

テトラサイクリン排出蛋白の
遺伝子工学的研究

1996年

染谷 雄一

目次

序論	4
第1章 材料と方法	13
第1節 実験材料	13
1. 菌株とプラスミド	
2. 培地	
3. 抗生物質、放射性同位体標識化合物、遺伝子工学研究用試薬類、その他の試薬	
4. 抗血清	
第2節 遺伝子工学的手法	16
1. DNA調製法	
2. 制限酵素、修飾酵素反応	
3. DNAの電気泳動	
4. 変異導入法	
5. DNA塩基配列決定法	
第3節 細菌学的手法及び生化学的手法	17
1. 薬剤感受性測定法	
2. 大腸菌リン脂質の調製	
3. 超音波破碎膜の調製	
4. 反転膜小胞の調製	
5. 内膜画分の調製、界面活性剤による可溶化	
6. テトラサイクリン排出蛋白の精製	
7. テトラサイクリン排出蛋白のリボソームへの再構成	
8. 蛋白質定量法	
9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	
10. イムノブロッティング	
11. [¹⁴ C]N-エチルマレイミド結合性の測定	
12. テトラサイクリン輸送活性測定法	
13. プロトン輸送測定法	
14. ジヒドロ葉酸還元酵素活性測定法	
15. β-ラクタマーゼ活性測定法	
第2章 細胞質側親水性領域に存在する保存性配列モチーフGXXXDRXGRRの役割	23
第1節 はじめに	23
第2節 部位限局ランダム変異導入、部位特異的変異導入による重要残基の検索	25
第3節 2つのGly残基の役割	30
第4節 正荷電残基の役割	33
第5節 Cys変異体へのSH修飾試薬の作用	35
第6節 考察	35

第3章 保存性配列モチーフGXXXDRXGRの第9番目残基Arg70の役割	41
第1節 はじめに	41
第2節 Arg70残基の部位特異置換	41
第3節 Arg70→Cys変異体のHg ²⁺ イオンによる活性化	44
第4節 Arg70→Cys変異体へのSH修飾試薬の作用	46
第5節 考察	50
第4章 Arg70残基変異体の抑圧変異体の解析	52
第1節 はじめに	52
第2節 Arg70→Cys変異体産生株からのテトラサイクリン耐性上昇抑圧変異株の分離	52
第3節 Arg70→Cys変異抑圧に対する171位残基の要求性	54
第4節 Thr171→Ser変異の種々の70位変異への効果	59
第5節 Arg70→Cys変異体の抑圧変異体へのHg ²⁺ の効果	61
第6節 Thr171→Ser変異による70位変異抑圧へのArg67、Arg71残基変異の効果	61
第7節 Cys変異体への <i>N</i> -エチルマレイミドの作用	67
第8節 考察	67
第5章 Arg70残基周辺の電荷-電荷相互作用に関する解析	70
第1節 はじめに	70
第2節 Arg70→Ala/Asp120→Asn二重変異体の性質	71
第3節 Arg70→Cys/Asp120→Cys二重変異体の性質	74
第4節 考察	77
第6章 膜貫通領域必須酸性残基Asp285のAsn変異体の抑圧変異体の解析	80
第1節 はじめに	80
第2節 Asp285→Asn変異体からのテトラサイクリン耐性回復抑圧変異体の分離	80
第3節 Asp285→Asn変異抑圧に対する220位残基の要求性	81
第4節 220位変異のAsp285→Lys変異への効果	85
第5節 Ala220周辺残基のGlu置換のAsp285→Asn変異への効果	86
第6節 考察	90
第7章 テトラサイクリン排出蛋白の精製とリポソームへの再構成	94
第1節 はじめに	94
第2節 テトラサイクリン排出蛋白の大量発現系の構築	94
第3節 テトラサイクリン排出蛋白の可溶化、精製	99
第4節 テトラサイクリン排出蛋白の大腸菌H ⁺ -ATPaseとのリポソームへの再構成	101
第5節 考察	104

第8章	テトラサイクリン排出蛋白とジヒドロ葉酸還元酵素、 β -ラクタマーゼとの融合蛋白の作成、 機能解析と精製	106
第1節	はじめに	106
第2節	融合蛋白大量発現系の構築	106
第3節	融合蛋白の精製	114
第4節	考察	114
第9章	<i>tetA</i> 遺伝子の二分割と分割遺伝子の同時発現	117
第1節	はじめに	117
第2節	二分割 <i>tetA</i> 遺伝子の単独及び同時発現系の構築	118
第3節	二分割蛋白の発現	121
第4節	二分割蛋白の機能	123
第5節	考察	123
第10章	新規テトラサイクリン系抗生剤、グリシルサイクリンのテトラサイクリン排出蛋白への作用	126
第1節	はじめに	126
第2節	グリシルサイクリンの抗菌活性	128
第3節	グリシルサイクリンによるテトラサイクリン耐性遺伝子の発現誘導	128
第4節	輸送基質としてのグリシルサイクリンの評価	128
第5節	考察	131
総括	132
謝辞	135
参考文献	136
論文目録	157

序論

すべての細胞は、生命を維持するため、必須の栄養素を外界から取り込み、毒性の強い物質を外界へ吐き出す必要がある。この細胞内と外界との間で物質の輸送の多くは細胞質膜に存在する蛋白質（輸送担体、膜輸送蛋白）によって仲介されている。輸送担体は大きく、物理的エネルギー（光など）や化学的エネルギー（ATPなど）を物質の輸送に変換する一次性能動輸送体と、一次性能動輸送により形成されたイオン（主として H^+ あるいは Na^+ ）の電気化学的ポテンシャルを別の物質の輸送に変換する二次性能動輸送体とに分けられる。二次性能動輸送体は更に共役イオンと物質の輸送の方向により共輸送体（シンポーター、symporter）と逆輸送体（アンチポーター、antiporter）とに分類される。また、特定の輸送担体を介していても共役イオンを必要とせず、単に濃度勾配に従って物質の輸送を仲介する促進拡散担体（ユニポーター、uniporter）も二次性能動輸送体に含まれる(1)。このように生物界における普遍性を持ちつつも、輸送担体の原子レベルでの立体構造と分子レベルでの物質輸送機構はほとんど明らかにされていない。その原因として、可溶性酵素においては比較的容易に得られる結晶学的解析に基づいた立体構造に関する情報が、膜輸送蛋白においては非常に困難を要することがひとつ挙げられる。膜蛋白質は、疎水性の強い脂質二重層の中に埋もれているので、疎水性部分に富んでいる。この性質が、三次元結晶を形成しにくくさせる主要因であり、高次構造解析の大きな障壁となっている。現在、X線結晶構造解析により三次元結晶構造が明らかにされた膜蛋白質は数例あるが、いずれも親水性部分を複雑なサブユニット構造の中に持ち合わせているものである。それに比べると、膜輸送蛋白の中でも二次性能動輸送体はそのほとんどが疎水性領域であるため、より一層の困難を極めると思われる。それ故、現在の蛋白質工学的研究分野において、二次性能動輸送体の三次元立体構造を解明することは最も待ち望まれる課題であると言っても過言ではない。

筆者は、二次性能動輸送体の三次元立体構造を解明すべくそのモデル系として、細菌のテトラサイクリン排出蛋白（TetA）(2,3)を取り上げた。これは、テトラサイクリン・2価カチオンキレート体と H^+ との1対1の逆輸送により薬剤を細胞外に排出する膜蛋白であり(4)、それ故、テトラサイクリン/ H^+ アンチポーター（metal-tetracycline/ H^+ antiporter）と呼ばれる（Figure 1）(5)。TetAが二次性能動輸送体のひとつであるという側面に加え、近年臨床上問題になっている抗生物質や化学療法剤に対する耐性の主たる原因蛋白のひとつであるという側面も持っている。TetAは薬剤（テトラサイクリン系抗生物質）を細胞外へ排出することにより耐性化させる初めての蛋白質として明らかにされた蛋白である。排出による薬剤耐性は、現在では、三大耐性機構（①薬剤分解・修飾酵素の産生、②薬剤作用点の変化および薬剤標的酵素の生産量増加、③薬剤の膜透過性の低下）のひとつ（③に含まれる）として認知され(6-9)、テトラサイクリン系薬剤以外に、従来①や②が耐性の主たる原因であった抗生物質、化学療法剤（マクロライド系抗生物質、クロラムフェニコール、ニューキノロン剤など）についても排出による耐性化が様々な菌種において見いだされている（Table 1）(8,10,11)。また、構造的に共通性のない種々の薬剤（化学療法剤のほか、消毒剤など毒性物質も含む）を排出し、多剤耐性をもたらす排出蛋白もまた様々な菌種において見いだされ、近年特に問題視されている。これはちょうど哺乳動物のガン細胞において多剤耐性を仲介するP-糖蛋白（P-glycoprotein）(12-14)あるいはMRP（multidrug resistance-related protein）(15-18)、LRP（lung resistance-related protein）(19,20)がガンの化学療法上問題視されているのと同様である。P-糖蛋白、MRPはATP加水分解のエネルギーを利用して、構造上類似性のない種々の抗悪性腫瘍剤を能動的に細胞外に排出する一次性能動輸送体のひとつであるが、その構造機能相関の解明に向けた研究が多く研究グループにより盛んに行われている。また、二次性能動輸送体の一種も生体異物排除系の中に存在し、クロマフィン顆粒やシナプス小胞においてはモノアミン輸送体（CGAT; chromaffin granule amine transporter、SVAT; synaptic vesicle amine transporter）が細胞内小胞に濃縮し(21,22)、腎近位尿細管上皮細胞

胞においては有機カチオン輸送体 (OCT1; organic cation transporter) が尿細管中に排泄し、無毒化する(23)ことが最近示唆され、注目されている。

テトラサイクリン耐性因子 (*tet*遺伝子) のほとんどはRプラスミドあるいはトランスポゾン上に見いだされ、耐性の基質特異性、耐性遺伝子のDNA-DNAハイブリダイゼーション、耐性蛋白のアミノ酸一次配列の相同性などから幾つかのクラスに分類されている (Table 2) (11,24,25)。また、最近では、排出による耐性以外にも、耐性蛋白がテトラサイクリン分子の標的であるリボソームを保護することによる耐性、更にはテトラサイクリン分子を修飾 (不活性化) することによる耐性も見いだされている。薬剤排出を仲介するグラム陰性細菌由来の *tet* 遺伝子は、クラスA~EとG、Hに、グラム陽性細菌由来の *tet* 遺伝子は、クラスKとLに分類されている。前者は構造遺伝子 *tetA* と調節遺伝子 *tetR* とから構成されるのに対し、後者は構造遺伝子しか持たない。これは発現調節機構の相違によるが、後者ではプロモーター領域と構造遺伝子の間に存在するリーダーペプチドコード領域のために翻訳時アテニューエーション機構が作動する(26-28)。前者においては、それぞれの遺伝子は重複したプロモーター領域から逆方向に転写される。TetR蛋白は通常プロモーター領域に重複するオペレーター領域に結合しているが、薬剤を結合するとオペレーター領域から解離し、両遺伝子の発現が誘導される (Figure 2) (29)。

ところで、テトラサイクリン分子がどのようにして細胞内に進入するかということがつい十数年前まで議論の的となっていた。というのも、テトラサイクリン感受性菌ではテトラサイクリン分子がエネルギー依存的に取り込まれ蓄積されるのに対し、耐性菌では蓄積量が減少することが観察されていた(30)ので、当初、細菌の細胞質膜には耐性菌では機能が抑制されるテトラサイクリンに特異的な誘導性の能動的取り込み系が存在すると考えられていた。しかし、この考えに反して、耐性を仲介する蛋白が発見されたのに対し、能動的取り込み系はついに発見されるにいたらなかったのである。この問題に対する回答は、蛋白成分を全く含まないリボソームを用いることによって得られた(31)。内部pHが外部よりも高い人工的な Δ pHによってテトラサイクリン分子はリボソーム内部に取り込まれるので、細胞においては、細胞膜に形成される Δ pHに依存して電氣的に中性の分子型テトラサイクリンが脂質二重層を単純拡散することによって蓄積が起こることになる (Figure 1)。つまり、薬剤の細胞内への取り込みは特定の輸送担体を必要としないことが明らかになった。また、テトラサイクリン分子の3つの解離基のpKa値(32,33)から推測すると、弱アルカリ性の細胞内においては、 H^+ を解離し1価のアニオン型となり、 Mg^{2+} などの2価カチオンとキレートして蓄積されている。そして、耐性菌においてはテトラサイクリン排出蛋白がそのキレート体をプロトンとの逆輸送により細胞外へ輸送することになる (Figure 1) (5,31)。

筆者のテトラサイクリン排出蛋白の立体構造と輸送機構に関する研究では、トランスポゾンTn10に由来するクラスBの排出蛋白 (TetA(B)) を用いた。クラスA~EとG、HのTetAはアミノ酸一次配列において互いに高い相同性を有し、同一の祖先蛋白から進化したことを窺わせる。TetA(B)は、401個のアミノ酸残基から構成される(34,35)が、ヒドロパシー解析(35)、プロテアーゼによる蛋白限定分解(36)、抗体結合性実験の結果(37)、アルカリ性フォスファターゼ融合蛋白の解析結果(38)等により、グラム陰性細菌由来のTetAについては多くの二次性能動輸送体に共通の細胞質膜を12回貫通する二次構造が推定されている (Figure 3)。一般に12回貫通型二次性能動輸送体は細胞質側の中央の親水性ループ領域を境として6本ずつに成る2つの領域に分けられ、これらの中にアミノ酸一次配列の相同性が見られることから、6本の膜貫通領域をコードする祖先遺伝子がtandem duplicationによって現在の遺伝子が形成されたという説が唱えられている(39,40)。特にTetAではN末側半分が α 領域、C末側半分が β 領域と呼ばれるが、やはり両領域は互いに相同であり、原始 α 遺伝子が重複し(α/α)、派生する(α/β)ことによって*tetA*遺伝子が生じたと推測されている。一方、グラム陽性細菌由来の蛋白については14本の膜貫通領域を持つ二次構造がヒドロパシー解析により推定され(41)、N末側6本の膜貫通領域でグラム陰性細菌型の排出蛋白と相同性が比較的高いことから、tandem duplicationに依らずに、原始 α (6本の膜貫

通領域をコードする)に全く由来を別にする原始 β (8本の膜貫通領域をコードする)が融合し生じたとされている(10,42)。ところが、C末側8本のうち後半の6本の膜貫通領域は低いながらもグラム陰性細菌型の排出蛋白と相同性を示しているので、原始 α の tandem duplication とともに2本の余分な膜貫通領域が中央に挿入されて14本膜貫通型が生じたのかもしれない。あるいはその余分な2本は膜を貫通せず、膜貫通領域は全部で12本である可能性も考えられる(11)。

このような蛋白の進化論は、アミノ酸配列の相同性、特に、幾つかの保存性アミノ酸残基によって構成されるモチーフがその根底にあると思われる(43-48)。ユニポーター、シンポーター、アンチポーターのほとんどが12本の膜貫通領域を含む共通の二次構造を持つことでさえも、これら3種の二次性能動輸送体がそれぞれ別々に発生し、進化したものとは考えにくい。この考えを裏付けるかのように、これら3種には共通の保存性配列モチーフが数種存在している。しかも、tandem duplication説に一致して、このようなモチーフの多くは蛋白のN末側半分とC末側半分の相対応する位置に存在している。これらのことは、これら3種の二次性能動輸送体が同一の祖先輸送担体から進化したことを物語るのと同時に、基本的に同一のメカニズムによって、基質輸送およびイオンとの共役が説明されることを強く示唆している。

そこで、本研究ではまず、二次性能動輸送体保存性配列モチーフの中で最も保存性アミノ酸が集中する、Gly-X-X-X-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Argモチーフ(43,44)の役割について解析した。このモチーフは塩基性残基が多い中に酸性残基がひとつ存在するという特徴を持ち、12本膜貫通型、14本膜貫通型(現在のところアンチポーターのみ)を含め、ほとんど全ての二次性能動輸送体の第2膜貫通領域と第3膜貫通領域とを結ぶ細胞質側親水性領域(ループ2-3)に保存されている。また更に、12本膜貫通型ではC末側の第8膜貫通領域と第9膜貫通領域とを結ぶ細胞質側親水性領域に、14本膜貫通型アンチポーターでは第10膜貫通領域と第11膜貫通領域を結ぶ領域にも同種あるいは類似のモチーフが保存され(11)、tandem duplication説を支持する結果になっている。当研究室ではすでにTetA(B)のGly-X-X-X-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Argモチーフに含まれる、Ser65およびAsp66残基の部位特異変異導入解析が行われている(49)。この連続する2残基は、排出を仲介するTetAの全てに保存されているので、Chopraが基質の認識結合部位であると考えていたものであった(50)。変異導入解析では、66位負電荷が機能に必須であること、Ser65はそれ自体必須ではないが、Cys65変異体がSH修飾試薬により修飾側鎖容積に依存した活性阻害を受けること、この活性阻害が基質によって保護されないことが見いだされた。その結果から、Ser65-Asp66は基質結合部位と言うよりはむしろ、66位の負電荷が輸送過程において基質と一時的に相互作用していると考えられ、このモチーフを含むループ2-3は基質透過経路の入り口に相当するゲートとして機能していると推定された(49)。この興味深い結果を受け、本研究ではループ2-3を構成する全アミノ酸残基に目を向け、部位特異変異導入解析を通して個々のアミノ酸残基の重要性を評価し、改めてこのモチーフの役割を考察した。

現在の膜蛋白質の構造機能研究では、部位特異的変異導入による解析が依然主流であるが、最近、抑圧変異体の解析もまた有用であることが種々の蛋白の解析を通して証明されてきた。ここでの抑圧変異体とは、あるアミノ酸置換によって機能が消失あるいは低下した変異体から分離される機能回復を起こした変異体を意味し、とりわけ第一のアミノ酸置換により低下した機能が別部位の第二のアミノ酸置換によって回復した(つまり、第一変異が第二変異により抑圧された)変異体(pseudo-revertant)を重要視している。というのは、これにより第一変異部位のアミノ酸残基と第二変異部位のアミノ酸残基が構造的に近いこと、変異により第一部位で失われたアミノ酸残基と第二部位に生じたアミノ酸残基とが機能的に等価であることなど、構造的機能的連関が一般的に示唆されるからである。ループ2-3の研究では、多くの部位特異変異体を作成し、その中に機能が消失あるいは低下した変異体が新たに幾つか見いだされることになる。そこで、そのうちのひとつ(70位Arg残基の変異体)を選び、抑圧変異体の分

離、解析を行うことにした。結果は上記のように単純に解釈されるものではなく、第二変異が蛋白のコンフォメーション変化を促すといった遠隔的な効果を第一変異部位近傍に及ぼしていると解釈された。また、以上の70位残基に関する部位特異的変異導入による解析と抑圧変異体の解析によって、ループ2-3のGly-X-X-X-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Argモチーフと、これに隣接するループ4-5に存在するAsp-X-X-X-X-X-X-Argモチーフとの相互作用が示唆されたので、この可能性についても若干の検討を加えることにした。Asp-X-X-X-X-X-X-Argモチーフもほとんど全ての二次性能動輸送体に保存される興味深いモチーフのひとつである(44)。

抑圧変異体の解析を更に膜貫通領域に存在する酸性残基についても行った。TetA(B)の膜貫通領域には4つの荷電アミノ酸残基が存在し (Figure 3)、いずれもグラム陰性細菌由来のTetA (クラスA~E、G、H) に保存されている。当研究室ではすでにこれら4つの保存性残基の部位特異変異導入解析が行われており、その重要性が指摘されている(51)。第8膜貫通領域のHis257はTetA(B)に存在する唯一重要なHis残基である(52,53)。現在は否定されているが、大腸菌ラクトース輸送体の膜貫通領域に存在するHis322残基がH⁺輸送に必須であるという考え(54-63)に基づいて、TetA(B)のHis257は他の19種類のアミノ酸残基に置換された。しかし、結果はむしろラクトース輸送体の場合と同様に、H⁺輸送への直接的な関与を否定するものであった(64,65)。しかしながら、257位は基質特異性に関与すること、His残基以外では活性が著しく低下または消失することから依然としてその重要性は注目すべきものである。残りの3つの荷電残基はすべてAsp残基で、第1膜貫通領域のAsp15、第3膜貫通領域のAsp84、第9膜貫通領域のAsp285である。Asp15やAsp84ではAsn置換で反転膜小胞でのテトラサイクリン輸送活性が著しく低下するものの、中程度のテトラサイクリン耐性を与えることができるのに対して、Asp285のAsn変異体は輸送活性が完全に消失し、また薬剤耐性も全く与えないというように、Asp285は膜貫通領域の3つの酸性残基の中で最も重要な役割を果たしている。これらの解析結果から、3つのAsp残基は基質(テトラサイクリン-2価カチオンキレート体)の認識結合に関与し、Asp285は更に共役イオン(H⁺)の輸送にも関与していると考えられた(51)。本研究では、Asp285のAsn変異体から薬剤耐性を与えることができる抑圧復帰変異体を分離し、その解析を系統的に行った。この解析では、第2変異として酸性残基の導入が同定され、膜貫通領域の酸性残基の重要性を示すと共に、第一変異部位と第二変異部位との間での機能的、構造的関係が明らかにされた。

以上の部位特異的変異導入解析、抑圧変異体の解析の結果から、テトラサイクリン/H⁺アンチポートの分子機構に関して、ある作業仮説を提出する。しかし、このモデルの中で示される残基間の相対的な位置関係や機能残基の役割を証明するためには、TetAの三次元立体構造の解明が必要である。そのためにはまず、目的蛋白を迅速に、大量にかつ適度な純度で得る系を準備する必要がある。そこで、本研究で、TetA(B)の大量発現系の構築、精製・再構成系の確立を行った。TetA(B)はマルチコピープラスミド上で発現させると耐性度が低下する、いわゆる負の遺伝子量効果(66-69)を示すので、これまで安定な大量発現系は報告されていなかったが、*tetA*遺伝子を*tetR*支配下から切り放し、マルチコピープラスミド上の*lac*プロモーター支配下に置き、*lacIq*変異大腸菌株を宿主とすることで、安定な大量発現系を得ることができ、大きな進展を見せた。また、内膜を適当な界面活性剤で可溶化後、DEAEイオン交換クロマトグラフィーにより一段階で活性を保持したまま精製する系を初めて確立し、結晶化のための蛋白標品を調製する系としても有用なものとなった。最初にも述べたように膜蛋白質は一般に疎水性が強いので、三次元結晶を形成しにくい。従って、親水性部分を多くすれば、その部分がいわゆる「たね」となって結晶化を促進されると期待される。そこで、三次元結晶構造既知の可溶性酵素(ジヒドロ葉酸還元酵素、β-ラクタマーゼ)を選び、TetAとの融合蛋白大量発現系の構築を行った。3種の融合蛋白遺伝子を作成したところ、いずれも融合蛋白の大量発現が確認されたので、可溶性酵素部分を用いてアフィニティ精製することを試みた。

また、TetA大量発現系を用いて、TetAの二分割発現を行った。Levyのグループは α 領域に機能的欠失のあるTetAと β 領域に機能的欠失のあるTetAを同時発現させると機能が相補されると報告している(70-73)。このことは別々のポリペプチドに由来する正常な α 領域と β 領域とが相互作用し、活性中心を形成していることを示し、TetAが少なくとも二量体を形成していることを示唆している(72)。また、Rubin and Levyは、*tetA(B)*遺伝子中央にフレームシフトを導入した変異遺伝子が部分的にテトラサイクリン耐性を付与することを観察し、 α 領域と β 領域との間の相互作用が更に示されることとなった(74)。しかし、この実験では β 領域ペプチドの開始点が明確でなく、ペプチド自身の検出も行われていない。この点を改善するため、*tetA(B)*遺伝子を蛋白中央の細胞質側親水性領域に相当する部位で明確に二分割し、それぞれの遺伝子断片を*lac*プロモーター支配下に置き、 α 領域、 β 領域のそれぞれの単独発現系と両領域の同時発現系を構築した。分割されたペプチド断片は免疫学的手法により確認され、細胞質膜への分子集合とテトラサイクリン輸送活性について検討された。

最後に、近年開発された新規テトラサイクリン系抗生剤、グリシルサイクリン(75)の評価を行った。グリシルサイクリンはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌など従来のテトラサイクリン耐性菌に対して優れた抗菌力を発揮することが知られ、注目されている。本研究ではグリシルサイクリンがTetA(B)を誘導するかどうか、つまりTetRと相互作用するかどうか、また、グリシルサイクリンがTetA(B)の輸送基質と成りうるかどうかについて検討した。

Table 1. Distribution of antibiotic/xenobiotic efflux proteins.

Classification	Efflux Protein	Substrate	Distribution	References
I. Major facilitator superfamily				
(1) 12-transmembrane-type	TetA(A), (B), (C), (D), (E), (G), (H)	tetracyclines	Gram-negative bacteria	See Table 2
	CmlA	chloramphenicol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76-78
	Bcr	bicyclomycin	<i>Escherichia coli</i>	79
	EmrD	multidrug	<i>Escherichia coli</i>	80
	NorA	new quinolones, multidrug	<i>Staphylococcus aureus</i>	81-84
	Bmr	multidrug	<i>Bacillus subtilis</i>	85-87
	Blt	multidrug	<i>Bacillus subtilis</i>	88
	LmrP	multidrug	<i>Lactobacillus lactis</i>	89
	CmrP	chloramphenicol	<i>Rhodococcus fascians</i>	90
	CmlR	chloramphenicol	<i>Streptomyces lividans</i>	91
	CGAT	monoamines	chromaffin granules	21
	SVAT	monoamines	synaptic vesicles	21
	OCT1	organic cations	renal proximal tubules	23
(2) 14-transmembrane-type	Tet (K), (L)	tetracyclines	Gram-positive bacteria	See Table 2
	QacA, QacB	multidrug	<i>Staphylococcus aureus</i>	92-95
	EmrAB	multidrug	<i>Escherichia coli</i>	96,97
	Mmr	methylenomycin A	<i>Streptomyces coelicolor</i>	98
	TcmA	tetracenomycin C	<i>Streptomyces glaucescens</i>	99,100
	LmrA	lincomycin	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	101
	ActII-ORF2	actinorhodin	<i>Streptomyces coelicolor</i>	102
	ActVA-ORF1	actinorhodin	<i>Streptomyces coelicolor</i>	103
	Pur8	puromycin	<i>Streptomyces alboniger</i>	104
	CmcT	cephamycin	<i>Nocardia lactamdurans</i>	105
II. 7-transmembrane-type	TetB (Tet347, OtrB)	tetracyclines	<i>Streptomyces rimosus</i>	106,107
III. 4-transmembrane-type	EmrE (Ebr, Mvr)	multidrug	<i>Escherichia coli</i>	108,109
	QacE	multidrug	<i>Klebsiella aerogenes</i>	110
	QacC/D (Smr,Ebr)	multidrug	<i>Staphylococcus aureus</i>	111-113
IV. RND family (resistance-nodulation-division)	AcrAB	multidrug	<i>Escherichia coli</i>	114,115
	EnvCD (AcrEF)	multidrug	<i>Escherichia coli</i>	114,116
	MexAB-OprM	multidrug	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	117-123
	MtrCDE	multidrug	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	124,125
V. ABC superfamily	MsrA	macrolides	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	126-129
	DrrAB	daunorubicin, doxorubicin	<i>Streptomyces peucetius</i>	130
	TlrC	tylosin	<i>Streptomyces fradiae</i>	131
	CarA	carbomycin	<i>Streptomyces thermotolerans</i>	132
	SrmB	spiramycin	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	133
	OleC	oleandomycin	<i>Streptomyces antibioticus</i>	134
	TnrB	tetronasin	<i>Streptomyces longisporoflavus</i>	135
	Ard1	A201A	<i>Streptomyces capreolus</i>	136

Table 1 (continued)

	Mdl	multidrug (?)	<i>Escherichia coli</i>	137
	P-glycoproteins	multidrug (anticancer drugs)	mammals	12-14
	MRP/GS-X pump	multidrug (anticancer drugs, glutathione conjugates)	mammals	15-18, 138,139
	LRP	multidrug (anticancer drugs)	mammals	19,20
	MOAT	organic anions	liver canalicular membrane	140,141
VI. Regulator	Mar operon	multidrug	<i>Escherichia coli</i>	142-146
	RamA	multidrug	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	147

Table 2. Classification and distribution of tetracycline resistance determinants in microorganisms.

Class	Mechanism	Distribution	References
A	Efflux	Enterobacteriaceae, <i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Pseudomonas</i>	148,149
B	Efflux	Enterobacteriaceae, <i>Haemophilus</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i>	34,35,150,151
C	Efflux	Enterobacteriaceae, <i>Vibrio</i> , <i>Pseudomonas</i>	152-154
D	Efflux	Enterobacteriaceae, <i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Pasteurella</i>	155-158
E	Efflux	<i>Aeromonas</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio salmonicida</i>	159-161
G	Efflux	<i>Vibrio anguillarum</i>	162,163
H	Efflux	<i>Pasteurella multocida</i>	164
K	Efflux	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i>	26,28,41
L	Efflux	<i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i>	27,165-172
M	Ribosomal protection	<i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> ; <i>Neisseria</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Kingella</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Fusobacterium</i>	173-179
O	Ribosomal protection	<i>Campylobacter</i> ; <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i>	180-182
P	Efflux & Ribosomal protection	<i>Clostridium perfringens</i>	183-185
Q	Ribosomal protection	<i>Bacteroides</i>	186,187
S	Ribosomal protection	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	188,189
X (F)	Modification + Efflux	<i>Bacteroides fragilis</i> (cryptic)	190-194

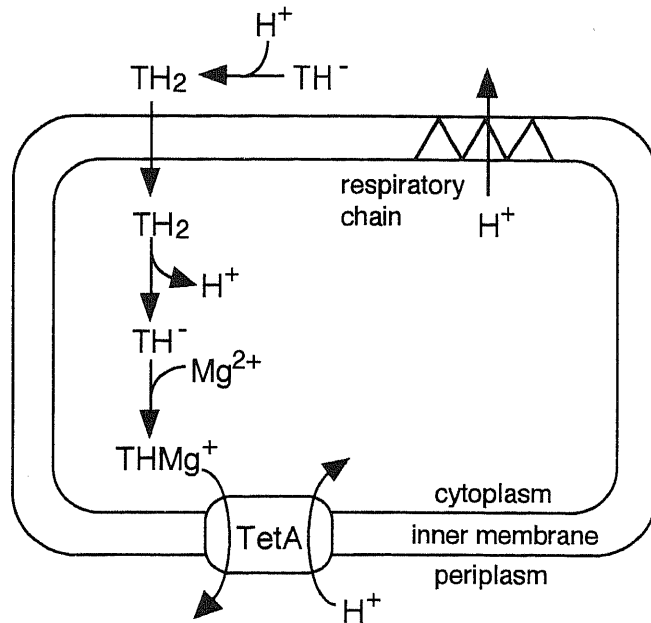


Figure 1. Mechanism of Δ pH-dependent tetracycline accumulation in cells and metal-tetracycline/ H^+ antiport by TetA. Tetracycline diffuses across the inner membrane as a protonated, electrically neutral form (TH_2). A monocationic chelate complex ($THMg^+$) of a magnesium ion and an anionic form (TH^-) is accumulated in tetracycline-susceptible cells. In tetracycline-resistant cells, a $THMg^+$ complex is excluded through an electrically neutral 1:1 exchange with a proton by TetA (5, 31).

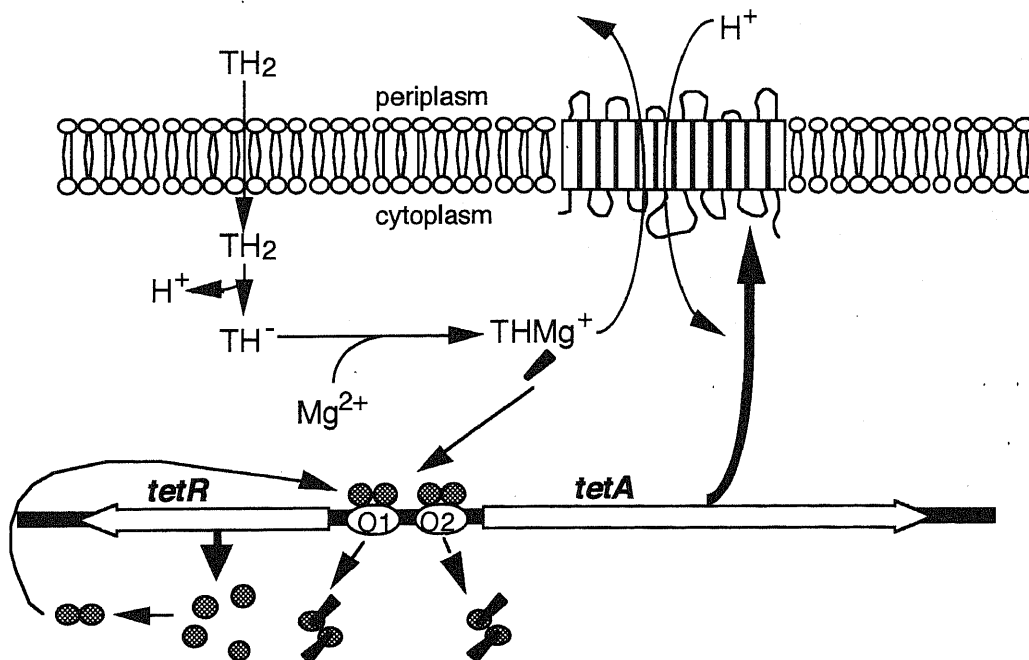


Figure 2. Mechanism of regulation of the tetracycline resistance determinants from Gram-negative bacteria. In the absence of tetracyclines, dimers of TetR, encoded by the *tetR* gene, bind to two tandem *tet* operators (O_1 and O_2) located between the *tetA* and *tetR* genes. The genes have divergent polarities and are transcribed from overlapping promoters. Tetracycline- Mg^{2+} complex ($THMg^+$) binds to the repressor-operator complex and triggers a conformational change in TetR so that expression of the *tet* genes is induced (29).

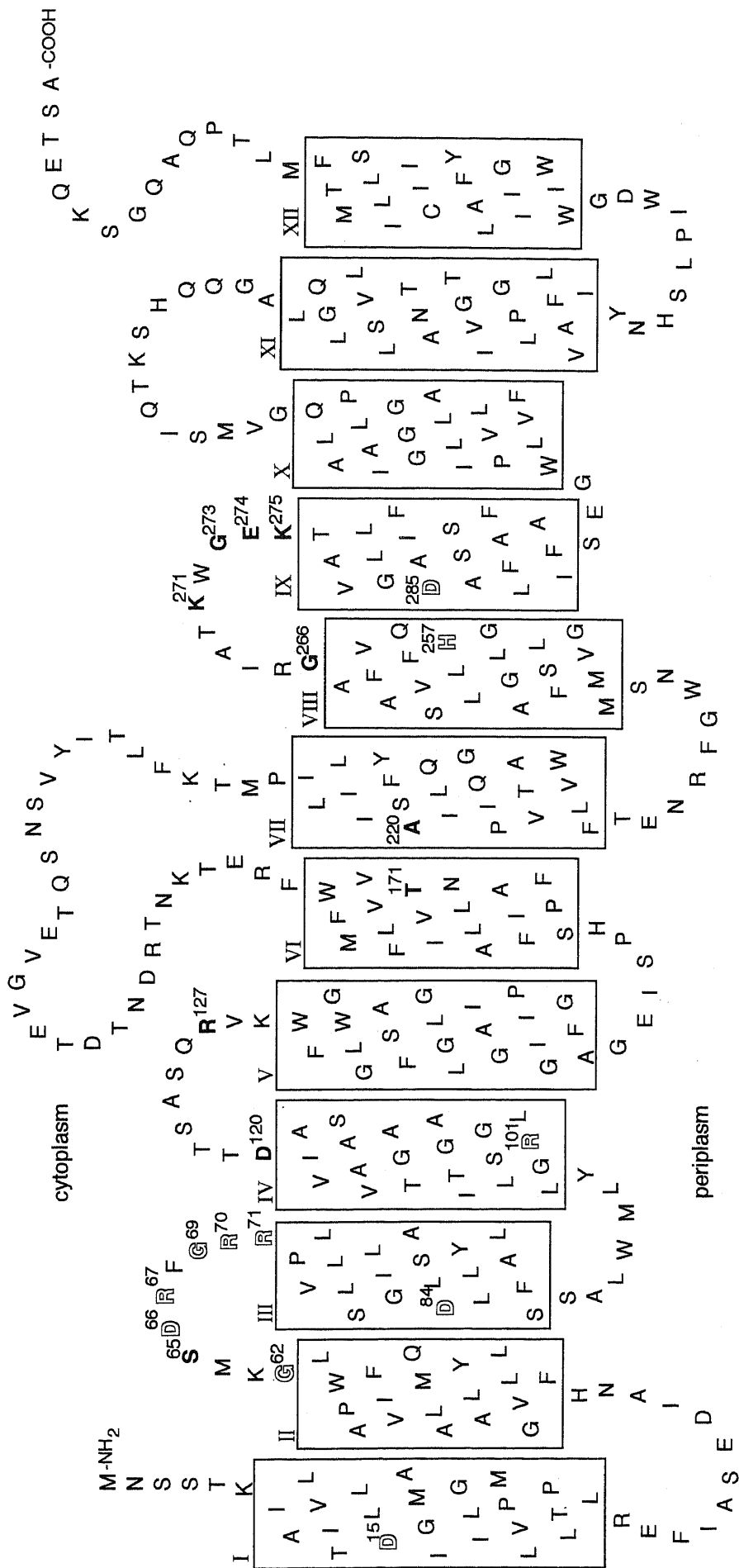


Figure 3. Secondary structure of the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter (TetA). Tn10-TetA is composed of 401 amino acid residues. The model is based on the hydropathy profile of the primary sequence (35), the limited proteolysis (36), the results of antibody binding (37), the analysis of the alkaline phosphatase fusions (38) and [¹⁴C]N-ethylmaleimide binding experiments for Cys-scanning mutants (195, 196). Hydrophobic α helical segments are boxed. The conserved sequence motifs in loop2-3 and loop8-9 are depicted by shaded or bold letters. Charged residues in transmembrane segments are also shown by shaded letters. Residues noted in this study are also shown by bold letters.

