤耐性菌シンポジウム(平成14年8月30-31日、群馬)

○村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
大腸菌異物排出タンパクAcrBの結晶構造解析
生体エネルギー研究会第28回討論会(平成14年8月22-25日、高知)

○山口明人
異物排出タンパクの構造と機能
細胞シグナリング研究会 第1回研究会(平成14年6月15日、名古屋)

○山口明人、村上聡、西野邦彦、田村 憲久、小林伸好
異物排出タンパクの構造と機能
第2回日本蛋白質科学会年会(平成14年6月13-15日、名古屋)

○Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryouyuke Nakashima and Eiki Yamashita
Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB
The 1st JBS biofrontier symposium Membrane Transporter:Structure and Function Relationship -Insights into ABC Transporter- (平成14年6月9-11日、大分県)

○Mari Sasaki, Ayako Shoji, Yoshiyuki Kubo, Shigeyuki Nada and Akihito Yamaguchi
Identification of a novel rat ABC transporter preferentially expressed in platelet
The 1st JBS biofrontier symposium Membrane Transporter:Structure and Function Relationship -Insights into ABC Transporter- (平成14年6月9-11日、大分県)

○齋藤麻美、田村憲久、西野邦彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌多剤排出タンパク質AcrBの機能残基検索と解析

第 49 回日本生化学会近畿支部例会(平成 14 年 5 月 25 日、京都大学)

○平川秀忠、西野邦彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌の二成分情報伝達系レスポンスレギュレーター完全ライブラリ構築と薬剤耐性発現解析
第 49 回日本生化学会近畿支部例会(平成 14 年 5 月 25 日、京都大学)

○西野邦彦
情報伝達と薬剤耐性
第 50 回日本化学療法学会総会(平成 14 年 5 月、神戸市)

③ ポスター発表 (国内会議 143 件、国際会議 20 件)

○久野 悠、山口 明人
MEG-01 細胞由来 platelet-like particle は刺激依存的に S1P を放出する
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、横浜)

○大東 穂、山口 明人
マウス ABCA5 の神経細胞における発現
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、横浜)

○宮田 耕資、西 毅、山口 明人
ABCA6 トランスポーターの組織、細胞内局在
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、横浜)

○小林 直木、西 毅、山口 明人
ラット赤血球反転膜小胞を用いた ATP 依存的スフィンゴシン-1-リン酸輸送機構の解明
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、横浜)

○尾上 麻実子、西 毅、山口 明人
血小板における ABCA7 蛋白質の機能解析
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、横浜)

○平川 秀忠、小林 あすか、平田 隆弘、西野 邦彦、山口 明人
The regulatory mechanism of the AcrAB and AcrEF multidrug exporter system by AcrS in *Escherichia coli*
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007 年 12 月 11-15 日、横浜)

○宮田 耕資、西 毅、山口 明人
Expression and cellular localization of ABCA6 in mouse liver
第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2007 年 11 月 26-27 日、仙台)

○小林 直木、西 毅、山口 明人
Identification of the sphingosine-1-phosphate export system in rat erythrocytes

第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2007 年 11 月 26-27 日、仙台)

○尾上 麻実子、西 毅、山口 明人

Identification of the function of ABCA7 in mouse platelets

第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2007 年 11 月 26-27 日、仙台)

○二階堂 英司

環境因子によるサルモネラ菌 AcrAB 異物排出蛋白質発現誘導機構の解析

第 63 回 大阪大学産業科学研究所学術講演会(2007 年 11 月 16 日、大阪大学接合科学研究所)

○平川 秀忠

The regulation of bacterial "needle-like" bio-nanomachinery and pathogenicity by indole in enterohaemorrhagic *E. coli*

第 63 回 大阪大学産業科学研究所学術講演会(2007 年 11 月 16 日、大阪大学接合科学研究所)

○村上 聡、中島 良介、松本 崇、近藤 洋平、津田 岳夫、小川 治夫、豊島 近

膜輸送体作動メカニズムの結晶学的解明

第 11 回 Spring8 シンポジウム(平成 19 年 10 月 29-30 日、兵庫県)

○Hidetada Hirakawa, Takeshi Honda and Akihito Yamaguchi

Roles of indole signaling and intercellular signal transduction on type III secretion system-dependent pathogenicity in EHEC

3rd ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria (7-10 Oct. 2007, Texas, USA)

○Matsumoto Yoshimi, Nishino Kunihiko, Iino Ryota, Sakakihara Syoichi, Nakata Masayoshi, Noji Hiroyuki and Yamaguchi Akihito

Visualization of *Escherichia coli* AcrAB-TolC efflux pump activity using ultra small chambers

47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Sep. 17-20, 2007, McCormick Place, Illinois USA)

○Kunihiko Nishino, Eiji Nikaido, Hiroki Sakata, Tomoyuki Nakano, Manami Tanaka and Akihito Yamaguchi

Regulatory network of multidrug transporters reveals their physiological role in *Salmonella* virulence

7th The Awaji International Forum on Infection and Immunity (Sep. 1-5, 2007, Awaji Yumebutai International Conference Center)

○Nikaido Eiji, Nishino Kunihiko and Yamaguchi Akihito

Regulation mechanisms of the *acrAB* multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* in response to bacterial metabolites

7th The Awaji International Forum on Infection and Immunity (Sep. 1-5, 2007, Awaji Yumebutai International Conference Center)

○Kunihiko Nishino, Ryota Iino, Masaaki Nakata, Yoshimi Matsumoto, Eiji Nikaido, Syoichi

Sakakihara, Syoji Takeuchi, Akihito Yamaguchi and Hiroyuki Noji

Single Cell Measurement of Bacterial Drug Efflux in Femtoliter Chamber Array

American Society of Microbiology, 107th General Meeting, (May 21-25, 2007, Metro Toronto Convention Center, Toronto, Canada)

○Eiji Nikaido, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi
Metabolites of *Escherichia coli* Induce the Expression of Multidrug Efflux Pumps in *Salmonella enterica*
American Society of Microbiology, 107th General Meeting, (May 21-25, 2007, Metro Toronto Convention Center, Toronto, Canada)