第1章 材料と方法

第1節 実験材料

1. 菌株とプラスミド

実験に使用した大腸菌株をTable 1-1に示した。すべて大腸菌K-12株由来のものである。

Strain	Genotype	Reference
TG1	$\Delta(lac, proAB), supE, thi, hsdD5 / F' traD36, proA^+B^+, lacI^qZ \Delta M15$	197
W3104 ^{rif}	$galT12, rpoB \lambda^- F^-$	198
MV1184	$\Delta(lac, proAB), ara, strA, thi, (\phi 80 lacZ \Delta M15), \Delta(srl, recA)306::Tn10 / F' traD36, proA^+B^+, lacI^qZ \Delta M15$	199
JM109	$recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, \lambda^-, \Delta(lac, proAB) / F' traD36 proA^+B^+ lacI^qZ \Delta M15$	200
JM110	$dam, dcm, hsdR17, supE44, thi, leu, rpsL, lacY, galK, galT, ara, tonA, thr, tsx, \Delta(lac, proAB) / F' traD36, proA^+B^+, lacI^qZ \Delta M15$	200
CJ236	$dut-1, ung-1, relA1, thi-1 / pCJ105 (cam^r F')$	201, 202
BMH71-18 <i>mutS</i>	$\Delta(lac, proAB), thi, supE, mutS215::Tn10 / F' traD36, proA^+B^+, lacI^qZ \Delta M15$	201, 202
RB791	W3110 $lacI^qL8$	203
DK8/pBWU13	$\Delta uncB-C, ilv::Tn10, thi / Amp^r unc^+$	204-206

プラスミドDNAの調製には通常TG1株を使用した。ただし、dam methylase、dcm methylaseの影響を受ける制限酵素でプラスミドDNAを消化する場合には、JM110株を使用した。ライゲーション反応および変異導入後の形質転換にはTG1株を使用した。ssDNAの調製にはMV1184株あるいはJM109株を使用した。デオキシウラシルを含むssDNAの調製にはCJ236株を使用した。Kunkel法(201,202)による変異導入操作にBMH71-18 *mutS*株を使用した。反転膜小胞の調製にはW3104^{rif}株およびRB791株を使用した。特に、RB791株は*lac*プロモーター支配下に置かれた遺伝子発現に用いられた。薬剤感受性の測定には通常W3104^{rif}株を使用した。二井博士、森山博士より分与されたDK8/pBWU13株はH⁺-ATPase(F₀F₁)の調製に用いられた。

マルチコピークロニングベクターとして、pUC118、pUC119 (199)、pHSG398 (207) (宝酒造) を、また、ローコピークロニングベクターとして、pLG339 (208) を用いた。通常使用しているトランスポゾンTn10由来の*tetR*および*tetA*遺伝子は、プラスミドpOT3 (R388::Tn10) (209)に由来する。大腸菌染色体性ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子*folA*をコードするプラスミドpTP70-1 (210,211) は巖倉博士より分与された。そのほかのプラスミドはすべて当研究室において構築された。

ssDNAの調製にはM13K07ヘルパーファージ(199) (宝酒造) を使用した。

2. 培地

①ハートインフュージョンブイヨン培地 (HI broth) (栄研化学)

ウシ心臓抽出液	500g
ペプトン	10g
塩化ナトリウム	5g / ℓ

②ハートインフュージョン寒天培地 (HI agar) (栄研化学)

ウシ心臓抽出液	500g
ペプトン	10g
塩化ナトリウム	5g
寒天	15g / ℓ

③2×YT broth (212)

Bacto-tryptone (Difco)	16g
Bacto-yeast extract (Difco)	10g
NaCl	5g / ℓ

④YT agar (212)

Bacto-tryptone (Difco)	8g
Bacto-yeast extract (Difco)	5g
NaCl	5g
寒天末	15g / ℓ

⑤medium A (3)

K ₂ HPO ₄	7.0g
KH ₂ PO ₄	3.0g
tri-sodium citrate · 2H ₂ O	0.5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0g / ℓ

滅菌後、別途滅菌した20% glucose、10% casamino acids (Difco) を1/100量加えた。

⑥M9 glucose medium (212)

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	15.0g
KH ₂ PO ₄	3.0g
NaCl	0.5g
NH ₄ Cl	1.0g / ℓ

滅菌後、別途滅菌した0.1mg/ml thiamine-HCl、100mM MgSO₄、10mM CaCl₂、20% glucoseを1/100量加えた。

M9 glucose agarは、M9 glucose mediumに寒天末を1.5%加えたものである。

3. 抗生物質、放射性同位体標識化合物、遺伝工学研究用試薬類、その他の試薬

塩酸テトラサイクリンは和光純薬、Sigmaより購入した。塩酸クロルテトラサイクリンはSigmaより購入した。塩酸ミノサイクリン、グリシルサイクリンは日本レダリーより分与された。

[7-³H]tetracyclineはDu Pont-New England Nuclearより購入した。N-ethyl-2,3-¹⁴C]maleimide、5'-[A-³⁵S]dCTP、5'-[α-³²P]dCTP、[³⁵S]protein AはAmershamより購入した。

PANSORBIN *Staphylococcus aureus* cellはCalbiochemより購入した。

Oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis systemはAmershamより購入した。Site-directed mutagenesis system Mutan-Kは宝酒造より購入した。Sequenase 7-deaza-dGTP KitはUnited States Biochemicalより購入した。その他の遺伝子操作に用いた制限酵素、修飾酵素、リンカー、キット等は、宝酒造、ニッポンジーン、東洋紡、New England Biolabsより購入した。

DEAE-Sepharose CL-6B、SephadexはPharmaciaより、Methotrexate-agaroseはSigmaより購入した。

その他の試薬はすべて試薬特級あるいは生化学用のものを使用し、和光純薬、ナカライテスクより購入した。

4. 抗血清

テトラサイクリン排出蛋白C末端14アミノ酸残基に対するウサギ抗血清（抗TetA-Ct14抗血清）は以前当研究室において作成された(37,213)。同中央ループ領域14アミノ酸残基に対するウサギ抗血清（抗TetA-ML14抗血清）および精製テトラサイクリン排出蛋白に対するウサギ抗血清（抗TetA抗血清）は大寺(213)が示す通りに本研究で作成された。中央ループ領域14アミノ酸残基に相当する合成ペプチド(ML14: N-Asp-Asn-Thr-Asp-Thr-Glu-Val-Gly-Val-Glu-Thr-Gln-Ser-Asn-C)はthyroglobulinに結合させ、日本白色種のウサギ(雄)を免疫した。ML14-thyroglobulin結合体はPBS (phosphate-buffered saline) 溶液として調製され、注射する際、等量のフロイント完全アジュバントと混合エマルジョンとした。初め、ML14-thyroglobulin結合体0.9mgを後足指裏皮内および腰部筋肉内に注射し、10日後に2.4mgを、更に6日後に1.8mgを同様に注射した。この日からおよそ5日毎に耳静脈より採血し、血清を調製した。精製テトラサイクリン排出蛋白は第3節6に示す方法で、0.1% Triton X-100を含む緩衝液中に調製された。初回の免疫には精製蛋白42μgを用い、以後、7~10日おきに3回84μgの精製蛋白を注射した。第3回投与日よりおよそ5日毎に耳静脈より採血し、血清を調製した。血清は56℃で30分間加温処理して非働化し、0.1% NaN₃を加え、4℃で保存した。

アルカリ性フォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体はBio-Radより購入した。

第二節 遺伝子工学的手法

1. DNA調製法

プラスミドDNAの調製はアルカリ法^(212,214)に従った。ssDNAの調製はVieira and Messing⁽¹⁹⁹⁾が述べる方法に従った。

2. 制限酵素、修飾酵素反応

制限酵素、修飾酵素反応は各メーカーが示した条件に従い、それぞれの酵素に添付する反応用緩衝液あるいはUniversal buffer（宝酒造、東洋紡）を用いて行った。

3. DNAの電気泳動

アガロースゲル電気泳動はADVANCE社のMupid-2を用いて行った。ポリアクリルアミドゲル電気泳動はアトーの垂直型スラブ電気泳動装置を用いて行った。泳動用緩衝液にはそれぞれ、1×TBE溶液(89mM Tris、89mM borate、2mM EDTA (pH 8.0))、0.5×TBE溶液を用いた。泳動後、1 μ g/mlのethidium bromide溶液で染色し、トランスイルミネーター上で295nmのUV光を照射し、写真撮影した（フジインスタントフィルムFP-3000B）。DNA断片の大きさは、EcoR IとHind IIIで消化された λ DNAの断片をもとに見積もられた。DNAの制限酵素切断断片の調製には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用い、365nmのUV光を照射し、写真撮影、ゲルの切り出しを行った。DNA断片は透析チューブ中で電氣的に溶出した後、エタノール沈殿により回収した。

4. 変異導入法

部位特異的変異導入は、合成オリゴヌクレオチドを用いてEckstein法^(197,215)あるいはKunkel法^(201,202)により行った。操作は基本的に市販されているキットのマニュアルに従った。

5. DNA塩基配列決定法

塩基配列の決定は、Sanger法⁽²¹⁶⁾により行った。操作は市販されているキットのマニュアルに従った。プライマーはキットに添付のUniversal primerあるいは合成オリゴヌクレオチドを用いた。

第三節 細菌学的手法および生化学的手法

1. 薬剤感受性測定法

薬剤感受性の測定は寒天平板希釈法を用いた。HI broth中37℃で一晩培養した菌液をHI brothで100倍希釈し、そのうち5 μ l (3 \times 10⁶ cell/ml) をマイクロプランター (佐久間製作所) を用いて二倍系列希釈の薬剤を含むHI agar平板に接種した。37℃で18時間以上培養した後、菌の生育を判定し、薬剤感受性を最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC, μ g/ml) で表した。

2. 大腸菌リン脂質の調製

Bligh and Dyerの方法⁽²¹⁷⁾に従った。

適当な宿主大腸菌株をmedium A中37℃でOD₅₃₀=1まで培養し、集菌した。菌体を生理食塩水で数度洗浄し、菌体湿重量1g当たり10mlの生理食塩水に懸濁した。菌体懸濁液30ml当たり100mlのメタノール、次いで50mlのクロロホルムを室温で攪拌しながら加えた。30分間放置後、懸濁液を濾過し、濾液を分液漏斗に移して、更にクロロホルムを50ml、蒸留水を50ml加え、激しく攪拌し、室温で一晩放置した。下層をナスフラスコに分取し、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを蒸発させ、残渣のリン脂質を50mg/mlの濃度になるように2mM β -mercaptoethanolに懸濁し、-20℃に保存した。

3. 超音波破碎膜の調製

液体培地 (10ml) 中37℃で適当な試薬を用いて遺伝子発現の誘導を開始して2時間後、集菌し、50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) で洗浄後、同緩衝液1mlに懸濁した。菌体懸濁液をチップソニケーター (BRANSON Sonifier Cell Disruptor 200) で超音波処理し、菌体を破碎した。未破碎菌を除去後、超遠心 (30分間、4℃、210,000 \times g; Beckmann、TLA100.2ローター、70,000rpm) で膜画分を回収し、同緩衝液50 μ lに懸濁し、-80℃に保存した。

4. 反転膜小胞の調製^(3,5)

medium A中37℃で適当な試薬を用いて遺伝子発現の誘導を開始して2時間後、集菌し、0.1M KCl、10mM EDTAを含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 6.6)、で洗浄後、菌体湿重量1g当たり5mlの同緩衝液に懸濁した。菌体懸濁液に終濃度100 μ g/mlのDNase IIを加えた後、5,000p.s.i.の圧力でフレンチプレス (SLM AMINCO) を通し、菌体を破碎した。未破碎菌を除去後、超遠心 (1時間、4℃、190,000 \times g; 日立、70ATローター、43,000rpm) で反転膜小胞を回収し、0.1M KClを含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した。再度超遠心を行い、同緩衝液に懸濁し、-80℃に保存した。

5. 内膜画分の調製、界面活性剤による可溶化

medium A中37℃で適当な試薬を用いて遺伝子発現の誘導を開始して2時間後、集菌し、0.1M KCl、2mM β -mercaptoethanol、10% glycerolを含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後、菌体湿重量1g当たり5mlの10mM MgCl₂、0.5mM EDTA、5% glycerol、0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した。菌体懸濁液に終濃度10 μ g/mlのDNase Iを加えた後、10,000p.s.i.の圧力でフレンチプレスを通し、菌体を破碎した。未破碎菌を除去後、超遠心 (1時間、4℃、190,000 \times g; 日立、70ATローター、43,000rpm) で反転膜小胞を回収し、0.5mM EDTA、1mM DTT、5% glycerol、0.5mM PMSFを含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した。再度超遠心を行い、同緩衝液に懸濁した後、30~45%(W/W)シヨ糖密度勾配遠心 (12時間、4℃、Rmax=205,000 \times g; 日立、40STローター、34,000rpm) し、内膜画分を分取した⁽²¹⁸⁾。内膜画分は0.5mM EDTA、5mM thioglycerol、10% glycerolを含む5mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) に希釈し⁽²¹⁹⁾、超遠心 (40分間、4℃、165,000 \times g; 日立、70ATローター、40,000rpm) で内膜画分を回収し、5mM thioglycerol、10% glycerolを含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、-80℃に保存した。また、上記3の方法に従い反転膜小胞を調製し、シヨ糖密度勾配遠心以降この方法に従うことも可能である。

TetAおよびその誘導体の可溶化は、内膜画分懸濁液 (20mg protein/ml) に終濃度1.25% octylglucoside (OG) あるいは2% Triton X-100 (TX100)、2% dodecylmaltoside (DM) を加えて穏やかに混和し、超遠心 (30分間、4℃、210,000 \times g; Beckmann、TLA100.2ローター、70,000rpm) した。上清を分取し、更なる精製操作あるいは再構成実験に用いた。

6. テトラサイクリン排出蛋白の精製

上記の界面活性剤可溶化後の超遠心上清500 μ lを、0.1% DMを含む50mM triethanolamine-HCl緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した、ベッド体積6ml (1 \times 8cm) のDEAE-Sepharose CL-6Bカラムに添加し、初めに同緩衝液30mlで、次いで溶出液全量が30mlになるように0.5MまでKCl濃度を直線的に変化させ、溶出した。この操作のみで、テトラサイクリン排出蛋白はほぼ完全に精製される。

テトラサイクリン排出蛋白とジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) との融合蛋白の精製には、Methotrexate agaroseを用いた。担体は1 \times 8cmのベッドでカラムに充填され、1M KCl、0.1mM EDTA、14mM β -mercaptoethanol、0.1% DMを含む10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化された。可溶化後の超遠心上清1mlをカラムに添加し、同緩衝液30mlで洗浄後、3mM葉酸を含む同緩衝液で溶出した。

7. テトラサイクリン排出蛋白のリボソームへの再構成

リボソームは、肉薄の試験管中、大腸菌リン脂質あるいはL- α -phosphatidylcholine (L- α -lecithin) type II-S (Sigma) に1mM DTTを含む20mM MOPS-Tris緩衝液 (pH 7.0) を10mg lipid/mlの濃度になるように加え、窒素ガスを吹き付けた後密封し、バス型ソニケーターで超音波処理し、作成した。

大腸菌H⁺-ATPase (F₀F₁-ATPase) はMoriyamaらの方法⁽²⁰⁶⁾に従い、OGで大腸菌DK8/pBWU13株の内膜画分を可溶化後、10~30%グリセロール密度勾配遠心にて精製した。

(1)凍結融解希釈法による再構成リボソームの調製: 10mg/mlリボソーム60 μ l、精製F₀F₁-ATPase 100 μ l (100 μ g protein)、およびTetAを含む可溶化後の超遠心上清100 μ l (200 μ g protein) あるいは精製TetA

100 μ l (20 μ g protein) を混合し、 -80°C にて凍結後、急速に溶解する操作を2度行い、13mlの0.1M KCl、5mM MgCl_2 を含む20mM MOPS-Tris緩衝液 (pH 7.0) に希釈し、超遠心 (1時間、 4°C 、 $165,000\times g$; 日立、70ATローター、40,000rpm) してプロテオリポソームを回収し、同緩衝液150 μ lに懸濁した。このプロテオリポソームは ^3H テトラサイクリン輸送活性測定に用いられた。蛍光消光法による H^+ 輸送の測定には、後述するように、凍結融解後の混合液50 μ lを1mlの測定用緩衝液に希釈し、そのまま測定を行った。

(2)ゲル濾過クロマトグラフィーによる再構成リポソームの調製: 1mg/mlリポソーム600 μ l、精製 F_0F_1 -ATPase 800 μ l (800 μ g protein)、およびTetAを含む可溶化後の超遠心上清500 μ l (1mg protein) あるいは精製TetA 500 μ l (100 μ g protein) を混合し、 -80°C にて凍結、急速に溶解する操作を2度行った後、5mM thioglycerolを含む20mM MOPS-Tris緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したSephadex G-25カラム (1 \times 10cm) に添加し、同緩衝液で溶出した。白濁した溶出液を集め、超遠心 (30分間、 4°C 、 $210,000\times g$; Beckmann、TLA100.2ローター、70,000rpm) し、プロテオリポソームを同緩衝液800 μ lに懸濁した。このプロテオリポソームも ^3H テトラサイクリン輸送活性測定に用いられた。

8. 蛋白質定量法

蛋白質の定量は、Lowryらの方法(220)、あるいは、Schaffner and Weissmannの方法(221)に従って行った。いずれの場合もウシ血清アルブミン (BSA) を標準蛋白として用いた。

9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmliの方法(222)に従って行った。電気泳動はアトーの垂直型スラブ電気泳動装置あるいはマリソルの垂直型マイクロスラブ電気泳動装置を用いて行った。泳動後、ゲルを染色液 (0.1% Coomassie brilliant blue R-250、50%メタノール、10%酢酸) に10分間浸して染色し、脱色液 (7%メタノール、7%酢酸) で脱色した。十分に脱色した後、蒸留水に浸して洗浄し、濾紙の上に乗せてゲル乾燥機 (アトー) で乾燥した。

10. イムノプロットイング

Towbinら(223,224)、Burnette(225)の方法に従って行った。電気泳動後のSDS-ポリアクリルアミドゲルにニトロセルロースフィルター (Millipore、0.22 μ m、Type GS)、あるいはImmobilon-PSQ (Millipore) を密着させ、湿式ゲルメンブラン転写装置あるいは半乾式ゲルメンブラン転写装置 (いずれもマリソル) を用いて、Tris-glycine緩衝液 (pH 8.3) (25mM Tris、192mM glycine、20%メタノール) 中で転写した。転写後のニトロセルロースフィルターは、3%ゼラチン含有Tris-buffered saline (TBS) 中でブロッキングし、次いで、予め大腸菌宿主株から調製した膜画分で非特異的な抗体を吸収した抗血清と3%ゼラチン含有TBS中で一次抗原抗体反応を行った。反応終了後、ニトロセルロースフィルターを0.1% Triton X-100含有TBSで、次いで、TBSで十分に洗浄した。二次抗原抗体反応は、3%ゼラチン含有TBS中でアルカリ性フォスファターゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体を用いて行った。反応終了後、0.1% Triton X-100含有TBS、次いで、TBSで十分に洗浄した。1mM MgCl_2 、0.5mg/ml p-nitroblue tetrazolium chloride (NBT)、0.25mg/ml

5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphate · toluidine salt (BCIP) を含む100mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.8) に浸して発色反応を行い、TetAあるいはその誘導体の検出を行った。アルカリ性フォスファターゼ標識二次抗体の代わりに $[^{35}\text{S}]$ protein Aを用いる場合は、ニトロセルロースフィルターを洗浄後風乾し、オートラジオグラフィーにより放射性標識された蛋白のバンドを検出した。

1.1. $[^{14}\text{C}]$ N-エチルマレイミド結合性の測定

5mg protein/mlの反転膜小胞 $100\mu\text{l}$ に終濃度0.5mMの $[^{14}\text{C}]$ N-ethylmaleimide (NEM) を加え、 30°C で5分間反応させた。0.1M KClを含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) 1mlを加えて直ちに超遠心 (30分間、 4°C 、 $210,000\times g$; Beckmann、TLA100.2ローター、70,000rpm) した。沈殿を $200\mu\text{l}$ の0.1M NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、5mM NEMを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、可溶化した。超遠心 (30分間、 4°C 、 $210,000\times g$; Beckmann、TLA100.2ローター、70,000rpm) 後の上清を抗TetA-Ct14抗血清 $15\mu\text{l}$ と混合し、室温で1時間反応させた。更に、Pansorbin⁽²²⁶⁾ (Calbiochem) を $100\mu\text{l}$ 加え、室温で1時間反応させた。低速遠心で得られた沈殿を適量の0.1M NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDSを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で数回洗浄した後、Laemmliのsample buffer⁽²²²⁾に懸濁した。室温に30分間放置した後、低速遠心上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に用い、オートラジオグラフィーにより放射性標識された蛋白のバンドを検出した。

1.2. テトラサイクリン輸送活性測定法

(1)反転膜小胞でのテトラサイクリン輸送活性の測定⁽⁵⁾

テトラサイクリン輸送活性は反転膜小胞への $[^3\text{H}]$ テトラサイクリンの取り込みとして測定された。

3.5mg protein/mlの反転膜小胞 $10\mu\text{l}$ に250mM β -NADHを $0.5\mu\text{l}$ 加えて、 30°C で1分間反応させ (対照は β -NADHを加えない)、 $[^3\text{H}]$ テトラサイクリン、 CoCl_2 、0.1M KClを含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) を $40\mu\text{l}$ 加えて、 30°C で任意時間反応させた。0.15M LiClを含む5mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) を2ml加えて希釈し、素早くニトロセルロースフィルター (Millipore、 $0.45\mu\text{m}$ 、Type HA) を通して減圧下濾過し、更に2度同緩衝液で洗浄した。減圧濾過には、Milliporeのポンプを装着した、Hoeflerの10穴濾過装置を用いた。ニトロセルロースフィルターは10mlのシンチレーター (2,5-diphenyloxazone (DPO) 8g、2,2'-p-phenylene-bis(5-phenyloxazole) (POPOP) 0.2g、Triton X-100 1 ℓ 、トルエン 2 ℓ) に溶解し、液体シンチレーションカウンターで ^3H -dpmを測定した。

通常、輸送活性測定は、 $10\mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ テトラサイクリン、 $50\mu\text{M}$ CoCl_2 存在下、0.1M KClを含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) 中で行われ、5、15、30、45、60、90および120秒間の取り込みを測定した。また、テトラサイクリン輸送の速度論的パラメーターは、1mM CoCl_2 存在下、様々な $[^3\text{H}]$ テトラサイクリン濃度において30秒間の取り込みを測定し、non-linear regression curveより求めた。

(2)プロテオリポソームでのテトラサイクリン輸送活性の測定

プロテオリポソーム30 μ lに0.1M KCl、10mM MgCl₂、1 μ g/ml valinomycin、10mM ATPを含む10mM Tricine-choline緩衝液 (pH 8.0) を30 μ l加え、30 $^{\circ}$ Cで1分間反応させた(対照はATPを加えない)。0.1M KCl、10mM MgCl₂、1 μ g/ml valinomycin、10 μ M [³H]テトラサイクリンを含む10mM Tricine-choline緩衝液 (pH 8.0) を90 μ l加え、30 $^{\circ}$ Cで任意時間反応させた後、全量を5mM thioglycerolを含む10mM Tricine-choline緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したSephadex G-50遠心カラムに添加し、400 \times gで2分間遠心した。溶出液の蛋白質濃度と³H-dpmを測定した。活性測定はATPの代わりに β -NADH (終濃度2.5mM) を用いても行われた。

1.3. プロトン輸送測定法

膜を介したプロトンの移動は蛍光消光法⁽²²⁷⁾により測定した。蛍光は日立F-2000型蛍光分光光度計を用いて測定した。pH感受性蛍光プローブとしてquinacrine (励起波長440nm、蛍光波長500nm)、あるいは、acridine orange (励起波長490nm、蛍光波長540nm) を用いた。

(1)反転膜小胞でのプロトン輸送活性の測定

0.1M KCl、10mM MgSO₄を含む50mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 7.0) 1mlに、2mg protein/mlの反転膜小胞を25 μ l、160 μ M quinacrine (あるいは250 μ M acridine orange) を5 μ l加え、蛍光のモニターを開始した。250mM β -NADHを2.5 μ l、2mMテトラサイクリンを5 \sim 10 μ l、1M NH₄Clを5 μ lを順次加えた。

(2)プロテオリポソームでのテトラサイクリン輸送活性の測定

0.1M KCl、10mM MgCl₂を含む10mM Tricine-choline緩衝液 (pH 8.0) 1mlに、凍結融解後の蛋白脂質混合液を50 μ l、160 μ M quinacrine (あるいは250 μ M acridine orange) を5 μ l、0.25mg/ml valinomycinを2.5 μ l加え、蛍光のモニターを開始した。0.1M ATPを5 μ l、2mMテトラサイクリンを5 \sim 10 μ l、1M NH₄Clを5 μ lを順次加えた。

1.4. ジヒドロ葉酸還元酵素活性測定法^(210,211,228)

NADPHの分解に基づく340nmにおける吸収の時間依存の減少を測定し、そのモル吸光係数 $\epsilon = 1.18 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ を用いて酵素活性を求めた。1Uの酵素活性は30 $^{\circ}$ Cにおいて1分間当たり1 μ molのジヒドロ葉酸 (DHF) をテトラヒドロ葉酸 (THF) に還元する酵素量とした。日立U-3300型分光光度計を用いて吸光度を測定した。

12mM β -mercaptoethanolを含む50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 2mlに、適当量の酵素溶液、24mM NADPHを5 μ l加え、吸光度測定を開始した。20mM DHFを5 μ l加え、およそ5分間測定を続けた。

15. β -ラクタマーゼ活性測定法(229,230)

β -ラクタム剤のラクタム環開裂に基づく吸収の減少を測定した。 β -ラクタム剤はcephalothin (CET)、benzylpenicillin (PCG) を用いた。CETの265nmにおけるモル吸光係数は $\epsilon = 7.20 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、PCGの235nmにおけるモル吸光係数は $\epsilon = 0.94 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である。1Uの酵素活性は30℃において1分間当たり $1 \mu\text{mol}$ の β -ラクタム剤を加水分解する酵素量とした。日立U-3300型分光光度計を用いて吸光度を測定した。

12mM β -mercaptoethanolを含む50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 2mlに、適当量の酵素溶液を加え、吸光度測定を開始した。10mMの β -ラクタム剤溶液を $40 \mu\text{l}$ 加え、およそ5分間測定を続けた。

第1節 はじめに

二次性能動輸送体は生物界に普遍的に存在し、その生命活動を支えている(1)。その中で、H⁺共役型シンプォーター、アンチポーターおよびユニポーターの多くは、輸送基質や共役方向が異なるにもかかわらず、 α ヘリックスを形成すると考えられる12本の疎水性領域が細胞質膜を貫通する二次構造が共通に推定されている(43-48)。Hendersonらは種々の二次性能動輸送体のアミノ酸一次配列を比較し、特定のアミノ酸残基が短い領域に保存されるモチーフを数種同定し、それらがほとんどの輸送担体において、推定二次構造中全く同じ位置に見いだされることを述べている(44,45)。このことは、それらが輸送担体の種類を越えて共通の役割を持っていること、二次性能動輸送体が基本的に共通のメカニズムによって基質輸送やそれに共役するイオン輸送を行っていること、更には、これら輸送担体が共通の祖先を持つことを示唆している。幾つかのモチーフの中で、とりわけ、第2膜貫通領域と第3膜貫通領域とを結ぶ細胞質側親水性領域(ループ2-3)には、保存性アミノ酸残基が集中して存在し、Arg-X-Gly-Arg-Arg(Xは任意のアミノ酸残基)というモチーフを構成している。このモチーフの直前にはAsp残基が、更に4残基前にはGly残基がよく保存されているので、Gly-X-X-X-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Argとモチーフは拡張されている(Figure 2-1)。このモチーフは12回膜貫通型輸送担体ばかりでなく、14回膜貫通型輸送担体にも同じ領域に保存されている(11)。

Chopraはテトラサイクリン排出を仲介する全ての耐性蛋白(グラム陰性細菌のクラスA~E、G、H、グラム陽性細菌のK、L)のループ2-3に、モチーフを構成するAsp残基に加え、その前にSer残基が保存されていることに注目し、この連続するSer-Asp残基が基質結合部位ではないかと推察した(50)。当研究室ではこの点に関して、部位特異変異導入法を用いてすでに解析がなされている(49)。Asp66残基のAsn変異体が完全にテトラサイクリン輸送活性を消失し、Glu変異体が野生型の10%程度の輸送活性を保持することから、66位の負電荷が機能に必須であると結論された。TetAの輸送基質は、正味1価カチオンのテトラサイクリン-Mg²⁺キレート体であるので、Asp66残基は基質と相互作用する部位であると推察された。一方、Ser65残基はAlaやCysに置換してもテトラサイクリン輸送活性にほとんど影響がなく、それ自身は機能に必須な残基ではない。ところが、Cys65変異体のテトラサイクリン輸送活性は、SH修飾試薬のひとつ、N-エチルマレイミド(NEM)を作用させることによりほぼ完全に阻害されるのに対し、NEMよりも修飾側鎖の小さなメチルメタンチオスルフォネート(MMTS)では約40%残存するというように、SH基修飾による活性阻害の程度が修飾基の大きさに依存していた。このことは変異導入解析によっても確かめられている(231)。すなわち、MMTS修飾を受けたCys残基に相当する、Met65変異体では中程度の輸送活性を保持し、側鎖が大きくなるPhe65変異体では活性が完全に消失する。また、Cys65変異体に対するNEM修飾が基質テトラサイクリンの存在により保護されず、むしろNEM結合が促進される(232)ことから、ループ2-3中央のSer-Asp残基は基質結合部位ではなく、むしろ、66位負電荷が輸送の初発段階において基質と一時的に相互作用していると推定された。それ故、細胞質側のループ2-3は、膜貫通領域によって構成される基質透過経路の入り口に相当するゲートとして機能していると考えられた(49,231-233)。

本研究ではこれらの結果を受けて、ループ2-3を構成する残り8残基の重要性を評価し、個々のアミノ酸残基の役割とループ2-3の役割について検討した。特に、ループ2-3には負電荷残基がAsp66残基ただひとつであるのに対して、塩基性残基がモチーフを構成する3つの保存性Arg残基とLys63残基と合計4

Protein		G	X	X	X	D	R	X	G	R	R
Antibiotic resistance proteins											
TetA(B) (G-)	62	G	K	M	S	D	R	F	G	R	R
TetA(A) (G-)	64	G	A	L	S	D	R	F	G	R	R
TetA(C) (G-)	64	G	A	L	S	D	R	F	G	R	R
TetA(D) (G-)	62	G	R	W	S	D	K	L	G	R	R
TetA(E) (G-)	62	G	R	W	S	D	R	I	G	R	R
TetA(G) (G-)	62	G	Q	L	S	D	S	Y	G	R	R
TetA(H) (G-)	62	G	R	L	S	D	K	Y	G	R	K
CmlA (<i>P.aeruginosa</i>)	70	G	P	L	S	D	R	L	G	R	R
Bcr (<i>E.coli</i>)	47	G	P	M	A	D	S	F	G	R	K
EmrD (<i>E.coli</i>)	66	G	P	I	S	D	R	V	G	R	R
NorA (<i>S.aureus</i>)	59	G	T	L	A	D	K	L	G	K	K
Bmr (<i>B.subtilis</i>)	62	G	R	W	V	D	R	F	G	R	K
CmlR (<i>S.lividans</i>)	59	A	A	L	A	R	T	W	P	R	R
EmrB (<i>E.coli</i>)	70	G	W	L	A	K	R	V	G	E	V
QacA (<i>S.aureus</i>)	75	S	A	F	A	D	K	W	G	R	K
Tet (K) (G+)	70	G	K	L	S	D	Y	I	N	I	K
Tet (L) (G+)	70	G	K	L	S	D	Q	L	G	I	K
Mmr (<i>S.coelicolor</i>)	82	G	G	L	A	N	R	I	G	A	K
TcmA (<i>S.glaucescens</i>)	82	G	K	L	G	D	R	F	G	H	R
LmrA (<i>S.lincolnensis</i>)	86	G	R	I	A	D	L	F	G	R	R
ActII-ORF2 (<i>S.coelicolor</i>)	98	G	R	L	G	D	I	Y	G	R	K
ActVA-ORF1 (<i>S.coelicolor</i>)	80	G	V	L	G	D	R	L	G	R	R
Pur8 (<i>S.alboniger</i>)	82	G	R	V	A	D	A	F	G	R	R
CmcT (<i>N.lactamdurans</i>)	87	G	R	L	A	D	I	H	G	H	R
Neurotransmitter transporters											
CGAT (rat)	155	G	P	L	T	N	R	I	G	Y	H
SVAT (rat)	151	G	L	L	T	N	R	I	G	Y	P
VAcHT (rat)	143	G	P	F	I	D	R	M	S	Y	D
OCT1 (rat)	168	G	Y	I	A	D	R	F	G	R	K
SV2 (rat)	223	G	G	L	A	D	R	L	G	R	R
sugar, organic anion, peptide transporters											
CitA (<i>E.coli</i>)	74	G	A	Y	I	D	R	I	G	R	R
KgtP (<i>E.coli</i>)	84	G	R	I	A	D	K	H	G	R	K
AraE (<i>E.coli</i>)	80	G	W	L	S	F	R	L	G	R	K
GalP (<i>E.coli</i>)	73	G	W	L	S	F	K	L	G	R	K
XylE (<i>E.coli</i>)	76	G	Y	C	S	N	R	F	G	R	R
LacY (<i>E.coli</i>)	64	G	L	L	S	D	K	L	G	L	R
CscB (<i>E.coli</i>)	66	G	I	V	Q	D	K	L	G	L	K
RafB (<i>E.coli</i>)	67	G	V	I	S	D	R	L	G	L	K
MelB (<i>E.coli</i>)	63	N	A	T	R	S	R	W	G	K	F
GLUT1 (human)	84	G	L	F	V	N	R	F	G	R	R
GLUT2 (human)	116	G	W	L	G	D	T	L	G	R	I
GLUT3 (human)	82	G	L	F	V	N	R	F	G	R	R
GLUT4 (rat)	100	G	I	I	S	Q	W	L	G	R	K
GLUT5 (rat)	89	G	F	L	V	N	N	L	G	R	K
GLUT7 (rat)	114	G	W	L	G	D	K	L	G	R	I
PepT1 (rabbit)	70	A	L	I	A	D	A	W	L	G	K
GAL2 (<i>S.cerevisiae</i>)	140	S	K	G	G	D	M	Y	G	R	K
HXT2 (<i>S.cerevisiae</i>)	125	G	R	L	G	D	M	Y	G	R	R

Figure 2-1. Conserved sequence motif, GXXXDRXGRR, in a putative cytoplasmic loop, loop2-3, between transmembrane segments 2 and 3 of various membrane transport proteins. Conserved amino acid residues are shown in boxes. Abbreviations are as follows: TetA and Tet, tetracycline resistance proteins from Gram-negative and -positive bacteria, respectively (27, 28, 35, 149, 153, 157, 161, 163, 164). CmlA, Tn1969-encoded chloramphenicol resistance protein (77). Bcr, bicyclomycin resistance protein (79). EmrD, *E. coli* multidrug resistance protein (80). NorA, new quinolone resistance protein (81). Bmr, *B. subtilis* multidrug resistance protein (85). CmlR, chloramphenicol resistance protein (91). EmrB, *E. coli* multidrug resistance protein (96). QacA, antiseptic-resistance protein (93). Mmr, methylenomycin A resistance protein (98). TcmA, tetracenomycin C resistance protein (99). LmrA, lincomycin resistance protein (101). ActII-ORF2 and ActVA-ORF1, actinorhodin resistance proteins (102, 103). Pur8, puromycin resistance protein (104). CmcT, cephamycin resistance protein (105). CGAT, chromaffin granule amine transporter (21). SVAT, synaptic vesicle amine transporter (21). VAcHT, vesicular acetylcholine transporter (234; see also 235, 236). OCT1, organic cation transporter in renal proximal tubules (23). SV2, synaptic vesicle protein 2 from brain (237; see also 238, 239). CitA, plasmid-mediated citrate transporter (240, 241). KgtP, α -ketoglutarate transporter (242). AraE, arabinose permease (243). GalP, galactose permease (44). XylE, xylose permease (244). LacY, lactose permease (245). CscB, sucrose permease (246). RafB, raffinose permease (247). MelB, melibiose permease (248). GLUT1-7, glucose transporters (249-254). PepT1, dipeptide/H⁺ symporter (255; see also 256). GAL2, galactose transporter (257, 258). HXT2, hexose transporter (259).

残基存在し、ポリカチオン性であるという点、2つの保存性Gly残基のループ構造形成、維持への寄与に関して留意した。

第2節 部位限局ランダム変異導入、部位特異的変異導入による重要残基の検索

すでに解析が行われたSer65、Asp66残基以外にループ2-3領域に重要残基が存在するかどうかを検討するため、まず初めにループ2-3を構成するアミノ酸残基全てを標的として部位限局ランダム変異導入を行った。この際、変異導入用プライマーとして、Tn10-TetAのLeu61からVal73のコドンに対応する塩基配列 (5'-CTT.GGA.AAA.ATG.TCT.GAC.CGA.TTT.GGT.CGG.CGC.CCA.GTG-3') をもとに、それぞれの位置に他の3種の塩基が0.5%ずつ混在するように合成されたオリゴヌクレオチドを用いた。変異導入はEckstein法に従い、TetAの α 領域のサブクローンpER2(51)のssDNAを鋳型として用いた。単離されたプラスミド (pRNDシリーズ) 42種のループ2-3付近に対応する部分の塩基配列を決定した。Table 2-1には塩基置換を生じていたプラスミドについて、その塩基置換とそれに伴うアミノ酸置換が示されている。

Table 2-1. Nucleotide sequence of localized random mutants. Only substituted nucleotides are shown.

Plasmid	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
	N-61Leu Gly Lys Met Ser Asp Arg Phe Gly Arg Arg Pro Val73-C 5'- CTT GGA AAA ATG TCT GAC CGA TTT GGT CGG CGC CCA GTG -3'	
pRND160	--- -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---	Gly62→Val
pRND108	--- --- -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---	Lys63→Asn
pRND156	--- --- --- --- --- A- --- --- --- --- --- --- --- ---	Asp66→Asn
pRND16	--- --- --- --- --- --- --- -T- --- --- --- --- --- --- ---	Arg67→Leu
pRND154	--- --- --- --- --- --- --- G- --- --- --- --- --- --- ---	Phe68→Val
pRND5	--- --- --- --- --- --- --- --- --- -C- --- --- --- --- --- ---	Gly69→Ala
pRND20	--- --- --- --- --- --- --- --- --- T- --- --- --- --- --- ---	Arg70→Trp
pRND157		
pRND163		
pRND104	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- T- --- --- ---	Arg71→Cys
pRND124	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T- --- --- ---	Arg71→Leu
pRND103	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -C- --- --- ---	(silent)
pRND3	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T A- --- --- --- ---	(silent)
pRND161	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- C- --- --- --- --- A-	Phe68→Leu, Val73→Met
pRND141	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -A --- T-	Val73→Leu
pRND110	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -A A- --- T- --- ---	(silent)
pRND105	--- -G- --- --- --- --- --- T- --- --- A- A- --- --- --- ---	Arg67→stop, Gly69→Ser

No base change: pRND4, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 48, 120, 123, 142, 144, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 155, 158, and 162.

このランダム変異導入では、ループ2-3のほぼ全域に渡って変異体を作成することができたが、Met64残基の変異体を得ることができなかった。本研究ではループ2-3の構成残基の変異体を扱うので、得られたランダム変異体のうち、Gly62→Val、Lys63→Asn、Arg67→Leu、Phe68→Val、Gly69→Ala、Arg70→Trp、Arg71→Cys、および、Arg71→Leu変異体を以後の解析に用いることにした。目的の塩基置換を含むEcoRV-EcoRI制限断片をそれぞれの変異pRNDプラスミドから調製し、トランスポゾンTn10に由来するtet遺伝子を持つローコピープラスミドpLGT2(51)の対応する部分と交換し、変異tetA遺伝子を持つプラスミドをFigure 2-2に示すように構築した。

得られた変異プラスミドで大腸菌W3104株を形質転換し、薬剤感受性測定とイムノプロットティングによる変異TetA産生の確認を行った。イムノプロットティングのためのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動には、超音波破碎膜10 μ g protein相当を用いた。なお、超音波破碎膜は、菌体培養液のOD₆₁₀が0.4の時点で終濃度0.25 μ g/mlのHCTC (121 $^{\circ}$ Cで20分間処理したもの)を加えて遺伝子発現を誘導した後、調製された。変異蛋白はすべて野生型TetAと同程度産生されていることが確認された (data not shown)。

変異プラスミドを有する大腸菌W3104株のテトラサイクリン耐性レベルをTable 2-2 (*で記したものがランダム変異導入で得られた変異体) に示した。

Table 2-2. Tetracycline resistance levels of *E. coli* W3104 cells harboring random and site-directed mutant plasmids.

Asterisks (*) indicate mutants obtained through random mutagenesis. Resistance levels were expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC).

Plasmid	TetA	MIC of tetracycline (μ g/ml)	Plasmid	TetA	MIC of tetracycline (μ g/ml)
None	None	0.8	pLGG69S	Gly69→Ser	100
pLGT2	Wild-type	200	pLGG69C	Gly69→Cys	100
pLGG62A	Gly62→Ala	12.5	pLGG69N	Gly69→Asn	9.5
pLGG62V *	Gly62→Val	0.8	pLGG69Q	Gly69→Gln	50
pLGG62L	Gly62→Leu	3.1	pLGR70W *	Arg70→Trp	0.8
pLGG62N	Gly62→Asn	1.6	pLGR70A	Arg70→Ala	12.5
pLGK63N *	Lys63→Asn	200	pLGR70L	Arg70→Leu	0.8
pLGK63C	Lys63→Cys	200	pLGR70K	Arg70→Lys	12.5
pLGK63L	Lys63→Leu	50	pLGR70D	Arg70→Asp	0.8
pLGM64C	Met64→Cys	200	pLGR70S	Arg70→Ser	12.5
pLGS65A	Ser65→Ala	200	pLGR71L *	Arg71→Leu	50
pLGS65C	Ser65→Cys	200	pLGR71C *	Arg71→Cys	50
pLGD66N	Asp66→Asn	0.8	pLGD66N/R70L	Asp66→Asn, Arg70→Leu	0.8
pLGD66E	Asp66→Glu	4.7			
pLGD66R	Asp66→Arg	0.8	pLGD66N/R70A	Asp66→Asn, Arg70→Ala	0.8
pLGR67L *	Arg67→Leu	200			
pLGR67C	Arg67→Cys	200	pLGD66R/R70D	Asp66→Arg, Arg70→Asp	0.8
pLGF68V *	Phe68→Val	200			
pLGF68C	Phe68→Cys	200	pLGR67L/R71L	Arg67→Leu, Arg71→Leu	50
pLGG69A *	Gly69→Ala	12.5			
pLGG69V	Gly69→Val	0.8	pLGK63L/R67L /R71L	Lys63→Leu, Arg67→Leu, Arg71→Leu	12.5
pLGG69L	Gly69→Leu	9.5			
pLGG69I	Gly69→Ile	0.8			

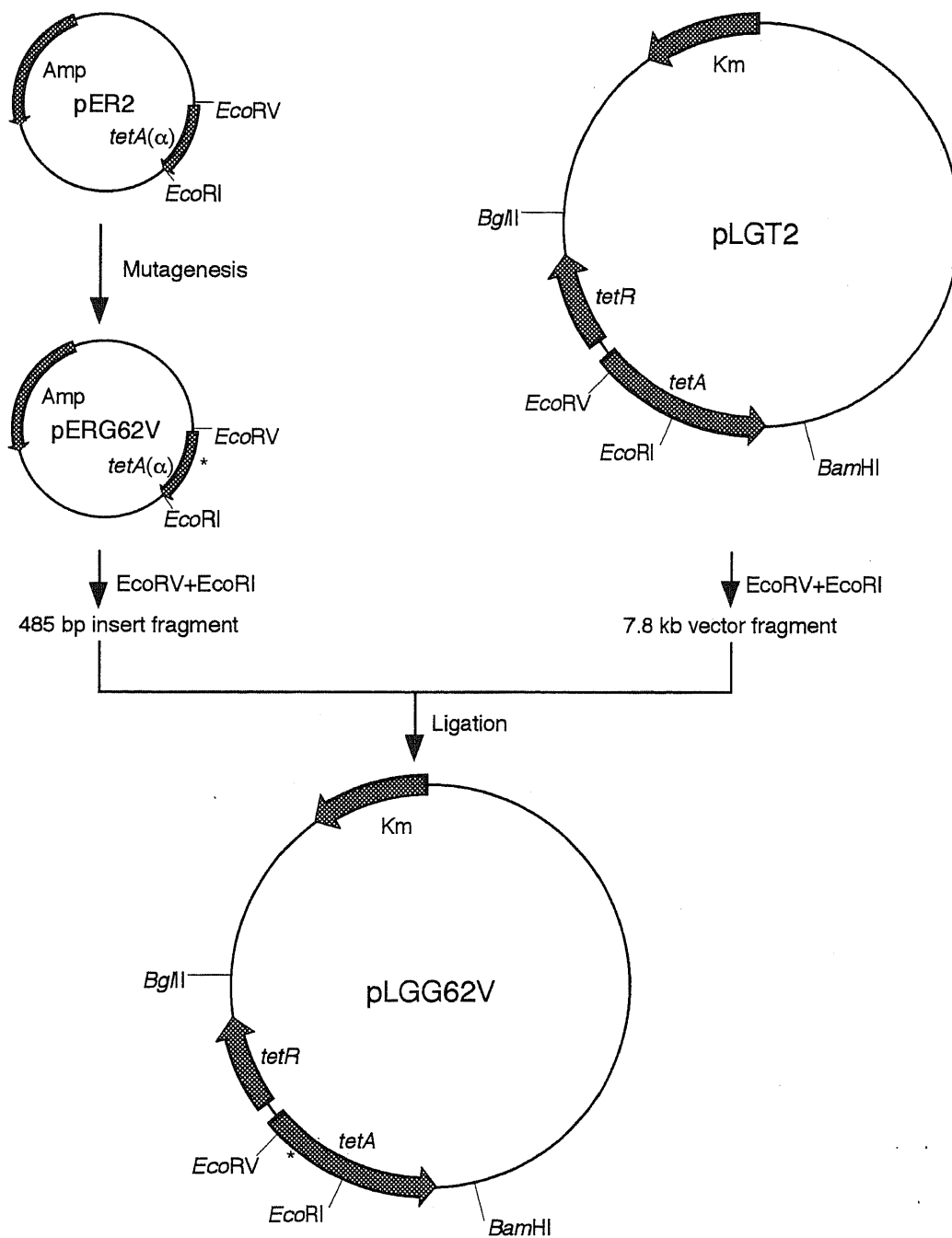


Figure 2-2. Construction of low-copy number plasmids carrying the mutant *tetA* genes. pER2 was constructed by insertion of the 485 bp *EcoRV*-*EcoRI* fragment of the *tetA* gene into the vector fragment of pUC118RV (51), which is a derivative of pUC118 in which the *EcoRV* site has been introduced into the original *Sac*I site by a linker insertion. The *EcoRV*-*EcoRI* fragment from the mutant pER2 plasmid (for example, pERG62V) was transferred to the corresponding region of pLGT2 (51), which contains the entire *tetA* and *tetR* genes, resulting in the mutant low-copy number plasmid (for example, pLGG62V). Asterisks (*) indicate the mutation sites.

G69V	5' -ATGTCTGATCGATTTGTACGGCGC-3' <i>Cl</i> aI	GGT→GTA	Gly69→Val
G69L	5' -CGATTTCTTCGTCGACCAAGT-3' <i>S</i> alI, <i>H</i> incII	GGT→CTT	Gly69→Leu
G69I	5' -CGATTTATTCGTCGACCAAGT-3' <i>S</i> alI, <i>H</i> incII	GGT→ATT	Gly69→Ile
G69S	5' -CGATTTTCTTCGTCGACCAAGT-3' <i>S</i> alI, <i>H</i> incII	GGT→TCT	Gly69→Ser
G69C	5' -CGATTTTGTTCGACGCCCA-3' <i>S</i> alI, <i>H</i> incII	GGT→TGT	Gly69→Cys
G69N	5' -CCGATTTAATCGGAGGCCTGTGCTG-3' <i>S</i> tuI	GGT→AAT	Gly69→Asn
G69Q	5' -ACCGATTTCAACGTCGACCAAGT-3' <i>S</i> alI, <i>H</i> incII	GGT→CAA	Gly69→Gln
R70A	5' -GATTTGGAGCTCGCCCAAGTGC-3' <i>S</i> acI	CGG→GCT	Arg70→Ala
R70L	5' -ATTTGGTCTGAGGCCTGTGCTGTT-3' <i>S</i> tuI	CGG→CTG	Arg70→Leu
R70S	5' -GATTTGGTTCGAGGCCTGTGCTGTT-3' <i>S</i> tuI	CGG→TCG	Arg70→Ser
R70K	5' -GATTTGGTAAGAGGCCTGTGCTGTT-3' <i>S</i> tuI	CGG→AAG	Arg70→Lys
R70D	5' -ACCGATTTGGTGATAGGCCTGTGCTGTTGT-3' <i>S</i> tuI	CGG→GAT	Arg70→Asp
D66N/R70D	5' -AAAATGTCTAATCGATTTGGCTTAAAGGCCTGTGCTGTTG-3' <i>Cl</i> aI <i>S</i> tuI <i>A</i> flIII	GAC→AAT CGG→TTA	Asp66→Asn Arg70→Leu
R67L/R71L	5' -GGAAAAATGTCTGACCTATTTGGTTCGACTCCC-3' <i>S</i> alI, <i>H</i> incII	CGA→CTA CGC→CTC	Arg67→Leu Arg71→Leu

Gly62残基の変異体の中で、Ala変異体のみ中程度のテトラサイクリン耐性を保持するものの、その他の置換でほぼ完全に耐性は失われている。もうひとつのGly残基、Gly69残基の変異体は、導入されるアミノ酸残基により耐性レベルは様々であるが、完全に耐性が失われるものもあり、2つの保存性Gly残基は重要な役割を担っていると考えられる。荷電残基に関しては、以前の解析で機能に必須であることが分かっているAsp66残基以外に、Arg70残基が置換による耐性レベルの低下が認められており、重要であると考えられる。残りの塩基性残基、Lys63、Arg67、Arg71残基は置換の影響をほとんど受けず、機能

に必須ではないと考えられる。2つのGly残基および4つの塩基性残基の役割については、節を改めて述べることにする。ここではまず、Table 2-2の結果からあまり重要でないと考えられるMet64残基とPhe68残基の変異体のテトラサイクリン輸送活性について述べておく。なお、野生型あるいは変異蛋白を含む反転膜小胞への呼吸基質NADH依存のテトラサイクリン取り込みをテトラサイクリン輸送活性とした。テトラサイクリン取り込みの測定は、 $10\mu\text{M}$ [^3H]テトラサイクリン、 $50\mu\text{M}$ CoCl_2 が存在する条件下で行われた。

Met64およびPhe68はモチーフを構成する残基ではないが、Phe68に相当する部位には芳香属性側鎖を有するアミノ酸残基が多く蛋白に見いだされ注目される (Figure 2-1)。Met64残基はCysに、Phe68残基はValおよびCysに置換したが、Figure 2-3に示すように、野生型と同程度のテトラサイクリン輸送活性を示すので、これらは機能に必須な残基ではないといえる。

第3節 2つの保存性Gly残基の役割

2つの膜貫通領域を結ぶループ領域には β ターン構造など折れ曲がり構造を形成する必要がある。Gly残基やPro残基は蛋白の折れ曲がり部分に多く見いだされるアミノ酸残基として知られている(260,261)。ループ2-3にはGly残基が2つ存在し、いずれも保存性配列モチーフの構成残基であることから、折れ曲がり構造を形成し、蛋白の正常な構造を維持するのに寄与していることが予想される。Table 2-2に示した薬剤耐性レベルは十分にその可能性を裏付けているように見える。本節では、これら2つのGly残基の変異体を産生する大腸菌株より反転膜小胞を調製し、テトラサイクリン輸送活性を測定した。

Figure 2-4に示すように、Gly62残基は、Ala、Val、Leu、Asnに置換したが、Val、Leu、Asn変異体では完全に輸送活性は失われていた。唯一活性を保持していたAla変異体でも野生型のわずか5%程度であった。AlaはGlyに次いで最も側鎖容積が小さいアミノ酸残基であることを考慮すると、この結果は、62位アミノ酸残基の側鎖の占める空間が制限されているために、この部位にGlyよりも大きな側鎖を持つアミノ酸残基が導入されるとペプチド主鎖に対して立体障害的に作用して折れ曲がり構造の形成を阻害していることが示唆される。また、62位のアミノ酸残基としては側鎖容積が最も小さいGlyであることが必須といえる。

Gly69残基はAla、Val、Leu、Ile、Ser、Cys、Asn、Glnに置換した。これら変異体は、69位に導入されるアミノ酸残基により様々な程度の輸送活性を示した (Figure 2-4)。Gly69残基がループ2-3の折れ曲がり構造に寄与しているならば、Gly62の置換においてみられたように導入した残基の側鎖容積や、その残基がどれほど無理なく折れ曲がり構造を形成できるかによって、輸送活性は影響を受けると考えられる。そこで、Gly69残基の変異体の輸送活性を、導入したアミノ酸残基の β ターン傾向指数、および側鎖容積に対してプロットしてみた (Figure 2-5)。 β ターン傾向指数はLevittが示した値(261)を用いた。この指数は三次元構造既知の蛋白の β ターン構造に出現するアミノ酸残基の相対頻度を指数化したものである。また、アミノ酸残基の側鎖容積はKyte and Doolittleの値(262)を用いた。

Figure 2-5を見ると、各変異体の輸送活性は側鎖容積よりはむしろ β ターン傾向指数との間により相関関係が得られ、 β ターン傾向指数の減少と共に輸送活性は低下していた。Alaは β ターン傾向指数が小さいにもかかわらず比較的高い輸送活性を示しているが、これは恐らくAlaが β ターン構造よりはむしろ α ヘリックス構造に多く出現するために、Alaの β ターン傾向指数が相対的に過小評価されているためと思われる。あるいは、側鎖容積もまた β ターン傾向指数と比較すれば寄与は小さいが、輸送活性に影響を与える要因の一部になっているのかもしれない。Gly62残基の置換でもAla変異体が有意の活性を保持する唯一の変異体であり、69位においてもAlaの小さな側鎖はペプチド主鎖の折れ曲がり構造の形成にそ

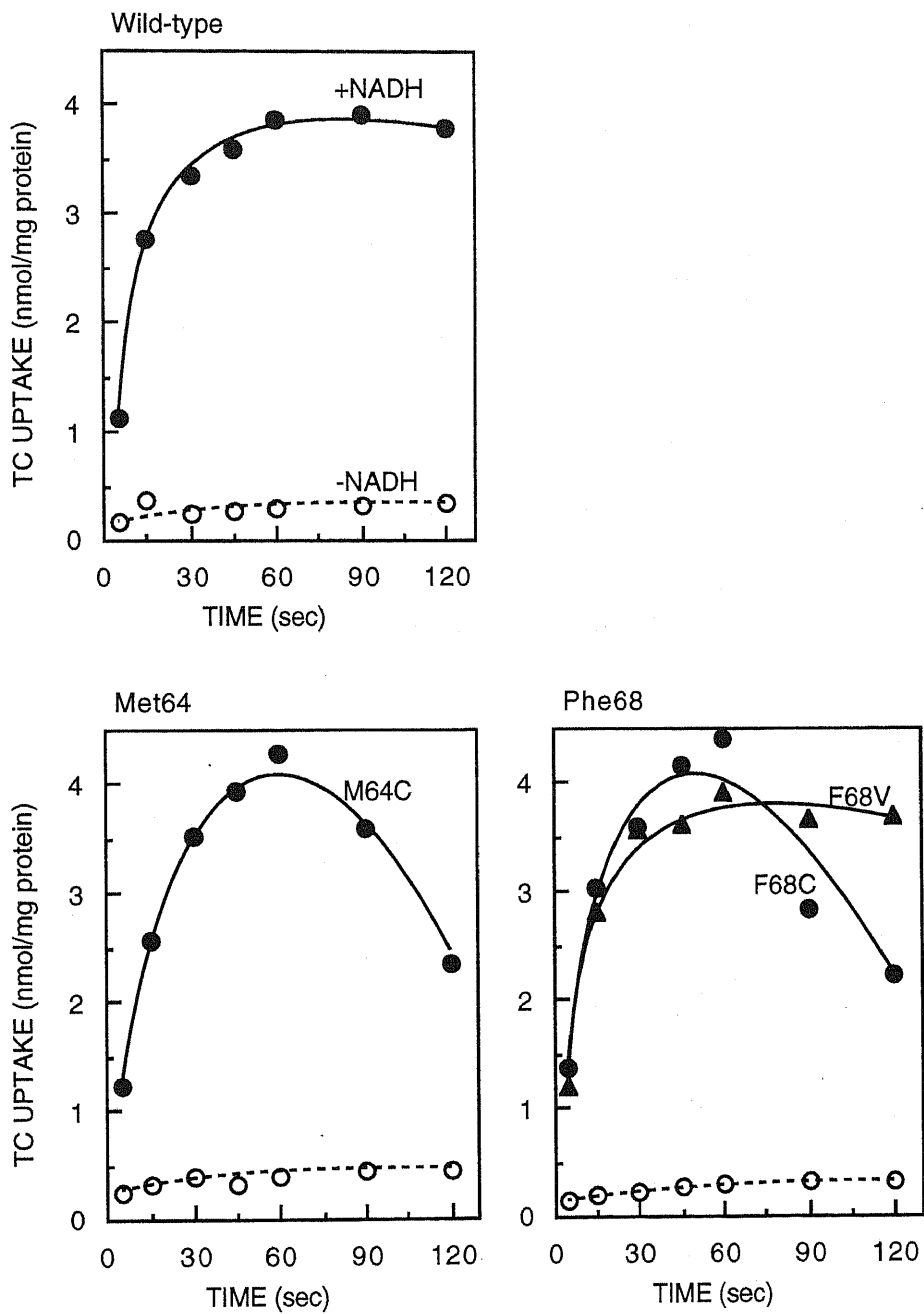


Figure 2-3. Tetracycline (TC) uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the wild-type (pLGT2) or mutant plasmids. [³H]Tetracycline uptake assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl₂. Plain lines represent the uptake in the presence of NADH and dashed lines the background uptake in the absence of NADH.

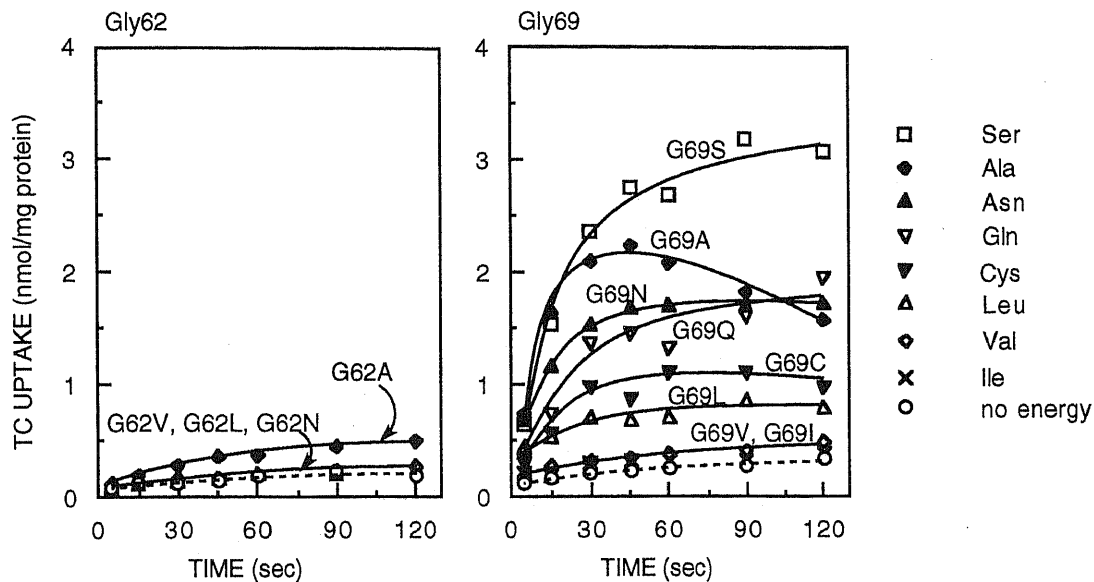


Figure 2-4. Tetracycline (TC) uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Gly62 or Gly69 substitution mutant plasmids. [³H]Tetracycline uptake assays were performed as shown in Figure 2-3.

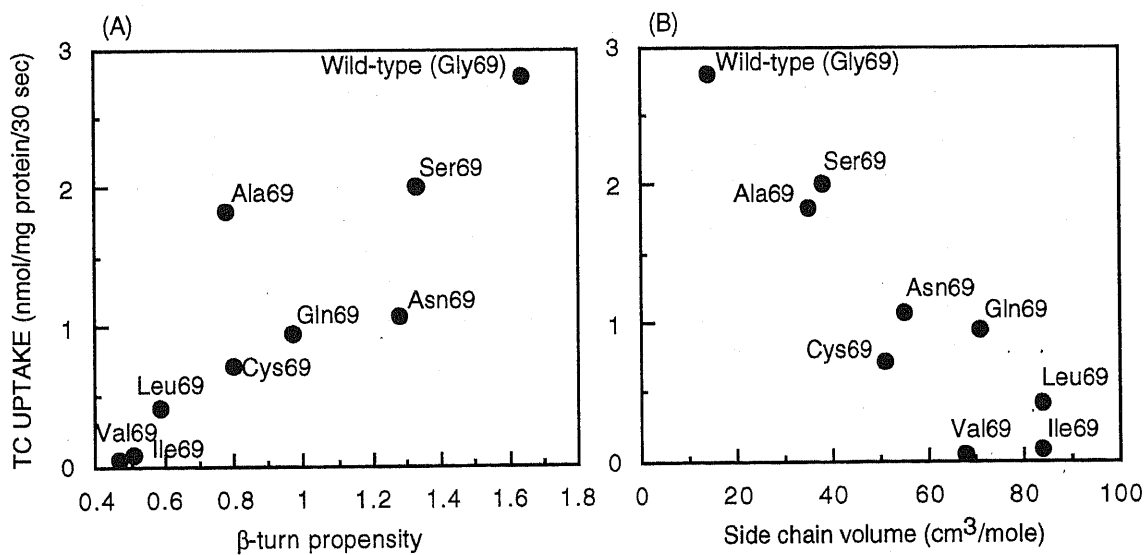


Figure 2-5. Correlation between the initial rate of tetracycline uptake and the β -turn propensity (A) or the side chain volume (B) of the amino acid residue at position 69. The NADH-dependent 30 sec uptake of tetracycline was measured and plotted. The β -turn propensity and the side chain volume are cited from papers written by Levitt (261) and Kyte and Doolittle (262), respectively.

れほど悪影響を及ぼしていないと考えられる。従って、69位に導入されるアミノ酸残基としては β ターン傾向指数が大きいことが要求され、また部分的に側鎖が小さいことが要求されると結論される。以上の結果は、ループ2-3が69位において β ターン構造を形成していることを示唆している。

第4節 正荷電残基の役割

ループ2-3は10アミノ酸残基より構成されると推定されるが、そのうち4残基が塩基性アミノ酸残基であり、全体としてポリカチオニックなループである。そのうち3つのArg残基は保存性配列モチーフを構成する残基である。このことから、ループ2-3の塩基性残基は機能に重要な役割をもつことが推測される。ここでは3つの保存性Arg残基に加えて、非保存性のLys63残基の変異体の性質を検討した。

Table 2-2で示したように、これら4つの塩基性残基の中でアミノ酸置換によるテトラサイクリン耐性レベルへの影響が最も大きかったのは、モチーフ第9番目に位置するArg70残基であった。これは他の保存性Arg残基とは対照的であった。

反転膜小胞を調製し、テトラサイクリン輸送活性を測定したところ、Arg70残基がとりわけ重要な役割を持っていることは明確である (Figure 2-6)。まず、Lys63残基はCys、Asn、Leuに置換された。AsnおよびLeu変異体の輸送活性は野生型のおよそ半分程度に減少していたが、Cys変異体は野生型と同程度の輸送活性を保持しているので、Lys63残基は機能に必須でないと言える。モチーフを構成するArg67残基およびArg71残基は、Cys、Leu変異体を構築したが、いずれの変異体も輸送活性は野生型のものほとんど変わらず、この2つも必須残基ではないと言える。

一方、Arg70残基についてはAla、Ser、Lys、Asp、Leu、Trp変異体を作成した。この中でLys変異体のみ野生型の約30%と顕著な輸送活性が観察されたのに対し、残りの5つの変異体では輸送活性は完全に消失していたか、もしくは著しく低下していた。従って、Arg70残基は同じくモチーフ構成残基であるArg67、Arg71残基とは異なり、その正荷電側鎖が機能に重要な役割を果たしていることが考えられる。

ループ2-3唯一の酸性残基Asp66はその負電荷が輸送機能に必須であり、Asn66変異体は完全に輸送活性を消失する(49)。Arg70残基のLeu変異体やAla変異体もまた輸送活性が大きく低下していることから、これら2残基間での塩橋形成が互いの電荷を中和し、蛋白構造の安定化に寄与している可能性が考えられる(263-269)。幾つかの蛋白において、塩橋形成に関与している2つの荷電アミノ酸残基のいずれか一方を置換したときに失われる活性は両方を置換したときには回復することが見いだされている。そこで、Asp66残基とArg70残基との間の塩橋形成の可能性について検討するため、両方を中性残基に置換した変異体を構築した。Asn66/Leu70二重変異体、Asn66/Ala70二重変異体はいずれも薬剤耐性を与えず (Table 2-2)、またテトラサイクリン輸送活性も見いだされなかった (Figure 2-7)。また、Asp66残基とArg70残基の荷電を交換した、Arg66/Asp70二重変異体も全く薬剤耐性を与えず (Table 2-2)、テトラサイクリン輸送活性もなかった (data not shown)。しかし、Asp66残基の負電荷が基質と相互作用するという考えのもとでは、Asp66残基の負電荷とArg70残基の正電荷とが永続的に塩橋を形成していることはむしろ考えにくい。従って、これら二重変異体の結果は、蛋白構造安定化のための永続的な塩橋形成のないことを示し、基質輸送過程における一時的な相互作用を否定するものではない。

最後に、ループ2-3のポリカチオニックな性質について検討した。ループ2-3の4つの塩基性残基の中で、Arg70残基のみが重要であるので、Arg70を残すように他の塩基性残基を中性残基に置換した変異体を構築した。Arg67およびArg71の2残基をLeuに置換したLeu67/Leu71二重変異体は、MICが50 $\mu\text{g/ml}$ と比較的高い薬剤耐性を与えている (Table 2-2)。また、更にLys63残基のLeu置換を追加したLeu63/Leu67/Leu71三重変異体もまたMICが12.5 $\mu\text{g/ml}$ という中程度の薬剤耐性を与えることができる (Table

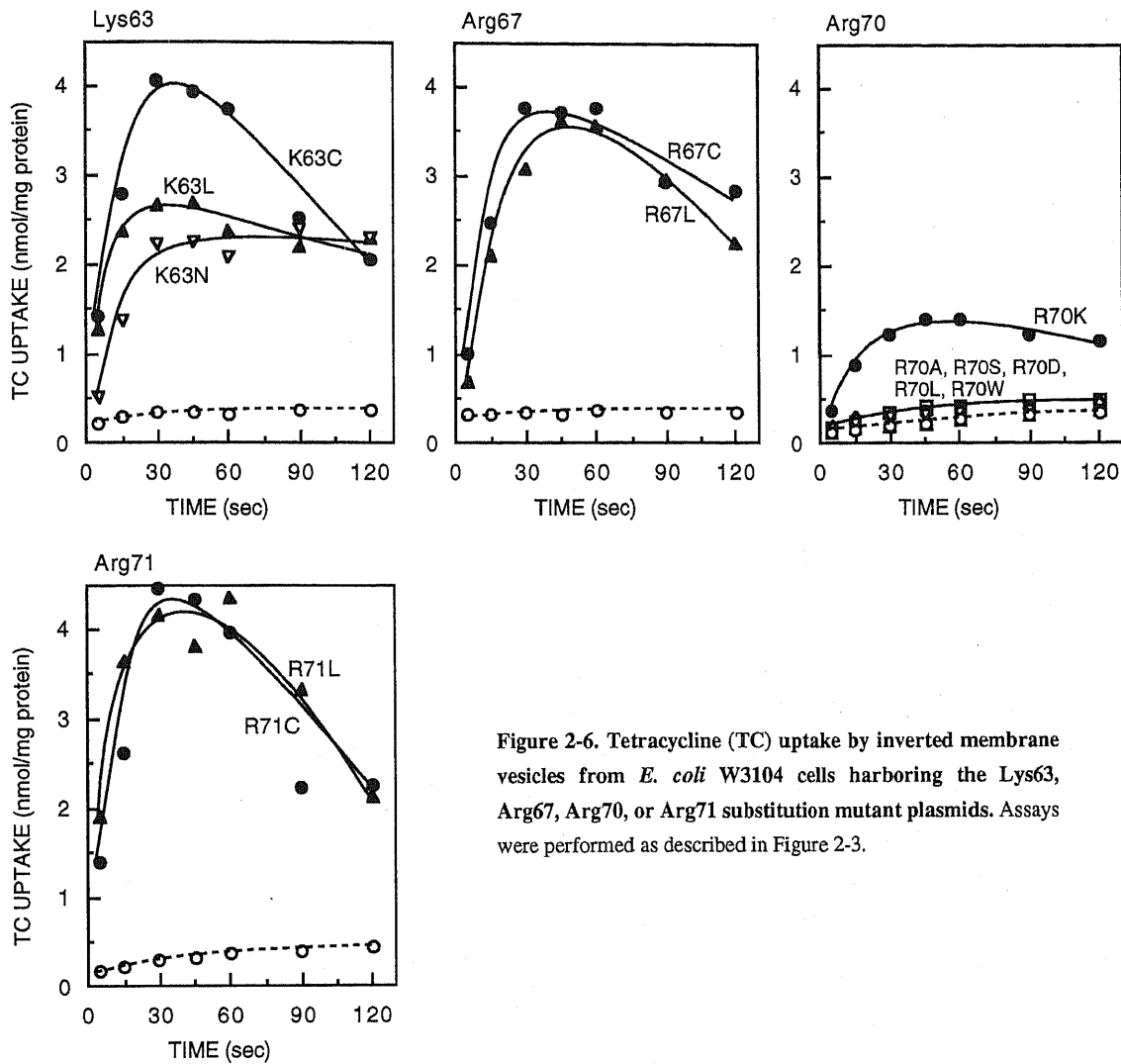


Figure 2-6. Tetracycline (TC) uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Lys63, Arg67, Arg70, or Arg71 substitution mutant plasmids. Assays were performed as described in Figure 2-3.

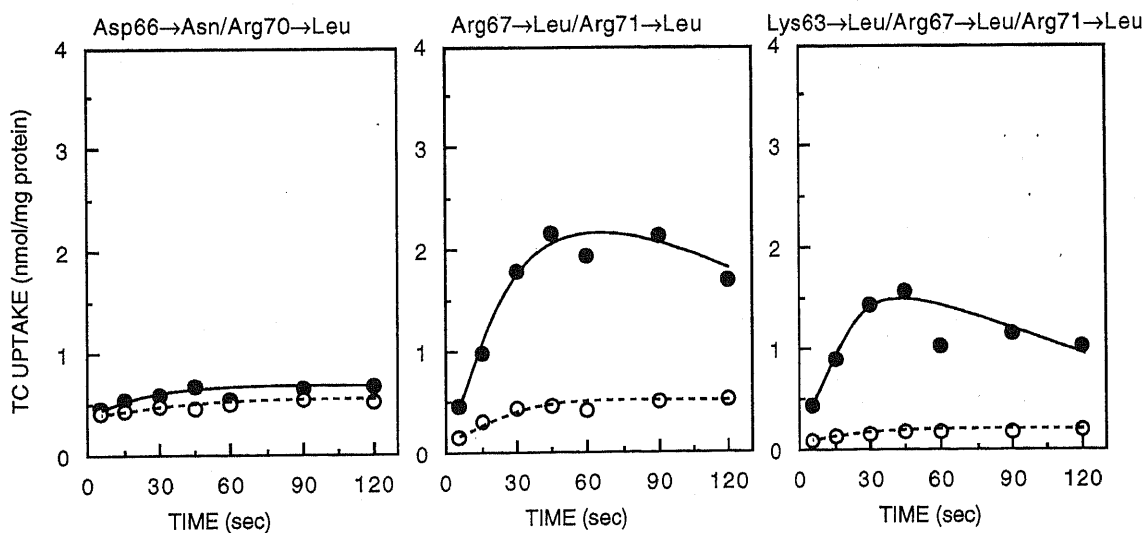


Figure 2-7. Tetracycline (TC) uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Asp66→Asn/Arg70→Leu double mutant plasmid, the Arg67→Leu/Arg71→Leu double mutant plasmid or the Lys63→Leu/Arg67→Leu/Arg71→Leu triple mutant plasmid. Assays were performed as described in Figure 2-3.

2-2)。更に、輸送活性を測定すると、Leu67/Leu71二重変異体は野生型の約40%の輸送活性を示し、Leu63/Leu67/Leu71三重変異体ですら野生型の30%程度の活性を保持しており (Figure 2-7)、ループ2-3のポリカチオン性性質は輸送機能には必須でないといえる。

第5節 Cys変異体へのSH修飾試薬の作用

ループ2-3中央のSer65残基のCys変異体の輸送活性はSH修飾試薬、*N*-エチルマレイミド (NEM) を作用させることによりほぼ完全に阻害される。野生型TetAはCys残基をひとつ (Cys377) もっているが、NEMによる活性阻害を受けない(49,231-233)。NEMよりも修飾側鎖が小さい、メチルメタンチオスルフォネート (MMTS) ではCys65変異体の活性阻害の程度が約40%と低下する(49)。以上の結果は輸送活性の阻害が65位側鎖による立体障害に基づいていることを示し、65位側鎖が基質輸送経路の極近傍に位置していることを示唆している。本研究では、Lys63、Met64、Arg67、Phe68、Gly69、Arg71のCys変異体を新たに構築したので、NEMの輸送活性への効果を検討した。それぞれの反転膜小胞を様々な濃度のNEMで5分間処理した後の活性を、未処理の時の活性と比較し、残存活性として表した (Figure 2-8)。その結果、新たに構築されたCys変異体は、2mMのNEMを作用させても輸送活性が阻害されることはなく、結局、ループ2-3にはNEM感受性部位が65位のみであることがわかった。

Cys65変異体以外のCys変異体がNEMによる活性阻害を受けない理由として、Cys残基側鎖がNEMを結合しても基質輸送を阻害する位置にはないこと、あるいは、Cys残基側鎖がNEMを結合できない位置にあることが考えられる。これらの可能性を区別するために、 $[^{14}\text{C}]$ NEMを用いてその結合性を調べた。反転膜小胞を0.5mMの $[^{14}\text{C}]$ NEMで5分間処理し、C末端特異抗体とPansorbinを用いてTetAを免疫沈降し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、オートラジオグラフィーで $[^{14}\text{C}]$ NEM結合性を判定した。Figure 2-9に示すように、この条件下で、活性が阻害されるCys65変異体だけでなく、Cys63、Cys67、Cys68、Cys69変異体にも $[^{14}\text{C}]$ NEM結合が観察された。従って、これらの部位でNEMを作用させてもテトラサイクリン輸送活性が阻害されないのは、NEMが結合しても基質輸送の障害とはならない方向に側鎖が向いていることを示している。また、Cys64、Cys71変異体では野生型TetAと同様に $[^{14}\text{C}]$ NEMの結合が見られなかった。NEMはSH基の解離型、S⁻と反応するので、Cys64、Cys71変異体では側鎖が蛋白内部に埋め込まれているので、解離型になることができない、もしくは、解離型になりにくいと考えられる。

以上の結果より、Ser65残基の側鎖がループ2-3の構造上特異な位置、基質輸送経路の極近傍に存在することが強く支持された。

第6節 考察

本章では、二次性能動輸送体に普遍的に見いだされるアミノ酸配列モチーフ、Gly-X-X-X-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Argの役割とそれを構成するアミノ酸残基の役割を明らかにするため、トランスポゾンTn10にコードされるテトラサイクリン排出蛋白 (TetA(B)) を用い、モチーフが存在するループ2-3領域の部位特異的変異導入解析を行った。

ループ2-3の10アミノ酸残基のうち、置換による活性への影響が顕著で機能に重要であるとされたものは、Gly62、Asp66、Gly69、Arg70の4残基であった (Table 2-2)。これらはいずれもモチーフを構成する残基である。しかし、Arg70残基と同様モチーフ構成残基でありながら、Arg67およびArg71残基は機能に必須ではなかった。この結果は、機能に重要であるという要因以外にもアミノ酸残基の保存性を

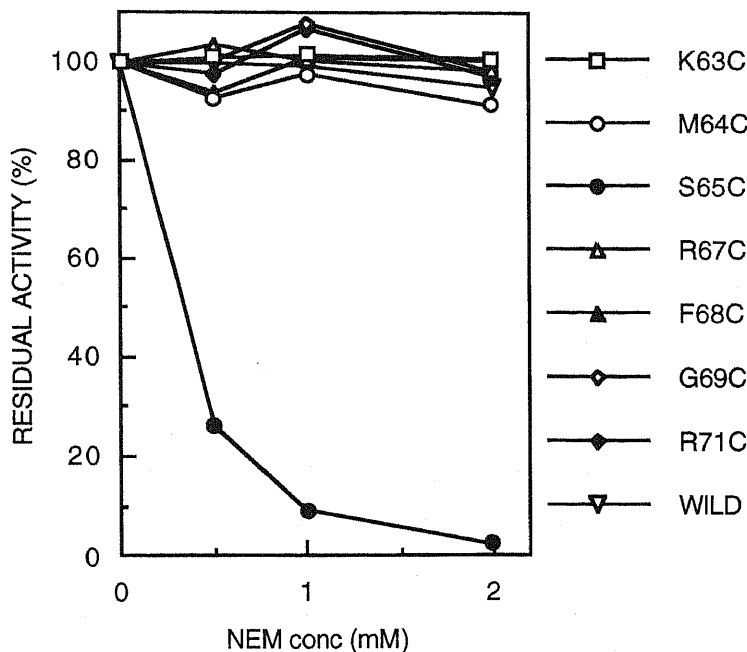


Figure 2-8. Effect of *N*-ethylmaleimide (NEM) on the tetracycline uptake by inverted membrane vesicles. The initial rate of NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec by the wild-type or Cys mutant vesicles was measured after preincubation with the indicated concentration of NEM at 30 °C for 5 min. Residual activity is expressed as a percentage of the initial rate in the absence of NEM.

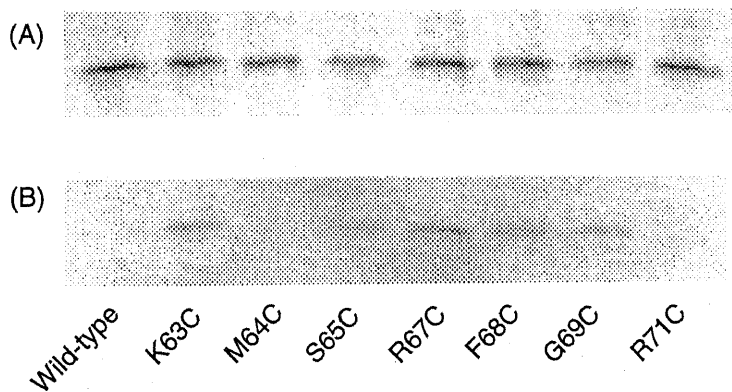


Figure 2-9. Modification of the Cys mutant TetA proteins with [¹⁴C]*N*-ethylmaleimide (NEM). Inverted membrane vesicles were incubated with 0.5 mM [¹⁴C]NEM for 5 min at 30 °C. After washing, the vesicles were solubilized with 1 % Triton X-100 and 0.1 % SDS. The detergent-extract was treated with anti-TetA-Ct14 antisera, followed by immunoprecipitation with Pansorbin cells. SDS-PAGE of the immunoprecipitates was performed. (A), Coomassie Brilliant Blue staining of the gel. (B), autoradiograph of the gel.

決定する要因が別にあることを示唆している。

Arg70残基はLys変異体のみ高い輸送活性を保持していたので、70位の正電荷は機能に重要であると考えられる (Figure 2-6)。その役割として、機能に必須な66位の負電荷と塩橋を形成して蛋白構造を安定化する可能性を挙げたが、両者を中性残基に置換しても、また電荷を交換しても活性回復は認められなかった (Figure 2-7) ので、その可能性は否定された。ただし、66位の負電荷は基質、テトラサイクリン2価カチオンキレート体との相互作用部位であるという推定(49,231-233)を考慮すれば、蛋白構造安定化のための永続的な塩橋形成はむしろ考えにくい。本研究の結果はこの考えを支持し、永続的な塩橋形成がないことを否定するが、輸送過程における一時的な相互作用を否定するものではない。Arg70残基の役割については、次章以降更に検討を加える。

ループ2-3は10残基中4残基が塩基性残基であり、全体としてポリカチオニックな性質を持つ。しかし、機能に重要なAsp66残基とArg70残基を残し、他の3つの塩基性残基をLeuに置換しても、興味深いことに、薬剤耐性を与えることができ、また顕著なテトラサイクリン輸送活性を保持していることが明らかになった (Figure 2-7)。従って、ループ2-3のポリカチオニックな性質は機能に必須ではないと言える。

2つのGly残基は蛋白構造の形成、維持に重要であることが明らかになった (Figure 2-4)。62位は69位よりも挿入されるアミノ酸残基に関して厳密さが要求される。すなわち、Glyに次いで側鎖容積が最も小さいAlaですら著しい活性低下をもたらしている。このことから、62位側鎖の占める空間が制限されていること、そのために大きな側鎖をもつアミノ酸残基が導入されるとペプチド主鎖に対して立体障害を引き起こし、蛋白構造を歪ませていることが示唆される。一方、69位の変異体は、導入されたアミノ酸残基により様々な程度の輸送活性を示し、アミノ酸残基の側鎖容積よりもむしろ β ターン傾向指数との間でよい相関関係が得られ (Figure 2-5)、69位が β ターン構造形成に寄与していることが示唆された。興味深いことに、Cys69変異体はNEMを結合する (Figure 2-9) が、その輸送活性は全くNEMの影響を受けていない (Figure 2-8)。Cys残基にNEMが結合すれば明らかに69位側鎖は大きくなり、輸送活性が阻害されても不思議ではない。この結果は69位変異体で見られた輸送活性が側鎖容積に依存するのではなく、アミノ酸残基が蛋白分子中の特定の部位に導入されたときに示す物理的なパラメーターによって主に支配されていることを示すものと思われる。

本研究では幾つかのCys変異体を新たに構築したが、NEMにより輸送活性が阻害されるのは、Cys65変異体のみであった (Figure 2-8)。 $[^{14}\text{C}]$ NEM結合性実験の結果、Cys64、Cys71変異体以外のCys変異体で $[^{14}\text{C}]$ NEMの結合が観察された (Figure 2-9)。従って、ループ2-3には、側鎖が蛋白内部に向いているためにNEMを結合できない位置 (64位、71位)、NEMを結合しても輸送活性が阻害されない位置 (63位、67位、68位、69位)、NEMが結合して輸送活性を阻害する位置 (65位) の3種類あることが明らかになった。更に注目すべき点として、Cys65変異体の活性はMMTSでは約40%しか阻害されない⁽⁴⁹⁾ことが挙げられる。これは輸送の阻害が65位側鎖による立体障害であることを示唆している。これを裏付けるかのように、MMTSで修飾されたCys側鎖に相当する側鎖をもつMet65変異体で中程度の活性をもち、更に側鎖が大きくなるPhe65変異体が完全に活性を失っていることが明らかになっている⁽²³¹⁾。以上の結果から、65位側鎖が基質輸送経路の極近傍に位置すること、それ故、ループ2-3がAsp66の負電荷を正味1価カチオンの基質との相互作用部位とする、細胞質側の基質輸送経路の入り口に相当する細胞質側ゲートとして機能していることが示唆される。

McNicholasらはヒドロキシルアミンを用いてpBR322にコードされるTetA(C)のランダム変異体を数種分離した⁽²⁷⁰⁾。それによると、テトラサイクリン耐性が著しく低下する変異体が、膜貫通領域ではほぼ全域に渡って分布していたが、親水性領域ではループ2-3およびループ10-11に著しく局在していた。この結果はループ2-3領域の重要性を裏付けるものであるが、更に興味深いことに、本研究のTetA(B)の結果

と同様に重要残基の分布が見られている。すなわち、TetA(C)のループ2-3の耐性低下変異体として、Gly64→Glu、Ser67→Phe、Asp68→Asn、Gly71→Asp、Arg72→Cysが挙げられる。これらの部位はそれぞれTetA(B)のGly62、Ser65、Asp66、Gly69、Arg70に相当し、TetA(C)の結果はTetA(B)の結果とよく一致している。

現在までに3種類の膜輸送蛋白について、ループ2-3領域のアミノ酸残基の解析が報告されている。まず、大腸菌の α -ケトグルタル酸輸送体 (α -ケトグルタル酸/H⁺シンポーター、KgtP) の解析がSeol and Shatkinによりなされた(271)。KgtPもTetAと同様に12回膜を貫通する二次構造をもち、Gly-X-X-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Argが保存されている (Figure 2-1)。この報告ではAsp88、His90、Arg92を部位特異的変異導入の標的として選んでおり、これらはそれぞれTetA(B)のAsp66、Phe68、Arg70に相当する。KgtPでもAsp88残基、Arg92残基は機能に重要という結果が得られている。しかし、それぞれ電荷を保存するGlu88変異体、Lys92変異体でも機能には不十分であるという点で若干TetA(B)の場合とは異なっていた。His90残基は保存性残基ではないが、Ala変異体の活性は野生型KgtPと同程度であり、TetA(B)のPhe68の結果と同じである。KgtPはシンポーター、TetA(B)はアンチポーターという違いはあるが、いずれの輸送体も保存性モチーフを含むループ2-3の重要残基の分布は一致し、このモチーフまたそれを構成する個々のアミノ酸残基は、基質輸送機構において共通の役割をもっているという考えを支持している。

部位特異的変異導入解析が精力的に行われている輸送体である、大腸菌ラクトース輸送体 (ラクトース/H⁺シンポーター、LacY) のループ2-3の解析が最近報告された。LacYのループ2-3の配列は、Gly64-Leu-Leu-Ser-Asp-Lys-Leu-Gly-Leu-Arg-Lysであり、モチーフの通常形に比べると、第8番目のGlyと第9番目のArgの間にLeuが挿入された形になっている (Figure 2-1)。Jessen-Marshallらは保存性の高いモチーフ構成残基 (Gly64、Asp68、Lys69、Gly71、Arg73、Lys74) の部位特異変異体を数種作成した(272)。それによると、3つの塩基性残基は、TetA(B)のArg70残基に相当するArg73残基でさえも、置換による活性への影響はほとんどなく、LacYではループ2-3の塩基性残基はあまり重要でないと言える。更に、TetA(B)のAsp66残基に相当するAsp68残基も、Asn、Glu、Hisに置換した場合には活性は著しく低下するものの、Ala、Ser、Thr、Tyr置換で野生型の10~20%の活性が残存し、負電荷が機能に必須というわけではない。これは、基質のラクトースが中性分子であることと関係があるのかもしれないが、置換しても野生型と同等の活性を保持する変異体はないので、この部位はAsp残基であることが最も望ましいことは両者において一致している。Gly64残基はTetA(B)のGly62残基の置換で見られたように、Ala変異体で50%程度の活性を保持する以外は活性は10%以下になり、第1番目の部位が側鎖容積の大きいアミノ酸残基を好まない点でよく一致している。しかし、Gly71残基は導入されるアミノ酸残基により様々な程度の輸送活性を示すが、TetA(B)のGly69残基のように特に β ターン傾向指数や側鎖容積に相関しているわけではない。Cys、Pro、Leu変異体では活性が40%以下に低下することから、Gly71残基は輸送の速度論に影響する残基としている。この2つのGly残基の変異導入解析は、JungらによるLacYの全Gly残基の解析の中でも行われ(273)、Jessen-Marshallらと同様の結果を得ている。Jessen-Marshallらは最後に、このモチーフが様々な輸送担体に保存されていることから、細胞質への基質の移動に重要な領域であり、基質の活性中心への結合に伴って蛋白全体のコンフォメーション変化を引き起こしているのかもしれないと推察している。また、別の可能性として、基質透過経路の開閉のためのゲートとして機能しているのかもしれないとも述べている(272)。

Merickelらは小胞体性モノアミン輸送体 (モノアミン/H⁺アンチポーター、SVAT、VMAT2) の変異導入解析の中で、そのループ2-3のGly151、Thr154、Asn155、Gly158の変異体を作成した(274)。これらはそれぞれTetA(B)のGly62、Ser65、Asp66、Gly69に対応する。VMAT2ではもともとモチーフの第5番目を中性残基が占めていることは注目すべき点である。Gly151およびGly158残基はLeuに置換しても活

性に変化がなく、必須ではない。Thr154残基はAlaに、Asn155残基はGln、Aspに置換したが、いずれも活性に大きな変化はなく、これらも必須残基ではない。従って、VMAT2ではAsn155残基が基質と相互作用する可能性はないと考えられる。

HendersonらはArg-X-Gly-Arg-Argモチーフが12本膜貫通蛋白分子内に2カ所存在することを指摘している(44)。ひとつはループ2-3であるが、もうひとつはループ8-9に存在している。これらは蛋白をN末側、C末側それぞれ6本ずつの膜貫通領域からなる2つの領域に分けたとき、細胞質側で対称の位置に存在し、tandem duplication説(39,40)を支持する証拠のひとつになっている。アミノ酸配列を詳細に検討すると、ユニポーター、シンポーターではループ2-3と同じ、Gly-X-X-X-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Argモチーフが見いだされるが、アンチポーターでは、酸性残基が第9番目に位置するようにモチーフは変形し、Gly-X-X-X-Arg-X-Gly-Glu-Argと表される (Figure 2-10)。これまで、薬剤排出蛋白しか見いだされていないが、14本膜貫通蛋白のC末側8本の領域はN末側相当領域のtandem duplicationに依らず、由来を異にするとされていた(10,42)。しかし、アミノ酸配列を詳細に観察すると、第10膜貫通領域と第11膜貫通領域を結ぶ領域にこのモチーフの名残をGly-X-X-X-Arg-X-Gly-X-Xという形で見いだすことができる(11)。しかし、ここでは特徴的な酸性残基の保存性は低く、Tet (K)およびTet (L)でモチーフ第5番目残基としてしか見いだされていない。

TetA(B)のループ8-9のアミノ酸配列は、Gly266-Arg-Ile-Ala-Thr-Lys-Trp-Gly-Glu-Lysである。当研究室ではすでにループ8-9の変異導入解析が行われている(275)が、ループ2-3に類似した配列をもつにもかかわらず、アミノ酸置換の効果には差異が認められた。機能に重要なAsp66残基、Arg70残基と対応する位置にあるThr270残基、Glu274残基はそれほど重要とは考えられていない。つまり、Thr270残基はCysに置換したが高い輸送活性を保持し、Glu274残基はAsp、Gln、Lysに置換した場合には活性はかなり低下するものの、Ala、Cys置換では野生型と変わらない活性を保持していた。Glu274残基は薬剤排出蛋白の多くに見いだされ、シンポーターやユニポーターとは異なりモチーフの第9番目に位置することで、共役との関連で注目されたが、結果は予想に反したものであった。保存性のLys271およびLys275残基はいずれもCys置換で活性低下は見られず、必須残基ではないと言える。一方、2つのGly残基に関してはループ2-3とほぼ同様の役割をもっていると考えられている。Gly266残基はCys置換では野生型と同程度の活性を示すが、Val置換で半分程度に活性は低下し、Gly62残基ほど厳密ではないが、側鎖容積に依存した活性を示した。一方、Gly273残基の変異体の輸送活性は導入したアミノ酸残基の β ターン傾向指数とよく相関し、Gly69残基と同じく β ターン形成に関与していると考えられる。ループ8-9では10残基全てのCys変異体を作成した。いずれのCys変異体も $[^{14}C]NEM$ 結合が観察されたが、輸送活性が阻害されるのはCys266、Cys268、Cys269、Cys273変異体の4つであった。その中で最もNEMの影響を受けたのがCys269変異体であったことは、269位が65位と対応する位置にあることを考えると興味深い。このことから、両ループの構造は非常に類似していると考えられる。ただし、機能の面で重要な残基がループ8-9には見いだされなかったため、ループ2-3は"active"なゲート、ループ8-9は"silent"なゲートと推測されている(275)。

当研究室では、枯草菌のプラスミドpNS1(28)にコードされるクラスKテトラサイクリン排出蛋白 (Tet (K)) (276,277)の変異導入解析も行っている(278)。Tet(K)は現在ハイドロパシー解析により14本の膜貫通領域をもつ二次構造が推定されている(41)。Figure 2-1およびFigure 2-10に示したように、Tet(K)にも保存性配列モチーフがループ2-3とループ10-11の2カ所に見いだされ、しかもAsp残基が両ループの第5番目に位置し、クラスKおよびクラスLに保存されている。Tet(K)のループ2-3に存在するAsp74はAsnに置換しても輸送活性は消失することなく、顕著に残存していたが、ループ10-11のAsp318はAsnに置換すると完全に活性を失う。従って、クラスKおよびクラスLのテトラサイクリン排出蛋白ではループ2-3よりもループ10-11の重要性が高く、"active"なゲートとして機能していることが示唆される。

Protein		G	X	X	X	D	R	X	G	R	R
		G	X	X	X	X	R	X	G	E	R
Antibiotic resistance proteins											
TetA(B) (G-)	266	G	R	I	A	T	K	W	G	E	K
TetA(A) (G-)	268	G	P	V	A	A	R	L	G	E	R
TetA(C) (G-)	268	G	P	A	T	K	R	F	G	E	K
TetA(D) (G-)	264	G	A	L	A	K	R	L	S	E	K
TetA(E) (G-)	267	G	F	I	A	K	H	L	G	E	R
TetA(G) (G-)	266	G	P	L	S	S	R	L	G	E	R
TetA(H) (G-)	267	G	K	L	A	Q	K	W	G	E	K
CmlA (P.aeruginosa)	270	G	R	V	I	P	K	W	G	S	P
Bcr (E.coli)	247	T	I	F	N	S	R	F	V	R	R
EmrD (E.coli)	262	A	W	F	A	G	R	P	N	K	R
NorA (S.aureus)	259	F	D	K	F	M	K	Y	F	S	E
Bmr (B.subtilis)	262	F	D	R	F	T	R	W	F	G	E
CmlR (S.lividans)	260	G	R	L	S	D	R	R	P	A	Q
EmrB (E.coli)	325	A	R	F	A	H	K	L	D	M	R
QacA (S.aureus)	331	P	G	L	A	A	R	F	G	P	K
Tet (K) (G+)	314	G	F	L	V	D	R	K	G	S	L
Tet (L) (G+)	314	G	I	L	V	D	R	R	G	P	L
Mmr (S.coelicolor)	334	A	R	I	S	A	R	F	S	N	G
TcmA (S.glaucescens)	335	G	I	V	I	S	R	F	G	P	G
LmrA (S.lincolnensis)	338	R	G	L	I	E	R	I	G	T	T
ActII-ORF2 (S.coelicolor)	359	A	V	L	G	S	K	F	G	R	K
ActVA-ORF1 (S.coelicolor)	333	T	V	L	V	R	S	I	G	P	R
Pur8 (S.alboniger)	335	A	R	L	L	P	R	T	R	P	R
CmcT (N.lactamdurans)	334	P	W	L	M	R	H	V	Q	A	R
Neurotransmitter transporters											
CGAT (rat)	354	G	V	L	A	N	K	M	G	R	W
SVAT (rat)	350	G	I	L	A	H	K	M	G	R	W
VACHT (rat)	346	V	R	L	A	A	R	Y	P	H	L
OCT1 (rat)	395	L	V	T	I	D	R	I	G	R	I
SV2 (rat)	616	A	L	L	M	D	K	I	G	R	L
sugar, organic anion, peptide transporters											
CitA (E.coli)	292	G	A	I	S	D	R	I	G	R	R
KgtP (E.coli)	300	G	A	L	S	D	K	I	G	R	R
AraE (E.coli)	315	V	F	T	V	D	K	A	G	R	K
GalP (E.coli)	308	I	G	L	V	D	R	W	G	R	K
XylE (E.coli)	333	I	M	T	V	D	K	F	G	R	K
LacY (E.coli)	280	P	L	I	I	N	R	I	G	G	K
CscB (E.coli)	278	P	F	F	V	N	R	V	G	P	K
RafB (E.coli)	283	P	W	I	I	N	R	I	G	A	K
MelB (E.coli)	283	P	R	L	V	K	S	L	S	R	R
GLUT1 (human)	325	L	F	V	V	E	R	A	G	R	R
GLUT2 (human)	355	V	F	L	V	E	K	A	G	R	R
GLUT3 (human)	323	L	F	L	V	E	R	A	G	R	R
GLUT4 (rat)	341	V	L	L	V	E	R	A	G	R	R
GLUT5 (rat)	332	V	F	V	V	E	L	W	G	R	R
GLUT7 (rat)	355	L	I	V	V	E	K	A	G	R	R
GAL2 (S.cerevisiae)	384	L	W	T	V	E	N	L	G	R	R
HXT2 (S.cerevisiae)	378	L	Y	T	V	D	K	F	G	R	R

Figure 2-10. Conserved sequence motif, GXXXDRXGRR or GXXXXRXGER, in a putative cytoplasmic loop, loop8-9, between transmembrane segments 8 and 9 of 12-transmembrane spanning transport proteins or in loop10-11 of 14-transmembrane spanning transport proteins. Conserved amino acid residues are shown in boxes. See Figure 2-1 for abbreviations and references. [12-transmembrane spanning proteins] TetA, CmlA, Bcr, EmrD, NorA, Bmr, CmlR, CGAT, SVAT, VACHT, OCT1, SV2, CitA, KgtP, AraE, GalP, XylE, LacY, CscB, RafB, MelB, GLUT1-7, GAL2, and HXT6. [14-transmembrane spanning proteins] Tet, EmrB, QacA, Mmr, TcmA, LmrA, ActII-ORF2, ActVA-ORF1, Pur8, and CmcT.