○千田靖子、平田隆弘、西野邦彦、山口明人
PTS system による大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF 発現誘導機構
第 80 回 日本細菌学会総会(2007 年 3 月 26-27 日、大阪)

○二階堂英司、西野邦彦、山口明人
異種細菌間センシングによるサルモネラ菌異物排出トランスポーター発現制御の解析
第 80 回 日本細菌学会総会(2007 年 3 月 26-27 日、大阪)

○西野邦彦、二階堂英司、山口明人
オーファン輸送体による細菌多剤耐性および病原性制御機構の解明
第 80 回 日本細菌学会総会(2007 年 3 月 26-27 日、大阪)

○橋本聡文
Intracellular localization and tissue distribution of novel RND-type proteins in mice
21 世紀 COE

○西晶子、山口明人、Michael Forgac、西毅
Tissue Specific Expression of the Splicing Variants of the Mouse Vacuolar Proton-Translocating ATPase a4 Subunit
21 世紀 COE

○大東穂
Analysis of ABCA transporters for finding signal molecule transporters
21 世紀 COE

○Megumi Ohigashi, Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi
Characterization of mouse ABCA5 protein
5th 21COE International Symposium, Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience (Dec 8-9, 2006, Awaji Yumebutai International Conference Center)

○Kunihiko Nishino, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
A biological function of multidrug transporters in iron homeostasis
5th 21COE International Symposium, Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience (Dec 8-9, 2006, Awaji Yumebutai International Conference Center)

○Syoko Kawasaki-Nishi, Akihito Yamaguchi, Michael Forgac and Tsuyoshi Nishi
Tissue Specific Expression of the Splicing Variants of the Mouse Vacuolar Proton Translocating ATPase a4 Subunit
5th 21COE International Symposium, Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience (Dec 8-9, 2006, Awaji Yumebutai International Conference Center)

○Satofumi Hashimoto, Yoshiyuki Kubo, Tsuyoshi Nishi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Intracellular localization and tissue distribution of novel RND-type proteins in mice
5th 21COE International Symposium, Towards Creating New Industries Based on
Inter-Nanoscience (Dec 8-9, 2006, Awaji Yumebutai International Conference Center)

○二階堂英司、西野邦彦、平田隆弘、山口明人
インドールによるサルモネラ菌異物排出トランスポーター発現制御機構
日本分子生物学会 2006 フォーラム(2006 年 12 月 6-8 日、名古屋国際会議場)

○久野悠、田村憲久、村上聡、山口明人
外膜チャネル TolC と共役する大腸菌異物排出蛋白質 EmrB のトポロジー決定
第 28 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2006 年、11 月 9-10 日、静岡県)

○千田靖子、小林あすか、平川秀忠、稲角嘉彦、平田隆弘、西野邦彦、山口明人
GlcNAc による大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF の誘導機構の解析
第 28 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2006 年、11 月 9-10 日、静岡県)

○Tsuyoshi Nishi, Nobuyoshi Kobayashi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Plasma membrane transporters participate the sphingosine 1-phosphate secretion from the rat
platelet
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (June 18-23, 2006,
Kyoto, Japan)

○Megumi Ohigashi, Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi
Cellular localization of mouse ABCA5 proteins in mouse tissues
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (June 18-23, 2006,
Kyoto, Japan)

○Yu Hisano, Norihisa Tamura, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi
Membrane Topology of EmrB, an Outer Membrane Channel-Coupled Multidrug Efflux
Transporter, in *Escherichia coli*
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (June 18-23, 2006,
Kyoto, Japan)

○Kunihiko Nishino, Eduardo A Groisman and Akihito Yamaguchi
Lipopolysaccharide Modifications Mediating Bacterial Resistance to Fe(III) and Al(III)
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (June 18-23, 2006,
Kyoto, Japan)

○Yasuko Senda, Asuka Kobayashi, Yoshihiko Inazumi, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata,
Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi
The induction of bacterial xenobiotic exporter, MdtEF, by *N*-acetyl-D-glucosamine is mediated
via PTS system in *Escherichia coli*
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (June 18-23, 2006,
Kyoto, Japan)

Takeshi Masaki, Hidetada Hirakawa, Kunihiko Nishino, ○Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi

mdtABC and *acrD* drug-exporter genes are suppressed by a ferric uptake regulator, Fur, in *Escherichia coli*
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (June 18-23, 2006, Kyoto, Japan)

Takeshi Masaki, Hidetada Hirakawa, ○Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Fur Negatively Regulates Drug-exporter Genes of *mdtABC* and *acrD* in *Escherichia coli*
American Society of Microbiology, 106th General Meeting, (May 21-25, 2006, Orlando, Florida)

○Naoki Kobayashi, Satoishi Murakami and Akihito Yamaguchi
Studies on the substrate-recognition site of AcrB using chimeric and site-directed mutagenesis
American Society of Microbiology, 106th General Meeting, (May 21-25, 2006, Orlando, Florida)

○Yu Hisano, Norihisa Tamura, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi
Topological analysis of EmrB, a TolC-coupled multidrug efflux protein in *Escherichia coli*
American Society of Microbiology, 106th General Meeting, (May 21-25, 2006, Orlando, Florida)

○久野悠、田村憲久、村上聡、山口明人
外膜チャネル TolC と共役する MFS 型異物排出蛋白 EmrB のトポロジー
日本薬学会 第 126 年会 (2006 年、3 月 28-30 日、仙台)

○岩田歩、小林直木、村上聡、山口明人
多剤排出蛋白質 AcrB のカルベニシリン高度耐性型変異体の構築
日本薬学会 第 126 年会 (2006 年、3 月 28-30 日、仙台)

○小林直木、村上聡、山口明人
大腸菌異物排出蛋白質 AcrB 部位特異的変異導入による基質認識部位の解析
日本薬学会 第 126 年会 (2006 年、3 月 28-30 日、仙台)

正木猛、平川秀忠、○平田隆弘、山口明人
大腸菌の鉄獲得遺伝子制御因子 Fur は異物排出蛋白質遺伝子 *mdtABC*, *acrD* も負に制御する
日本薬学会 第 126 年会 (2006 年、3 月 28-30 日、仙台)