第1節 はじめに

第2章では、TetA(B)のループ2-3領域に存在する保存性配列モチーフGly-X-X-X-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Argの第9番目残基Arg70の正荷電側鎖が、他の2つの保存性Arg残基とは異なり、機能に重要であることが示された(279)。当研究室では、ループ2-3領域に引き続く第3膜貫通領域およびループ3-4付近の精密なトポロジーを決定するために、これらの領域に含まれるアミノ酸残基を個々にCys残基に置換し、¹⁴C]N-エチルマレイミド (NEM) の結合性を調べている(195)。その過程で、第2章では作成されていなかったArg70残基のCys変異体が構築された。Cys残基側鎖は中性で比較的小さく、Cys70変異体の性質はAla70変異体、Ser70変異体に類似して、わずかなテトラサイクリン輸送活性しか残存していないであろうことが予想された。ところが、予想に反し、Cys70変異体はLys70変異体に次ぐ顕著な輸送活性をもつことが観察された。本章では、このCys70変異体の高い輸送活性を示す原因について検討した。

第2節 Arg70→Cys変異体の構築

Arg70残基のCys置換はEckstein法に従い、Table 3-1に示す合成オリゴヌクレオチドとpER2のssDNAを鋳型として用いた。

Table 3-1. Mutagenic primer used for the Arg70→Cys substitution.
Asterisks (*) and underline indicate mismatches and a new restriction site, respectively.

Primer	Nucleotide sequence	Codon change	Amino acid substitution
R70C	5'-GATTTGGTTGC <u>CAGG</u> CCTGTGCTGTT-3' * * * * * StuI	CGG→TGC	Arg70→Cys

Figure 2-2に示したようにローコピープラスミド、pLGR70Cを構築し、大腸菌W3104株を形質転換した。変異蛋白の産生量は野生型TetAと同程度であった (data not shown)。Cys70変異株のテトラサイクリン耐性レベルを測定し、Table 3-2に他の70位変異株とともにまとめた。

Table 3-2. Tetracycline resistance levels of *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70 substitution mutant plasmids.

Plasmid	TetA	MIC of tetracycline ($\mu\text{g/ml}$)
None	None	0.8
pLGT2	Wild-type	200
pLGR70C	Arg70→Cys	12.5
pLGR70A	Arg70→Ala	12.5
pLGR70S	Arg70→Ser	12.5
pLGR70K	Arg70→Lys	12.5
pLGR70D	Arg70→Asp	0.8
pLGR70L	Arg70→Leu	0.8
pLGR70W	Arg70→Trp	0.8

Cys70変異体はAla、Ser、Lys変異体と同程度の薬剤耐性レベルを与えることができることが分かる。Lys変異体はAla、Ser変異体に比べると高い輸送活性をもっているにも関わらず、薬剤耐性レベルでは変化がない。MICの測定は焦点としている蛋白の輸送活性だけを反映するとは限らないので、必ずしもin vitroでの輸送活性測定と比例しないが、この結果はCys、Ala、Ser変異体もテトラサイクリン排出能をもっていることを示している。

Cys残基側鎖は中性で比較的小さいので、Cys70変異体の性質はAla70、Ser70変異体に類似して、わずかなテトラサイクリン輸送活性しか示さないであろうと思われた。ところが、反転膜小胞を調製し、テトラサイクリン輸送活性を測定すると、Figure 3-1Aに示すように、明らかにAla70、Ser70変異体の輸送活性よりも高く、Lys変異体に次ぐ活性を保持していることが明らかになった。Figure 3-1Bではアッセイ溶液中の Co^{2+} 濃度を1mMに上げ、テトラサイクリン- Co^{2+} キレート体の量を上昇させたときの取り込みを示しているが、野生型、Lys変異体、Ala変異体の輸送活性の上昇の程度に比べて、Cys変異体の活性の上昇度は著しく大きいことが分かる。

1mM CoCl_2 存在下で測定した速度論的定数 (Table 3-3) を見ても、Cys70変異体がAla、Ser変異体とは異なる性質を持っていることが分かる。また、各変異体に対するテトラサイクリンの見かけの親和性は野生型に対する値とほぼ同じであり、70位が基質と直接相互作用する部位ではないことが示唆される。

Table 3-3. Kinetic constants for tetracycline uptake by inverted membrane vesicles.

NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of various concentrations (5-100 μM) of tetracycline and 1 mM CoCl_2 . The kinetic constants were calculated from non-linear regression. Data indicate average \pm S.D..

Mutation	K_m (μM)	V_{max} (nmol/mg protein/min)
None (Wild-type)	24.8 \pm 7.3	43.1 \pm 4.8
Arg70→Cys	26.6 \pm 5.7	10.7 \pm 0.8
Arg70→Lys	18.6 \pm 2.7	19.2 \pm 1.0
Arg70→Ala	22.7 \pm 3.1	4.4 \pm 0.3
Arg70→Ser	23.8 \pm 9.8	2.3 \pm 0.4

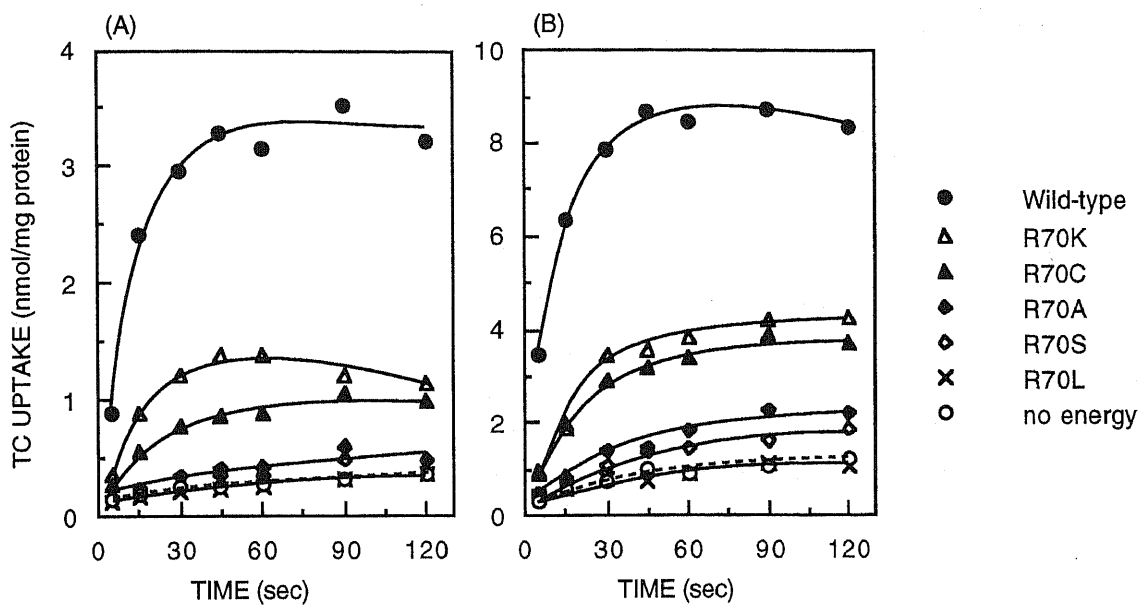


Figure 3-1. Tetracycline (TC) uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70 substitution mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl_2 (A) or 1 mM CoCl_2 (B).

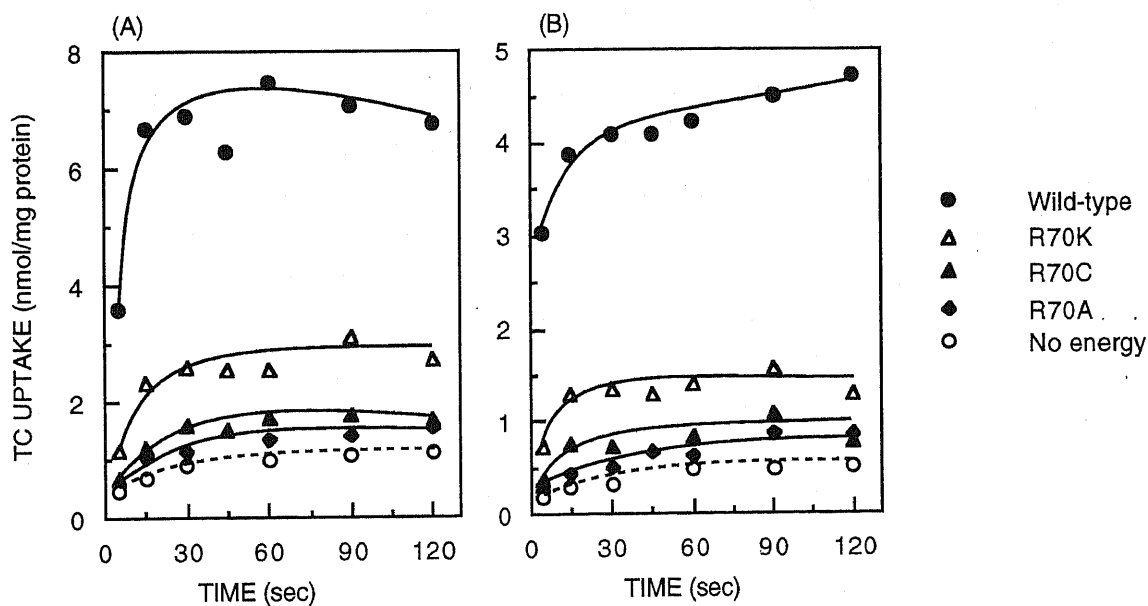
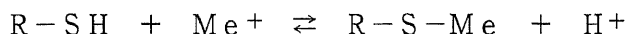


Figure 3-2. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70 substitution mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 1 mM MnCl_2 (A) or 1 mM MgSO_4 (B).

第3節 Arg70→Cys変異体のHg²⁺イオンによる活性化

Cys70変異体が予想外に高いテトラサイクリン輸送活性を示す原因を明らかにするため、Cys残基側鎖のSH基が、ある種の重金属イオンと高い親和性を有することに着目した。SH基はHg⁺、Hg²⁺、Ag⁺、Cd²⁺、Zn²⁺、Pb²⁺などと親和性が高く、両者は次式のように反応して、メルカプチドを形成することが知られている(280)。



Co²⁺もまたSH基との親和性が高く、システイン分子やグルタチオン分子のSH基とメルカプチドを形成することが知られている(281,282)。TetAはテトラサイクリンと2価カチオンとのキレート体を輸送基質とするので、通常のテトラサイクリン輸送活性測定ではCoCl₂ (Co²⁺) が含まれている。SH基のメルカプチド形成を考慮すると、Cys70変異体の顕著な活性はアッセイ溶液中のCo²⁺がCys70残基側鎖のSH基に結合してメルカプチド (-S-Co⁺) を形成し、正荷電側鎖として機能している可能性が考えられた。テトラサイクリンはMn²⁺やMg²⁺ともキレート体を形成しTetAにより輸送される(5)が、Co²⁺の代わりにこれらの2価カチオンを用いて反転膜小胞で輸送活性を測定した場合には、Cys70変異体の活性はむしろAla70変異体の活性に近い (Figure 3-2)。この結果は、Mn²⁺やMg²⁺がメルカプチドを形成しにくいことを示すものと考えられる。

メルカプチド形成を明確にするために、次にSH基に対してより親和性の高いHg²⁺の効果を検討した。まず、Hg²⁺がテトラサイクリンとキレート体を形成するかどうかについて検討した。テトラサイクリン分子は360nm付近に極大吸収をもち、2価カチオンを加えキレート体が形成されるにつれて極大吸収が380nm付近に移動するという特徴を持っている(5,283)。テトラサイクリン濃度を10 μMに固定し、HgCl₂を徐々に加えていった場合、5mMという高濃度でも極大吸収波長の移動は見られず (data not shown)、キレート体形成はないと結論された。そこで次に、Hg²⁺をCo²⁺と共存させた場合に輸送活性に影響があるかどうかを調べた。Figure 3-3AはCo²⁺を加えずHg²⁺だけを加えてテトラサイクリン輸送が起こるかどうかを見たものであるが、キレート体を形成しないことと一致して、野生型TetAを含む反転膜小胞でもテトラサイクリンの取り込みは全く見られなかった。Figure 3-4Aは50 μMのCo²⁺と様々な濃度のHg²⁺を共存させたときの野生型TetAとCys70変異体の輸送活性の変化を示したものである。野生型は10 μM塩化第二水銀が存在するところまで輸送活性に変化はなく、それ以上の濃度では輸送活性は著しく低下し、1mMの濃度では完全に活性は消失した。一方、Cys70変異体は2 μM塩化第二水銀まで輸送活性に変化は見られないが、10 μMの点で活性が顕著に上昇し、それ以上で低下するという現象が見られた。10 μM以上の濃度で輸送活性が減少するのは、高濃度のHg²⁺がプロトンの濃度勾配 (ΔpH) を破壊するためであることがFigure 3-4Bに示す実験により明らかである。NADHにより膜を介して形成されたΔpHは10 μMより高い濃度のHg²⁺を加えると消失するのが分かる。これは恐らく、Hg²⁺が直接呼吸鎖を阻害するためと思われる(284)。Figure 3-3Bにおいて、50 μM Co²⁺および10 μM Hg²⁺存在下での時間依存のテトラサイクリン取り込みを測定した。Figure 3-1Aと比較すると、野生型、Lys変異体およびAla変異体の輸送活性はHg²⁺の存在により全く影響を受けないのに対し、Cys70変異体の輸送活性はHg²⁺の存在により著しく上昇し、輸送の初速ではおよそ3倍の上昇が見られる。この条件ではLys変異体よりも高い輸送活性を示していることは特記すべき点である。Hg²⁺存在下でのテトラサイクリン輸送のV_{max}値も明らかにCys変異体の方がLys変異体よりも大きい (Table 3-4)。以上の結果は、Cys70変異体の70位のSH基がHg²⁺を結合してメルカプチド (-S-Hg⁺) を形成し、Lys側鎖よりもむしろ好都合な正荷電側鎖として機能していることを示している。

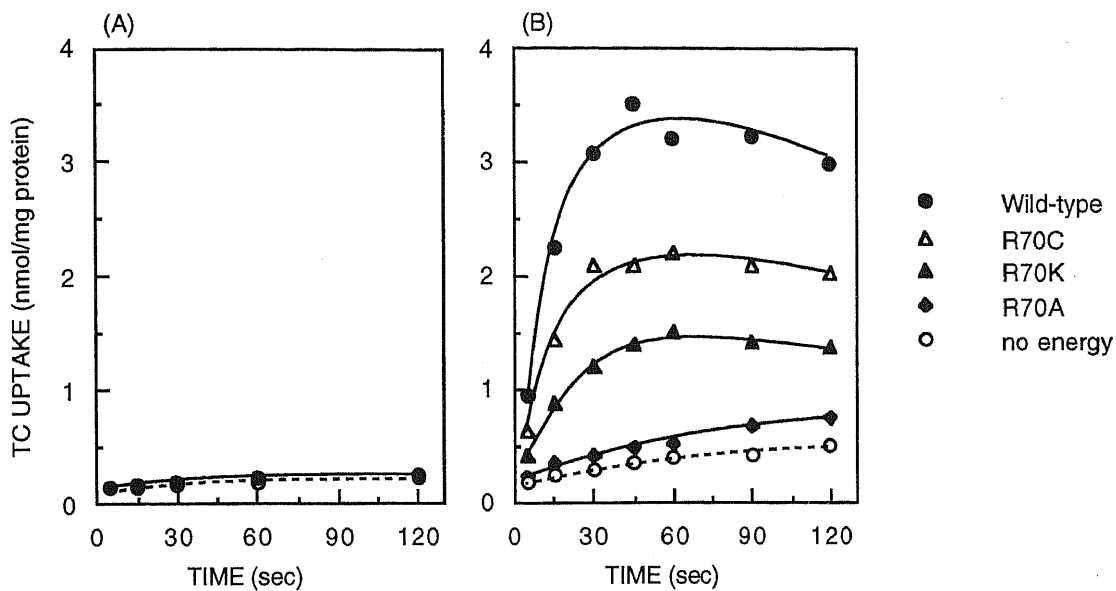


Figure 3-3. Effect of HgCl_2 on tetracycline uptake by inverted membrane vesicles. Assays were performed in the presence of $10 \mu\text{M}$ tetracycline and $10 \mu\text{M}$ HgCl_2 (A) or $50 \mu\text{M}$ CoCl_2 plus $10 \mu\text{M}$ HgCl_2 (B).

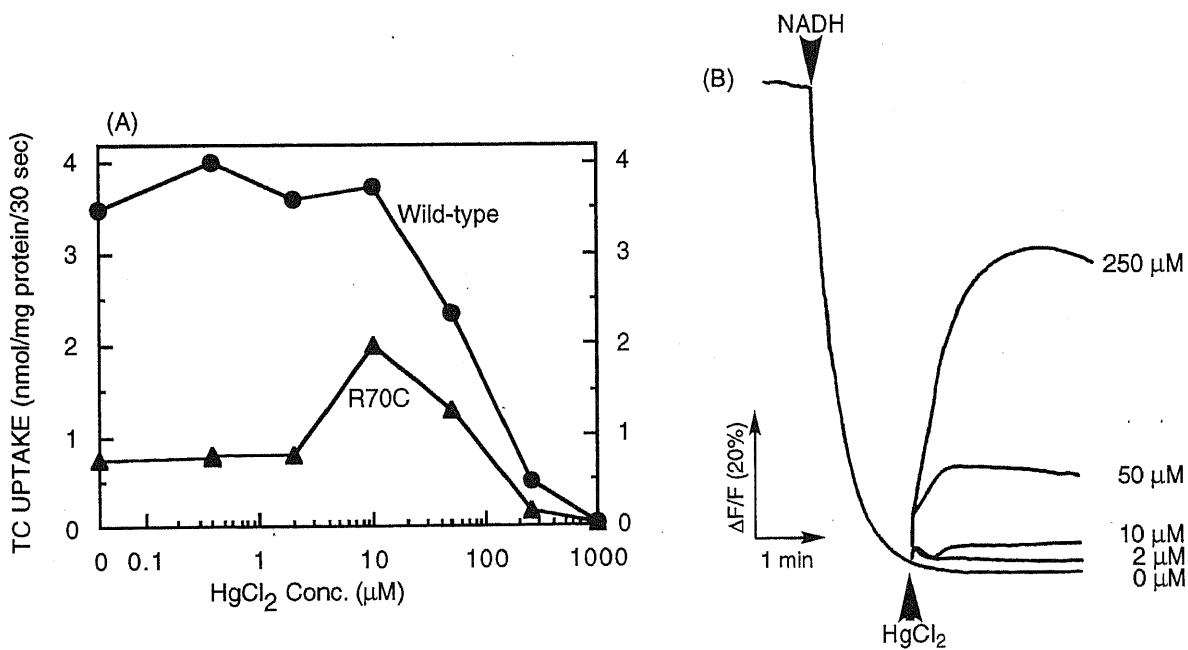


Figure 3-4. Effect of HgCl_2 on tetracycline uptake by inverted membrane vesicles (A) and ΔpH formed by NADH-dependent respiration in membrane vesicles (B). (A) NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of $10 \mu\text{M}$ tetracycline, $50 \mu\text{M}$ CoCl_2 and the indicated concentrations of HgCl_2 . (B) H^+ translocation across inverted vesicles was measured by monitoring the change in fluorescence of acridine orange. After energization of the wild-type vesicles with NADH, HgCl_2 was added, which gave the indicated final concentrations.

Table 3-4. Kinetic constants for tetracycline uptake by inverted membrane vesicles.

NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of various concentrations (5-100 μ M) of tetracycline, 1 mM CoCl₂ and 10 μ M HgCl₂. The kinetic constants were calculated from non-linear regression. Data indicate average \pm S.D..

Mutation	Km (μ M)	Vmax (nmol/mg protein/min)
None (Wild-type)	31.4 \pm 3.5	46.1 \pm 2.0
Arg70 \rightarrow Cys	19.7 \pm 6.0	22.5 \pm 2.2
Arg70 \rightarrow Lys	10.3 \pm 4.2	17.5 \pm 1.9

第4節 Arg70 \rightarrow Cys変異体へのSH修飾試薬の作用

Arg70 \rightarrow Cys変異体の輸送活性に対するSH修飾試薬、*N*-エチルマレイミド (NEM) およびメチルメタンチオスルフォネート (MMTS) の効果を検討した。70位が存在するループ2-3にはこれまでCys変異体の輸送活性がSH修飾試薬により阻害されるものはSer65 \rightarrow Cys変異体だけであった(49,279)が、Figure 3-5に示すように、Cys70変異体の輸送活性もNEM、MMTSにより阻害されることが明らかになった。MMTSは0.5mMという低い濃度で最大の阻害に達し、残存活性は15%程度になっている。それに比べるとNEMによる阻害は高濃度の試薬を要し、2mM以上で残存活性は10~20%になる。この結果はMMTSの方がSH基に対して反応性が高いことを示している。Figure 3-5のinsetでは反転膜小胞を最初に2mMのMMTSで処理した後示される濃度のNEMで更に処理した場合の残存活性を示したものであるが、その値は高濃度のNEMでも変わらず、Cys70残基とMMTSとの反応が完結していることが分かる。

Cys65変異体の場合、阻害の程度は修飾側鎖の大きさに依存していた(49)が、Cys70変異体ではそのような依存性は見られなかった。従って、SH修飾試薬によるCys70変異体の活性阻害は、修飾側鎖が基質透過を立体障害しているためではないことを示唆している。SH修飾を受けたCys70変異体の残存活性がAla変異体やSer変異体の輸送活性と同程度であることはこの考えを支持しているように見える。

Cys70変異体の輸送活性はHg²⁺により活性化を受ける。この原因と考えられるメルカプチド形成には遊離のSH基が必要である。また、SH修飾試薬の標的となるのも遊離のSH基 (NEM、MMTSは実際にはS型と反応する) である。これらのことから、Hg²⁺が本当にCys70残基のSH基に結合しているならば、SH修飾試薬で処理されたCys70変異体はHg²⁺による活性化を受けないことが、また、Hg²⁺で前処理されたCys70変異体はSH修飾試薬による活性阻害を受けないことが予想される。

まず第一点に関して、Cys70変異体を含む反転膜小胞を2mM MMTSあるいは5mM NEMで5分間処理した後、それぞれHg²⁺存在下あるいは非存在下で輸送活性を測定し、比較した (Table 3-5)。

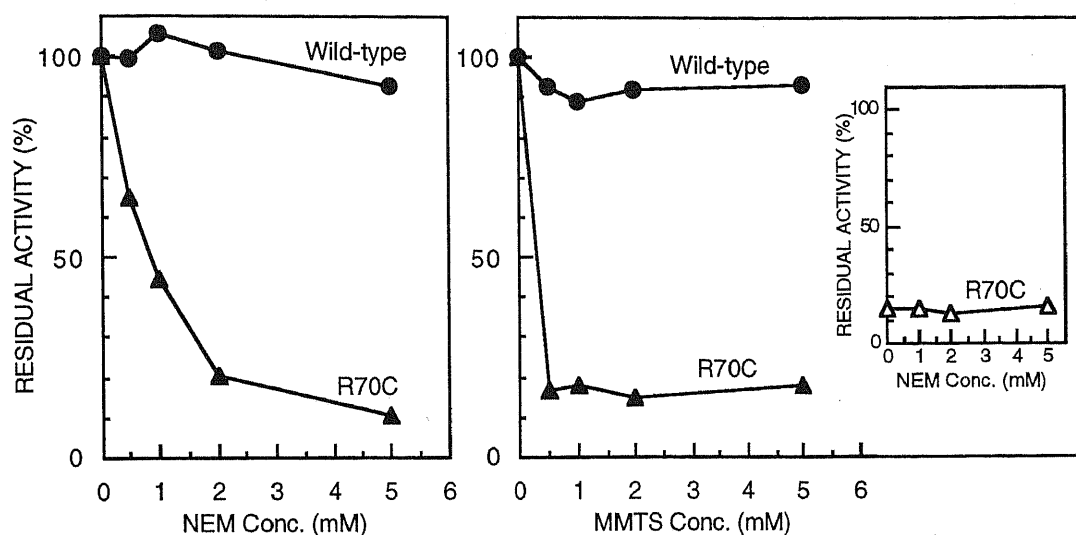


Figure 3-5. Effects of sulfhydryl reagents on tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from the Cys70 mutant. Inverted membrane vesicles were pretreated with the indicated concentrations of *N*-ethylmaleimide (NEM) or methyl methanethiosulfonate (MMTS) for 5 min at 30 °C. Then NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl₂. Residual activity is expressed as a percentage of the activity without sulfhydryl reagents. In the inset, the Cys70 vesicles were first treated with 2 mM MMTS for 5 min, and then treated with the indicated concentrations of NEM.

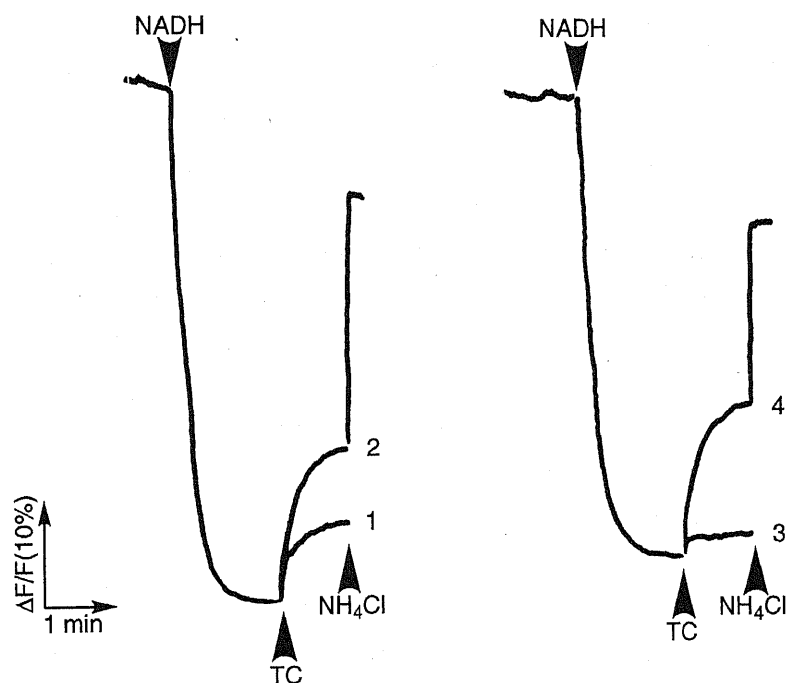


Figure 3-6. Effect of preincubation with Hg²⁺ on NEM-inhibition of tetracycline-dependent H⁺ translocation in the Cys70 vesicles. H⁺ translocation across inverted vesicles was measured by monitoring the change in fluorescence of quinacrine. Assays were performed in the presence of 10 mM MgSO₄. Before energization with 625 μ M NADH, neither HgCl₂ nor NEM were added in trace 1. In trace 2, the vesicles were preincubated with 10 μ M HgCl₂ for 1 min prior to energization. In trace 3, the vesicles were preincubated with 2 mM NEM for 3 min prior to energization. In trace 4, the vesicles were preincubated with 10 μ M HgCl₂ for 1 min, followed by incubation with 2 mM NEM for 3 min prior to energization.

Table 3-5. Effects of sulfhydryl modification on Hg²⁺-activation for the Arg70→Cys mutant TetA.

After treatment with an SH reagent for 5 min at 30 °C, NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of 10 μM tetracycline, and 50 μM CoCl₂ (None), or 50 μM CoCl₂ plus 10 μM HgCl₂ (+Hg²⁺). Activation was calculated as a ratio of the initial rates in the presence and absence of HgCl₂.

TetA	SH reagent	Tetracycline uptake (nmol/mg protein/30 sec)		Activation
		None	+Hg ²⁺	
Arg70→Cys	None	0.7	1.9	2.7
	2 mM MMTS	0.3	0.3	1.0
	5 mM NEM	0.2	0.2	1.0
Wild-type	None	2.9	2.9	1.0
	2 mM MMTS	2.9	2.6	0.9
	5 mM NEM	2.5	2.2	0.9

Cys70変異体はSH修飾試薬で処理されないとき、輸送活性はHg²⁺により約3倍の活性化を受けるが、MMTSあるいはNEMの修飾により阻害された活性は、Hg²⁺が存在しても最早上昇することはない。野生型TetAはHg²⁺による活性化もSH修飾試薬による活性阻害もうけないので、このような変化はない。以上の結果より、Hg²⁺の標的はCys70残基の遊離のSH基であることが分かる。

次に、第二点については蛍光消光法によりH⁺輸送を測定することで検討した。Figure 3-6にはCys70変異体の結果のみ示されている。trace 1は10mM Mg²⁺存在下での結果であるが、NADH添加によりΔpH形成後、テトラサイクリン（終濃度10μM）を加えると、蛍光強度が回復しテトラサイクリンとのアンチポートによりH⁺が反転膜小胞から排出されたことが分かる。trace 2ではNADH添加前に10μMのHg²⁺が加えられている。この場合、テトラサイクリン添加に伴うH⁺の排出量が多くなっており、Cys70変異体のテトラサイクリン輸送活性上昇（Figure 3-3B）と対応している。trace 3ではNADH添加前に反転膜小胞が2mMのNEMで3分間処理されており、テトラサイクリン輸送の阻害（Figure 3-5）と一致して、テトラサイクリン依存のH⁺輸送も阻害されている。最後に、trace 4は、10μMのHg²⁺存在下で反転膜小胞を2mMのNEMで3分間処理し、活性測定を行ったものである。この場合、trace 2と同程度のH⁺輸送が観察され、Hg²⁺がCys70残基のSH基をNEM修飾から保護し、メルカプチドを形成して活性上昇を導いていると解釈される。NEMの代わりにMMTSを用いても同様の結果が得られた（data not shown）。また、野生型TetAではHg²⁺やSH修飾試薬による変化は見られなかった（data not shown）。

更にこのことはテトラサイクリン取り込みの測定でも確かめられた。Figure 3-7Aはテトラサイクリンと一緒に終濃度が2mMになるようにNEMを反転膜小胞に晒したときのテトラサイクリンの取り込みを示している。野生型TetAの輸送活性はFigure 3-1に示した通常の測定条件のときに比べると高くなっているが、Cys70変異体の輸送活性は明らかに阻害されていることが分かる。Figure 3-7Bは2mM NEMに加えて更に10μM Hg²⁺が含まれるが、野生型TetAの輸送活性はFigure 3-7Aと変わらないのに対し、Cys70変異体の輸送活性は著しく上昇している。この場合、野生型に対する活性の比はFigure 3-3Bの結果と同程度である。この結果は、Hg²⁺とSH修飾試薬は同一の標的、Cys70残基のSH基を競合するが、Hg²⁺の方が早くSH基に結合しメルカプチドを形成するので、活性上昇が生じることを示している。

以上の結果より、Cys70変異体のHg²⁺による活性上昇は側鎖のSH基がメルカプチドを形成することに基づく結論される。

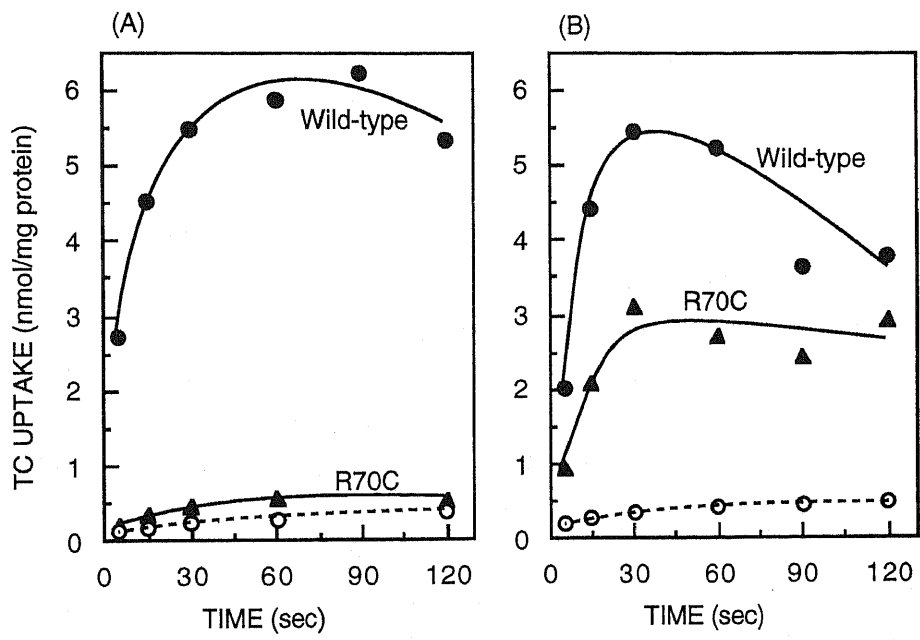


Figure 3-7. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles in the presence of 2 mM NEM (A) and 2 mM NEM plus 10 μM HgCl₂ (B). Tetracycline uptake was measured in the presence of 10 μM tetracycline, 50 μM CoCl₂, and 2 mM NEM in the absence (A) or presence (B) of 10 μM HgCl₂.

本章では第3膜貫通領域周辺の一連のCys-scanning変異体⁽¹⁹⁵⁾の中で、第2章において作成されなかったループ2-3の重要残基Arg70のCys変異体に焦点を当て、その性質の解析を行った。CysはAlaやSerのように中性の、比較的小さい側鎖をもっているため、当初はCys70変異体のテトラサイクリン輸送活性はAla70変異体やSer70変異体に類似して著しく低いであろうと予想していた。ところが、意外にもCys70変異体の輸送活性は顕著に見られ、Lys70変異体の活性に次ぐものであった (Figure 3-1)。通常の活性測定用緩衝液中には Co^{2+} が含まれていること、システイン分子やグルタチオン分子のSH基に Co^{2+} が結合しうる^(281,282)ことから、Cys70変異体の顕著な輸送活性の原因として、Cys70残基側鎖のSH基が測定緩衝液中の Co^{2+} を結合してメルカプチド ($-\text{S}-\text{Co}^{2+}$) を形成し、正荷電側鎖のように振る舞っている可能性が考えられた。 Co^{2+} の代わりに Mn^{2+} や Mg^{2+} を用いたときにはCys70変異体の活性はAla70変異体の活性よりも著しく高くなるということはなく (Figure 3-2)、これらの2価カチオンは Co^{2+} に比べるとメルカプチド形成能が著しく低いことが示唆される。Cys70残基側鎖がメルカプチドを形成するという証拠はSH基に非常に親和性の高い Hg^{2+} を用いることにより得られた。 Hg^{2+} はテトラサイクリンとキレート体を形成せず、その輸送を仲介することはない (Figure 3-3A)。 Hg^{2+} を Co^{2+} と共存させると、Cys70変異体の輸送活性のみ大きく上昇し、Lys70変異体よりも高い活性を示すようになることは興味深い (Figure 3-3B)。このことは、 Hg^{2+} を結合しメルカプチド ($-\text{S}-\text{Hg}^{2+}$) となったCys側鎖がLys側鎖よりも機能において適していることを示している。また、Cys70変異体はSH修飾試薬 (NEMおよびMMTS) により活性阻害を受ける (Figure 3-5) が、低下した活性は Hg^{2+} を加えても最早上昇することはない (Table 3-5)、 Hg^{2+} による活性化には遊離のSH基が必要であることが分かる。更に、 Hg^{2+} が存在することによりCys70変異体のSH修飾試薬による活性阻害が回避されること (Figure 3-6、Figure 3-7) は、 Hg^{2+} の標的がCys70残基側鎖のSH基であることをより強く確認するものである。以上の結果より、70位の正荷電側鎖が機能に重要な役割を担っていることが確認された。

Cys残基は修飾試薬による特異的な標識が容易であるので、様々な蛋白においてCys変異体を作成されている。特に大腸菌ラクトース輸送体 (LacY) においてはほぼ全域に渡ってCys-scanning変異体を作成され、重要残基とSH修飾試薬の影響を受ける残基のマッピングが行われている⁽²⁸⁵⁻²⁹⁰⁾。当研究室でもTetAのCys-scanning変異体を数十種作成し、 ^{14}C NEM結合性の差異により目的の残基が膜貫通部分に存在するのか、膜表面に露出するのかを判定することに用いている^(195,196)。本研究では、Cys変異体を側鎖修飾による荷電残基の再構築に用いたが、イオンをその目的で使用したのは初めての例である。負荷電残基の再構築にはよくヨード酢酸が用いられる。例えば、バクテリオロドプシン⁽²⁹¹⁾、ラクトース輸送体⁽²⁶⁶⁾、大腸菌 F_0F_1 -ATPase⁽²⁹²⁾では、機能に重要なAspやGluをCysに置換すると活性が失われるが、ヨード酢酸でカルボキシメチル化すると活性が回復することを観察している。この場合、ヨード酢酸で修飾されたCys残基の側鎖はGlu残基よりも炭素1個分長くなっている。また、(2-プロモエチル)アミンを用いてアミノエチル化するとLys側鎖と同じ長さの正荷電側鎖が生じ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼなどに用いられた⁽²⁹³⁾。ラクトース輸送体では正荷電側鎖を導入するために、メタンチオスルフォネートエチルアンモニウム (MTSEA) を用いている⁽²⁶⁸⁾。いずれの場合も修飾による活性回復が見られている。また、荷電残基の再構築ではないが、ニコチン作動性アセチルコリンレセプターでは、そのイオンチャンネル部分の特性を解析するために、正電荷を導入するMTSEAやメタンチオスルフォネートエチル (トリメチル) アンモニウム (MTSET)、負電荷を導入するメタンチオスルフォネートエチルスルホン酸 (MTSES) を用いている⁽²⁹⁴⁾。その他、ロドプシンやバクテリオロドプシンではCys変異体をスピンドラベルし、蛋白の構造変化の検出を行っている⁽²⁹⁵⁻³⁰⁵⁾。また、蛍光試薬標識蛋白を用いた構造変化の検出がラクトース輸送体⁽³⁰⁶⁻³¹⁰⁾、ミオシン⁽³¹¹⁻³¹⁴⁾などで行われている。

最近、膜蛋白質において立体構造上近傍に位置するであろう幾つかのアミノ酸残基をHis残基に置換して金属結合部位を作り出し、それら残基の位置関係を解析する研究が行われている(315,316)。Hisは Zn^{2+} など重金属イオンを配位するアミノ酸としてよく知られ、多くの金属酵素に見いだされる。本研究では蛋白の金属による修飾を述べたが、Cys残基によるメルカプチド形成もまた残基間の相対的位置関係の解明に応用できるかもしれない。

第1節 はじめに

近年、膜蛋白質の構造機能研究のために抑圧変異体の解析が盛んに行われるようになった(205,263,264,267,317-343)。抑圧変異体とは、あるアミノ酸置換によって活性が低下もしくは消失した変異体をもとに得られる、活性を回復した変異体を意味している。活性回復に導く新たなアミノ酸置換が、活性低下の原因となるアミノ酸置換の部位での野生型への復帰である場合には、単に戻り変異体 (back mutant, true revertant) と呼ばれ、別部位での新たなアミノ酸置換が活性回復を起こしたものは、pseudo-revertant (second-site revertant) と呼ばれる。本研究での抑圧変異体は特に断りがない限り後者を指すことにする。この後者の抑圧変異体解析が構造機能解析に有用であるのは、活性消失の原因となる第一変異部位と活性回復の原因となる第二変異部位とが立体構造上近傍に位置すること、第一変異部位で失われたアミノ酸残基と第二変異部位で生じたアミノ酸残基とが機能的に等価であることが一般的に示唆されることによる。しかし、多くの蛋白で抑圧変異体解析が行われ、変異部位が明らかにされるにつれ、活性回復の原因が必ずしも上記の範疇に入らない抑圧変異体も分離されるようになってきた。この場合、むしろ、曖昧な意味になるが、第一変異部位と第二変異部位との間で構造的、機能的な連関があるというべきかもしれない。

本章では前章で作成されたArg70残基のCys変異体から抑圧変異体を分離することを試みた。Cys70変異体は完全に活性を消失した変異体ではないが、野生型に比べればテトラサイクリン耐性レベルもかなり低く、輸送活性も十分ではない(344)。従って、この変異体の抑圧変異体を分離すれば70位残基そのものの機能における役割や70位残基の近傍にある、あるいは相互作用するアミノ酸残基を推測することが可能になると期待される。

第2節 Arg70→Cys変異体産生株からのテトラサイクリン耐性上昇抑圧変異株の分離

Arg70→Cys変異体産生株のテトラサイクリン耐性レベルは、Table 3-2にも示したように最小発育阻止濃度 (MIC) が $12.5 \mu\text{g/ml}$ と野生型の耐性レベルに比べると著しく低い。Arg70→Cys変異体の抑圧変異体を分離するため、大腸菌W3104/pLGR70C株培養液約1.5mlを $100 \mu\text{l}$ 程度に濃縮し、テトラサイクリン $200 \mu\text{g/ml}$ を含むYT寒天培地上に塗布し、 37°C で培養した。3日後40個のコロニーを得、テトラサイクリンのMICを測定した。耐性レベルが明らかに上昇した菌株16について、プラスミドDNAを単離し、改めて大腸菌W3104株を形質転換し、再度テトラサイクリンのMICを測定した。そのうちMICが野生型と同じ $200 \mu\text{g/ml}$ を示す菌株 (W3104/pLGR70CR5) を選択した。第二変異が *tetA* 遺伝子領域内にあることを確認するために、pLGR70CR5より *tetA* 遺伝子の大部分を含む *EcoRV*-*Bam*HI切断断片を野生型 *tetA* 遺伝子をもつ pLGT2の対応する領域と交換したプラスミド、pLGT $\alpha\beta$ (R5)を構築し (Figure 4-1)、大腸菌W3104株を形質転換し、テトラサイクリン耐性レベルを測定した。この菌株に対するテトラサイクリンのMICはW3104/pLGR70CR5株と同じであったので、変異部位は *tetA* 遺伝子内にあると判断した。そこで、pLGR70CR5の *tetA* 遺伝子全域を含む *Xba*I-*Bam*HI切断断片をpCT1183Bの対応する領域と交換してpCTR70CR5を構築し (Figure 4-1)、変異 *tetA* 遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、70位およびその周辺での塩基置換は保たれたまま、TetAの171位に対応するコドンがACTからTCTに変化していた。

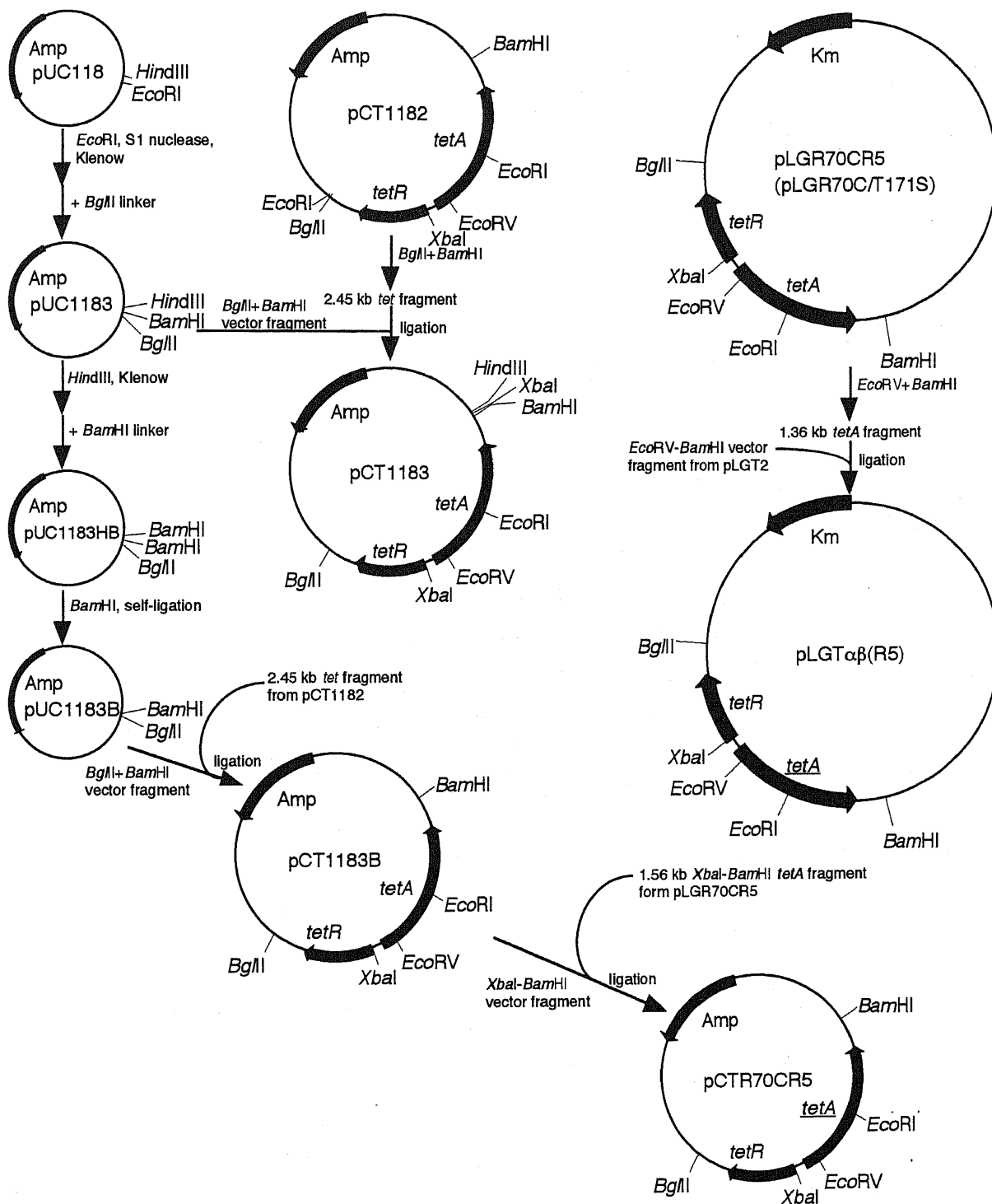


Figure 4-1. Modification of a multicopy cloning vector (pUC118), subcloning of the Tn10-*tet* genes in a multicopy plasmid and construction of the plasmids encoding the *tetA* gene from the revertant plasmid. pUC1183, pUC1183HB and pUC1183B are derivatives of pUC118, in which multicloning sites are modified by a linker insertion. pCT1182 containing the entire *tetR* and *tetA* genes from the transposon Tn10 was constructed previously. pCT1183 was constructed by the insertion of the *Bgl*II-*Bam*HI fragment from pCT1182 to pUC1183. pCT1183B was constructed by the insertion of the same fragment to pUC1183B. The revertant plasmid pLGR70CR5 is derived from pLGR70C. The *Eco*RV-*Bam*HI fragment from pLGR70CR5 was exchanged with the corresponding region of pLGT2 carrying the wild-type *tet* genes to construct pLGT $\alpha\beta$ (R5). pCTR70CR5 was constructed by exchanging the *Xba*I-*Bam*HI fragment from pLGR70CR5 with the corresponding region of pCT1183B. The *tetA* gene from the revertant plasmid is underlined.

その結果、171位はThrからSerへと置換されることになる。171位は推定二次構造中 (Figure 3) では、第6膜貫通領域のほぼ中央に位置し、親水性ループ領域にある70位残基と直接相互作用している可能性は低いと考えられる。次節以降、171位変異による70位変異抑圧のメカニズムについて検討する。なお、以後の解析では、pLGR70CR5をpLGR70C/T171Sと改めることにする。

第3節 Arg70→Cys変異抑圧に対する171位残基の要求性

Arg70→Cys変異を抑圧し耐性レベルを回復させるためには、171位のアミノ酸残基として何が要求されるのかを明らかにするため、Thr171残基を部位特異置換した。Kunkel法に従い、Table 4-1に示すオリゴヌクレオチドも用いて、Thr171残基をAla、Cys、Tyrに置換した。この際、トランスポゾンTn10のtetR遺伝子およびtetA遺伝子を含むマルチコピープラスミド、pCT1183由来のデオキシウラシルを含むssDNAを鋳型として用いた。変異マルチコピープラスミド (pCTT171Aなど) より調製される171位変異を含むMluI-EcoRI切断断片と、70位変異を含むプラスミド (pERR70Cなど) からのEcoRV-MluI切断断片をローコピープラスミドpLGT2のEcoRV-EcoRIベクター断片に挿入し、70位と171位の二重変異プラスミド (pLGR70C/T171Aなど) を構築した。171位の単独変異プラスミド (pLGT171Aなど) は、171位変異を含むEcoRV-EcoRI切断断片をpCTT171Aなどから調製し、pLGT2の対応する領域と交換し構築した。また、pLGT171SはpCT1183からのEcoRV-MluI切断断片とpCTR70CR5からのMluI-EcoRI切断断片とをpLGT2のEcoRV-EcoRIベクター断片に挿入し構築した (Figure 4-2)。作成された変異ローコピープラスミドで大腸菌W3104株を形質転換し、薬剤感受性レベルの測定に用いた (Table 4-2)。いずれの変異蛋白も野生型TetAと同レベル発現していることを確認した (data not shown)。

Table 4-1. Mutagenic primers used for the Thr171 mutations.

Nucleotide sequences of mutagenic primers correspond to the complementary sequence of the tetA gene. Asterisks (*) indicate mismatches. Mutations were first detected by the disappearance of the original SspI site (AATATT → GATATT) as indicated by underlines.

Primer	Nucleotide sequence	Codon change	Amino acid substitution
T171AR	5' -GGAAAGCGAC <u>GATATTT</u> -3' * *	ACT→GCT	Thr171→Ala
T171CR	5' -AGGAAACAGAC <u>GATATTT</u> -3' ** *	ACT→TGT	Thr171→Cys
T171YR	5' -AGGAAATAGAC <u>GATATTT</u> -3' ** *	ACT→TAT	Thr171→Tyr

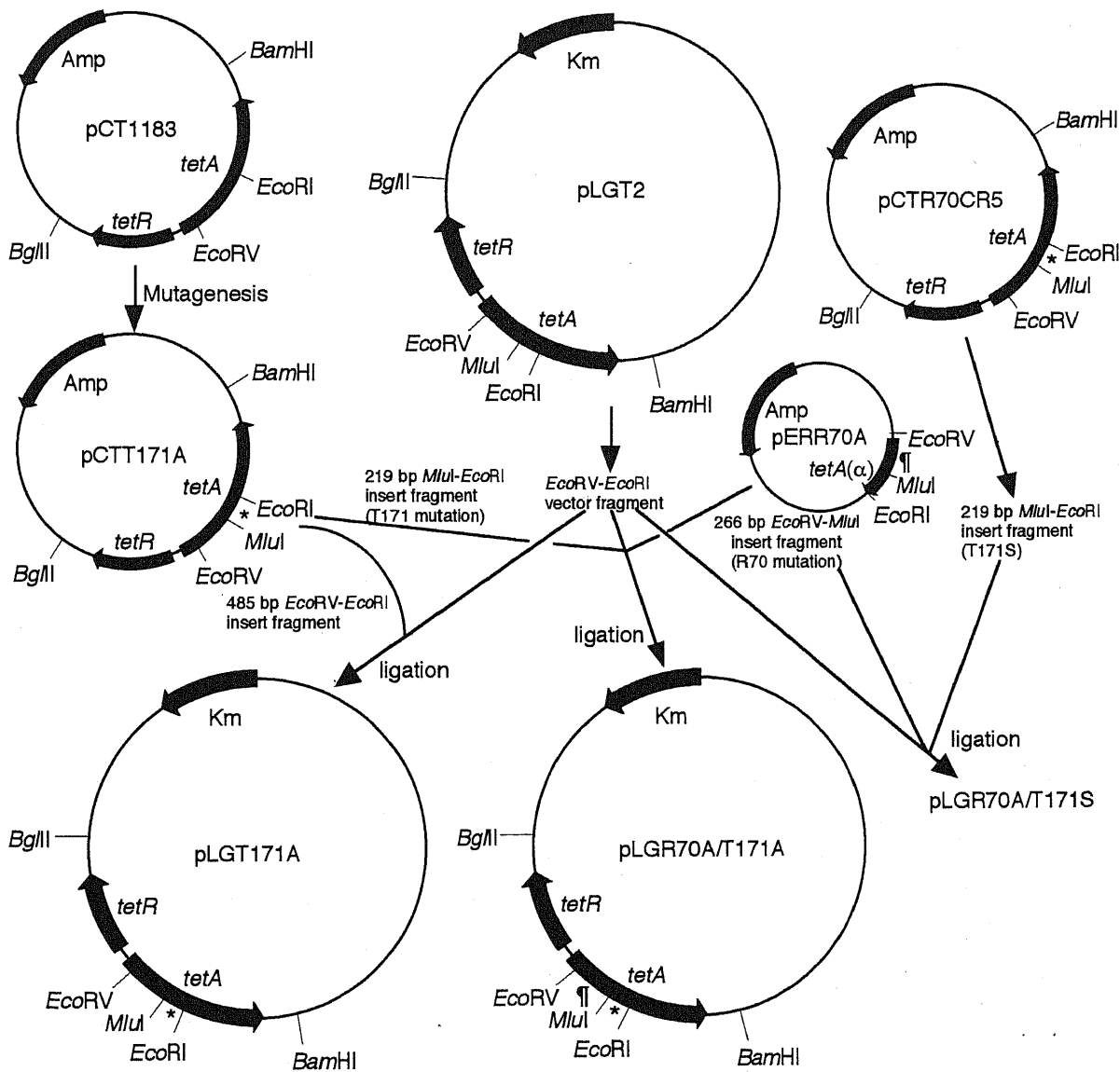


Figure 4-2. Construction of low-copy number expression plasmids carrying the Arg70/Thr171 mutant *tetA* gene. Mutations of Thr171 were introduced by the method of Kunkel on a multicopy plasmid pCT1183. The Thr171 single mutant plasmids (for example, pLGT171A) were constructed by exchanging the *EcoRV-EcoRI* fragment from the pCT plasmids (pCTT171A) with the corresponding region of pLGT2. pLGT171S was constructed by the insertion of the *EcoRV-MluI* fragment from pERR2 and the *MluI-EcoRI* fragment from pCTR70CR5 to the *EcoRV-EcoRI* vector fragment of pLGT2. The Arg70/Thr171 double mutant plasmids (for example, pLGR70A/T171A) were constructed by the insertion of the *EcoRV-MluI* fragment from the pERR plasmids (pERR70A) and the *MluI-EcoRI* fragment from the pCT plasmids (pCTT171A) to the *EcoRV-EcoRI* vector fragment of pLGT2. The *MluI-EcoRI* fragments containing the T171S mutation were cut off from pCTR70CR5.

Table 4-2. Tetracycline resistance levels of *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70/Thr171 substitution mutant plasmids.

Plasmid	TetA	MIC of tetracycline ($\mu\text{g/ml}$)
None	None	0.8
pLGT2	Wild-type	200
pLGR70C	Arg70→Cys	12.5
pLGR70C/T171S	Arg70→Cys/Thr171→Ser	200
pLGR70C/T171A	Arg70→Cys/Thr171→Ala	50
pLGR70C/T171C	Arg70→Cys/Thr171→Cys	50
pLGR70C/T171Y	Arg70→Cys/Thr171→Tyr	3.1
pLGR70A	Arg70→Ala	12.5
pLGR70A/T171S	Arg70→Ala/Thr171→Ser	200
pLGR70A/T171A	Arg70→Ala/Thr171→Ala	50
pLGR70A/T171C	Arg70→Ala/Thr171→Cys	50
pLGR70A/T171Y	Arg70→Ala/Thr171→Tyr	3.1
pLGT171S	Thr171→Ser	200
pLGT171A	Thr171→Ala	200
pLGT171C	Thr171→Cys	200
pLGT171Y	Thr171→Tyr	200

Cys70変異に様々な171位変異を導入した場合、Ser171変異が導入されたCys70/Ser171変異体が野生型レベルのテトラサイクリン耐性を与えることができる以外に、Ala171変異、Cys171変異（それぞれ、Cys70/Ala171変異体、Cys70/Cys171変異体）も耐性レベルを顕著に上昇させていることが分かる。ところが、171位にTyr残基が導入される（Cys70/Tyr171変異体）と、耐性レベルの上昇は見られず、むしろ感受性菌レベル近くまで低下していた。171位残基の効果はCys70変異に対するだけでなく、Ala70変異に対しても全く同様であった。一方、171位単独の置換は薬剤耐性レベルに全く影響がなく、Thr171残基は機能そのものに関与する残基ではないと言える。

次に、反転膜小胞でのテトラサイクリン輸送活性を測定した（Figure 4-3）。Cys70変異単独でも顕著な輸送活性を示すが、Ser171変異、Ala171変異あるいはCys171変異が加わった場合には、明らかな輸送活性上昇が見られ、機能的に回復していると言える。Table 4-3に示した速度論的定数を見ると、 K_m 値がやや減少傾向を示すが、 V_{max} 値が上昇しているのが分かる。Figure 4-3では、Ala171変異あるいはCys171変異の方がSer171変異よりも活性上昇の程度が大きいように見えるが、 V_{max} 値にはそれほど大きな差は見られなかった（Table 4-3）。一方、Tyr171変異は薬剤耐性レベルからも推測される通り、輸送活性をほぼ完全に消失させている。この傾向はAla70変異に対しても同様に見られ（Figure 4-3）、特にAla70/Ala171変異体、Ala70/Cys171変異体で V_{max} 値の上昇が顕著であった（Table 4-3）。以上の結果より、70位の変異を抑圧し機能を上昇させるには、171位のアミノ酸残基として、特異的な水酸基は必要ではなく、側鎖がThrの側鎖よりも小さくなる必要があることが分かる。

171位を単独で置換させた場合、Ser171変異体でわずかに輸送活性が低下するが、他の変異体は野生

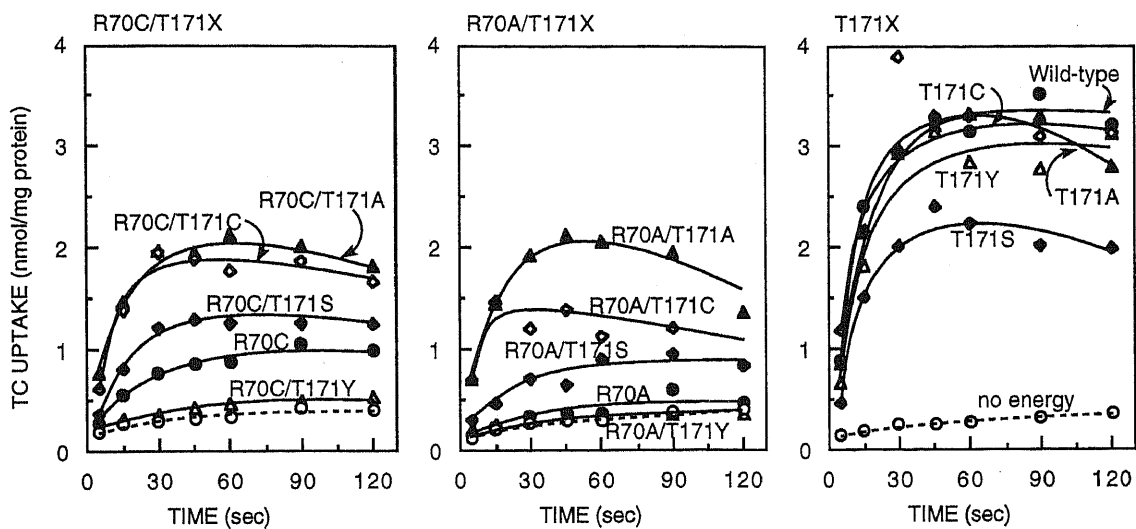


Figure 4-3. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70/Thr171 mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl₂.

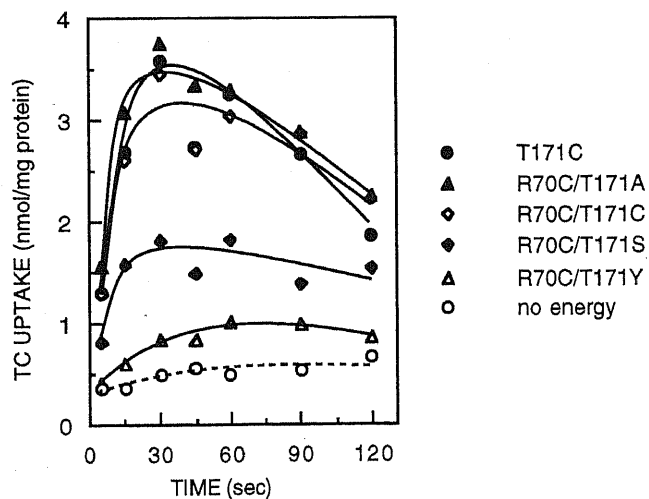


Figure 4-5. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70/Thr171 mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline, 50 μ M CoCl₂ and 10 μ M HgCl₂.

型と同レベルであった (Figure 4-3)。速度論的定数を測定すると (Table 4-3)、いずれの変異体も V_{max} 値が低下し、また、 K_m 値が減少する傾向にあった。特に Ser171 変異体で K_m 値が野生型に比べおよそ 1/4 に低下し、顕著である。Tyr171 変異単独では活性を消失させないことから、Thr171 残基は機能残基ではなく、171 位のアミノ酸残基として Thr が最も適し、側鎖容積が厳密に保たれている必要があると言える。観察された K_m 値 ($= (k_2 + k_{-1}) / k_1$) の低下は、真の親和性が上昇し、基質結合速度 (k_1) が上昇したというよりはむしろ、基質が蛋白に結合した後、輸送され放出される過程の速度 (k_2) が減少したためと考えられる。

Table 4-3. Kinetic constants for tetracycline uptake by inverted membrane vesicles.

NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of 1 mM CoCl_2 and various concentrations of tetracycline. Kinetic constants were calculated from non-linear regression. Data indicate average \pm S.D.. ND means that parameters could not be determined because of loss of activity.

Mutations	K_m (μM)	V_{max} (nmol/mg protein/min)
None (wild-type)	24.8 ± 7.3	43.1 ± 4.8
Thr171→Ser	5.8 ± 2.8	8.5 ± 1.1
Thr171→Ala	9.7 ± 1.8	11.8 ± 0.6
Thr171→Cys	13.8 ± 3.0	23.7 ± 1.6
Thr171→Tyr	13.4 ± 4.4	15.5 ± 1.6
Arg70→Cys	26.6 ± 5.7	10.7 ± 0.8
Arg70→Cys/Thr171→Ser	15.2 ± 3.2	16.0 ± 1.1
Arg70→Cys/Thr171→Ala	16.0 ± 4.4	14.3 ± 1.4
Arg70→Cys/Thr171→Cys	13.1 ± 5.6	16.2 ± 1.5
Arg70→Cys/Thr171→Tyr	N.D.	N.D.
Arg70→Ala	22.7 ± 3.1	4.4 ± 0.3
Arg70→Ala/Thr171→Ser	26.5 ± 4.9	9.1 ± 0.7
Arg70→Ala/Thr171→Ala	35.0 ± 6.9	22.7 ± 2.0
Arg70→Ala/Thr171→Cys	54.2 ± 18.3	36.2 ± 6.5
Arg70→Ala/Thr171→Tyr	N.D.	N.D.
Arg70→Lys	18.6 ± 2.7	19.2 ± 1.0
Arg70→Lys/Thr171→Ser	8.2 ± 1.2	4.5 ± 0.2

第4節 Thr171→Ser変異の種々の70位変異への効果

Ser171変異が他の70位変異体の活性に対してどのような影響を及ぼすかを検討するため、70位と171位の二重変異体を構築した。70位に変異をもつpER2プラスミドよりEcoRV-MluI切断断片を、pCTR70CR5よりSer171変異を含むMluI-EcoRI切断断片を調製し、pLGT2のEcoRV-EcoRIベクター断片に挿入し、二重変異プラスミドを構築した (Figure 4-2)。大腸菌W3104株を形質転換した後、薬剤感受性の測定 (Table 4-4) と変異蛋白産生の確認を行った (data not shown)。

Table 4-4. Tetracycline resistance levels of *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70/Thr171 substitution mutant plasmids.

MICs of tetracycline are shown in a unit of $\mu\text{g/ml}$. MIC for W3104 cells is 0.8 $\mu\text{g/ml}$.

Arg70 substitution	Thr171 substitution	
	None (Thr171)	Thr171→Ser
None (Arg70)	200	200
Arg70→Cys	12.5	200
Arg70→Ala	12.5	200
Arg70→Ser	12.5	200
Arg70→Lys	12.5	200
Arg70→Asp	0.8	12.5
Arg70→Leu	0.8	12.5
Arg70→Trp	0.8	12.5

Ser171変異が加わることにより、中程度のMICを示すCys、Ala、SerおよびLys変異体は野生型レベルの耐性を与えることができるようになるばかりでなく、全く耐性を与えることができないAsp、LeuおよびTrp変異体に対しても抑圧効果を示し、中程度の耐性を与えることができるようになっている。これらの変異体の輸送活性をFigure 4-4に示したが、70位がCys、Ala、Ser、LysおよびAspである変異体については顕著に輸送活性が上昇しているのが分かるが、LeuおよびTrp変異体については明確でなかった。速度論的定数を見ると (Table 4-3)、Ser171変異は、Cys70およびAla70変異体に対しては明らかにVmax値を上昇させ、抑圧効果を示している。ところが、Lys70変異体に対してはVmax値は減少し、更にKm値の著しい減少が見られ、機能的には抑圧されたとは言えない。Lys70変異に対するSer171変異の効果は70位にArg残基をもつ野生型蛋白に対する効果に類似しており、70位に正荷電残基がある場合と、それ以外の残基が占める場合とで171位変異の効果に差異があると考えられる。恐らく70位に正荷電がある限りは171位が変化してもそれが機能できると考えられる。

いずれにせよ、Ser171変異の抑圧効果に特異性がないことから、また推定二次構造 (Figure 3) において、171位は第6膜貫通領域のほぼ中央に位置し、70位は親水性領域に存在するように、両者が立体構造上近傍にある可能性は低いと考えられる。また、171位変異の抑圧効果が、70位変異に対して特異性はないものの、171位残基の側鎖容積に依存することから、171位の側鎖容積の減少が蛋白の微妙なコンフォメーション変化を誘起し、それが70位近傍へと伝達されて抑圧が起こる可能性が考えられる。この際、70位近傍の他の正荷電側鎖が失われた70位の正荷電側鎖の機能を代替できる位置に動いていることも考えられる。70位近傍には保存性配列モチーフを構成するArg67、Arg71が存在し、代替残基の候補となりうる。この可能性については第6節で検討する。

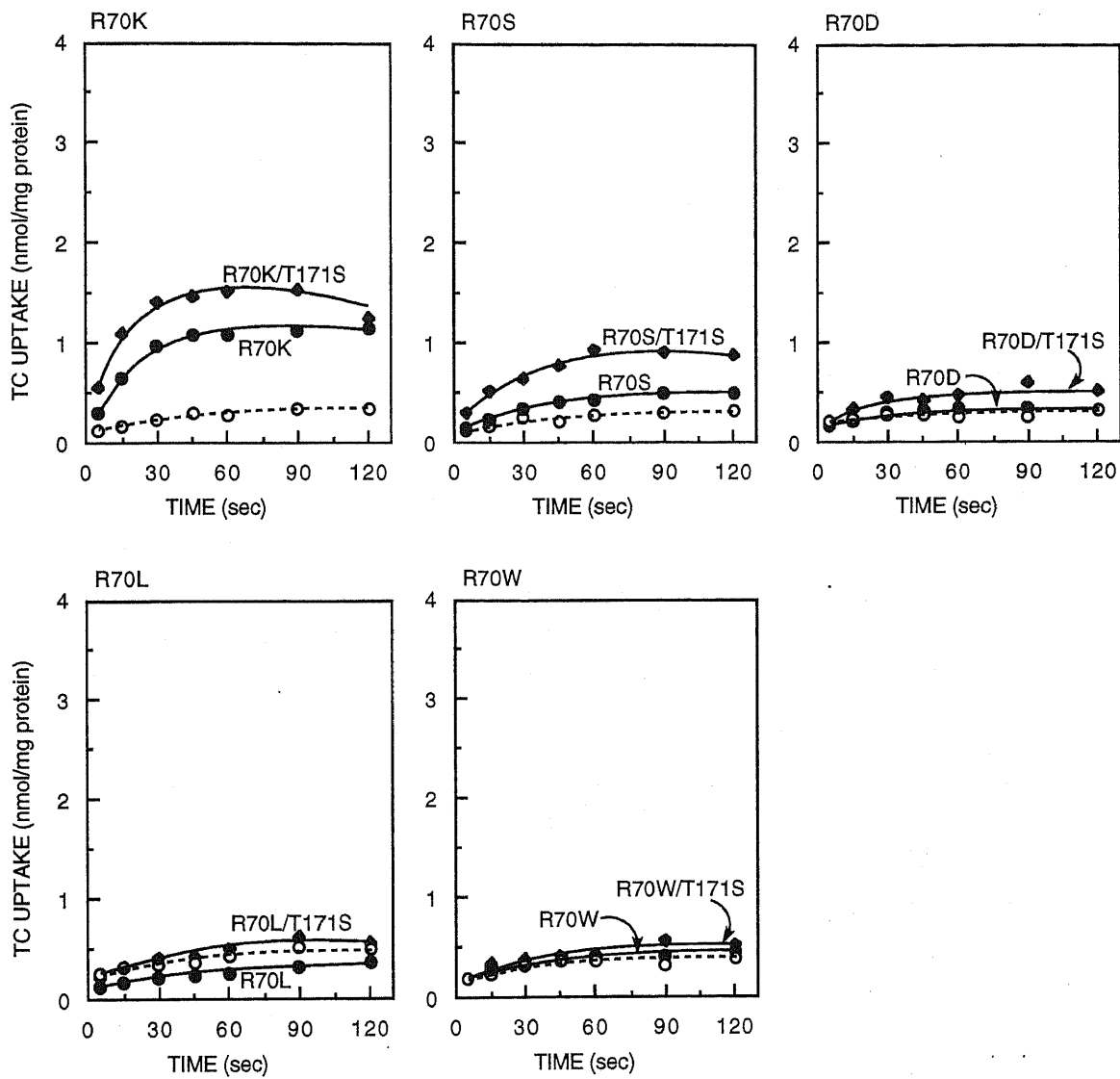


Figure 4-4. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70/Thr171 mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl_2 .

第5節 Arg70→Cys変異体の抑圧変異体へのHg²⁺の効果

Cys70単独変異体の輸送活性はHg²⁺により著しく上昇する (Figure 3-3) (344)。本節では、Cys70変異と171位変異をもつ二重変異体の輸送活性がHg²⁺により活性化を受けるのかどうか、またその程度について検討した。Figure 4-5は10 μM Hg²⁺が共存する条件で測定されたテトラサイクリンの取り込みを示している。Figure 4-3の結果と比較して、Cys70変異を含む二重変異体は輸送活性が上昇しているが、その程度はCys70単独変異体 (Figure 3-3) に比べると小さい。Cys70/Tyr171変異体が10 μM Hg²⁺が存在する場合に、顕著な輸送活性が観察されるようになり、興味深い。比較としてCys171変異体の輸送活性を測定したが、Hg²⁺による影響は認められなかった。恐らくCys171残基は膜内の疎水性領域に存在し、その側鎖にHg²⁺が到達できないためと考えられる。このことは、¹⁴C]NEMがCys171変異体には結合しない (data not shown) こととも一致する。Table 4-5の速度論的定数を見ても、171位変異 (Ser、AlaあるいはCys) が導入されると、Table 4-3と比較してV_{max}値が上昇するが、その程度は明らかにCys70単独変異体ほどではなくなっている。また別の見方をすると、Hg²⁺存在下で、すなわちCys70残基がメルカプチドを形成し正荷電側鎖様になっている場合、Cys70/Ser171二重変異体のV_{max}値はCys70単独変異体のV_{max}値とほとんど同じである。これは明らかにHg²⁺非存在下 (Table 4-3) での様相とは異なっている。Table 4-3では、70位残基が正荷電をもつArg (野生型) あるいはLysである場合には、Ser171変異はV_{max}値を顕著に低下させることも述べた。Hg²⁺存在下でのSer171変異のCys70変異に対する効果は最早抑圧する効果ではなく、正荷電側鎖に対する効果に類似していると思われる。これらの結果は、70位に正荷電がある場合には、171位が変化しても70位の正電荷が機能を持つことを示唆している。

Table 4-5. Kinetic constants for tetracycline uptake by inverted membrane vesicles.

NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of 1 mM CoCl₂, 10 μM HgCl₂ and various concentrations of tetracycline. Kinetic constants were calculated from non-linear regression. Data indicate average ± S.D..

Mutations	K _m (μM)	V _{max} (nmol/mg protein/min)
Arg70→Cys	19.7 ± 3.5	22.5 ± 2.2
Arg70→Cys/Thr171→Ser	20.0 ± 7.5	26.0 ± 3.5
Arg70→Cys/Thr171→Ala	22.4 ± 8.7	24.0 ± 3.5
Arg70→Cys/Thr171→Cys	24.6 ± 11.4	26.2 ± 4.6
Arg70→Cys/Thr171→Tyr	6.0 ± 3.0	1.0 ± 0.2
Thr171→Cys	10.1 ± 7.1	21.0 ± 4.2

第6節 Thr171→Ser変異による70位残基変異抑圧へのArg67、Arg71残基変異の効果

第4節において70位の正電荷が失われThr171残基がSerに置換された抑圧変異体では、70位近傍の正荷電残基が機能を代替できる位置に移動する可能性を述べた。Arg70近傍には保存性配列モチーフの構成アミノ酸残基であるArg67とArg71が存在し、代替残基の候補となりうる。本節ではArg70残基のAla変異体をもとにArg67残基あるいはArg71残基を置換し、Ser171変異による抑圧効果への影響を検討した。このために、Table 4-6に示す合成オリゴヌクレオチドを用いて67位と70位、および70位と71位の二重置換を導入した。また、これらにSer171変異を含む三重変異体はFigure 4-2に示したように構築し

ルである。これは変異蛋白が宿主菌にとって致死的事であることを示し、蛋白のコンフォメーションが著しく損なわれていることが示唆される。これら二重変異にSer171変異が加わっても耐性レベルの回復はわずかであった。

次に、反転膜小胞へのテトラサイクリンの取り込みを測定した。Figure 4-6は通常の条件での結果を、Table 4-8は輸送の速度論的定数を示すが、Arg70残基が含まれるCys67変異体およびCys71変異体の輸送活性はSer171変異が加わることによって低下し、野生型TetAへの効果 (Figure 4-3、Table 4-3) に類似しているが、Ala71変異体に対しては顕著な変化は見られなかった。Cys67/Ala70二重変異体は低い輸送活性をもつが、Cys67/Ala70/Ser171三重変異体では2倍に活性は上昇し、Arg67残基が代替残基である可能性は低い。一方、Ala70/Cys71二重変異体、Ala70/Ala71二重変異体はいずれも輸送活性はほぼ完全に消失していた。ところが、これらにSer171変異を加えた三重変異体は顕著な輸送活性を示している。もとの二重変異体が宿主レベル以下の薬剤耐性しか与えないこと、Cys71およびAla71変異体でSer171変異により薬剤耐性レベルの上昇は起こるが、輸送機能は回復していないことを考慮すると、70位と71位の二重変異体では正しいコンフォメーションを採ることができず蛋白の安定性が失われており、Ser171変異による薬剤耐性レベルの上昇、輸送能の発現はむしろ蛋白の安定性の上昇 (致死性の低下) のためかもしれない。Table 4-8の速度論的定数を見ると、Ala70/Ala71/Ser171三重変異体のVmax値はAla70/Cys71/Ser171三重変異体のVmax値に比べ顕著に低くなっている。この差は、Cys71残基側鎖のSH基がアッセイ溶液中のCo²⁺とメルカプチドを形成したことによると考えられる。そうであるならば、Arg71残基が代替残基である可能性が高いことになる。

そこで、Figure 4-7で、Cys残基を含む変異体について10 μM Hg²⁺存在下での輸送活性を測定した。Cys70変異を含む変異体の場合 (Figure 3-3、Figure 4-5) とは異なって、Cys67変異を含む変異体ではHg²⁺が存在すると活性が阻害されている (Table 4-9も参照)。Cys71単独変異体およびCys71/Ser171二重変異体の輸送活性もやや阻害される傾向にある (Table 4-8、4-9)。Cys70単独変異体がHg²⁺存在下で野生型TetAに近づくように、Ala70/Cys71二重変異体はHg²⁺存在下ではAla70単独変異体に近づくこと期待されたが、輸送活性の上昇は全く見られず、産生される変異蛋白が正しいコンフォメーションを維持していないことを強く支持している。一方、Ala70/Cys71/Ser171三重変異体はこれらの変異体の中で唯一Hg²⁺存在下で輸送活性が上昇している。その活性化の程度もCys70変異体に匹敵していること (Table 4-9) は最も注目すべき点である。従って、これらの結果より、70位Arg残基が中性残基に置換され更にThr171残基がSerに置換されると、失われた70位の正電荷の代わりに71位のArg残基が務めている可能性が示唆される。

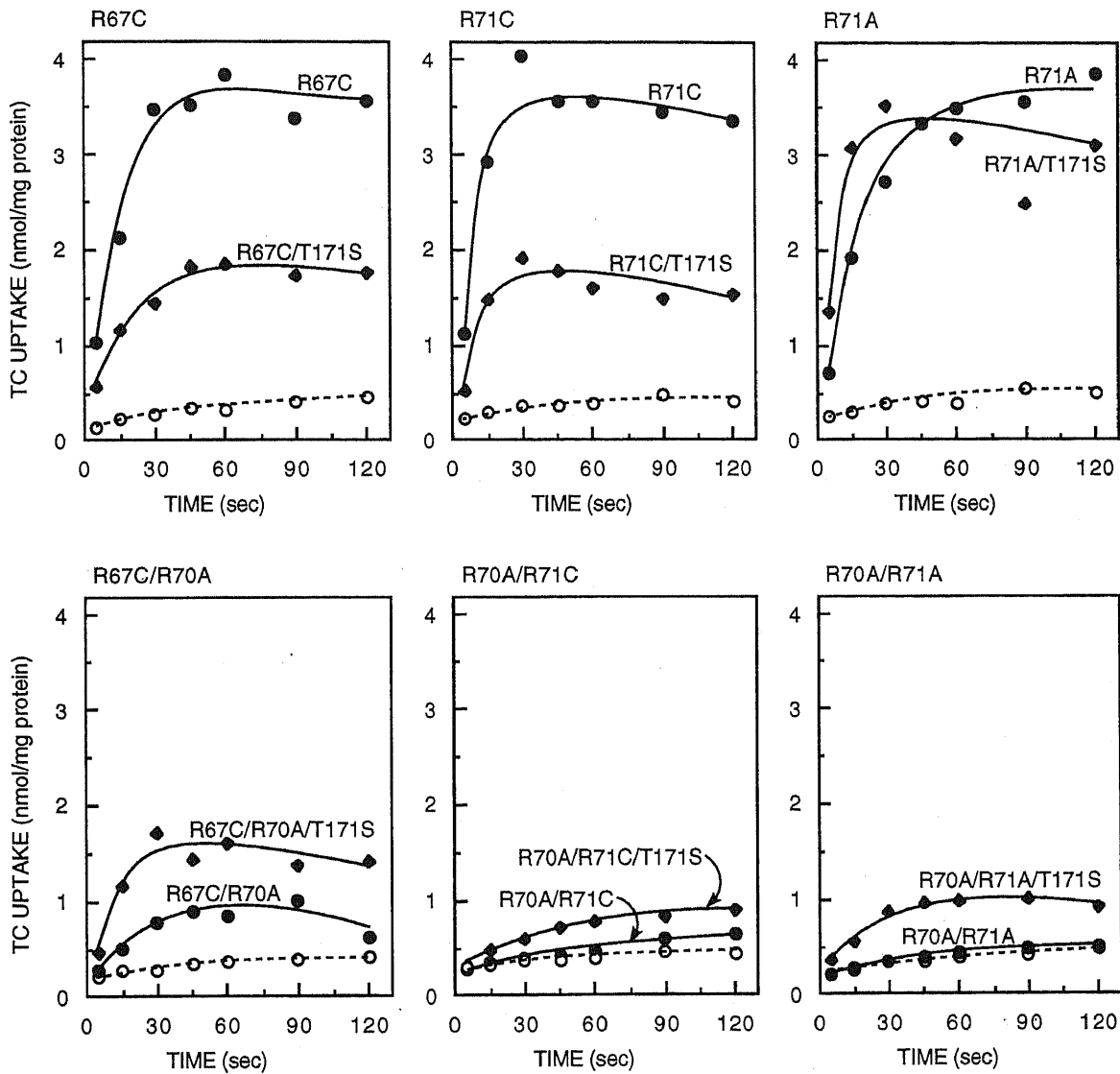


Figure 4-6. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Arg67/Arg70/Arg71/Thr171 mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl_2 .

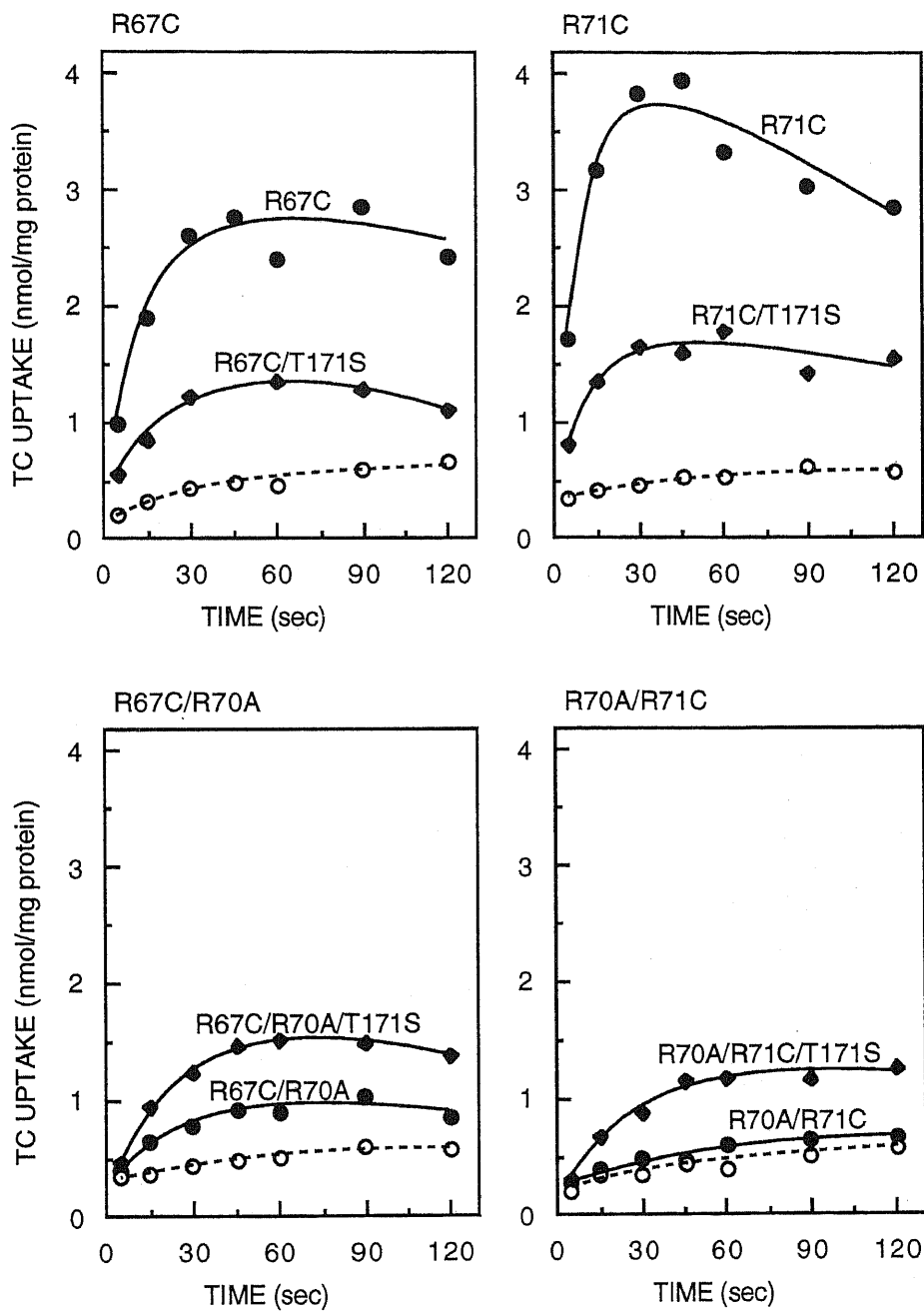


Figure 4-7. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Arg67/Arg70/Arg71/Thr171 mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline, 50 μ M CoCl₂ and 10 μ M HgCl₂.

Table 4-8. Kinetic constants for tetracycline uptake by inverted membrane vesicles.

NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of various concentrations of tetracycline and 1 mM CoCl₂ (-) or 1 mM CoCl₂ plus 10 μM HgCl₂ (+). Kinetic constants were calculated from non-linear regression. Data indicate average ± S.D.. N.D. means that parameters could not be determined.

Mutations	Addition of Hg ²⁺	Km (μM)	Vmax (nmol/mg protein/min)
Arg67→Cys	-	21.5 ± 1.2	27.0 ± 0.5
Arg67→Cys/Thr171→Ser	-	5.8 ± 1.9	7.2 ± 0.6
Arg67→Cys/Arg70→Ala	-	11.2 ± 4.7	3.8 ± 0.5
Arg67→Cys/Arg70→Ala/Thr171→Ser	-	18.9 ± 2.9	10.4 ± 0.6
Arg71→Cys	-	16.2 ± 6.1	32.1 ± 5.0
	+	19.3 ± 3.4	24.2 ± 1.9
Arg71→Cys/Thr171→Ser	-	4.2 ± 2.4	6.5 ± 0.9
	+	4.0 ± 2.1	3.7 ± 0.5
Arg70→Ala/Arg71→Cys	-	N.D.	N.D.
	+	N.D.	N.D.
Arg70→Ala/Arg71→Cys/Thr171→Ser	-	16.7 ± 1.8	3.8 ± 0.1
	+	21.5 ± 3.1	5.5 ± 0.4
Arg71→Ala	-	30.3 ± 3.1	30.5 ± 1.2
Arg71→Ala/Thr171→Ser	-	8.7 ± 3.5	6.2 ± 0.6
Arg70→Ala/Arg71→Ala	-	N.D.	N.D.
Arg70→Ala/Arg71→Ala/Thr171→Ser	-	20.8 ± 1.3	2.2 ± 0.05

Table 4-9. Effect of HgCl₂ on tetracycline uptake by inverted membrane vesicles.