○大東穂、西毅、山口明人
マウス ABCA5 の機能解析
21 世紀 COE ナノバイオグループシンポジウム (2006 年、3 月 3-4 日、兵庫県 淡路夢舞台国際会議場)

○橋本聡文、山口明人
mRNA distribution of novel RND-type proteins in mice
21 世紀 COE ナノバイオグループシンポジウム (2006 年、3 月 3-4 日、兵庫県 淡路夢舞台国際会議場)

○小林直木、村上聡、山口明人
異物排出蛋白質 AcrB の基質認識部位に関する蛋白工学的解析
21 世紀 COE ナノバイオグループシンポジウム (2006 年、3 月 3-4 日、兵庫県 淡路夢舞台国際会議場)

○平川秀忠、小林あすか、児玉年央、本田武司、山口明人

インドールシグナルによる 大腸菌の酸耐性と病原因子の発現調節
第 28 回日本分子生物学会年会(2005 年 12 月 7-10 日 福岡)

○橋本聡文、久保義行、西毅、平田隆弘、山口明人
新規マウス RND 型タンパク質 RNDEU-2,3 の臓器内分布
第 28 回日本分子生物学会年会(2005 年 12 月 7-10 日 福岡)

○小林あすか、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
生育段階依存的な大腸菌異物排出蛋白質の発現誘導とその調節機構
第 28 回日本分子生物学会年会(2005 年 12 月 7-10 日 福岡)

○正木猛、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
Fur による大腸菌異物排出蛋白質 AcrD と MdtABC の発現調節とその役割
第 28 回日本分子生物学会年会(2005 年 12 月 7-10 日 福岡)

○千田靖子、小林あすか、平川秀忠、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人
PTS system を介した GlcNAc による大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF の誘導機構の解析
第 28 回日本分子生物学会年会(2005 年 12 月 7-10 日 福岡)

○Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Regulation of Xenobiotic Exporter Gene Expression and Multidrug Resistance in *Escherichia coli*
4th 21st Century COE program "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience"
International symposium, November 18, 2005, Toba, Mie, Japan

○村上聡、中島良介、松本崇、山下栄樹
多剤排出蛋白質群の X 線結晶構造解析
Spring8 シンポジウム(平成 17 年 11 月 17 日)

○岩田歩、小林直木、田村憲久、大川裕子、村上聡、山口明人
高度カルベニシリン耐性型多剤排出蛋白質 AcrB の分子設計
第 78 回日本生化学会大会 (平成 17 年 10 月 19 日～22 日 神戸)

○久野悠、田村憲久、村上聡、山口明人
大腸菌外膜チャンネル TolC と共役する MFS 型異物排出蛋白 EmrB のトポロジー決定
第 78 回日本生化学会大会 (平成 17 年 10 月 19 日～22 日 神戸)

○橋本聡文、久保義行、西毅、平田隆弘、山口明人
新規マウス RND 型膜タンパク質の発現部位解析
第 78 回日本生化学会大会 (平成 17 年 10 月 19 日～22 日 神戸)

○柴田紗貴子、竹中ちえみ、西毅、山口明人
ABCA7 はマウス血小板に発現している
第 78 回日本生化学会大会 (平成 17 年 10 月 19 日～22 日 神戸)

○小林あすか、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
大腸菌における生育段階依存的な異物排出タンパク質発現誘導機構
第 78 回日本生化学会大会 (平成 17 年 10 月 19 日～22 日 神戸)

○小林伸好、平田隆弘、西毅、佐野孝光、木原章雄、五十嵐靖之、山口明人

ラット血小板からのスフィンゴシン1リン酸放出機構の解明
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

○小林直木、田村憲久、村上聡、山口明人
AcrBの基質認識部位に関する蛋白工学的解析
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

○正木猛、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
Fur(Ferric uptake regulator)による大腸菌異物排出蛋白質 AcrD, MdtABCの発現抑制
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

○千田靖子、平川秀忠、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人
Regulatory mechanisms of gene expression by the two-component signal transduction system, EvgSA, in *Escherichia coli*
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

○大東穂、竹中ちえみ、西毅、山口明人
モノクローナル抗体とノックアウトマウスを用いた ABCA5 の解析
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

○平川秀忠、児玉年央、小林あすか、本田武司、平田隆弘、山口明人
インドールシグナルによる大腸菌の薬剤耐性と病原性の調節
第78回日本生化学会大会 (平成17年10月19日～22日 神戸)

Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Toshio Kodama, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Regulation of Xenobiotic Exporter Gene Expressions by Environmental Response systems in *Escherichia coli*
Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems, August 28～September 2, 2005, Magdalen college, Oxford, UK

○Megumi Ohigashi, Chiemi Takenaka, Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi
Characterization of ABCA5 protein with its specific monoclonal antibody and knockout mice
International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8-10, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○Sakiko Shibata, Chiemi Takenaka, Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi
Identification of ABCA7 protein expression in mouse platelet
International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8-10, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○Nobuyoshi Kobayashi, Tsuyoshi Nishi, Takahiro Hirata, Akio Kihara, Takanitsu Sano, Yasuyuki Igarashi and Akihito Yamaguchi
Distinct secretion mechanism of sphingosine 1-phosphate
International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8-10, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○Satofumi Hashimoto, Yoshiyuki Kubo, Tsuyoshi Nishi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Localization of novel RND-type proteins in culture cells and mice tissues

International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8–10, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○Naoki Kobayashi, Norihisa Tamura, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi
Identification of the residues involved in substrate recognition in RND-type multidrug efflux transporter

International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8–10, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○Ayumi Iwata, Naoki Kobayashi, Norihisa Tamura, Yuko Ohkawa, Fumiaki Ishibashi, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi

Molecular design of the super carbenicillin resistance AcrB

International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8–10, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Toshio Kodama, Takeshi Honda, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi

Regulation of *E. coli* drug resistance and pathogenicity by indole signaling

International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8–10, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○Asuka Kobayashi, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi

Regulation mechanisms of the growth phase-dependent expression of xenobiotic exporters in *Escherichia coli*

International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8–10, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○Takeshi Masaki, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi

Fur (Ferric uptake regulator) controls the expression of AcrD and MdtABC, multidrug efflux transporters in *Escherichia coli*

International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, August 8–10, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan

○Takahiro Hirata, Asuka Kobayashi, Hidetada Hirakawa, Manabu Horikawa, Masaji Ishiguro and Akihito Yamaguchi

Small-Scale and Efficient Reporter Assay of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing System and the Evaluation of 3-oxo-C₁₂-Homoserine Lactone Analogues

American Society for Microbiology, 105th General Meeting, (June 5–9, 2005, Atlanta, Georgia)

○Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi

Indole sensing mechanisms that control growth phase-dependent expression of xenobiotic exporter genes

American Society for Microbiology, 105th General Meeting, (June 5–9, 2005, Atlanta, Georgia)

○平川秀忠、平田隆弘、山口明人

インドールシグナルによる大腸菌情報伝達ネットワークの解析
第78回日本細菌学会総会（平成17年4月4–5日、東京）

○小林あすか、平川秀忠、平田隆弘、山口明人

新規 AI-2 アナログによる大腸菌異物排出蛋白質の発現誘導
第 78 回日本細菌学会総会（平成 17 年 4 月 4-5 日、東京）

○正木猛、平川秀忠、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌異物排出蛋白質 AcrD, MdtABC に対する発現抑制因子の探索
第 78 回日本細菌学会総会（平成 17 年 4 月 4-5 日、東京）

○小林直木、村上聡、山口明人
RND 型異物排出蛋白質 AcrB/AcrD キメラを用いた基質認識部位の探索
第 78 回日本細菌学会総会（平成 17 年 4 月 4-5 日、東京）

○平田隆弘、小林あすか、平川秀忠、堀川学、石黒正路、山口明人
緑膿菌 LasR-LasI quorum-sensing system の簡便迅速測定法の構築と 3-oxo-C₁₂-homoserine lactone アナログの評価
第 125 年会 日本薬学会（平成 17 年 3 月 29-31 日、東京）

○小林直木、田村憲久、村上聡、山口明人
大腸菌異物排出蛋白質 AcrB/AcrD キメラを用いた基質認識部位の探索
第 125 年会 日本薬学会（平成 17 年 3 月 29-31 日、東京）

○小林伸好、平田隆弘、西毅、木原章雄、佐野孝光、五十嵐靖之、山口明人
ラット血小板からのスフィンゴシン 1 リン酸放出機構の解明
第 125 年会 日本薬学会（平成 17 年 3 月 29-31 日、東京）

○Takahiro Hirata, Asuka Kobayashi, Hidetada Hirakawa, Manabu Horikawa, Masamichi Ishiguro and Akihito Yamaguchi
Miniaturized Quorum-Sensing Assay of *Pseudomonas aeruginosa* LasR-LasI in *Escherichia coli* system and the Evaluation of 3-oxo-C₁₂-Homoserine Lactone Analogues
Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium 2005, Oku-Biwako Makino Prince Hotel, Shiga, Japan, March 9-10, 2005.

○Syoko Kawasaki-Nishi, Tsuyoshi Nishi and Akihito Yamaguchi
Analysis of the Mechanism of Proton Translocation through the Integral Vo Domain of the Vacuolar (H⁺)-ATPases
Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium 2005, Oku-Biwako Makino Prince Hotel, Shiga, Japan, March 9-10, 2005.

○Hidetada Hirakawa, Asuka Kobayashi, Takahiro Hirata, Hajime Nitta, Nobuo Kato and Akihito Yamaguchi
Indole Sensing Mechanisms that Control Growth phase-dependent Expression of Xenobiotic Exporter Genes
Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium 2005, Oku-Biwako Makino Prince Hotel, Shiga, Japan, March 9-10, 2005.

○村上 聡

さがけライブ「薬剤耐性化問題の克服を目指した多剤排出蛋白質の薬剤認識機構の解明とその応用」

2004 年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム(平成 16 年 12 月 22-23 日、東京)

○田村憲久、村上聡、山口明人

S-S 架橋形成による大腸菌多剤排出タンパク質 AcrB-TolC 複合体の検出

2004 年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム(平成 16 年 12 月 22-23 日、東京)

○小林直木

異物排出トランスポーターAcrB の立体構造から異物の排出機構を探る

2004 年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム(平成 16 年 12 月 22-23 日、東京)

○小林伸好

輸送活性から情報伝達物質排出トランスポーターを探る！-血小板からのスフィンゴシン1リン酸分泌機構の解明-

2004 年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム(平成 16 年 12 月 22-23 日、東京)

○橋本聡文

遺伝子からの情報伝達物質排出トランスポーターを探る！

2004 年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム(平成 16 年 12 月 22-23 日、東京)

○平川秀忠、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人

インドールによる異物排出蛋白質の発現誘導メカニズムの解析

第 27 回分子生物学会年会 (平成 16 年 12 月 8-11 日、神戸)

○稲角嘉彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人

GlcNAc による大腸菌異物排出タンパク質 MdtEF の誘導機構

第 27 回分子生物学会年会 (平成 16 年 12 月 8-11 日、神戸)

○正木猛、平川秀忠、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人

大腸菌異物排出蛋白質 AcrD, MdtABC に対する発現抑制因子の探索

第 27 回分子生物学会年会 (平成 16 年 12 月 8-11 日、神戸)

○小林あすか、平川秀忠、平田隆弘、山口明人

大腸菌におけるアシルホモセリンラクトン依存的 Quorum-sensing 測定系の確立

第 27 回分子生物学会年会 (平成 16 年 12 月 8-11 日、神戸)

○Nori-hisa Tamura, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi

Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected by site-directed disulfide cross-linking

Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004(SISSIN-2004), ISIR, Osaka Univ., Osaka, Japan Dec. 6-7, 2004.

○Naoki Kobayashi, Nori-hisa Tamura, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi

Studies on the substrate-recognition site of multidrug efflux transporter AcrB using AcrB/AcrD chimera

Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004(SISSIN-2004), ISIR, Osaka Univ., Osaka, Japan Dec. 6-7, 2004.

○Yoshihiko Inazumi, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
N-acetylglucosamine as an inducer for the expression of bacterial multidrug exporter genes
Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004(SISSIN-2004),
ISIR, Osaka Univ., Osaka, Japan Dec. 6-7, 2004.