NADH-dependent tetracycline uptake for 15 sec was measured in the presence of 10 μM tetracycline and 50 μM CoCl₂ with or without 10 μM HgCl₂. Hg²⁺-activation represents the ratio of the uptake in the presence of 10 μM HgCl₂ to the uptake in its absence.

TetA	Tetracycline uptake in the absence of HgCl ₂ (nmol/mg protein/15 sec)	Tetracycline uptake in the presence of HgCl ₂ (nmol/mg protein/15 sec)	Hg ²⁺ -activation
Wild-type	2.2	2.0	0.9
R67C	1.9	1.6	0.8
R67C/T171S	0.87	0.42	0.5
R70C	0.38	1.2	3.2
R70C/T171S	0.60	1.1	1.8
R71C	2.7	2.8	1.0
R71C/T171S	1.2	0.81	0.7
R67C/R70A	0.26	0.27	1.0
R67C/R70A/T171S	0.87	0.62	0.7
R70A/R71C	N.D.	N.D.	-
R70A/R71C/T171S	0.12	0.35	2.9

第7節 Cys変異体への*N*-エチルマレイミドの作用

Cys70単独変異体の輸送活性は*N*-エチルマレイミド (NEM) により阻害される (Figure 3-5) (344)。本節では、Cys70変異の抑圧変異体および67位、71位にCys残基を有する変異体の輸送活性へのNEMの効果を検討した。Figure 4-8はCys70単独変異体と171位変異を含む二重変異体の輸送活性のNEMによる阻害を示している。Cys70単独変異体の輸送活性は2mMのNEM処理で約90%阻害されるが、Thr171残基が置換された抑圧変異体ではNEM感受性がやや低下する傾向にあった。特にCys70/Ser171二重変異体で顕著であり、2mMのNEM処理では輸送活性はおよそ50%阻害されているに過ぎない。この結果は、171位の置換が蛋白のコンフォメーション変化を引き起こし、70位側鎖の配向に影響を与えていることを示唆している。対照として、Cys171変異体を用いたが、この輸送活性はNEMの影響を全く受けなかった。この結果は、Cys171変異体がHg²⁺の影響を受けないという結果 (Figure 4-5) からも示されるように、171位が膜内の疎水性領域に存在することを示している。また、67位、71位にCys残基を有する変異体については5mMのNEMで処理したときの活性を未処理の時の活性と比較し、グラフに示した (Figure 4-9)。Cys67単独変異体、Cys71単独変異体の輸送活性はNEMによりほとんど影響されないが、Cys67/Ser171二重変異体、Cys71/Ser171二重変異体ではNEM感受性が顕著に増加している。この結果も、171位変異による蛋白のコンフォメーション変化を支持しており、70位側鎖ばかりでなく、67位、71位の側鎖の配向性にも影響を及ぼしていることが示唆される。一方、Cys67/Ala70二重変異体、Cys67/Ala70/Ser171三重変異体、Ala70/Cys71/Ser171三重変異体の輸送活性はNEMの影響をほとんど受けていない。これらの共通点はAla70変異を含むことであり、結果はAla70変異そのものによるわずかな構造変化を反映しているのかもしれない。

第8節 考察

本章では、抑圧変異体の系統的な解析を通してTetAの構造機能連関の解明を目指した。抑圧変異体を分離するための素材として、ループ2-3の保存性残基Arg70のCys変異体を用いた。この変異体はテトラサイクリン感受性宿主株に対して中程度の薬剤耐性しか与えず、また輸送活性も野生型TetAの10%程度で機能的には完全な蛋白ではない。この変異体を産生する大腸菌株から野生型レベルのテトラサイクリン耐性を与える自然復帰変異株を分離したところ、Cys70変異を保持しながら、第6膜貫通領域中央のThr171残基がSer171に置換される抑圧変異体を分離することができた。推定二次構造 (Figure 3) から判断して、70位と171位とが立体構造上近傍に位置する可能性は低いと思われた。部位特異的に171位残基を置換した結果、171位のアミノ酸残基はThrよりも小さな側鎖をもつことが機能抑圧に必要な条件であることが分かった (Table 4-2, Figure 4-3)。また、Ser171変異はCys70変異ばかりでなく、第2章で作成された他の70位変異 (Lys, Ala, Ser, Asp, Leu, Trp) に対しても一様の耐性レベル上昇効果を示した (Table 4-4)。ところが、輸送活性を測定すると、Ser171変異が活性上昇効果を示すのは、70位がArg (野生型) あるいはLys以外の場合に限られていた (Table 4-3)。更に、Hg²⁺存在下ではCys70単独変異体とCys70/Ser171二重変異体の輸送活性はほとんど変わらなかった (Table 4-5)。以上の結果は、Ser171変異は70位を正電荷をもたない側鎖が占めるときにのみ機能的な抑圧効果を発揮することを示し、70位が正電側鎖をもつときは171位のアミノ酸残基に依らず、それが依然機能していることを示唆している。

70位と171位とが立体構造上近傍にないこと、Ser171変異が70位のアミノ酸残基に依らず一様の抑圧効果をもつこと、70位変異の抑圧が171位の側鎖容積に依存することから、抑圧変異体においては171

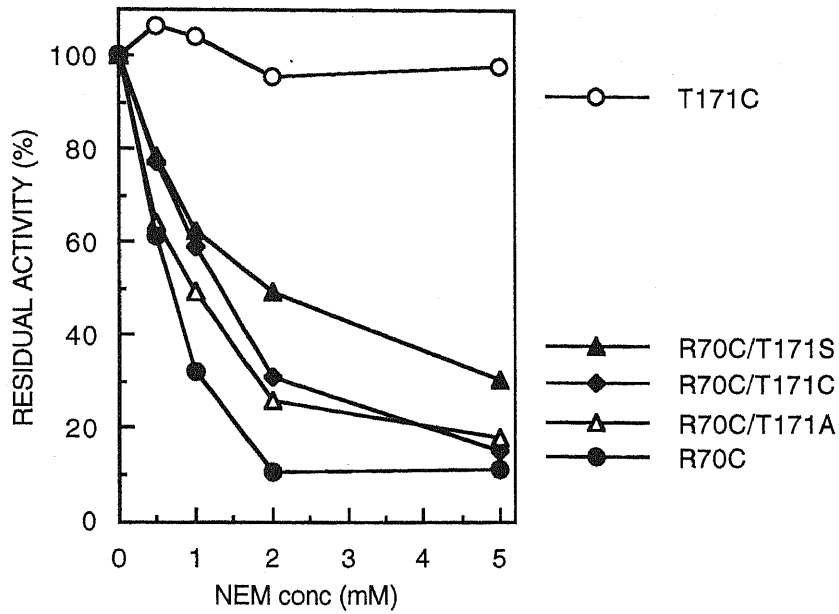


Figure 4-8. Effect of *N*-ethylmaleimide (NEM) on the tetracycline uptake by inverted membrane vesicles. NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured after preincubation with the indicated concentrations of NEM at 30 °C for 5 min. Residual activity is expressed as a percentage of the initial rate in the absence of NEM.

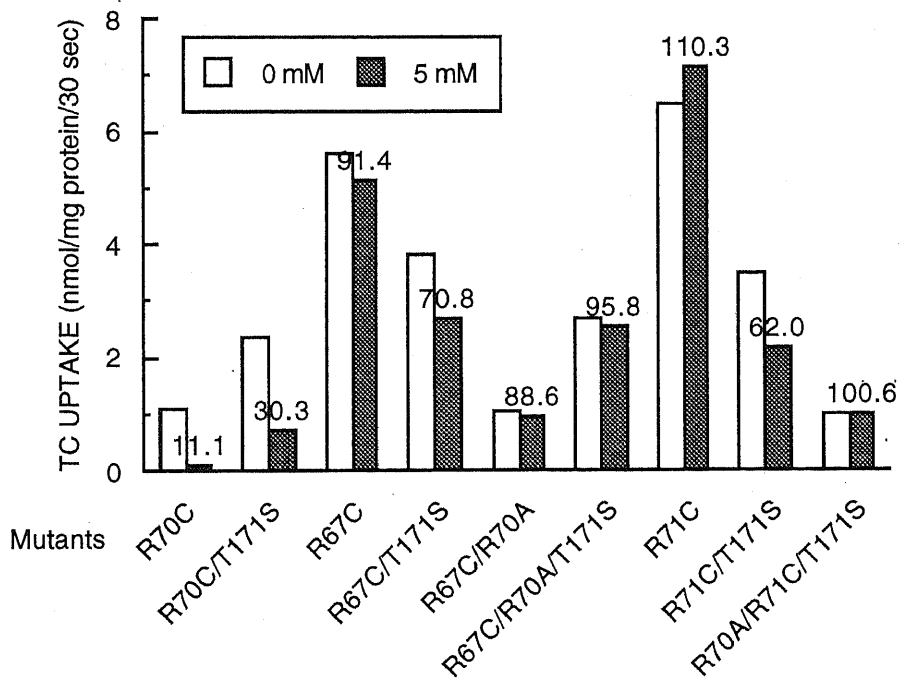


Figure 4-9. Effect of *N*-ethylmaleimide (NEM) on the tetracycline uptake by inverted membrane vesicles. NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured after preincubation with 0 and 5 mM NEM at 30 °C for 5 min. Numbers above bars are residual activities which are expressed as a percentage of the initial rate in the absence of NEM.

位の側鎖容積の減少により蛋白のコンフォメーション変化が誘起され、蛋白構造中を伝わって70位近傍に到達することが考えられた。このことは、171位単独変異体によるテトラサイクリン輸送の速度論的定数の大きな変化 (Table 4-3) によっても支持される。171位が単独に置換されても (Tyr置換でも) 活性の消失がないことはThr171残基が輸送機能に直接関与する必須残基ではないことを示している。従って、速度論的定数の変化は基質輸送の素反応が置換により乱された結果と考えられる。更に、Ser171変異がCys70変異体のNEM感受性を低下させ、Cys67変異体およびCys71変異体の感受性を上昇させることも蛋白のコンフォメーション変化が生じていることを示唆している。171位残基の置換の結果としてこのようなコンフォメーション変化が起こるためには、171位は膜貫通領域が接する側面に位置しなければならないことが考えられる。第8膜貫通領域に存在するHis257残基のCys変異体の輸送活性が Hg^{2+} 感受性である⁽³⁴⁶⁾のとは対照的にCys171変異体の活性は Hg^{2+} 非感受性であり (Figure 4-5)、更にSH修飾試薬に対しても非感受性であったこと (Figure 4-8) は、171位側鎖が膜貫通領域の疎水的な側面に位置していることを支持している。それ故、171位残基がヘリックス間相互作用に重要であることが示唆される。

Ser171変異による70位変異の抑圧のメカニズムに関して、70位近傍の正荷電側鎖が機能を代替する可能性を考えた。その候補としてArg67残基あるいはArg71残基が考えられたので、これらの変異の効果を検討した。種々の変異体の中で、Ala70/Cys71/Ser171三重変異体が最も注目すべきものであった。この変異体のみ輸送活性が Hg^{2+} により約3倍活性化され、その程度はCys70単独変異体に匹敵するものであった (Table 4-9)。Cys71単独変異体、Cys71/Ser171二重変異体など他の変異体の輸送活性が Hg^{2+} による活性化を受けないことを考慮すると、70位残基が中性に置換され、更に171位残基がThrよりも小さくなると、失われたArg70残基の代わりにArg71残基が機能していることが示唆される。Ala70/Ala71/Ser171三重変異体もまた活性を有するが、上記の可能性からいうと、これには機能する正荷電側鎖が71位にない。しかし、Ala70単独変異体も70位に正荷電側鎖がなくても輸送機能を保持している。従って、この領域の正電荷は必ずしも機能に必須ではないが、蛋白の代謝回転を上げ、基質輸送の効率を上昇させる上で重要であると考えられる。

第1節 はじめに

第2章、第3章、第4章において、Arg70残基の正電荷が機能に重要な役割を担っていることを述べた(279,344,347)。TetAの基質は正味1価カチオンのテトラサイクリン2価カチオンキレート体である(5)ので、Arg70残基の正電荷が直接基質と相互作用する可能性は低いと考えられる。第2章でArg70残基が存在する細胞質側のループ2-3は基質輸送経路の入り口のゲートとして機能していることが推察された(49,231-233,279)。ゲートは恐らく出口となるペリプラズム側にも存在し、両者の交互の開閉が厳密に守られることにより、プロトン輸送と共役した基質輸送が厳密に行われているであろう。この際、膜貫通領域の動的変化と協調して、ループ領域もまた動的変化を遂げると考えられる。そこで、ゲートの開閉として捉えられるループ領域の動的変化に、ループ領域に存在する幾つかの荷電アミノ酸残基間の相互作用の変化が関与している可能性を考えた。

第2章で、Arg70残基の正電荷とAsp66残基の負電荷との間の塩橋形成の可能性を検討した。両者を同時に中性残基に置換した二重変異体や荷電を逆転した二重変異体を構築したが、いずれもテトラサイクリン耐性を与えることができず、蛋白構造安定化のための永続的な塩橋形成の可能性は否定された。この結果はむしろ、Asp66残基の負電荷が基質との相互作用部位であるという考え(49,231-233)を支持し、負電荷が厳密に66位に存在しなければならないことを示している。また、Asp66残基の負電荷は消失すると蛋白は完全に失活するので必須であると言えるが、Arg70残基の正電荷は消失しても活性は著しく低下するが残存するので必ずしも必須ではない(279,344)。それ故、Arg70残基の正電荷は直接基質輸送機能に関与しているのではなく、輸送効率、代謝回転を上昇させるのに必要であると結論された。Arg70残基が、ある負荷電残基と相互作用してゲートの開閉に寄与しているならば、Arg70残基の正電荷の消失による活性低下は、対になる負電荷の露出が輸送反応を部分的に阻害している結果かもしれない。

当研究室ではTetA(B)の親水性領域に存在する、保存性の高い負荷電残基の部位特異的変異導入解析がすでに行われている(348)。その結果、機能に必須なものはAsp66残基のみであったが、それに次いで重要な残基としてAsp120残基が見いだされている。この残基は推定二次構造 (Figure 3) において第4膜貫通領域と第5膜貫通領域とを結ぶ細胞質側のループ4-5領域の第1番目に存在し、ループ2-3のArg70残基と立体構造上近傍に位置する可能性が高い。そこで、本章では、Asp120残基をArg70残基と相互作用する可能性のある残基のひとつとして着目し、部位特異的変異導入による解析を行った。

第2節 Arg70→Ala/Asp120→Asn二重変異体の性質

Arg70残基がAsp120残基とループ間相互作用を形成する可能性を検討するため、Arg70→Ala/Asp120→Asn二重変異体を構築した。Asp120→Asn変異プラスミド (pCTD120NおよびpLGD120N) は当研究室において作成されたものを用いた(348)。二重変異体を発現するローコピープラスミドはFigure 5-1に示すように構築し、大腸菌W3104株を形質転換するのに用いた。変異蛋白が正常に膜に発現することを確認し (data not shown)、薬剤耐性レベルを測定した (Table 5-1)。

Table 5-1. Tetracycline resistance levels of *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70/Asp120 substitution plasmids.

Plasmid	TetA	MIC of tetracycline ($\mu\text{g/ml}$)
None	None	0.8
pLGT2	Wild-type	200
pLGR70A	Arg70→Ala	12.5
pLGD120N	Asp120→Asn	25
pLGR70A/D120N	Arg70→Ala/Asp120→Asn	50

Ala70単独変異体、Asn120単独変異体のテトラサイクリン耐性レベルに比較して、Ala70/Asn120二重変異体の耐性レベルはわずかではあるが明らかに上昇しており、単独の置換で露出された電荷が両者を置換して正味中性にすると蛋白が安定化されるか、機能面での回復が起こっていることが示唆される。そこで、次に反転膜小胞を調製し、テトラサイクリン輸送活性を測定した (Figure 5-2)。通常の測定条件で、Ala70単独変異体の輸送活性は著しく低下しているが、Asn120単独変異体は野生型に匹敵する活性を保持していた。しかし、Table 5-2に示した輸送の速度論的定数を見ると、両者は同等のVmax値をもち、Asp120残基の単独置換も著しく機能を低下させることがわかる。Figure 5-2のAsn120単独変異体の結果はむしろKm値の大きな低下のためと考えられる。一方、Figure 5-2より、Ala70/Asn120二重変異体の輸送活性はAla70単独変異体に比べて明らかに回復していることがわかる。これは速度論的定数にも顕著に現れ、有意にVmax値が上昇している (Table 5-2)。従って、以上の結果よりArg70残基とAsp120残基との間での相互作用が示唆される。

Table 5-2. Kinetic constants for tetracycline uptake by inverted membrane vesicles.

NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of various concentrations of tetracycline and 1 mM CoCl₂. The kinetic constants were calculated from non-linear regression.

Mutations	Km (μM)	Vmax (nmol/mg protein/min)
None (Wild-type)	24.8 \pm 7.3	43.1 \pm 4.8
Arg70→Ala	22.7 \pm 3.1	4.4 \pm 0.3
Asp120→Asn	4.0 \pm 1.9	4.3 \pm 0.4
Arg70→Ala/Asp120→Asn	21.5 \pm 3.4	5.9 \pm 0.3

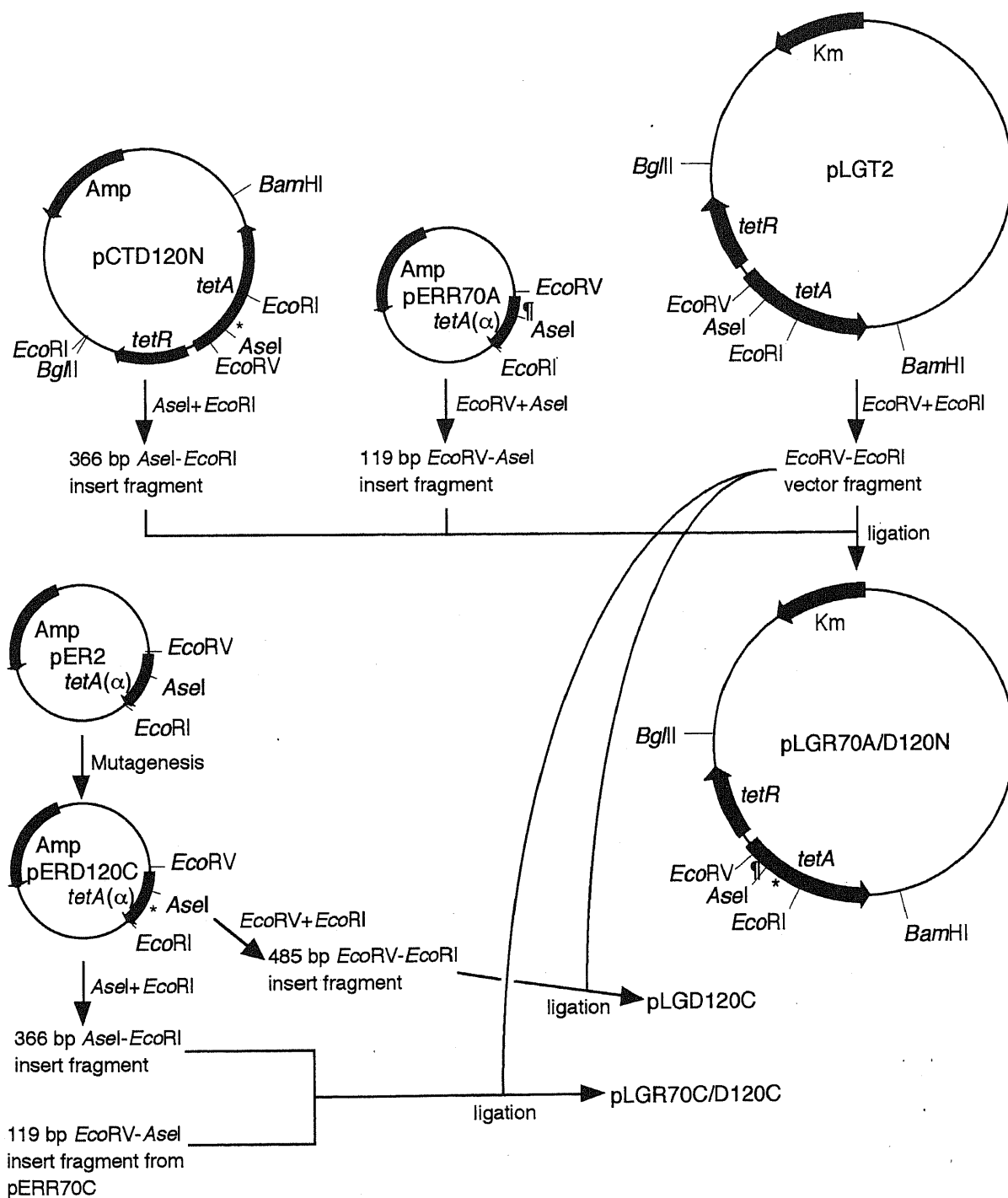


Figure 5-1. Construction of plasmids carrying the Arg70/Asp120 mutant *tetA* gene. pLGR70A/D120N was constructed by the insertion of the *EcoRV*-*Asel* fragment from pERR70A and the *Asel*-*EcoRI* fragment from pCTD120N into the *EcoRV*-*EcoRI* vector fragment of pLGT2. The D120C mutation was introduced by the method of Kunkel on pER2. The *EcoRV*-*EcoRI* and *Asel*-*EcoRI* fragments were cut out from pERD120C and used for constructions of pLGD120C and pLGR70C/D120C, respectively. Symbols (¶ and *) represent mutations at positions 70 and 120, respectively.

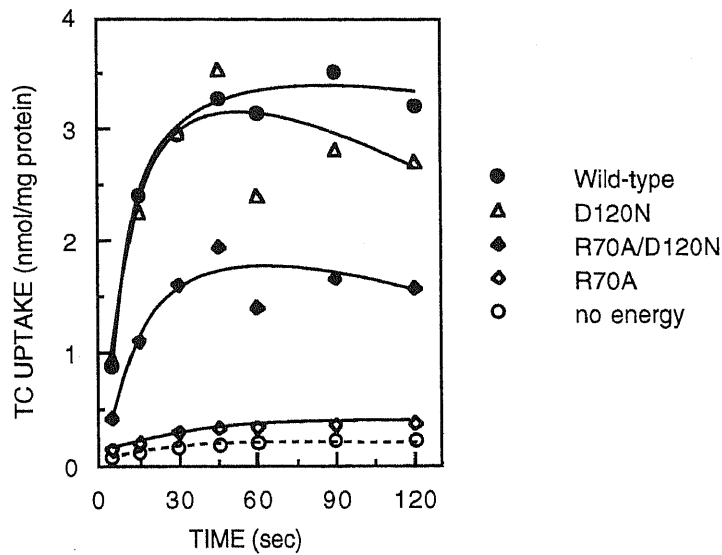


Figure 5-2. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70/Asp120 mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl₂.

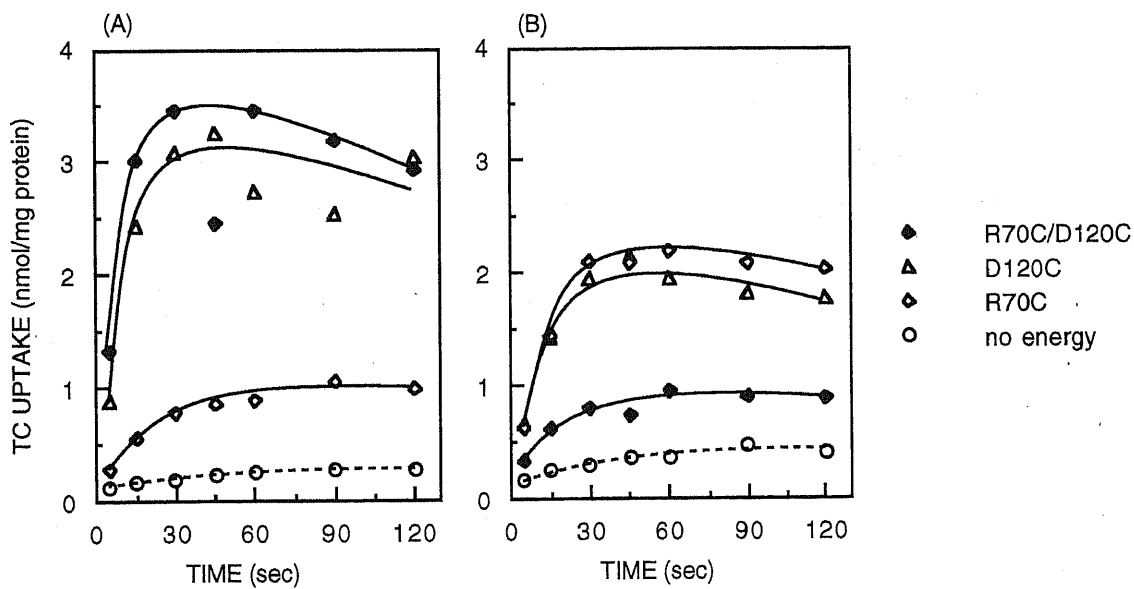


Figure 5-3. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70/Asp120 mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl₂ (A) or 50 μ M CoCl₂ plus 10 μ M HgCl₂ (B).

第3節 Arg70→Cys/Asp120→Cys二重変異体の性質

Arg70残基とAsp120残基が相互作用しているならば立体構造上両者は互いに近傍に位置することが予想される。このことを証明するため、両者の間での架橋形成の可能性を検討することにした。N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD) はカルボキシル基とアミノ基との間で0 Åの架橋、すなわちアミド結合形成を促すので、極近傍に存在する正負両荷電アミノ酸残基を架橋するのに非常に有用である。しかし、DCCDは、架橋形成反応の際最初にカルボキシル基と反応するのであるが、-COO⁻ではなく、-COOHにのみ反応するので、親水性領域に存在するカルボキシル基とは反応しないことが予想される。DCCDは単にカルボキシル基修飾試薬としても用いられ、F₀F₁-ATPase阻害剤としてよく知られている。大腸菌F₀F₁-ATPaseに対してDCCDはその膜内在性のcサブユニットのGlu61残基に結合しH⁺輸送を阻害することが分かっている(349,350)。Glu61残基はH⁺輸送に直接関与する残基であり、H⁺の結合、解離を伴うが、cサブユニットはF₀F₁-ATPase 1分子中10分子前後存在し、その内の大部分のGlu61残基は膜内の疎水性領域に面していると認識されている(332)。これに反し、TetA(B)はDCCDを作用させてもテトラサイクリン輸送は阻害されず、DCCDを結合しないと考えられる(351)。この結果から、TetAの膜貫通領域に存在する3つのAsp残基は膜貫通領域の親水性側面に位置していることが示唆されるとともに、野生型蛋白においてDCCDを用いてArg70残基とAsp120残基との間で架橋を形成させることは困難と思われる。そこで、架橋試薬として二価性SH修飾試薬を用いることを考慮した。そのためには、両残基をCysに置換した二重変異体を構築する必要がある。Cys70変異体は第3章で構築したので、本章ではCys120変異体およびCys70/Cys120二重変異体を構築した。Cys120変異の導入は、Table 5-3に示した合成オリゴヌクレオチドを用い、pER2のssDNAを鋳型としてKunkel法により行った。

Table 5-3. Mutagenic primer used for the Asp120→Cys mutation.
Asterisk (*) and underline indicate mismatches and a new restriction site, respectively

Primer	Nucleotide sequence	Codon change	Amino acid substitution
D120C	5' -CGGTCATT <u>GCATGC</u> ACCACCTCAG-3' SphI	GAT→TGC	Asp120→Cys

変異プラスミドはFigure 5-1に示したように作成し、大腸菌W3104を形質転換するのに用いた。各変異蛋白は野生型と同程度産生されていた (data not shown)。変異体を産生する大腸菌の薬剤耐性レベルをTable 5-4に示した。

Table 5-4. Tetracycline resistance levels of *E. coli* W3104 cells harboring the Arg70/Asp120 substitution plasmids.

Plasmid	TetA	MIC of tetracycline (μg/ml)
None	None	0.8
pLGT2	Wild-type	200
pLGR70C	Arg70→Cys	12.5
pLGD120C	Asp120→Cys	3.1
pLGR70C/D120C	Arg70→Cys/Asp120→Cys	4.7

Asn120変異体とは異なり、Cys120変異体の薬剤耐性レベルは著しく低下していた。また、Cys70/Cys120二重変異体の耐性レベルも低く、Cys70変異体から見た場合、回復しているとは言えない。これ

は前節に述べたAla70/Asn120二重変異体とは異なっている。ただ、MICは正菌体で測定するため、様々な要素の複合として決まるものであるため、必ずしもTetAの排出活性のみを反映しているとは限らない。そこで次に、反転膜小胞でのテトラサイクリン輸送活性を測定した (Figure 5-3A)。Cys120変異体は薬剤耐性レベルがほぼ感受性菌レベルであるにもかかわらず、Asn120変異体と同程度の輸送活性を示した。MICの低下は変異蛋白の産生が宿主菌にとって致死的であることが考えられる。一方、Cys70/Cys120二重変異体もまたMICとは対照的に高い輸送活性を示し、Cys70単独変異体と比べ著しく、またCys120単独変異体と比べても上昇していた。Table 5-5に速度論的定数を示したが、二重変異体のVmax値は顕著にそれぞれの単独変異体のVmax値よりも上昇していることが分かる。これは本質的にTable 5-2の結果と一致し、Arg70残基とAsp120残基との間での相互作用を示唆していると考えられる。

Table 5-5. Kinetic constants for tetracycline uptake by inverted membrane vesicles.

NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of various concentrations of tetracycline and 1 mM CoCl₂. The kinetic constants were calculated from non-linear regression.

Mutations	Km (μM)	Vmax (nmol/mg protein/min)
None (Wild-type)	24.8 ± 7.3	43.1 ± 4.8
Arg70→Cys	26.6 ± 5.7	10.7 ± 0.8
Asp120→Cys	8.8 ± 3.3	6.0 ± 0.6
Arg70→Cys/Asp120→Cys	24.7 ± 4.2	13.8 ± 0.9

Cys70単独変異体が活性化される、10 μM Hg²⁺存在下で輸送活性を測定したところ、Cys120単独変異体の輸送活性はおおよそ2/3に低下した (Figure 5-3B)。この結果は120位のメルカプチドが輸送活性を阻害することを示し、70位のArg残基の正電荷との間での電気的な反発が生じているのかもしれない。同じ条件で、Cys70/Cys120二重変異体の輸送活性はおおよそ1/6にまで低下していた。この結果も、2つの部位でのメルカプチドが電気的な反発を起こしていることを示唆しているが、Hg²⁺による活性阻害の程度がCys120単独変異体よりも大きく、ひとつのHg²⁺が2つのSH基に結合して架橋 (-S-Hg-S) が形成され、蛋白の代謝回転を大きく低下させている可能性も考えられる。

次に、これら3種のCys変異体の輸送活性へのN-エチルマレイミド (NEM) の効果を検討した (Figure 5-4)。Cys70単独変異体の輸送活性は最大90%阻害されるが、それには2mMのNEMを要する。Cys120単独変異体は0.5mMで約30%活性が阻害され、それ以上の濃度のNEMで処理しても阻害の程度に大きな変化はない。それ故、120位のSH基はNEMとの反応性が70位のSH基よりも高いと言える。一方、Cys70/Cys120二重変異体は最大阻害が約85%とCys70単独変異体と同じ程度であるが、0.5mMのNEM処理ですでにそのレベルに到達している。従って、二重変異体に対しては、それぞれの単独変異体への効果が相加的に現れていると言える。

以上は作成された変異体の性質であるが、幾つかの結果から、Arg70残基とAsp120残基とが互いに近傍にあることが示唆された。ここで、2残基間で架橋を形成させるという本来の目的に入る。2価性SH修飾試薬として3種のフェニレンビスマレイミド (N,N'-1,2-フェニレンビスマレイミド、N,N'-1,3-フェニレンビスマレイミド、N,N'-1,4-フェニレンビスマレイミド) を用いた。これらで2つのSH基が架橋された場合、その間の距離はそれぞれ5.5、8.8、9.9 Åと見積もられる。Cys70/Cys120二重変異体を0~5mMの各試薬で室温30分間処理した後、SDS-PAGEを行い蛋白を分離し、イムノブロットングによりTetAの検出を行った。架橋形成が起こっているならばわずかでも蛋白の移動度が変化していることが予想されたが、顕著な変化は見られず、この方法での架橋形成の検出には限界があると判断した。現段階ではここまでしか解析が進んでおらず、今後の検討を要する。

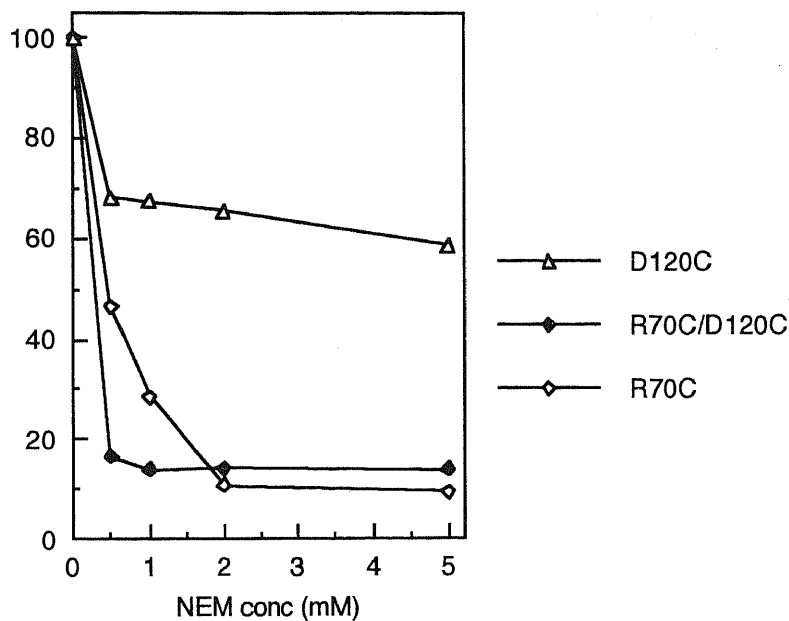


Figure 5-4. Effect of *N*-ethylmaleimide (NEM) on tetracycline uptake by inverted membrane vesicles. After incubation with the indicated concentrations of NEM for 5 min at 30 °C, NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured. Residual activity is expressed as a percentage of the uptake in the absence of NEM.

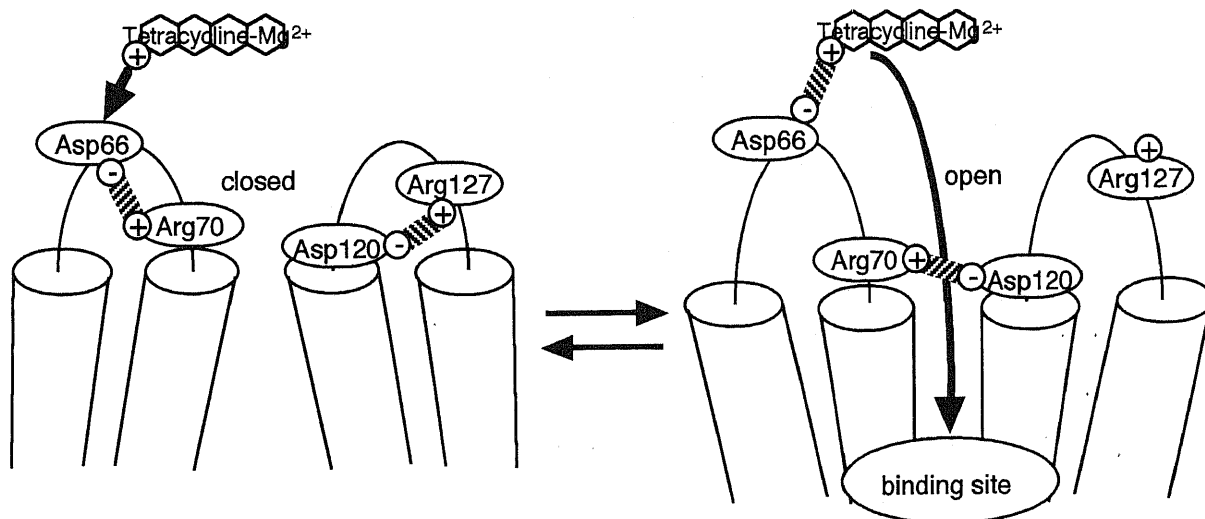


Figure 5-5. Putative roles of charged residues in the cytoplasmic loop regions. Interactions between Asp66 and Arg70, and between Asp120 and Arg127 are required for the closure of the cytoplasmic gates. When Asp66 senses a tetracycline- Mg^{2+} chelate complex, interaction between Arg70 and Asp120 is formed and the gates are open. Then substrate is transferred to the binding site in the transmembrane domain and interactions between Asp66 and Arg70, and between Asp120 and Arg127 are reformed.

第4節 考察

本章では、前章までに明らかにされたループ2-3領域のArg70残基の正電荷が重要であるという結論(279,344,347)を受け、Arg70残基が立体構造上近傍の負電荷と相互作用し、細胞質側のゲートの開閉に寄与している可能性を挙げ、検討した。当研究室の以前の研究より、ループ4-5に存在するAsp120残基の負電荷はループ2-3のAsp66残基に次いで機能に重要であることが分かっていた(348)。更に、推定二次構造中、Arg70残基が第3膜貫通領域の直前に存在し、Asp120残基が第4膜貫通領域の直後にあり、実際の立体構造においても極近傍に位置する可能性が最も高いと思われ、Arg70残基と相互作用する残基の第一候補とした。

一般に、正荷電残基と負荷電残基とがイオン対を形成しているとき、そのうちのいずれか一方を中性残基に置換したときには活性が消失するが、両方を同時に中性残基に置換したときには活性が保持される傾向がある(263-269)。従って、Arg70残基とAsp120残基の両方を中性残基に置換したときの活性がそれぞれの単独変異体の活性よりも上昇しているならば、これら2残基間で何らかの相互作用があると期待される。

そこで、Ala70/Asn120二重変異体を構築し、その性質をそれぞれの単独変異体の性質と比較した。その結果、二重変異体のテトラサイクリン輸送活性(V_{max} 値)は明らかに単独変異体よりも上昇していることが見いだされた。単独変異体はいずれもわずかではあるが輸送活性を保持しており、必ずしも機能に必須ではないが、単独置換によって孤立した電荷は基質輸送過程の素反応を著しく傷害していると考えられる。このことは、二重置換で孤立した電荷を消失させた場合に明らかに活性が回復したことから裏付けられる。Figure 5-5にはArg70残基とAsp120残基の役割に関する現時点での作業仮説が示されている。ループ2-3とループ4-5のループ間相互作用にはこの2残基の他にループ2-3のAsp66残基とループ4-5のArg127残基を加えている。Asp66残基は前述のように必須残基であり(49)、正味1価カチオンの基質が相互作用する部位と考えられている(231-233)。Arg127残基は、当研究室のTetAの保存性Arg残基の解析により機能に重要であることが見いだされている残基である(345)。このモデルにおいて、基質が存在していないときは、Asp66残基とArg70残基が、またAsp120残基とArg127残基がループ内で相互作用し、その結果細胞質側ゲートが閉じた状態にある。基質がAsp66残基の負電荷と相互作用すると、Asp66残基とArg70残基の相互作用が切断され、その結果、Arg70残基はAsp120残基と相互作用しようとし、Asp120残基とArg127残基の相互作用が切断され、ゲートが開く。この初期相互作用においてArg127残基の正電荷がこのモデルの中で孤立するが、別の負荷電残基や水素結合能を有するアミノ酸残基により安定化されるとしてもよい。細胞質側ゲートが開くと、基質は膜内の結合部位に移ることになる。このとき、Asp66残基の負電荷が基質を放すので、Arg70残基との相互作用が再び形成され、またArg127残基の正電荷も再びAsp120残基と相互作用し、もとの状態に戻るようになる。Asp66残基とArg70残基はループ2-3に存在する保存性配列モチーフを構成する残基であり、種々の二次性能動輸送体に保存されていることは第2章で述べた。更に、ここに示したAsp120残基とArg127残基もFigure 5-6に示すように二次性能動輸送体に広く保存される残基であることは注目に値する(44)。このことは、Figure 5-5のモデルが一般性をもって二次性能動輸送体に受け入れられうる可能性を示唆している。

Arg70残基とAsp120残基とが本当に近くに存在するという直接的な証拠を得るために、Cys70/Cys120二重変異体を構築した。この変異体もそれぞれの単独変異体に比べ活性回復が見られ、両者が近傍にあることを支持している。3種のフェニレンビスマレイミドを用いて架橋形成の可能性について検討したが、結果はそれを裏付けるには至らなかった。今回は架橋形成の判定が可能と思ひ、intactのTetAを使用したが、実際これではSDS-PAGEやイムノブロットングで判定がつかなかった。それ故、今後は2分割発現系、具体的には、ペリプラズム側のループ3-4に相当するところでtetA遺伝子を切断

Protein	G X X X D R X G R R					D X X X X X R																					
	in loop2-3					in loop4-5																					
TetA(B) (G-)	62	G	K	M	S	D	R	F	G	R	R	120	D	T	T	S	A	S	Q	R	V	K	W				
TetA(A) (G-)	64	G	A	L	S	D	R	F	G	R	R	122	D	I	T	D	G	D	E	R	A	R	H				
TetA(C) (G-)	64	G	A	L	S	D	R	F	G	R	R	122	D	I	T	D	G	E	D	R	A	R	H				
TetA(D) (G-)	62	G	R	W	S	D	K	L	G	R	R	120	D	S	T	A	V	S	E	R	T	A	W				
TetA(E) (G-)	62	G	R	W	S	D	R	I	G	R	R	120	D	V	T	P	E	E	S	R	T	H	W				
TetA(G) (G-)	62	G	Q	L	S	D	S	Y	G	R	R	120	D	S	T	G	E	G	S	R	A	R	W				
TetA(H) (G-)	62	G	R	L	S	D	K	Y	G	R	K	120	D	V	T	P	A	K	N	R	T	R	Y				
CmlA (P. aeruginosa)	70	G	P	L	S	D	R	L	G	R	R	128	R	D	I	Y	A	G	R	E	E	S	N	V			
Bcr (E.coli)	47	G	P	M	A	D	S	F	G	R	K	105	R	D	I	Y	P	K	E	F	S	R	M	M			
EmrD (E.coli)	66	G	P	I	S	D	R	V	G	R	R	124	R	D	L	Y	E	R	T	Q	L	R	H	A	N	S	
NorA (S.aureus)	59	G	T	L	A	D	K	L	G	K	K	118	D	I	S	P	S	H	Q	K	A	K	N				
Bmr (B.subtilis)	62	G	R	W	V	D	R	F	G	R	K	121	D	I	T	T	I	K	T	R	P	K	A				
CGAT (rat)	155	G	P	L	T	N	R	I	G	Y	H	214	S	V	Y	T	D	N	Y	E	R	G	R	A			
SVAT (rat)	151	G	L	L	T	N	R	I	G	Y	P	210	S	V	Y	T	D	D	E	E	R	G	K	P			
VAcHT (rat)	143	G	P	F	I	D	R	M	S	Y	D	202	D	K	Y	P	E	E	P	E	R	S	R	A			
OCT1 (rat)	168	G	Y	I	A	D	R	F	G	R	K	227	E	F	V	G	S	G	Y	R	R	T	T				
SV2 (rat)	223	G	G	L	A	D	R	L	G	R	R	282	E	F	L	A	Q	E	K	R	G	E	H				
CitA (E.coli)	74	G	A	Y	I	D	R	I	G	R	R	K	141	E	I	A	T	P	G	N	K	G	F	Y			
KgtP (E.coli)	84	G	R	I	A	D	K	H	G	R	K	K	151	E	V	A	V	E	G	R	K	G	F	Y			
AraE (E.coli)	80	G	W	L	S	F	R	L	G	R	K	139	E	M	A	S	E	N	V	R	G	K	M				
GalP (E.coli)	73	G	W	L	S	F	K	L	G	R	K	K	132	E	I	A	P	E	K	I	R	G	S	M			
XylE (E.coli)	76	G	Y	C	S	N	R	F	G	R	R	153	E	L	A	P	A	H	I	R	G	K	L				
LacY (E.coli)	64	G	L	L	S	D	K	L	G	L	R	K	126	E	A	F	I	E	K	V	S	R	R	S	N		
CscB (E.coli)	66	G	I	V	Q	D	K	L	G	L	K	K	129	D	S	F	T	E	K	M	A	R	N	F	H		
RafB (E.coli)	67	G	V	I	S	D	R	L	G	L	K	K	129	E	A	Y	I	E	R	V	S	R	S	S	G		
MelB (E.coli)	63	N	A	T	R	S	R	W	G	K	F	K	133	D	K	R	E	R	E	Q	L	V	P	Y	P	R	
Glut1 (human)	84	G	L	F	V	N	R	F	G	R	R	146	E	V	S	P	T	A	F	R	G	A	L				
Glut2 (human)	116	G	W	L	G	D	T	L	G	R	I	K	178	E	I	A	P	T	A	L	R	G	A	L			
Glut3 (human)	82	G	L	F	V	N	R	F	G	R	R	144	E	I	S	P	T	A	L	R	G	A	F				
Glut4 (rat)	100	G	I	I	S	Q	W	L	G	R	K	R	162	E	I	A	P	T	H	L	R	G	A	L			
Glut5 (rat)	89	G	F	L	V	N	N	L	G	R	K	151	E	L	A	P	K	N	L	R	G	A	L				
Glut7 (rat)	114	G	W	L	G	D	K	L	G	R	I	K	176	E	I	S	P	H	T	L	R	G	A	A			
PepT1 (rabbit)	70	A	L	I	A	D	A	W	L	G	K	F	X	149	D	Q	F	E	E	G	Q	E	K	Q	R	N	R
GAL2 (S.cerevisiae)	140	S	K	G	G	D	M	Y	G	R	K	200	E	I	A	P	K	H	L	R	G	T	L				
HXT2 (S.cerevisiae)	125	G	R	L	G	D	M	Y	G	R	R	185	E	T	A	P	K	H	I	R	G	T	C				

Figure 5-6. The GXXXDRXGRR motif in the cytoplasmic loop2-3 and the DXXXXXXR motif in the cytoplasmic loop4-5 of various membrane transport proteins. The fifth acidic and ninth basic amino acid residues in loop2-3, and the first acidic and eighth basic residues in loop4-5 are shown in boxes. Abbreviations are as follows: TetA, tetracycline resistance proteins from Gram-negative bacteria. CmlA, Tn1969-encoded chloramphenicol resistance protein. Bcr, bicyclomycin resistance protein. EmrD, *E. coli* multidrug resistance protein. NorA, new quinolone resistance protein. Bmr, *B. subtilis* multidrug resistance protein. CGAT, chromaffin granule amine transporter. SVAT, synaptic vesicle amine transporter. VAcHT, vesicular acetylcholine transporter. OCT1, organic cation transporter in renal proximal tubules. SV2, synaptic vesicle protein 2 from brain. CitA, plasmid-mediated citrate transporter. KgtP, α -ketoglutarate transporter. AraE, arabinose permease. GalP, galactose permease. XylE, xylose permease. LacY, lactose permease. CscB, sucrose permease. RafB, raffinose permease. MelB, melibiose permease. GLUT1-7, glucose transporters. PepT1, dipeptide/H⁺ symporter. GAL2, galactose transporter. HXT2, hexose transporter. See Figure 2-1 for references.