○Hidetada Hirakawa Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Indole signaling induces the expression of xenobiotic efflux nano-machine via two-component
system-dependent and independent pathways
Sanken International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2004(SISSIN-2004),
ISIR, Osaka Univ., Osaka, Japan Dec. 6-7, 2004.

○稲角嘉彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
Investigation of compounds that induce MdtEF, a multidrug exporter of *E. coli*
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○小林伸好、平田隆弘、西毅、木原章雄、佐野孝光、五十嵐靖之、山口明人
ラット血小板には S1P 排出体が存在する
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○田村憲久、村上聡、山口明人
S-S 架橋形成による大腸菌多剤排出タンパク質 AcrB-TolC 複合体の検出
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○正木猛、平川秀忠、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人
Identification of negative regulation factors of AcrD and MdtABC, multidrug efflux transporters in
Escherichia coli
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○石橋史旭、田村憲久、村上聡、山口明人
Site-directed mutagenesis study on the essential charged residues in transmembrane domains of
multidrug efflux transporter AcrB
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○橋本聡文、平田隆弘、久保義行、山口明人
新規マウス RND 型膜蛋白質の検索と発現解析
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○平川秀忠、稲角嘉彦、正木猛、平田隆弘、山口明人
Analysis of the regulation mechanisms of xenobiotic exporters induced by indole in *Escherichia coli*
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○小林直木、田村憲久、村上聡、山口明人
RND 型多剤排出蛋白質 AcrB/AcrD キメラ蛋白質を用いた基質認識部位の解析
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○西毅、西(川崎)晶子、山口明人、Michael Forgac
V-ATPase の d サブユニットは ATP 加水分解とプロトン輸送の共役に重要な役割を果たしている
第 77 回 日本生化学会大会(平成 16 年 10 月 13 日-平成 16 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜)

○Hidetada Hirakawa, Yoshihiko Inazumi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Regulation of Drug Exporter Genes by Intercellular Signal Molecules in *Escherichia coli*
American Society for Microbiology 104 general Meeting. Ernest N. Morial Convention Center,
New Orleans, LA, United States, May 24-27, 2004.

Yoshihiko Inazumi, Hidetada Hirakawa, Kunihiko Nishino, ○Takahiro Hirata and Akihito
Yamaguchi
Up-Regulation of a Drug Exporter Gene, mdtEF, by N-acetyl-D-glucosamine in *Escherichia coli*
American Society for Microbiology 104 general Meeting. Ernest N. Morial Convention Center,
New Orleans, LA, United States, May 24-27, 2004.

○平川 秀忠、稲角 嘉彦、平田 隆弘、山口 明人
細胞間情報伝達による異物排出蛋白質の発現制御解析
第 77 回 日本細菌学会総会(平成 16 年 4 月 1-3 日、大阪)

○稲角 嘉彦、平川 秀忠、平田 隆弘、山口 明人
二成分情報伝達系 EvgSA システムで制御される大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF の誘導物質探索
第 77 回 日本細菌学会総会(平成 16 年 4 月 1-3 日、大阪)

○平川秀忠、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人
インドールで誘導される大腸菌異物排出蛋白質の発現制御ネットワーク解析
第 26 回日本分子生物学会年会(平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸)

○稲角 嘉彦、平川 秀忠、西野 邦彦、平田 隆弘、山口 明人
二成分情報伝達系 EvgSA システムで制御される大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF の誘導物質探索
第 26 回日本分子生物学会年会(平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸)

○小林直木、田村憲久、村上聡、山口明人
RND 型多剤排出蛋白質 AcrB/AcrD キメラ蛋白質の解析
第 26 回日本分子生物学会年会(平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸)

○田村憲久、齋藤麻美、村上聡、山口明人
Site-directed mutagenesis in the periplasmic domain of multidrug efflux transporter AcrB
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)

○石橋史旭、田村憲久、村上聡、山口明人
Site-directed mutagenesis study on the putative substrate transmembrane pathway of multidrug
efflux transporter AcrB
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)

○稲角嘉彦、西野邦彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
Analysis of transcriptional regulation by the EvgAS two-component system of *E. coli*
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)

○久保義 行、関谷明香、山口明人、名田茂之
The Gene Knockout Analysis to Elucidate the Physiological Function of ABCA5, a New Member of
ABCA Subfamily
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)

- 西野邦彦、平田隆弘、本田武司、山口明人
Regulation of Xenobiotic-Exporter Gene Expression by Histone-Like Protein H-NS in Escherichia coli
第 76 回日本生化学会大会(平成 15 年 10 月 15-18 日、横浜)
- 稲角嘉彦、西野邦彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
二成分情報伝達系 EvgAS システムによる遺伝子転写調節機構の解析
第 50 回日本生化学会近畿支部例会(平成 15 年 5 月 31 日、大阪)
- Hidetada Hirakawa, Kunihiko Nishino, Jyunko Yamada, Yoshihiko Inazumi, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
Comprehensive Analysis of Two-component Signal Transduction System Induced Multidrug Resistance in Escherichia coli
AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 103rd General Meeting(WASHINGTON CONVENTION CENTER; May 18-22, 2003)
- Asami Saito, Takahiro Hirata, Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi
Identification of Functional Amino Acids in AcrB Multidrug Transporter of Escherichia coli
AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 103rd General Meeting(WASHINGTON CONVENTION CENTER; May 18-22, 2003)
- Kunihiko Nishino, Takahiro Hirata, Takeshi Honda and Akihito Yamaguchi
Histone-like Protein H-NS Controls the Expression of AcrEF and YhiUV Multidrug Transporters in Escherichia coli
AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 103rd General Meeting(WASHINGTON CONVENTION CENTER; May 18-22, 2003)
- 田村憲久、齋藤麻美、平田隆弘、村上聡、山口明人
大腸菌多剤排出タンパク質 AcrB の基質特異性に関わる残基の同定
第 76 回日本細菌学会総会(平成 15 年 4 月 1-3 日、熊本)
- 小林伸好、西野邦彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌 ABC 型マクロライド排出輸送体 MacB のトポロジー解析
第 76 回日本細菌学会総会(平成 15 年 4 月 1-3 日、熊本)
- 齋藤麻美、田村憲久、平田隆弘、村上聡、山口明人
大腸菌主要多剤排出タンパク AcrB の分子構造に基づいた機能残基の同定
第 76 回日本細菌学会総会(平成 15 年 4 月 1-3 日、熊本)
- 稲角嘉彦、平川秀忠、平田隆弘、山口明人
大腸菌異物排出蛋白質 MdtEF の誘導物質探索
日本薬学会第 124 年会(平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎)
- 石橋史旭、田村憲久、村上 聡、山口明人
大腸菌多剤排出蛋白質 AcrB の膜貫通領域における基質透過経路の探索
日本薬学会第 124 年会(平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎)
- 小林直木、田村憲久、村上 聡、山口明人