し、N末側3本、C末側9本の膜貫通領域を含むペプチド断片を発現させる系を用いる予定である。分割された蛋白は明らかにintactのTetAとは異なるところに泳動されるので、架橋形成が起こればintactのTetAに近い泳動度のところに検出されることが期待される。

最近、ラクトース輸送体において、Cys二重変異体をピレンマレイミドで標識し、その蛍光を測定することで2残基が近傍にあることが証明された(306,352)。これは、2つのピレン環が平面どうしで重複すると、excimerを形成し、通常の蛍光波長よりも長波長側に独特のピークを形成することにより判別される。この方法も近傍に存在することのひとつの証明法として、これには精製蛋白が必要であるが、Cys70/Cys120二重変異体にも応用したい手段である。

第1節 はじめに

TetAは、正味1価カチオンのテトラサイクリンと2価カチオンとのキレート体とH⁺とをアンチポートする(5)ので、蛋白の負荷電残基が基質および共役イオンの認識、結合に重要であると考えられる。TetA(B)の膜貫通領域には3つの酸性残基、第1膜貫通領域のAsp15残基、第3膜貫通領域のAsp84残基、第9膜貫通領域のAsp285残基が存在する (Figure 3) (35)。これらはいずれもグラム陰性細菌由来のTetA (クラスA~E、G、H) に保存され(164)、重要性が示唆された。当研究室ではすでにこれらの残基の部位特異的変異導入解析が行われている(51)。その結果、Asp15残基とAsp84残基はGlu、Asn、Lys置換で高いテトラサイクリン耐性レベルを維持しているが、Glu置換でのみ高い輸送活性を保持していることから、これらの部位のカルボキシル基は機能に必須ではないが、基質輸送に重要であると結論された。Asp15残基の重要性はMcMurryらによっても確認されている(353)。また、Asp15残基とAsp84残基を同時にAsnに置換するとテトラサイクリン耐性を全く与えなくなる(354)ので、これら2つの部位については少なくともいずれか一方にカルボキシル基が必要であると言える。一方、Asp285残基はGlu置換でもわずかな輸送活性しか示さず、Asn置換ではテトラサイクリン耐性も全く与えることができない。従って、285位のアミノ酸残基はAspであることが機能に必須であると言え、Asp285残基は基質だけでなく、H⁺の輸送にも関与していると推察された(51)。

本章では、Asp285残基の役割を更に詳細に解明することを目的として、Asp285残基のAsn変異体とともにテトラサイクリン耐性を回復する抑圧変異体を分離し、285位と機能的、構造的に連関するアミノ酸残基の検索を行った。

第2節 Asp285→Asn変異体からのテトラサイクリン耐性回復抑圧変異体の分離

Asn285変異体をコードするローコピープラスミドpLGD285N(51)を保持する大腸菌W3104株はテトラサイクリン耐性を全く示さず、MICは宿主株と同じ0.8 μg/mlである。この変異株から耐性を回復する自然復帰変異株を得るため、その培養液約1.5mlを100 μl程度に濃縮し、その全量を50 μg/mlのテトラサイクリンを含むYT寒天平板に塗布し、37°Cで培養した。2日後10個のコロニーが得られたので、その薬剤耐性レベルを測定したところ、いずれも野生型TetAを産生する大腸菌株と同じ耐性レベル、MICで200 μg/mlを示した。それぞれの復帰変異株よりプラスミドDNAを単離し、改めて大腸菌W3104株を形質転換しても野生型レベルの耐性を示したので、耐性獲得の原因は大腸菌染色体上ではなく、プラスミド上にあると判断した。

変異部位を含む領域を限定するため、復帰変異株より単離されたプラスミド (pLGD285NB-1) から285位を含むC末側半分 (β領域) をコードするEcoRI-BamHI切断断片を野生型TetAをコードするpLGT2の対応する領域と交換したプラスミド (pLGβrev) を作成した。W3104/pLGβrev株もpLGD285NB-1と同じ野生型レベルの耐性を示したので、変異部位はβ領域に含まれると判断した。そこで、pLGD285NB-1から調製されたEcoRI-BamHI切断断片をマルチコピープラスミドpUC118に挿入したプラスミド (pUCD285NB-1) を作成し、β領域をコードする領域の塩基配列を決定したところ、Asn285変異は保持したまま、Ala220残基に対応するコドンGCGがGAGに置換されており、その結果Glu置換が生じ

ていた。この結果は負電荷の消失が新たな負電荷の導入により耐性回復が起こったことを示している。220位は推定二次構造上 (Figure 3)、第7膜貫通領域のほぼ中央に位置し、第9膜貫通領域の285位と膜表面からの距離はほぼ同じであることが推定される。このことから、285位側鎖と220位側鎖とが立体構造上近傍に位置していることが示唆される。

第3節 Asp285→Asn変異抑圧に対する220位残基の要求性

Asn285変異体の抑圧変異体はAla220→Glu変異を新たにもち、新たな負電荷が導入されていた。本節ではAsn285変異を抑圧するには負電荷を有するカルボキシル基が必要なのかどうかを明らかにするため、Ala220残基をGlu、Asp、Gln、Lysに置換し、Asn285変異と組み合わせ、テトラサイクリン耐性が回復するかどうか検討した。また、220位の単独変異体も構築した。変異導入にはTable 6-1に示す合成オリゴヌクレオチドを用いた。GluおよびAsp置換は、pLGD285NのEcoRI-BamHI切断断片をマルチコピープラスミドpUC118に挿入したプラスミド (pUCD285N) を鋳型として用い、Eckstein法に従って行った。GlnおよびLys置換は、pLGD285NのEcoRV-BamHI切断断片をマルチコピープラスミドpUC118RVに挿入したプラスミド (pRVBHD285N) を鋳型として用い、Kunkel法により行った。Asn285変異を含む二重変異体はそれぞれの変異プラスミドからEcoRI-BamHI切断断片を調製し、pLGT2の対応する領域と交換し構築した。220位の単独変異プラスミドは、それぞれの変異プラスミドから調製したEcoRI-BglI切断断片と野生型tetA遺伝子をもつpCT1183から調製したBglI-BamHI切断断片とをpLGT2のEcoRI-BamHIベクター断片に組み込み構築した (Figure 6-1)。

Table 6-1. Mutagenic primers used for the Ala220 mutations.

Asterisks (*) and underlines indicate mismatches and new restriction sites, respectively. Nucleotide sequences of primers correspond to the complementary sequence of the tetA gene.

Primer	Nucleotide sequences	Codon change	Amino acid substitution
A220ER	5' -GGCCTAT <u>CAGCTG</u> CTCTGAAAAAT-3' PvuII	GCG→GAG	Ala220→Glu
A220DR	5' -GGCCTAT <u>CAGCTG</u> ATCTGAAAAAT-3' PvuII	GCG→GAT	Ala220→Asp
A220QR	5' -CCTAT <u>CAGCTG</u> CTGTGAAAAA-3' PvuII	GCG→CAG	Ala220→Gln
A220KR	5' -CCTAT <u>CAGCTG</u> CTTTGAAAAA-3' PvuII	GCG→AAG	Ala220→Lys

構築した変異プラスミドで大腸菌W3104株を形質転換し、薬剤耐性レベルを測定した (Table 6-2)。また、変異蛋白はいずれも野生型TetAと同程度産生されていることを確認した (data not shown)。

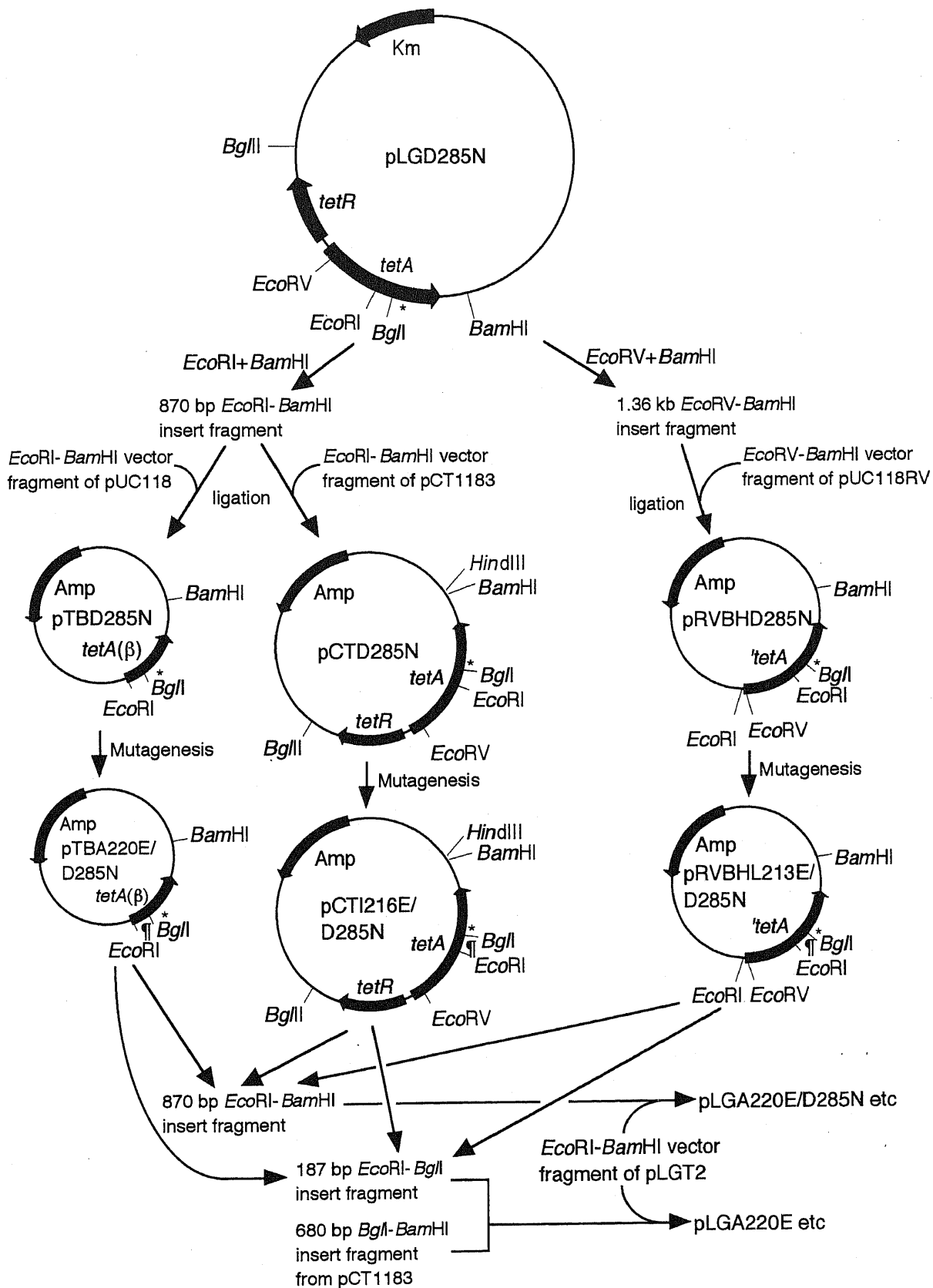


Figure 6-1. Subcloning of the Asp₂₈₅→Asn mutant *tetA* gene and construction of double mutant plasmids containing the helix 7 mutation and the Asp₂₈₅ mutation, and single mutant plasmids containing the helix 7 mutation. Double mutant plasmids were constructed by the insertion of the *EcoRI*-*Bam*HI fragment from pTB, pCT or pRVBH series to the pLGT2 vector. Single mutant plasmids were constructed by the insertion of the *EcoRI*-*Bgl*I fragment from pTB, pCT or pRVBH series and the *Bgl*I-*Bam*HI fragment from pCT1183 to the pLGT2 vector. Symbols († and *) represent the helix 7 mutation and the Asp₂₈₅ mutation, respectively.

Table 6-2. Tetracycline resistance levels of *E. coli* W3104 cells harboring the Ala220/Asp285 substitution plasmids.

Plasmid	TetA	MIC of tetracycline ($\mu\text{g/ml}$)
None	None	0.8
pLGT2	Wild-type	200
pLGD285E	Asp285→Glu	100
pLGD285N	Asp285→Asn	0.8
pLGD285NB-1	Ala220→Glu/Asp285→Asn	200
pLG β rev	Ala220→Glu/Asp285→Asn	200

pLGA220E/D285N	Ala220→Glu/Asp285→Asn	200
pLGA220D/D285N	Ala220→Asp/Asp285→Asn	50
pLGA220Q/D285N	Ala220→Gln/Asp285→Asn	3.1
pLGA220K/D285N	Ala220→Lys/Asp285→Asn	4.7

pLGA220E	Ala220→Glu	100
pLGA220D	Ala220→Asp	50
pLGA220Q	Ala220→Gln	50
pLGA220K	Ala220→Lys	25

Glu220変異はAsn285変異を抑圧し、テトラサイクリン耐性を野生型レベル、MICで200 $\mu\text{g/ml}$ にまで上昇させるが、Gluよりも側鎖が短くなるAspでもわずかに弱くなるが抑圧効果を示し、MICで50 $\mu\text{g/ml}$ にまで回復させることができた。これは、285位の単独置換で、Glu285変異体よりも野生型(Asp285)の方が高い耐性を与えるのと対照的である。しかし、GlnおよびLys変異は抑圧効果がほとんどなく、MICの上昇はわずかしき見られなかった。従って、Asn285変異を抑圧するにはカルボキシル基の存在が必要であると言える。一方、220位の単独変異体を見ると、どれも比較的高いテトラサイクリン耐性を与えることができる。Glu220およびAsp220変異体は膜貫通領域にひとつ余分にカルボキシル基が導入され、また、Lys220変異体では正電荷が導入されるにもかかわらず、耐性を与えることができ、蛋白構造への荷電アミノ酸残基の影響は比較的小さいと考えられる。

Figure 6-2では、各変異プラスミドを保持する大腸菌株から調製された反転膜小胞へのテトラサイクリンの取り込みを測定した。Asn285単独変異体はテトラサイクリン輸送活性が全くないが、その抑圧変異体であるGlu220/Asn285二重変異体は顕著な輸送活性を示し、テトラサイクリン輸送におけるカルボキシル基の重要性が確認された。しかし、その輸送活性は野生型レベルの耐性を与えることができることを考慮するとかなり低いものであった。また、Asp220/Asn285二重変異体も輸送活性が観察されたが、更に低く、Asn285変異抑圧には側鎖の長いGlu220変異の方が適していると言える。一方、Gln220/Asn285二重変異体およびLys220/Asn285二重変異体はMICから予想される通り、輸送活性は検出されなかった。220位の単独変異体は、Glu220変異体が野生型よりも高い輸送活性を示すほか、Asp220変異体およびGln220変異体で比較的高い輸送活性が観察された。ところが、Lys220変異体は、中程度の耐性を与えることができるにもかかわらず、輸送活性は認められなかった。Table 6-3でテトラサイクリン輸送の速度論的定数を測定したところ、Glu220/Asn285二重変異体およびAsp220/Asn285二重変異体の K_m 値はいずれも野生型のおよそ4倍に上昇していた。Figure 6-2では10 μM テトラサイクリンを含む条

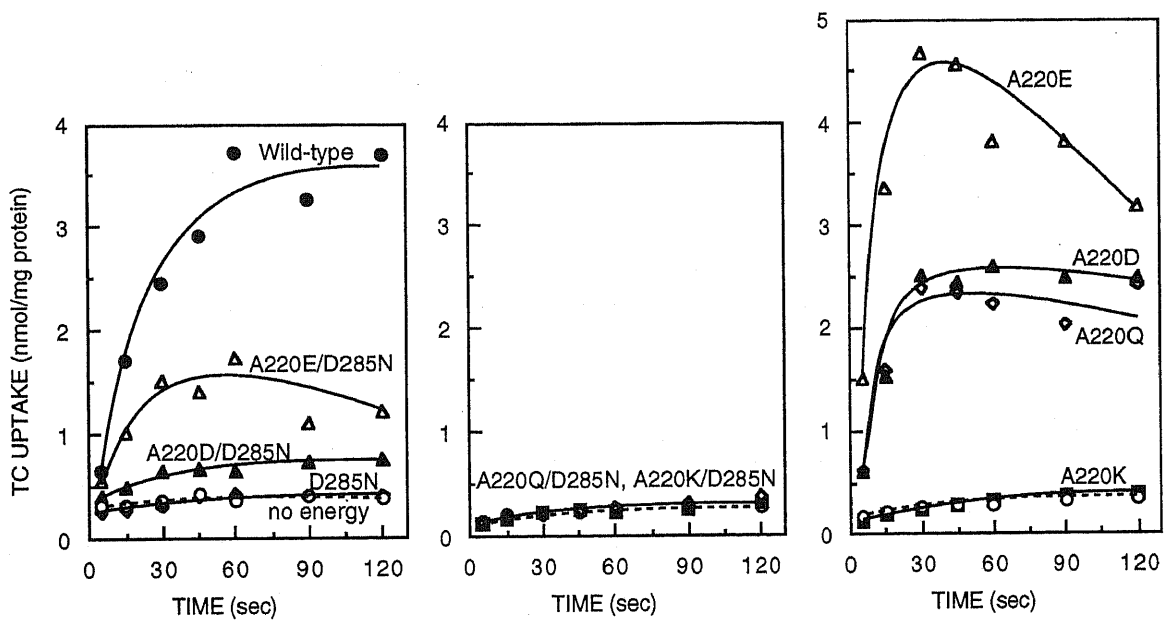


Figure 6-2. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring the Ala220/Asp285 substitution mutant plasmids. Assays were performed in the presence of 10 μM tetracycline and 50 μM CoCl_2 .

件で活性を測定しているため、これら二重変異体の低い活性は基質との親和性の低下が原因であると言える。一方、輸送のVmax値はGlu220/Asn285二重変異体の方がAsp220/Asn285二重変異体よりも約3.5倍大きい。これは、285位のGlu変異体が野生型よりも低い活性をもつことと対照的である(51)。この結果は220位の方が285位よりも基質結合部位から離れていることを示し、220位側鎖の長さが代謝回転に影響していることが示唆される。

220位に余分にカルボキシル基が導入されるGluおよびAsp変異体ではKm値が野生型のおよそ1/2に低下し、220位側鎖も基質の認識、結合に寄与していることが示唆される。この場合も220位側鎖の長さはVmax値にのみ影響し、二重変異体の結果と一致した。この余分なカルボキシル基は機能に致命的な障害を与えることはないが、野生型よりも輸送活性を上昇させずに、Km値を低下させることから、この変異体では基質の放出過程が幾分損なわれている可能性がある。220位はもともと中性側鎖をもつAlaであるが、同じく中性のGlnが導入されてもKm値の低下が認められた。これは、Gln残基側鎖が親水性であるために水素結合を通して基質結合に寄与できるものと考えられる。また、Vmax値はGlu220変異体と同程度であり、輸送効率に側鎖の長さが影響していることを支持している。一方、Lys220変異体は中程度のテトラサイクリン耐性を与えることができるが、輸送活性は全く観察されなかった。この変異体では、220位の塩基性側鎖と285位の酸性側鎖との間で相互作用が生じ、基質輸送あるいはH⁺輸送を傷害しているのかもしれない。

Table 6-3. Kinetic constants for tetracycline uptake by inverted membrane vesicles.

NADH-dependent tetracycline uptake for 30 sec was measured in the presence of various concentrations of tetracycline and 1 mM CoCl₂. Kinetic constants were calculated from Lineweaver-Burk plots. N.D. means that parameters could not be determined.

Mutations	Km (μ M)	Vmax (nmol/mg protein/min)
None (Wild-type)	36	27
Ala220→Glu/Asp285→Asn	145	53
Ala220→Asp/Asp285→Asn	141	15
Ala220→Glu	14	28
Ala220→Asp	16	16
Ala220→Gln	20	28
Ala220→Lys	N.D.	N.D.

第4節 220位変異のAsp285→Lys変異への効果

Lys220単独変異体はテトラサイクリン輸送活性を全く示さず、Lys220残基の塩基性側鎖とAsp285残基の酸性側鎖との間でのイオン性の相互作用が機能を傷害していることが示唆された。また、この結果より220位と285位とが立体構造上近傍に位置している可能性が示された。当研究室ではAsp285残基のLys変異体が構築されている(51)。そこで、本節では、中性側鎖をもつAsn285変異を抑圧することができるAla220残基の酸性残基への置換が、塩基性側鎖をもつLys285変異を抑圧することができるかどうかを検討した。そのために、pLGD285K(51)よりLys285変異を含む*Bgl*I-*Bam*HI切断断片を調製し、220位変異を含む*Eco*RI-*Bgl*I切断断片とともに、Figure 6-1に示したのと同様にpLGT2の対応する領域に組み込み、二重変異プラスミドを構築した。変異蛋白産生を確認し (data not shown)、薬剤耐性レベルを測定した

(Table 6-4)。

Table 6-4. Tetracycline resistance levels of *E. coli* W3104 cells harboring the Ala220/Asp285 substitution mutant plasmids.

Plasmid	TetA	MIC of tetracycline ($\mu\text{g/ml}$)
None	None	0.8
pLGT2	Wild-type	200
pLGD285K	Asp285→Lys	9.5
pLGA220E/D285K	Ala220→Glu/Asp285→Lys	4.7
pLGA220D/D285K	Ala220→Asp/Asp285→Lys	3.1

Lys285単独変異体はわずかにテトラサイクリン耐性を与えることができるが、220位に酸性残基が導入されると耐性レベルは顕著に低下し、Asn285変異に対する効果とは著しく異なっていた。この結果はLys220単独変異体で示唆されたように、220位残基の酸性側鎖と285位残基の塩基性側鎖との間での相互作用が機能を傷害していると解釈され、両者が近傍に位置することを支持している。

第5節 Ala220周辺残基のGlu置換のAsp285→Asn変異への効果

これまでの結果より、Asn285変異を抑圧するためには220位への酸性残基の導入が必要であること、また、Glu220変異の方がAsp220変異よりも抑圧効果が強いこと、カルボキシル基が285位から220位へと移ることで K_m 値が大きく上昇することから、基質透過のための活性中心は220位よりも285位に近いところに存在することが示唆された。このような別部位でのアミノ酸置換による抑圧は蛋白の柔軟性を示すものである。自然復帰変異体では塩基置換の頻度が限られている可能性があり、必ずしも機能を完全に回復する部位に変異が導入されない場合も考えられる。本節ではこの可能性を考慮し、220位以外に酸性残基が導入されてAsn285変異を抑圧し、テトラサイクリン耐性を回復させる部位があるのかどうかを検討した。第二変異を導入する部位としては220位が存在する第7膜貫通領域に注目し、その前後数残基を選び、Glu置換を導入した (Figure 6-3)。また、細胞質膜内在性蛋白の膜貫通領域は α ヘリックスを形成しているとされており、Asp285残基の1ターン下方のPhe289残基をAspに置換し、Asn285変異に対する効果も検討した。変異導入はKunkel法に従い、Table 6-5に示した合成オリゴヌクレオチドを用いた。このうち、Ile216→Glu変異、Gln221→Glu変異の導入にはpCTD285Nを鋳型とし、それ以外にはpRVBHD285Nを鋳型として用いた。Asn285変異を含む二重変異プラスミド、単独変異プラスミドはFigure 6-1に示したのと同様に構築した。

Table 6-5. Mutagenic primers used for the site-directed mutagenesis.

Asterisks (*) and underlines indicate mismatches and new restriction sites, respectively. Nucleotide sequences of primers correspond to the complementary sequence of the *tetA* gene.

Primer	Nucleotide sequence	Codon change	Amino acid substitution
L213ER	5' -AAATAAT <u>GAGCTCAAT</u> GGGC-3' <i>SacI</i>	TTG→GAG	Leu→Glu
I216ER	5' -TGAAAAGTACTCAATCAACA-3' <i>ScaI</i>	ATT→GAG	Ile→Glu
Y217ER	5' -GAAAATTCATGATCAA-3' <i>BclI</i>	TAT→GAA	Tyr→Glu
F218ER	5' -GCGCTGATTCATAAATA-3' <i>HinfI</i>	TTT→GAA	Phe→Glu
S219ER	5' -CAATTGCGCTTCGAAATAAATAAT-3' <i>Csp45I</i>	TCA→GAA	Ser→Glu
Q221ER	5' -TATCAATT <u>CAGCTG</u> AAAA-3' <i>PvuII</i>	CAA→GAA	Gln→Glu
L222ER	5' -TTGGCCAATCTCTTGGGCTGAA-3' <u><i>BstXI</i></u> <i>MscI</i>	TTG→GAG	Leu→Glu
I223ER	5' -GAATTTGGCCCTCGAGTTGCGCTGA-3' <i>XhoI, AvaI</i>	ATA→GAG	Ile→Glu
G224ER	5' -GGGAATTTGTTCTATCAATTGC-3' <i>XmnI</i>	GGC→GAA	Gly→Glu
G224DR	5' -AATTTGATCGATTAATTGCG-3' <i>Clal</i> _____ <i>AseI</i>	GGC→GAT	Gly→Asp
P227ER	5' -CGTTGCTTCAATTTGGCCAATCAAT-3' <i>MscI</i>	CCC→GAA	Pro→Glu
F289DR	5' -CTAAAAATGCATCTGCACT-3' <i>EcoT22I</i>	TTT→GAT	Phe→Asp

構築したプラスミドで大腸菌W3104株を形質転換し、変異蛋白の産生を確認し (data not shown)、テトラサイクリン耐性レベルを測定した (Table 6-6)。

Table 6-6. Tetracycline resistance levels of *E. coli* W3104 cells harboring mutant plasmids.

MICs of tetracycline are shown in a unit of $\mu\text{g/ml}$. MIC for W3104 cells is $0.8 \mu\text{g/ml}$. N.C. means that mutant was not constructed.

Helix 7 mutation	Asp285 mutation	
	Asp285→Asn	None (Asp285)
None	0.8	200
Leu213→Glu	0.8	50
Ile216→Glu	0.8	50
Tyr217→Glu	0.8	100
Phe218→Glu	0.8	100
Ser219→Glu	0.8	100
Ala220→Glu	200	100
Ala220→Asp	50	50
Gln221→Glu	0.8	100
Leu222→Glu	0.8	25
Ile223→Glu	0.8	100
Gly224→Glu	12.5	25
Gly224→Asp	12.5	100
Pro227→Glu	3.1	3.1
Phe289→Asp	0.8	N.C.

Glu220/Asn285二重変異体、Asp220/Asn285二重変異体以外、構築された二重変異体の中でAsn285単独変異体よりも耐性レベルが上昇しているのは、Glu224/Asn285二重変異体、Asp224/Asn285二重変異体、Glu227/Asn285二重変異体の3種のみであったが、224位の置換ではMICが $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、227位の置換では $3.1 \mu\text{g/ml}$ と回復の程度は弱いものであった。Asn285変異を抑圧することのできるこれら3つの変異部位の位置関係を見るために、Figure 6-4で第7膜貫通領域のエドマンドソンホイールプロット(355)を描くと、3部位が α ヘリックスの同一側面上に存在することが明らかにされた。また、抑圧効果の程度が220位から224位、227位へと離れるに従って弱くなることも明らかである。この結果は膜貫通領域が α ヘリックス構造を形成していることを確認するとともに、活性中心を構成する上で、第7膜貫通領域上のカルボキシル基の導入にはある程度の柔軟性があることが示された。他方、220位上流側の残基の中で、Ile216とLeu213が同一側面上にあるが、それらの部位のGlu変異はAsn285変異を抑圧することができなかった (Table 6-6)。この結果は機能に必要なカルボキシル基は適度な深さに位置しないと機能を発揮することができないと解釈される。

一方、第9膜貫通領域においては、285位の1ターン下方に位置するPhe289残基をAspに置換しても、Asn285変異体の耐性レベルを上昇させることができず、第7膜貫通領域の場合とは異なって厳密にカルボキシル基が配置される必要があることを示している。このことは、活性中心が220位よりも285位

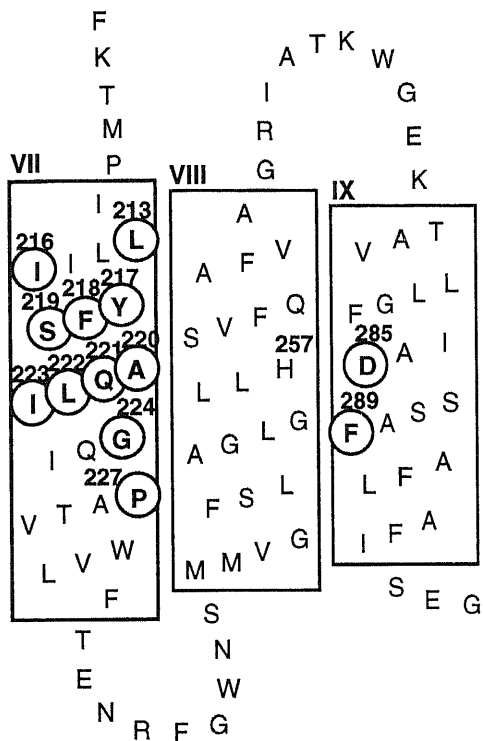


Figure 6-3. Putative secondary structure around transmembrane domains VII, VIII and IX of Tn10-TetA. Amino acid residues which underwent second site mutations in this study are enclosed in circles, with position numbers in the primary sequence. The primary mutation residue, Asp285, is also enclosed in a circle.

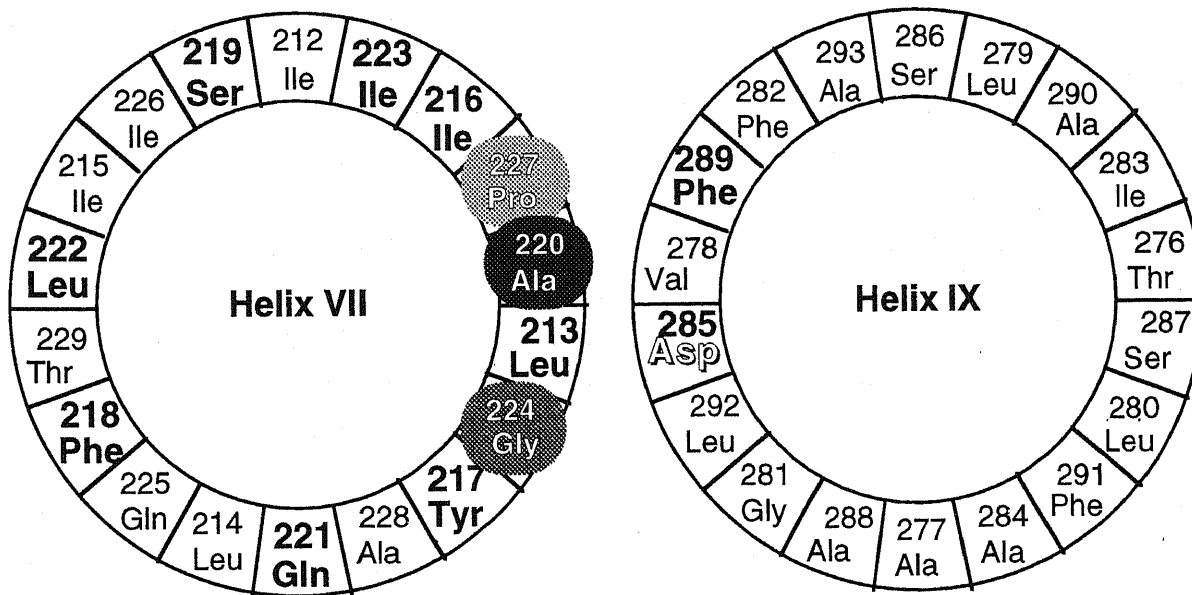


Figure 6-4. Edmundson wheel projection maps of putative transmembrane domains VII and IX. The respective transmembrane helices were viewed vertically from the cytoplasmic surfaces. The residues of which Glu mutants showed any suppression to the Asp285→Asn mutant are denoted by outlined letters with shadowed circles. Other residues where the Glu mutation was introduced are denoted by bold letters.

の近傍に位置するという考えとよく一致している。

耐性が回復した224位、227位変異を含む3種の二重変異体について反転膜小胞でのテトラサイクリン輸送活性の測定を試みたが、有意の輸送活性は観察されなかった (data not shown)。Glu220/Asn285二重変異体、Asp220/Asn285二重変異体の K_m 値が顕著に上昇していたことを考慮すると、3種の二重変異体においても更なる K_m 値の上昇が起こっていることが予想され、そのために輸送活性が観察されないのかもしれない。

第7膜貫通領域のGlu単独変異体はGlu227変異体を除いて比較的高いテトラサイクリン耐性を与えており (Table 6-6)、新たなカルボキシル基の導入が機能および蛋白構造に致命的な影響を与えていないことを示している。また、これらの部位のアミノ酸残基は機能に必須でないとも言える。Glu227変異体はMICが $3.1 \mu\text{g/ml}$ とわずかな耐性しか与えることができない。227位はもともとPro残基が占めており、蛋白の構造維持に寄与していた可能性があるため、この部位の置換は蛋白構造の変化を介して機能を大きく傷害するのかもしれない。

第6節 考察

本章ではまず、テトラサイクリン耐性を全く与えないAsp285→Asn変異体より野生型レベルの耐性を与えることができる自然復帰変異体を単離した。この変異体はAsn285変異をそのままちながら、第7膜貫通領域のAla220残基がGluに置換されていた。推定二次構造において、285位、220位は膜内のほぼ同じ深さのところと位置すると考えられ、両者は立体構造において極近傍に位置することが示唆された。また、得られた抑圧変異体は酸性残基の消失を新たな酸性残基の出現で機能回復を起こすタイプであり、膜貫通領域の酸性側鎖が機能に必須であることを裏付けるものである。このような抑圧変異体は、大腸菌 F_0F_1 -ATPaseの H^+ 輸送に関与するcサブユニットの変異体(322)、ウシのロドプシンのシッフ塩基対イオンの変異体(356,357)、*Rhodobacter sphaeroides*の光合成反応中心の H^+ 輸送に関与する残基の変異体(340)、大腸菌メリビオース輸送体の共役イオン認識に関与する残基の変異体(319)からも得られている。

220位残基を部位特異的に置換したところ、中性のGln、塩基性のLysはAsn285変異に対して抑圧効果をほとんど示さず、酸性側鎖をもつGlu、Aspでのみ大きな抑圧効果が認められた (Table 6-2)。従って、Asn285変異を抑圧するためには酸性側鎖が必要であると結論される。また、酸性側鎖の位置特異性に関して検討したところ、220位以外に224位、227位にGluあるいはAspが導入されてもAsn285変異が抑圧されることが明らかになった (Table 6-6)。224位、227位は α ヘリックス構造で220位と同一側面上に位置し (Figure 6-4)、それぞれ220位の1ターン、2ターン下方に存在する残基である (Figure 6-3)。このような縦方向の柔軟性はロドプシンにおいても見いだされている(358,359)。すなわち、レチナル分子とシッフ塩基を形成するLys296残基の対イオンとなっているGlu113残基をGlnに置換した変異体をもとに、それぞれ α ヘリックスの1ターン、2ターン離れた117位、120位にGluが導入されると機能回復が起こるといえるものである。

本研究の結果は、220位、224位、227位の3部位を含む側面が、第9膜貫通領域のAsp285残基を含む側面とともに、基質輸送経路を構成する領域であることを示唆している。最近、Guayらは、TetA(B)のTrp231残基のCys変異体が第10章に述べるグリシルサイクリンに対して耐性化することから、Trp231残基が基質認識に関与する残基であることを報告した(358)。Trp231残基は第7膜貫通領域に存在し、しかも220位、224位、227位と同一側面上に存在する残基である (Figure 6-3) ることは興味深く、この側面の重要性を支持している。また、Glu220変異の方がAsp220変異よりも大きな抑圧効果を持つこと、カ

ルボキシル基の導入に関して第7膜貫通領域の方が第9膜貫通領域よりも柔軟性をもつことから、基質輸送にかかわる活性中心は第9膜貫通領域により近いところにあることが示唆される。また、反転膜小胞において、Lys220単独変異体のテトラサイクリン輸送活性が観察されなかったこと (Figure 6-2)、また、Glu220変異およびAsp220変異がLys285変異を抑圧できなかったこと (Table 6-4) は、両部位間でのイオン性の相互作用が機能を障害していることを示し、220位と285位とが立体構造上近傍に位置することを支持している。

ところで、220位など膜貫通領域への余分な荷電アミノ酸の導入は、意外にも、比較的高いテトラサイクリン耐性を維持しており (Table 6-2, 6-6)、蛋白のフォールディングに大きな影響を与えていないことを示している。TetAでのこのような現象とは対照的に、大腸菌のラクトース輸送体では膜貫通領域の荷電アミノ酸残基が蛋白のフォールディングに重要な寄与をしている。ラクトース輸送体の抑圧変異体の解析から、膜貫通領域内の幾つかの正荷電残基と負荷電残基とがイオンペアを形成していることが示唆され (263, 264, 267)、部位特異変異導入解析により確認されている (265, 266, 268)。この場合、イオンペアを形成している一方の電荷を中性にすると機能が著しく傷害されるが、両方を中性にすると機能が回復する現象が観察されている。ラクトース輸送体ではこのような膜貫通領域でのイオンペアの形成と解離がゲートの開閉となっていると主張している (267)。また、大腸菌メリビオース輸送体でも余計な荷電アミノ酸残基の存在は機能障害の原因となっているようである (319)。メリビオース輸送体の膜貫通領域に存在するAsp51残基は共役イオン結合に重要とされている。Asp51残基をSerに置換した変異体からメリビオース輸送を回復した抑圧変異体を分離したところ、Ser51変異以外にGly113→Asp変異が見いだされた。負電荷の消失が新たな負電荷の導入により補われる点でTetAのAsn285変異体の場合と一致するが、単独にAsp113変異を導入した変異体は活性が全くなく、大きく異なる点である。

TetAにはAsp285残基の他に更に2つの保存性Asp残基が存在する (35, 51)。それは第1膜貫通領域のAsp15残基と第3膜貫通領域のAsp84残基であり、これらも基質輸送に重要であることが示されている (51, 353)。また、TetAを2つの領域、それぞれ6本の膜貫通領域を含む α 領域と β 領域とに分けたとき、Asp84残基とAsp285残基が対応する部位にあり、Asp15残基とAla220残基が対応する部位にあることは興味深い (Figure 3)。tandem duplication説 (40) を支持する、このような対照性は他にも観察され、特に顕著であるのは、第2章に述べた保存性配列モチーフの存在である (44)。また、第8膜貫通領域と第9膜貫通領域のアミノ酸残基で構成されるカルテット、His257-X-X-X-Gln261/Gly281-X-X-X-Asp285は第2膜貫通領域と第3膜貫通領域にも見られ、Tyr50-X-X-X-Gln54/Gly80-X-X-X-Asp84と表され、TetAに保存され、その重要性も示されている (64)。このような結果から、現在少なくとも第1～3膜貫通領域と第7～9膜貫通領域が基質輸送経路 (チャンネル) を構成していると考えられている。また、第5章においてループ4-5のAsp120残基、Arg127残基がゲートの開閉に寄与している可能性が考えられ、更にはArg101残基という極めて重要な残基が第4膜貫通領域に存在することが示され (195, 345)、第4および第5膜貫通領域も基質輸送チャンネルに関わっている可能性も考えられている。

第2章から本章までの結果 (279, 344, 347, 359, 360) および当研究室での研究結果 (49, 51, 52, 64, 231-233, 275) をもとに、テトラサイクリン/H⁺アンチポートの分子機構に関してゲート付きチャンネルによる直接共役説を提唱する (Figure 6-5)。このモデルでは、上で述べた膜貫通領域がひとつのチャンネルを形成し、膜の両側にループ領域により構成されるゲートをもっている。細胞質側ではループ2-3、ループ4-5およびループ8-9がゲート機能を持っていると考えられる。正味1価カチオンの基質とH⁺のチャンネル内の結合部位は重複し、それらの結合は互いに拮抗している。基質がループ2-3のAsp66残基の負電荷と相互作用すると、細胞質側ゲートが開く。このとき、ループ2-3のArg70残基の正電荷とループ4-5のAsp120残基の負電荷が相互作用している。基質がチャンネル内の結合部位に結合するのに呼応して、そこに結合していたH⁺が放出される。ここで、ループ2-3内でAsp66残基とArg70残基とが相互作用し、ループ4-5

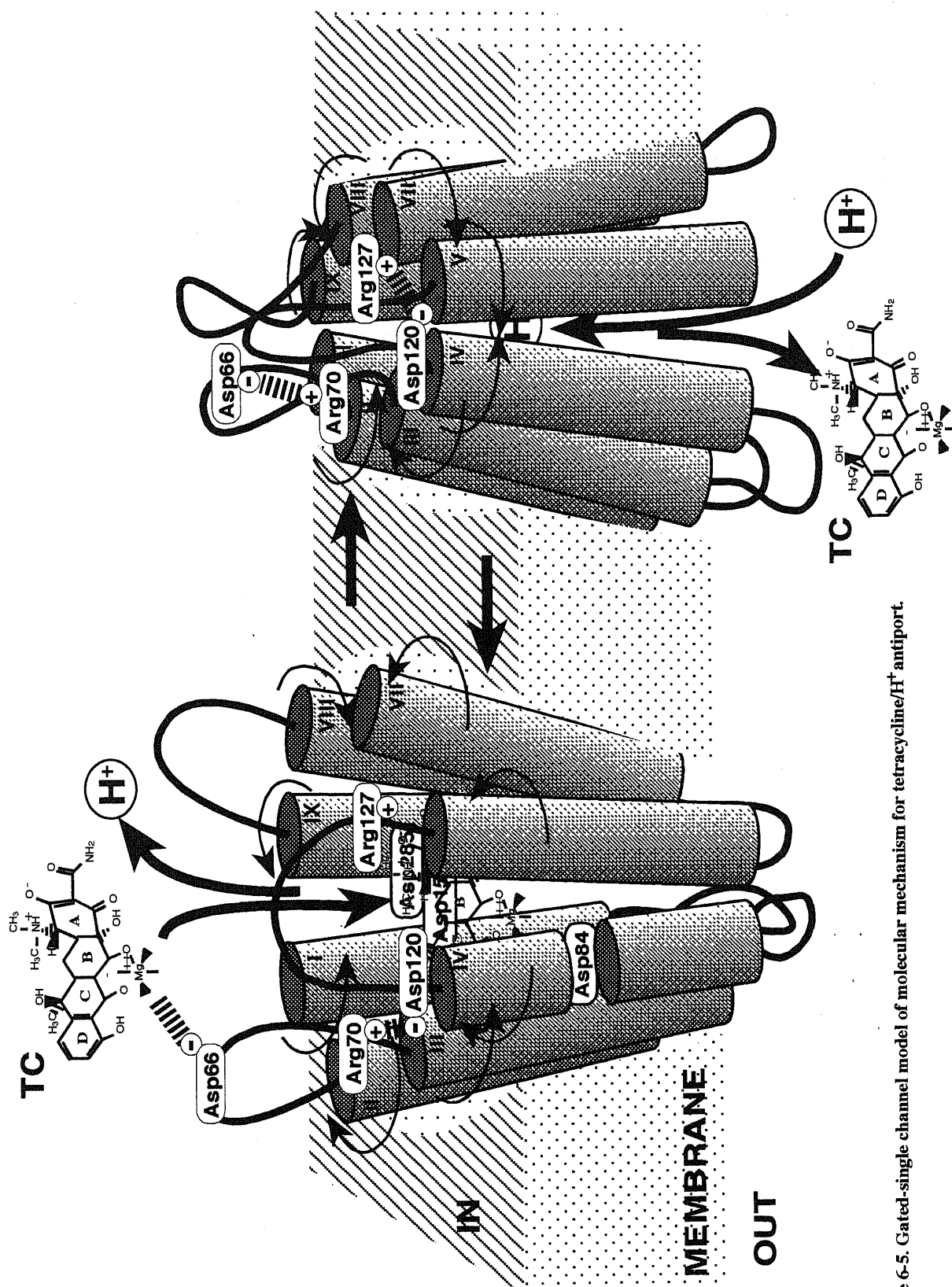


Figure 6-5. Gated-single channel model of molecular mechanism for tetracycline/ H^+ antiport.