AcrB/AcrD キメラ蛋白質を用いた基質認識部位の探索
日本薬学会第 124 年会(平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎)

○橋本 聡文、久保 義行、平田 隆弘、山口 明人
新規マウス RND 型膜蛋白質の検索と発現解析
日本薬学会第 124 年会(平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎)

○田村憲久、齋藤麻美、村上聡、山口明人
大腸菌多剤排出タンパク質 AcrB の結晶構造に基づく部位特異的変異導入
日本薬学会第 124 年会(平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎)

○久保義行、関谷明香、山口明人
ABC 輸送体 ABCA5 の細胞生物学的解析
日本薬学会第 124 年会(平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎)

○平川秀忠、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人
細胞間情報伝達シグナルによる異物排出タンパク質の発現誘導
日本薬学会第 124 年会(平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎)

○Kunihiko Nishino
The Study of Bacterial Drug Resistance Regulation by Nano-scale Signal Transduction Molecule
International Symposium on 21st century COE program -Towards creating new industries based
on inter-nanoscience(平成 15 年 3 月 12 日、大阪大学)

○Noriyoshi Tamura
Mechanism for the Substrate Recognition of Multidrug Efflux Transporter AcrB of *E.coli*
International Symposium on 21st century COE program -Towards creating new industries based
on inter-nanoscience(平成 15 年 3 月 12 日、大阪大学)

○Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima and Eiki Yamashita
Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB
Gordon Research Conferences(Multi-Drug Efflux Systems)(Four Points Sheraton,USA; March
9-14, 2003)

○Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi
X-ray crystallographic analysis of bacterial multidrug efflux transporter AcrB
Gordon Research Conferences(Multi-Drug Efflux Systems)(Four Points Sheraton,USA; March
9-14, 2003)

○Kunihiko Nishino, Hidetada Hirakawa and Akihito Yamaguchi
Comprehensive Analysis of Drug Resistance Modulated by Drug Efflux and Two-Component
Regulatory Systems in *Escherichia coli*
Gordon Research Conferences(Multi-Drug Efflux Systems)(Four Points Sheraton,USA; March
9-14, 2003)

○村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB
理研シンポジウム(平成 15 年 1 月 23 日-24 日、兵庫)

○平川秀忠、西野邦彦、山田純子、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌レスポンスレギュレーターによる異物排出蛋白質発現制御メカニズムの解析
第 25 回日本分子生物学会年会(平成 14 年 12 月 11 日～12 月 14 日横浜市、パシフィコ横浜)

○西野邦彦、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌レスポンスレギュレーターEvgA 過剰発現株を用いたアレイ解析
第 25 回日本分子生物学会年会(平成 14 年 12 月 11 日～12 月 14 日横浜市、パシフィコ横浜)

○Takahiro Hirata, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi
Overproduction of EvgA, a response regulator of two-component signal transduction system,
confers the multidrug-resistance and acid-resistance in *Escherichia coli*
International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2002 (平成 14 年 12 月 12-13
日 大阪)

○小林伸好、田村憲久、西野邦彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌 ABC 型マクロライド排出タンパク MacB のトポロジー解析
第 24 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 14 年 11 月 7-8 日、名古屋)

○久保義行、関谷明香、山口明人、名田茂之
新規脳・精巢型 ABC 膜輸送体ノックアウトマウス作成と機能解析
第 24 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 14 年 11 月 7-8 日、名古屋)

○齋藤麻美、田村憲久、村上聡、平田隆弘、山口明人
大腸菌異物排出トランスポーターAcrB の結晶構造に基づいた部位特異的変異導入法による異
物輸送メカニズム解析
第 24 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 14 年 11 月 7-8 日、名古屋)

○平川秀忠、西野邦彦、山田純子、稲角嘉彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌レスポンスレギュレーターによる異物排出蛋白質の発現制御
第 24 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(平成 14 年 11 月 7-8 日、名古屋)

○田村 憲久、平田 隆弘、山口 明人
テトラサイクリン排出蛋白 TetA(B)のトポロジー形成 -N 末端側を中心に-
第 75 回日本生化学会大会(平成 14 年 10 月 14-17 日、京都)

○小林 伸好、西野 邦彦、田村 憲久、平田 隆弘、山口 明人
大腸菌 ABC 型マクロライド排出体 MacB の耐性化因子としての役割とそのトポロジーの決定
第 75 回日本生化学会大会(平成 14 年 10 月 14-17 日、京都)

○齋藤麻美、田村憲久、西野邦彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌多剤排出タンパク質 AcrB の機能残基検索と解析
第 75 回日本生化学会大会(平成 14 年 10 月 14-17 日、京都)

○平川秀忠、西野邦彦、山田純子、平田隆弘、山口明人
大腸菌二成分情報伝達系を介した薬剤耐性化メカニズムの解析
第 75 回日本生化学会大会(平成 14 年 10 月 14-17 日、京都)

○田村 憲久、平田 隆弘、山口 明人
テトラサイクリン排出タンパク質のトポロジー形成

生体エネルギー研究会第 28 回討論会(平成 14 年 8 月 22-25 日、高知)

○西野邦彦、平川秀忠、平田隆弘、○山口明人
大腸菌異物排出輸送体の網羅的解析と二成分情報伝達系による発現調節機構
生体エネルギー研究会第 28 回討論会(平成 14 年 8 月 22-25 日、高知)

○Akihito Yamaguchi, Satoshi Murakami, Ryouyuke Nakashima and Eiki Yamashita
Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB
Gordon Research Conference(Membrane Transport Proteins) (平成 14 年 7 月 20-31 日、米国)

○Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi
Two-component signal transduction system that regulates multidrug transporters in *Escherichia coli*
American Society for Microbiology 102nd General Meeting(平成 14 年 5 月、米国)

○齋藤麻美、西野邦彦、平田隆弘、山口明人、村上聡、田村憲久
大腸菌多剤排出タンパク質 AcrB の機能残基の検索と解析
第 75 回細菌学会総会(平成 14 年 4 月 4 日、横浜)

○平川秀忠、西野邦彦、山口明人
大腸菌推定二成分情報伝達系遺伝子発現ライブラリ構築と解析
第 75 回細菌学会総会(平成 14 年 4 月 4 日、横浜)

○西野邦彦、山口明人
情報伝達による薬剤排出蛋白発現制御機構の解析
第 75 回細菌学会総会(平成 14 年 4 月 4 日、横浜)

○田村憲久、山口明人
テトラサイクリン排出タンパク TetA のトポロジー形成機構
日本薬学会第 122 年会(平成 14 年 3 月 26-28 日、千葉市、幕張メッセ)

○小林伸好、西野邦彦、平田隆弘、山口明人
大腸菌新規マクロライド特異的 ABC 型排出システム MacAB の構造機能解析
日本薬学会第 122 年会(平成 14 年 3 月 26-28 日、千葉市、幕張メッセ)

○平田隆弘、齋藤麻美、田村憲久、村上聡、山口明人
大腸菌多剤排出タンパク AcrB の生化学的・蛋白工学的解析
日本薬学会第 122 年会(平成 14 年 3 月 26-28 日、千葉市、幕張メッセ)

○西野邦彦、平川秀忠、山口明人
二成分情報伝達系による多剤排出蛋白遺伝子発現制御
日本薬学会第 122 年会(平成 14 年 3 月 26-28 日、千葉市、幕張メッセ)

(4)特許出願

①国内出願 (5 件)

1. 発明の名称: 温度調節装置およびそれを用いたタンパク質結晶化装置 発明者:
安達宏昭、出願人: 安達宏昭、出願日: 2004 年 1 月 20 日、出願番号: 特願
2004-011704

2. 発明の名称:L-システイン生産菌及びL-システインの製造法,発明者:高木博史、中森茂、山口明人、西野邦彦、出願人:味の素株式会社、出願日:2004年3月31日、出願番号:特願2004-103652
3. 発明の名称:高分子結晶の製造方法及び高分子結晶育成装置,発明者:北野博史、安達宏昭、出願人:株式会社ニコン、安達宏昭、佐々木孝友、森勇介、高野和文、井上豪、松村浩由、村上聡、出願日:2004年9月8日、出願番号:特願2004-261541
4. 発明の名称:細胞検体の異物排出活性検出方法、及びその利用、発明者:飯野亮太、西野邦彦、仲田昌義、榊原昇一、山口明人、野地博行、出願人:国立大阪大学法人大阪大学、出願日:2006年10月30日、出願番号:特許出願2006-294558
5. 発明の名称:オートインデューサー-2受容体のモデレーター、発明者:加藤修雄、平岡正光、大神田淳子、河野富一、山口明人、平田隆弘、西野邦彦、恵比須繁之、Bonnie L. Bassler、出願人:国立大学法人大阪大学、出願日:2007年3月1日、出願番号:特願2007-056450

②海外出願 (3件)

1. 発明の名称:(US patent)L-cysteine producing microorganism and method for producing L-cysteine, 発明者:高木博史、中森茂、山口明人、西野邦彦、出願人:味の素株式会社、出願日:2004年10月5日、出願番号:2005-0221453
2. 発明の名称:(国際出願)Temperature controller and protein crystallizer utilizing the same apparatus, 発明者:(全ての指定国について)安達宏昭、(米国についてのみ)佐々木孝友、森勇介、高野和文、井上豪、松村浩由、村上聡、出願人:(全ての指定国について)安達宏昭、(米国についてのみ)佐々木孝友、森勇介、高野和文、井上豪、松村浩由、村上聡、出願日:2005年1月19日、出願番号:PCT/JP2005/000585
3. 発明の名称:(国際出願)Process for producing polymer crystal and polymer crystal growing apparatus, 発明者:出願人および発明者:安達宏昭、発明者および出願人(米国についてのみ):北野博史、出願人:(全ての指定国について)安達宏昭、(米国についてのみ)北野博史、(米国を除く全ての指定国について)佐々木孝友、森勇介、高野和文、井上豪、松村浩由、村上聡、株式会社ニコン、出願日:2005年9月7日、出願番号:PCT/JP2005/016405

(5)受賞等

①受賞

山口明人 平成20年 日本薬学会賞

山口明人 平成20年 日本細菌学会 浅川賞

村上 聡 平成19年 文部科学大臣表彰・若手科学者賞

西野邦彦 平成14年 米国微生物学会・Student Travel Grant Award

西野邦彦 平成15年 日本細菌学会・黒屋奨学賞

西野邦彦 平成17年 Science誌-米国科学振興協会(AAAS)・Young Scientist Award

平川秀忠 平成17年 米国微生物学会・Student Travel Grant Award

西野邦彦 平成 18 年 井上科学振興財団・第 22 回(平成 17 年度)井上研究奨励賞

西野邦彦 平成 18 年 Invitrogen 社-Nature 誌・Biotechnology Award 2006

村上聡 平成 19 年 文部科学省・平成 19 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰・科学技術賞(若手科学者賞)

西野邦彦 平成 18 年 財団法人 日本抗生物質学術協議会・日本抗生物質学術協議会奨励賞

西野邦彦 平成 19 年 日本化学療法学会西日本支部・第 2 回日本化学療法学会西日本支部支部長賞

②新聞報道

日本工業、2002 年 10 月 10 日

「多剤排出タンパク質の立体構造“SP-8”で解析 阪大が初 病原菌の薬剤耐性抑制へ」

日経産業、2002 年 10 月 10 日

「薬剤耐性たんぱく質の構造を解明 阪大、院内感染防御に道」

日経、2002 年 10 月 10 日

「耐性菌に薬剤の「排出口」を確認」

日刊工業、2002 年 10 月 10 日

「薬剤効能弱めるたんぱく質 阪大が立体構造解明」

日本工業新聞、2002 年 11 月 27 日

「バイオテクノロジー ポストゲノム研究で成果 タンパク質舞台に可能性広がる 阪大産業科学研究所 多剤排出タンパク質の立体構造解析に成功 新薬開発に期待」

科学新聞、2003 年 6 月 13 日、第 2952 号

「拠点形成実施計画 5 つの研究グループを編成 ナノバイオグループ 生体分子を機械として臨床にまで応用展開」

読売新聞、2006 年 8 月 17 日

「多剤耐性菌 仕組み解明 阪大助教授ら」

朝日新聞、2006 年 8 月 17 日

「薬の効果なくすたんぱく質 阪大が排出の仕組み解明」

日本経済新聞、2006 年 8 月 17 日

「薬が効かなくなる病原菌 耐性の仕組み解明 阪大グループ」

毎日新聞、2006 年 8 月 17 日

「院内感染克服に“光” 病原菌耐性化 メカニズム解明 阪大グループ」

科学新聞、2007 年 4 月 1 日

「平成 19 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 日々の研鑽『栄誉の春』 若手科学者賞」

科学新聞、2007年11月16日
「期待の抗生物質研究 住木・梅沢記念賞と奨励賞 受賞者決定」

③その他

Chemistry in BRITAIN, December 2002
「FRONTIERS “Drug trafficking exposed”」

“It takes three to tango.”

Nature Biotechnol. 2002, 20:1210-1212. Lomovskaya O, Zgurskaya HI, Nikaido H.

The recently determined high-resolution crystal structure of the bacterial multidrug resistance transporter AcrB brings us one step closer to the design of more effective therapeutic agents.

ANNUAL REPORT OF OSAKA UNIVERSITY Academic Achievement 2002-2003 Volume4
「Osaka University 100 Papers: 10 Selected Papers “Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB”」

Natural Product Reports, Volume22, Number4, August 2005
「REVIEW “Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism?”」

平成18年にサイエンスフロンティア21という番組で、「薬が効かない原因を探る！」というタイトルでテレビ放映

ANNUAL REPORT OF OSAKA UNIVERSITY Academic Achievement 2006-2007 Volume8
「Osaka University 100 Papers: 10 Selected Papers “Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism”」

(6)その他特記事項

7 研究期間中の主な活動
ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要

8 結び

杉山雄一先生の分担研究者として頂いていたCREST「異物排出の分子基盤」から数えると、10年間連続してCRESTによる研究助成を頂いたことになる。大阪大学産業科学研究所に教授として着任してから足かけ12年のうち、大部分をCRESTに助けて頂いた。私の阪大での研究成果はCRESTのおかげと深く感謝している。

本研究課題を企画した時点では、構造決定されているトランスポーターは皆無だった。膜を介して物質を異動させる膜タンパク質としては、チャンネル(ポリンを含む)、イオンポンプ、トランスポータ

一の3種類がある。このうち、量的に最も少なく、生化学的解析には適さない(従って結晶化は難しい)と一般に思われていたイオンチャネルの構造が最も早く、1998年、McKinnonにより決定された。最初のイオンポンプ構造決定は、我が国の豊島らによるCa²⁺-ATPase(2000)。種類が最も多く、産生量もそこそこあって、生化学的解析では非常に古くから進んでいたトランスポーターの結晶構造だけが取り残された形だった。トランスポーターは比較的大きな基質を運ぶので、反応過程でのコンホメーション変化が大きく、分子の形が一定しないため結晶化に向いていないのではないかと危惧されていた。

私たちは、村上准教授(当時は助手)を中心に異物排出タンパクの結晶化に取り組み、2001年には良い結晶を得た。この段階でCRESTを申請したのだが、X線回折像を示して説明したけれども、最後まで解ききることができることを信じて貰えず、平成13年度のタンパク領域での第一回の時の採択はならなかった。翌年、結晶構造決定に成功し、Nature誌に報告される事になった段階で、平成14年度に採択された。結晶解析のようなリスクな研究の場合、それも、当該分野で全く結晶解析が成功していないという状況の中で、この課題はものになるということを見極めて頂くことは、自分が審査員だったとしても難しいことであると思うが、CRESTの様な、戦略的創造研究と名うった研究費であればあるほど、そういった先見性に投資するという形があれば、研究費が後手に回らず、より活かして使えるのには思う。

研究費の使い勝手としては、科研費よりはるかに上だと感じる。研究には、真水の研究費だけでなく、実験室の整備や、研究環境の向上、事務処理等いろいろな関連経費が必要である。科研費はこういうものには原則支出できず、運営交付金(旧校費)しか使えないが、運営交付金は競争的資金ではなく、極めて限られた資金でしかない。現在、間接経費というものも科研費でも措置されるようになってきているのは前進であるが、大学の方針によっては、間接経費は獲得した人には全く還元されない。また、CRESTの事務所の存在も大いに役立った。経費節約のためとはいえ、CREST事務所廃止、全学大学への委託研究費という現在の流れは、第2の科研費になるだけであり、何とも残念な傾向であると思っている。

本CRESTでは、約束した構造に基づく輸送機構の解明、多剤認識機構の解明が共に、基質結合型結晶構造決定により、予想していた以上に見事に解明できたのは、非常に幸いなことであった。今日では、次々とトランスポーターの構造決定がなされ、もはやポストストラクチャー時代に入った感があるが、その時代を拓く先導的役割を果たすことができたエポックメイキングな課題であったと自負している。発現制御機構の面でも大きな進歩があった。宿主や他の細菌の存在に反応して異物排出タンパクが輸送されてくる仕組みがわかってきた。

本CRESTの実績を元に、私(山口)が平成20年の日本薬学会賞、日本細菌学会浅川賞をダブル受賞したのははじめ、村上聡さんが文部科学大臣表彰若手科学者賞、西野邦彦さんがYoung Scientist Awardなど、様々な顕彰を受けた。世界トップレベルの研究水準を維持するのにちょうど良いサイズで、効率の良いCRESTの様な研究助成システムが今後も発展し続いていくことを心より期待している。