内でAsp120残基とArg127残基が相互作用して、細胞質側ゲートが閉じるようにコンフォメーション変化が生じ、ペリプラズム側ゲートが開くようになる。ペリプラズム側は細胞質側よりも酸性であるので、 H^+ が結合部位に結合しようとして、それに呼応して基質が放出される。 H^+ の結合は細胞質側ゲートが開いたコンフォメーションに変化させるのに十分であると思われる。

このモデルはシンポーターにも適応できると考える。アンチポーターでは基質と H^+ との結合が拮抗的であるのに対し、シンポーターでは協調的であると考えられる。つまり、 H^+ の結合は基質の結合を促し、コンフォメーション変化が起こる。次いで、基質および H^+ が放出されると、再びコンフォメーション変化が起こり、もとの状態に戻る、というものである。

しかしながら、このようなモデルや各膜貫通領域の並び方、アミノ酸残基間の位置関係を証明するためには、蛋白の3次元立体構造を解明する必要がある。膜蛋白質は強い疎水性故に3次元結晶を形成しにくく、現在までにX線結晶構造解析された膜内在性蛋白質は数例しかない。つい最近になって、2次元結晶の電子顕微鏡画像解析が進んできたものの、原子レベルでの詳細な構造は明らかになっていない。このような状況の中、膜蛋白質の立体構造解析は現在最も魅力的な研究課題であるといってもよい。次章以降でTetAの立体構造解析を押し進めるべく、その大量発現系、精製系の確立を試みることにする。

第1節 はじめに

前章までは、部位特異的変異導入法を用いてTetAの幾つかのアミノ酸残基を置換し、その結果からもともとのアミノ酸残基が基質輸送機構においてどのような役割を担っているのか、アミノ酸残基がどのように配置されているのか、また、分子レベルでどのように基質が輸送され、どのようにしてイオンとの共役が達成されているのかを推定してきた。このような推定は実際の立体構造が解明されるまでは証明されたとは言えない。可溶性酵素においては比較的容易にX線結晶構造解析により3次元立体構造が解明され、多くの情報が得られている。しかし、膜内在性の蛋白は未だ数例しか立体構造が解明されていない。その最初の例が紅色光合成細菌*Rhodospseudomonas viridis*の光合成反応中心複合体であり、1985年にX線結晶解析により3Åの解像度の立体構造が報告された(361)。その後は、1992年に大腸菌ポリン(OmpF、PhoE)がそれぞれ2.4、3Åの解像度で(362)、1993年に*Synechococcus*の光合成反応中心複合体Iが6Åの解像度で(363)、1995年に*Rhodospseudomonas acidophila*の集光性アンテナ複合体IIが2.5Åの解像度で(364)、ウシミトコンドリアのチトクロームc酸化酵素(365)および*Paracoccus denitrificans*のチトクロームc酸化酵素(366)がいずれも2.8Åの解像度でX線結晶解析により立体構造が解かれているのみである。また、ウシミトコンドリアのF₀F₁-ATPaseの膜表在性部分(F₁)を構成する $\alpha\beta\gamma$ 複合体の立体構造も1994年にX線結晶解析により2.8Åの解像度で解かれ注目された(367)。X線結晶構造解析は蛋白の3次元結晶を必要とするが、2次元結晶を用いた電子顕微鏡画像解析から3次元構造を再構成する試みが幾つかの膜蛋白について行われている。高度好塩菌*Halobacterium halobium*のバクテリオロドプシンがその最初の例で、1990年に詳細な3次元構造が提出された(368)。以後、1993年に筋小胞体のCa²⁺-ATPase(369)、ウシのロドプシン(370)、ホウレン草クロロプラストの光合成反応中心複合体II(371)、1995年に*Rhodospirillum rubrum*の集光性アンテナ複合体Iの構造(372)が提出されている。このような状況の中、膜蛋白質の、とりわけ膜輸送蛋白の3次元結晶化、X線結晶構造解析は現在最も注目されている。

本章ではTetAの結晶化、構造解析を行うべく、その前段階を整える。まず、TetAの大量産生系を準備し、機能を保持したまま迅速且つ大量に精製する系を確立することを試みた。

第2節 テトラサイクリン排出蛋白の大量発現系の構築

トランスポゾンTn10にコードされるクラスBのテトラサイクリン排出蛋白遺伝子*tetA*は負の遺伝子量効果、すなわち、マルチコピープラスミド上にTn10-*tet*遺伝子をクローニングすると、宿主菌のテトラサイクリン耐性レベルがローコピープラスミドの場合よりも著しく低下する現象が知られている(66-69)。負の遺伝子量効果は他のグラム陰性細菌の*te*遺伝子では知られていない(161)。この効果はTetAの過剰産生が原因であり、このとき膜電位が消失すると言われている(69)。Tn10-TetAを大量に発現する系を確立する試みが幾つかなされているが、負の遺伝子量効果が障壁となっているために、これまで安定な大量発現系は知られていない。

本節ではTn10-TetAの安定な大量発現系の構築を目指した。マルチコピークローニングベクターpUC118は*lac*プロモーター・オペレーターをもち、その支配下の*lacZ*遺伝子上流にマルチクローニングサ

イトがある。pCT1182(51)はTn10-*tet*遺伝子をpUC118のマルチクローニングサイトにサブクローニングしたものである。TetA大量発現系の構築はこのpCT1182を出発材料とした (Figure 7-1)。pCT1182はベクター由来の*lac*プロモーターを保持しており、マルチクローニングサイトのEcoRI切断部位が残っていることに着目した。*tetA*遺伝子中央にはEcoRI切断部位があるので、まずこれをサイレント変異により消去し、次いでTetAのN末端側にEcoRI切断部位をサイレント変異により導入することにした。これらの変異導入はpCT1182を鋳型として、Table 7-1に示す合成オリゴヌクレオチドを用い、Kunkel法により行った。

Table 7-1. Mutagenic primers used for construction of a TetA overproducing plasmid.

Nucleotide sequences of primers correspond to the complementary sequence of the *tetA* gene. Asterisks (*) and underlines indicate mismatches and the EcoRI restriction sites introduced or deleted, respectively. With EGR, the site was introduced, and with EDR, the site deleted. Any codon changes do not lead to amino acid substitution.

Primer	Nucleotide sequence	Codon change
	**	
EGR	5' -TTT <u>GTCGAAGAATTC</u> ATTTTC-3' EcoRI	AGT→TCT for Ser3
	*	
EDR	5' -GTATACCGAGTT <u>CGATTGC</u> -3' (EcoRI)	AAT→AAC for Asn200

EGRとEDRとを用いて作成されたプラスミドをpCT1184とした。次に、pCT1184をEcoRIで消化して調製されたベクター断片をセルフライゲーションさせることにより、*tetA*と*lacZ*がin frameで融合した遺伝子を作成することができた。このプラスミドをpSYTETとした。このプラスミドから、TetAはLacZ (β -ガラクトシダーゼ)の開始コドンから翻訳されることになり、その結果TetAのN末端に β -ガラクトシダーゼの4アミノ酸残基 (Thr-Met-Ile-Thr) が挿入されたかたちになっていることが塩基配列から推定される (Figure 7-2)。

構築されたpSYTETで大腸菌W3104株を形質転換したところ、数時間後に溶菌が認められた (data not shown)。これは*lac*プロモーターの誘導剤であるIPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を添加しなくても起こるので、*lac*プロモーターからのbasalな転写でもTetAが大量に発現し、致死的效果を与えていることが示唆される。通常ラクトースオペロンの発現は*lacI*プレッサーが*lac*プロモーターに重複するオペレーター領域に結合しているのが抑制されている(373)が、W3104株の染色体由来の*lacI*プレッサーではマルチコピープラスミド上の*lac*プロモーターを十分に抑制できていないと考えられる。そこで、*lacI*プレッサー過剰産生変異株を用いることを試みた。W3104株では*lacI*プレッサーの発現は誘導性であるが、RB791株は遺伝子型として*lacIq*をもち、構成的に*lacI*プレッサーを発現する変異株である。RB791株をpSYTETで形質転換したところ、溶菌は見られず、正常なコロニーを形成した。

pSYTETからのTetAの産生を確認するため、RB791/pSYTET株より反転膜小胞を調製した。遺伝子発現は終濃度0.1mMのIPTGを添加し、誘導した。また同時に、RB791株およびRB791/pLGT2株の反転膜小胞も調製した。なお、pLGT2からの発現は終濃度0.25 μ g/mlのHCTC (heat-inactivated chlortetracycline) で誘導された。10 μ gの蛋白を含む反転膜小胞をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に用い、ゲルをクマジーブリリアントブルーで染色した (Figure 7-3)。その結果、RB791/pSYTET株由来の反転膜小胞には35kDa付近に明瞭な太いバンドが認められた。このバンドに対応するものはRB791株の反転膜小胞には全く認められず、RB791/pLGT2株の反転膜小胞ではわずかししか認められなかった。また、C末端特異抗体を用いたイムノブロットイングにより、この35kDa付近の太いバンドがTetAであることが確認され

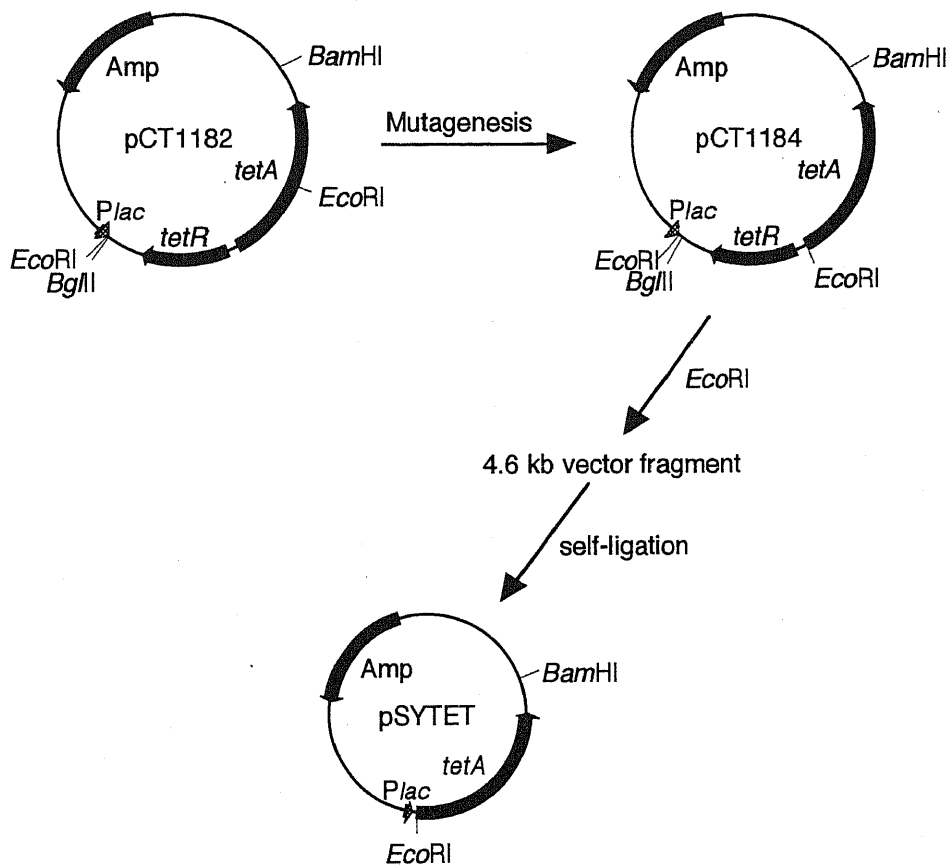


Figure 7-1. Construction of a plasmid carrying the *tetA* gene under control of the *lac* promoter. The multicopy plasmid, pCT1182 (51), contains the entire *tetR* and *tetA* genes from the transposon Tn10. pCT1184 was constructed from pCT1182 by site-directed mutagenesis which moved the *Eco*RI site in the middle of the *tetA* gene to its 5' end. The 4.6 kb *Eco*RI fragment from pCT1184 was self-ligated. A resultant plasmid was designated as pSYTET in which the *tetA* gene was placed downstream of the *lac* promoter.

```

Plac on pUC118->
1 10 20 30 40 50 60 70 74
TTTACACTTTATGCTTCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAATTGTGAGCGGATAACAATAATTCACAGGAAACAGCT
-35 Promoter -10 [ Operator ]SD

lacZ-> / P tet->
75
pCT1182: ATGACCATGATTACGAAATTCAGATCTG-----TTGACACTCTATCATTTGATAGAGTTATTTTACCCTCCCTATCAGTGTGATAGAGAAAAGTGAATGAAATAGTTCGACG-----
EcoRI BglIII -35 [ 01 ] -10 [ 02 ]SD MetAsnSerSerThr-----

pCT1184: ATGACCATGATTACGAAATTCAGATCTG-----TTGACACTCTATCATTTGATAGAGTTATTTTACCCTCCCTATCAGTGTGATAGAGAAAAGTGAATGAAATTCCTTCGACG-----
EcoRI BglIII -35 [ 01 ] -10 [ 02 ]SD MetAsnSerSerThr-----

pSYTET: ATGACCATGATTACG/ <- deletion
EcoR I AsnSerSerThr-----
MetThrMetIleThr

```

Figure 7-2. Nucleotide sequences around the cloning sites of the *tet* genes on pUC118. pCT1182 is a multicopy plasmid containing the Tn10-*tetR* and *tetA* genes. pCT1184 was constructed from pCT1182 by site-directed mutagenesis. pSYTET was constructed from pCT1184 by a deletion of the small *EcoRI* fragment. O1 and O2 represent the tandem *tet* operators (29, see also Figure 2).

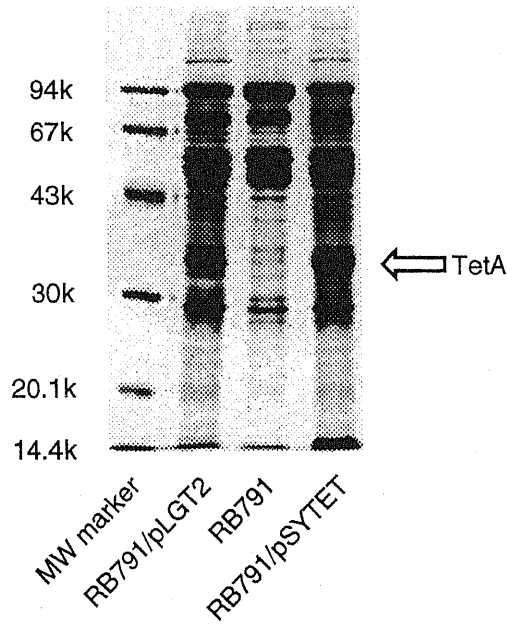


Figure 7-3. Overproduction of TetA in membranes from *E. coli* RB791 cells harboring pSYTET. Inverted membrane vesicles were prepared from RB791/pLGT2, RB791, and RB791/pSYTET, and 10 μ g of proteins were used for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The gel was stained with Coomassie brilliant blue.

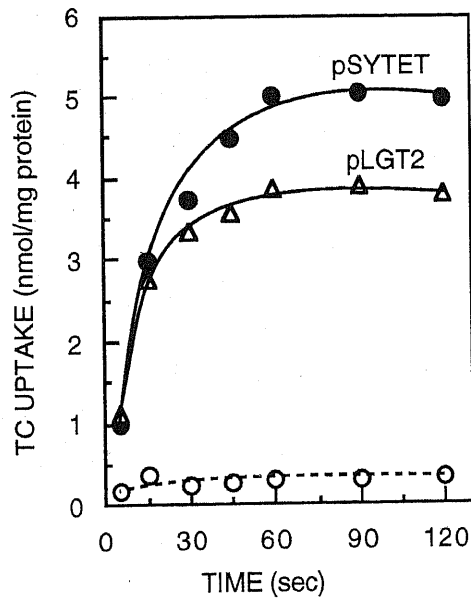


Figure 7-4. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from RB791/pSYTET cell and RB791/pLGT2 cells. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl_2 .

た (data not shown)。以上のように、TetAの大量発現が容易に観察されたのは本研究が初めてである。

次に、反転膜小胞へのテトラサイクリンの取り込みを測定した。Figure 7-4に示すようにpLGT2由来の反転膜小胞よりも高い輸送活性を示すが、蛋白の増加量に比べれば活性の上昇はわずかである。このような現象はLevyのグループによっても観察されており(374)、輸送担体が高密度に膜内にあるために輸送基質やH⁺の局所での濃度が、pLGT2由来の反転膜小胞の場合と比較して低下したためとも考えられる。

第3節 テトラサイクリン排出蛋白の可溶化、精製

疎水性の強い膜内在性蛋白質を精製するには、その第一段階として目的の蛋白を界面活性剤を用いて可溶化する必要がある。可溶化された蛋白は界面活性剤のミセルとして溶解しており、脂質二重層に存在しているときよりも不安定である。それ故、更なる精製過程は迅速に行う必要がある。そのためには可溶化する前までにある程度目的蛋白を濃縮することが望ましいと思われる。そのために、菌体をフレンチプレスで破碎した後、まず、膜画分をシヨ糖密度勾配遠心によって内膜と外膜とに分離した(218)。分画された内膜は表在性蛋白が含まれているので、これを除去するためEDTAを含む低イオン強度の緩衝液で処理し(219)、適当な緩衝液 (例えば、50mM MOPS-KOH (pH 7.0)、5mMチオグリセロール、10%グリセロール) に内膜を懸濁した。分画過程でのそれぞれの画分をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に用いた (Figure 7-5)。以上の処理によりTetAを失うことなく、内膜内在性蛋白のおよそ30%以上をTetAが占めるまで濃縮できた。なお、表在性蛋白除去には、5M尿素処理、あるいは強アルカリ性緩衝液 (50mM CAPS-KOH (pH 11.0)、0.1M塩化カリウム、10%グリセロール) 処理も有効であった (data not shown)。これらの処理でTetAは膜画分に回収されたので、大量発現したTetAはインクルージョンボディにはなっていないと考えられる。

精製過程をより少なくするためには可溶化以前の濃縮操作に加え、目的蛋白を選択的に可溶化することも重要である。TetAは終濃度1.25%のオクチルグルコシド (OG; n-octyl- β -D-glucopyranoside) でEDTA処理した内膜画分から比較的選択的に可溶化された (Figure 7-5)。その他、種々の界面活性剤を試みたところ、2% Triton X-100 (TX100)、2% ドデシルマルトシド (DM; n-dodecyl- β -D-maltopyranoside)、1.5% MEGA-9 (n-nonanoyl-N-methylglucamide)、1% MEGA-10 (n-decanoyl-N-methylglucamide)、2% ヘプチルチオグルコシド (HTG; n-heptyl- β -D-thiogluco-pyranoside) でも同様の効果が見られた。一方、オクチルチオグルコシド (OTG; n-octyl- β -D-thiogluco-pyranoside)、MEGA-8 (n-octanoyl-N-methylglucamide)、CHAPS、CHAPSOはTetAを可溶化できなかった (data not shown)。また、可溶化の際緩衝液に0.1Mの塩化カリウムが含まれているとTetAの可溶化は阻害される傾向にあった (data not shown)。

次に、精製法について検討した。膜輸送体の精製にはしばしばDEAE陰イオン交換体がいわれている (375-383)ので、TetAの精製にもDEAE陰イオン交換体があるのかどうかを検討することにした。イオン交換体はPharmaciaのDEAE-Sepharose CL-6Bを用いた。樹脂をBioRadのエコノカラム (1×10cm) に充填し (ベッド体積はおよそ7ml)、界面活性剤を含む50mMトリエタノールアミン-HCl緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した。このとき加えられる界面活性剤は上で述べたTetAの可溶化に有効であったもののうち幾つかを試し、それぞれの界面活性剤の臨界ミセル濃度 (CMC; critical micelle concentration) よりも幾分高い濃度で用いた (1% OG、0.1% TX100、0.1% DM、1% HTG)。1.25% OGで内膜を可溶化後、超遠心上清をカラムに添加し、界面活性剤を含む50mMトリエタノールアミン-HCl緩衝液 (pH 8.0) 約30mlで洗浄後、同緩衝液中0.5Mまでの塩化カリウムの直線塩濃度勾配により溶出させた。試された4種の界面活性剤のうち、0.1% TX100あるいは0.1% DMを用いた場合にTetAが他の蛋白とよく分離して溶出され、良好な結果を得た。Figure 7-5には0.1% TX100を含む50mMトリエタノールアミン-HCl緩衝液 (pH 8.0) で精

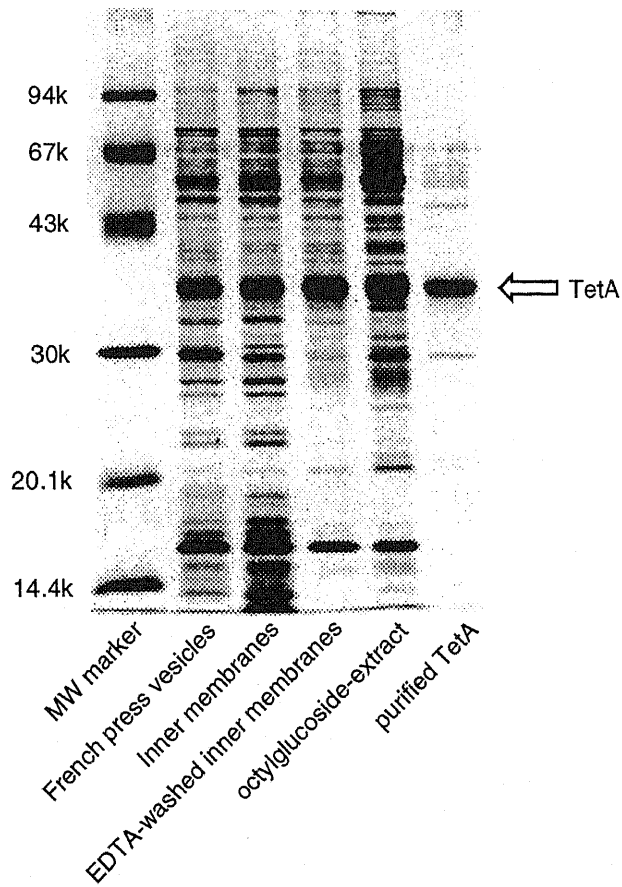


Figure 7-5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of various fractions prepared from *E. coli* RB791 cells harboring pSYTET. French press vesicles, inner membranes, EDTA-washed inner membranes, and 1.25 % octylglucoside-extract containing 50 μ g of proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Five μ g of purified TetA was used.

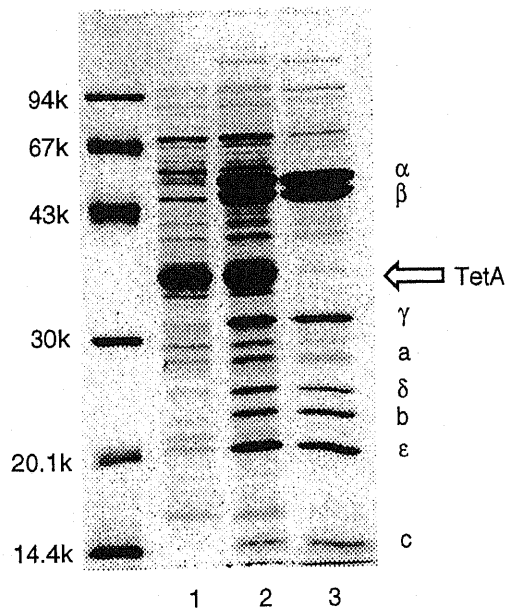


Figure 7-6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of reconstituted proteoliposomes. Lane 1, proteoliposomes reconstituted with 1.25 % octylglucoside-extract; lane 2, proteoliposomes reconstituted with 1.25 % octylglucoside-extract and purified F_0F_1 -ATPase; lane 3, proteoliposomes reconstituted with purified F_0F_1 -ATPase. Positions of the subunits of F_0F_1 are shown.

製されたTetAを示すが、かなりの純度で精製されていることがわかる。0.1% DMでもほぼ同様の結果であった (data not shown)。また、可溶化時の界面活性剤には影響されなかった (data not shown)。一方、OGあるいはHTGを含む緩衝液では蛋白の溶出がほとんど見られず、界面活性剤の濃度を上げてても同様であったので、カラム操作の過程で蛋白が非可逆的に凝集してしまったと考えられる。

以上のように、可溶化から一段階で純度の高い蛋白を得られたことはTetAの機能的な再構成にとって重要な利点である。次節では、TetAのリポソームへの再構成を検討した。

第4節 テトラサイクリン排出蛋白の大腸菌H⁺-ATPaseとのリポソームへの再構成

二次性能動輸送体の再構成では基質輸送のためのエネルギーをどのような形で供給するかが問題になる。機能的な再構成は、特定のエネルギーを添加せず濃度勾配に従った基質のダウンヒル輸送を測定するか、アンモニウムや酢酸の拡散による人工的なH⁺の濃度勾配か、K⁺とバリノマイシンによる人工的な膜電位を利用した基質の能動輸送を測定することで確認されている。TetAの場合、基質であるテトラサイクリンが若干疎水性であるため、脂質二重層を拡散して透過する性質を持っており(31)、ダウンヒル輸送を測定することが困難である。また、人工的なH⁺の濃度勾配では極めて一過性の輸送しか測定できず、これも再構成系へ適応するのは難しい(4)。TetAのテトラサイクリン輸送には膜電位は関与しない(5)ので、K⁺バリノマイシンの系も用いることができない。

以上は二次性能動輸送体単独でリポソームに再構成する方法であるが、イオンの濃度勾配を形成させる一次性能動輸送遺体をもとに再構成する方法もある。この場合、バクテリオロドプシンやH⁺-ATPaseが有効である。Moriyamaらは大腸菌H⁺-ATPase (F₀F₁-ATPase) の大量発現系を構築し、精製したF₀F₁-ATPaseをシナプス小胞の神経伝達物質輸送担体とともにリポソームに機能的に再構成することに成功した(206)。F₀F₁-ATPaseは正菌体とは逆向きにリポソームに挿入される(385)。神経伝達物質輸送担体はH⁺と伝達物質のアンチポーターであるので、ATP加水分解に依存した神経伝達物質のリポソーム内への取り込みが観察されることになる(206)。従って、この系はアンチポーターの再構成系として有用である。そこで、TetAの再構成にこの系を用いることにした。

まず初めに、OGによって可溶化された粗膜抽出物を精製F₀F₁-ATPaseとともにリポソームに再構成した。再構成の操作は第1章第3節に述べたように行った。Figure 7-6に再構成リポソームのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンを示すが、Figure 7-5の粗膜抽出物のパターンと比べて顕著に低分子量(16kDa付近)の夾雑物と高分子量(60kDaおよび70kDa)の夾雑物の量が減少し、結果的にTetAが濃縮されていた。簡便に機能的な再構成を確認するために蛍光消光法によりテトラサイクリンに依存したH⁺の輸送を観察した。Figure 7-7Aに示すようにATP添加により蛍光が消光し、H⁺がリポソームに取り込まれ、ΔpHが形成される。テトラサイクリンを加えると、蛍光強度が回復し、H⁺がリポソームの外に排出されたことを示している。テトラサイクリン依存のH⁺の排出は精製F₀F₁-ATPaseのみのリポソームでは観察されない (data not shown) ので、TetAによるテトラサイクリン/H⁺アンチポートを反映していると考えられる。このことを更に確認するために、Ser65→Cys変異体の大量発現プラスミド、pSYS65Cを構築し、野生型TetAと同様に可溶化し、リポソームに再構成した。このリポソームもテトラサイクリン依存のH⁺の排出が観察された (Figure 7-7C)。Ser65→Cys変異体はNEMによりテトラサイクリン輸送が阻害される(49)。そこで、この変異体を含むリポソームを予め1mMのNEMで処理したところ、テトラサイクリン依存のH⁺の排出がほぼ完全に消失していた (Figure 7-7D)。野生型TetAを含むリポソームはNEMの影響を全く受けない (Figure 7-7B) ので、ここで観察されたテトラサイクリン依存のH⁺の排出はTetAによるテトラサイクリン/H⁺アンチポートであることが確認された。

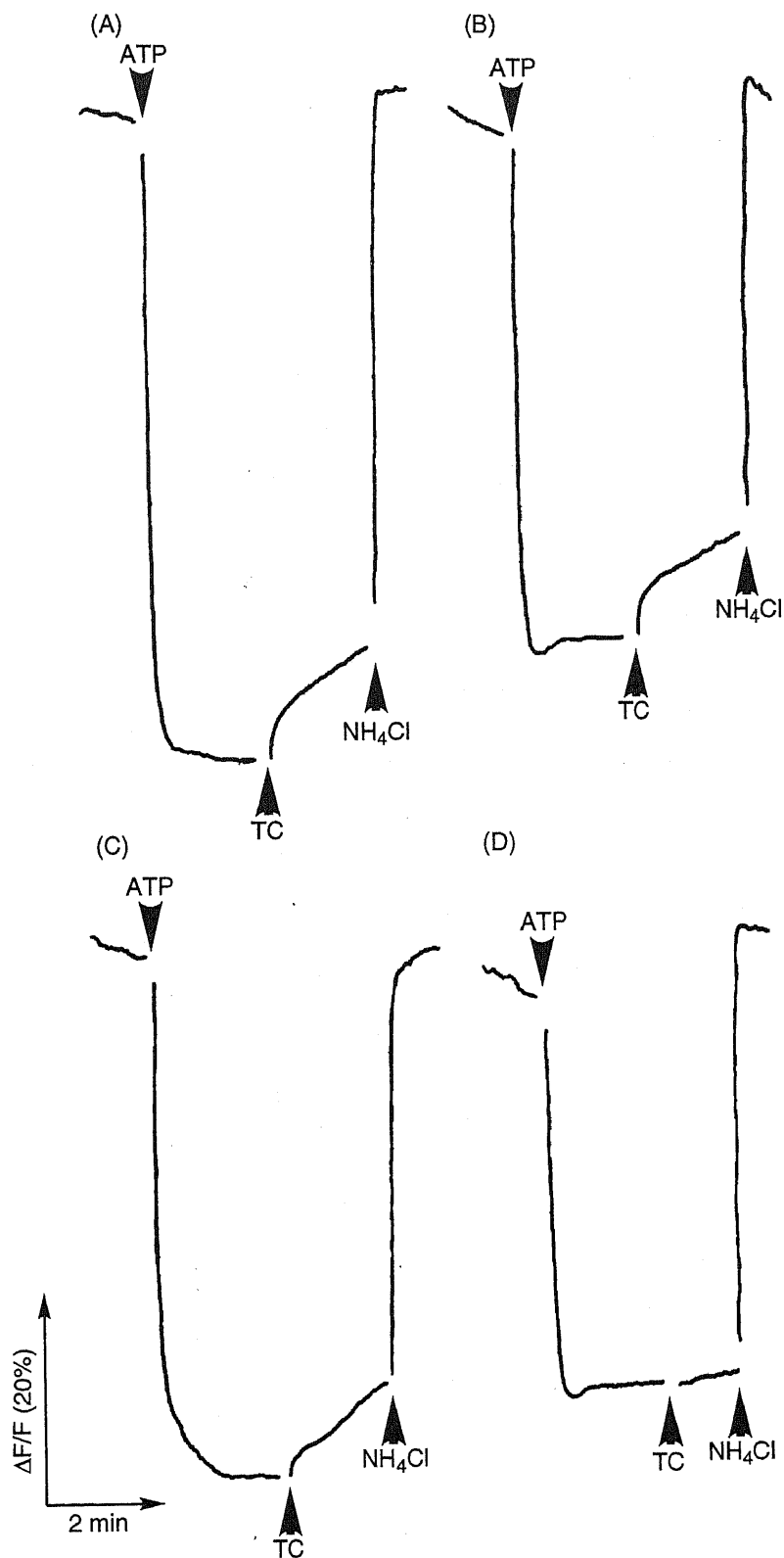


Figure 7-7. Tetracycline-dependent H^+ translocation in proteoliposomes reconstituted with the octylglucoside-extract of the inner membranes from RB791/pSYTET cells and purified F_0F_1 -ATPase. H^+ translocation was measured in the presence of 2 mM $MgCl_2$ by monitoring the change in fluorescence of acridine orange. 0.5 mM ATP, 20 μ M tetracycline (TC) and 2.5 mM NH_4Cl were added at the times indicated by arrows. (A) and (B), proteoliposomes containing the wild-type TetA. (C) and (D), proteoliposomes containing the Ser65→Cys mutant TetA. In (B) and (D), proteoliposomes were incubated with 1 mM *N*-ethylmaleimide for 2 min prior to addition of ATP.

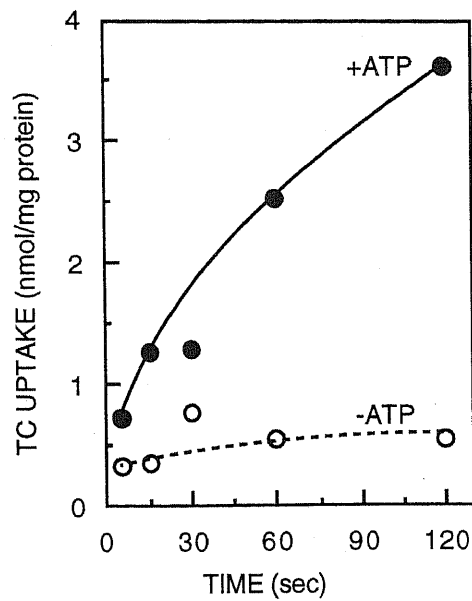


Figure 7-8. Tetracycline uptake by proteoliposomes reconstituted with the octylglucoside-extract of the inner membranes from RB791/pSYTET cells and purified F_0F_1 -ATPase. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 10 mM $MgCl_2$ with or without 10 mM ATP.

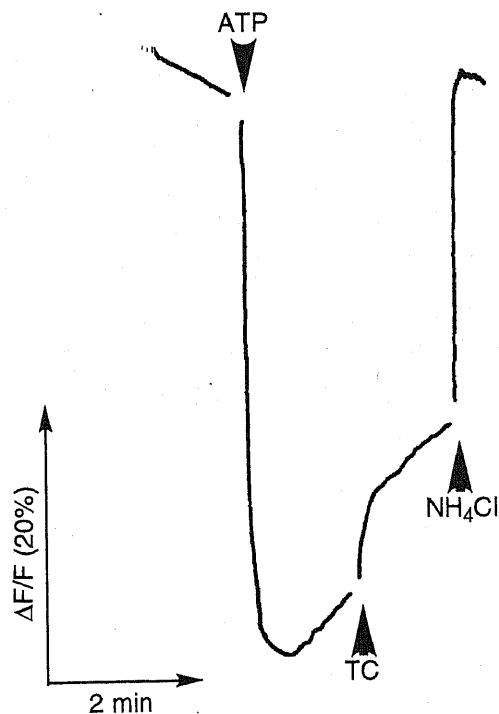


Figure 7-9. Tetracycline-dependent H^+ translocation in proteoliposomes reconstituted with purified TetA and purified F_0F_1 -ATPase. H^+ translocation was measured in the presence of 2 mM $MgCl_2$ by monitoring the change in fluorescence of acridine orange. 0.5 mM ATP, 20 μ M tetracycline (TC) and 2.5 mM NH_4Cl were added at the times indicated by arrows.

Figure 7-8は再構成リボソームによるテトラサイクリンの取り込みを示している。ATPを添加したときと添加しないときで比較したところ、ATP添加時に有意のテトラサイクリン取り込みが観察された。一方、ATPの代わりにNADHを加えた場合にはテトラサイクリン取り込みは全く見られなかった (data not shown) ので、ATP依存のテトラサイクリン取り込みはリボソームに組み込まれた機能的なTetAによることが確認された。

次に、DEAE陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製されたTetAを精製F₀F₁-ATPaseとともにリボソームに再構成した。Figure 7-9に示すように、テトラサイクリンに依存したH⁺輸送が観察され、精製TetAが機能を保持していることがわかる。精製蛋白の再構成は初めての成功例である。またこの結果によりTetAのみがテトラサイクリン輸送に関わる因子であることが確認された。

第5節 考察

これまで、TetAの再構成を試みた例が幾つか報告されている。HickmannらはTn10-TetAのC末端にコラーゲンリンカーを介してβ-ガラクトシダーゼを融合させた蛋白をλP_Lプロモーター支配下で大量発現させることを試みている(386)。融合蛋白はある程度大量発現し、抗β-ガラクトシダーゼ抗体を用いることでアフィニティ精製された。精製融合蛋白は更にコラーゲナーゼで処理され、TetA部分のみを単離し、リボソームへの再構成を行っているが、すでに活性を失っており、その試みは果たせなかった。また、最近、AldemaらがTn10-TetAのC末端にポリヒスチジンタグを融合させ、T7プロモーターから大量発現させている(374)。この融合蛋白はNi²⁺カラムで簡単に精製することができるという利点がある。精製された融合蛋白は1,3-cyclopentylthio-5-hydroxy-6-α-deoxytetracycline(387)を用いて基質結合能を保持していることは確認されたが、リボソームへの再構成は行われていない。

本研究ではTn10-tetA遺伝子をpUC118のlacプロモーター支配下に置き、lacリプレッサーを構成的に発現するlacIq変異大腸菌株を宿主とすることで、TetAを安定に大量発現する菌株を得ることができた。産生されるTetAはベクターのβ-ガラクトシダーゼの開始コドンから読まれることになるので、そのN末端にはβ-ガラクトシダーゼに由来する4アミノ酸残基(Thr-Met-Ile-Thr)が見かけ上挿入されていることになる(Figure 7-2)が、テトラサイクリン輸送活性には影響していないように見える(Figure 7-4)。

TetAの大量発現系を得たことは、TetAの精製を容易にするための重要な第一歩となった。まず、様々な界面活性剤を試したところ、TetAは1.25% OG、あるいは2% TX100、2% DM、1.5% MEGA-9、1% MEGA-10、2% HTGでよく可溶化された。TX100やDMはCMCが低いため、除去しにくい性質を持つので、OGを用いて可溶化した後の超遠心上清を精製F₀F₁-ATPaseとともにリボソームに再構成したところ、テトラサイクリン/H⁺アンチポートが観察された(Figure 7-7、7-8)。また、可溶化の際、大腸菌リン脂質を5mg/ml程度加えておく方が比較的高い輸送活性を保持したまま再構成ができた。TetAの精製はDEAE陰イオン交換クロマトグラフィーにより一段階で達成された(Figure 7-5)。一般に、膜蛋白質は脂質二重層から可溶化されると、ミセル中では不安定になるので、精製はより少ないステップで迅速に行う必要がある。本研究で開発されたTetAの精製法はその要求に合うものである。精製時の界面活性剤はTX100あるいはDMが最適であり、OG、HTGでは良好な分離が得られなかった。

機能的再構成には成功したものの、再構成リボソームで見られた輸送活性は反転膜小胞で観察される輸送活性に比較して、かなり低いものであった。また、通常発現系(pLGT2)からの反転膜小胞での輸送活性に比べ、大量発現系(pSYTET)からの反転膜小胞での輸送活性は、TetA発現量が著しく増加しているわりには上昇の程度が小さいものであった(Figure 7-4)。これらの結果に対して、TetAの大部分がインクルージョンボディを形成している可能性も考えられたが、内膜を5M尿素で処理してもTetAは

可溶化されなかったので、膜内在性のままであると結論された。反転膜小胞では、局所的な基質濃度や H^+ 濃度が蛋白に対して飽和してしまい、相対的に輸送活性が低くなってしまったとも考えられるが、可溶化、精製後の低い活性に対しては一部のTetAがその過程で失活したことが考えられる。この点、精製法に改良の余地を残している。いずれにせよ、TetAの大量発現から始まって、可溶化、精製、再構成の系を確立したことは本研究が初めてであり、今後の更なる改善のためにも重要な礎を築いたことになる。また、この系で迅速且つ大量にTetAを精製することができるので、3次元結晶化のための材料を提供するのにも好都合であると考えられる。

また、再構成系の確立は蛋白の構造と機能の物理化学的測定にも道を開くことになると考えられる。バクテリオロドプシンやロドプシンは膜蛋白質の中でも物理化学的研究が最も進んだ蛋白として知られ、NMR、ESR、FT-IR、共鳴ラマンといった分光学的解析がなされ、詳細な H^+ 輸送機構や光照射後の構造変化が解明されている(388-390)。二次性能動輸送体においてはまだこのような測定法は一般的ではないが、TetA蛋白の動的な変化の追跡に応用されることが期待される。

第8章 テトラサイクリン排出蛋白とジヒドロ葉酸還元酵素、 β -ラクタマーゼとの融合蛋白の作成、機能解析と精製

第1節 はじめに

第7章でも述べたように膜蛋白質の立体構造が3次元結晶のX線構造解析により明らかにされた例は少ない。構造が解明された蛋白の多くは複雑なサブユニット組成をもち、その中には疎水性の強い膜内在性成分ばかりでなく、膜表面でそれらと結合する親水性のサブユニットをもっていることに気付く。このことから、疎水性の膜内在性蛋白だけでは3次元結晶をつくりにくい、特異的に結合する親水性蛋白が存在することによって3次元結晶化が促されると考えられる。事実、Iwataらは*Paracoccus denitrificans*のチトクロームc酸化酵素の結晶を特異抗体のFv断片とともに作成しており(366)、蛋白の親水性部分を多くすることが結晶化を促進させていることを裏付けている。

TetAは単一のポリペプチド鎖からなり、その推定二次構造 (Figure 3) から親水性領域に露出した部分が少なく、非常に疎水性が強いことが伺える。従って、TetAの3次元結晶化は非常に困難であることが予想される。そこで、蛋白の疎水性を改善する手段として、本研究では親水性の酵素をTetAに融合することを試みることにした。可溶性酵素としては、3次元結晶構造が既知の、大腸菌染色体性のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) (391,392) およびプラスミド性のTEM1 β -ラクタマーゼ(393)を選び、それらの遺伝子をtetA遺伝子に融合し、融合蛋白の大量発現プラスミドを構築することを試みた。

第2節 融合蛋白大量発現系の構築

ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) については、TetAのN末端への融合蛋白 (DHFR-TetA) とTetAのC末端への融合蛋白 (TetA-DHFR) の2種類の発現系を、TEM1 β -ラクタマーゼについてはTetAのC末端への融合蛋白 (TetA- β -lactamase) の発現系を構築することにした。大腸菌染色体性のDHFR遺伝子 (*folA*) は、工業技術院の巖倉正寛博士より分与されたプラスミドpTP70-1(210,211)にコードされるものを用いた。TEM1 β -ラクタマーゼ遺伝子はクローニングベクターpUC118にコードされるものを用いた。融合遺伝子は主に適当な制限酵素切断部位を遺伝子両端に導入し、2つの遺伝子を連結させ作成した。制限酵素切断部位はKunkel法による部位特異的変異導入により導入した。この際、Table 8-1に示した合成オリゴヌクレオチドを用いた。

Table 8-1. Mutagenic primers used for construction of plasmids carrying fusion genes.

Asterisks (*) and underlines indicate mismatches and new restriction sites, respectively.

Primer	Nucleotide sequence	Note
pUCNdeIR	5' -TGGT <u>CATATG</u> TGTTTCCT-3' NdeI	Template: pUC118; NdeI overlaps ATG for <i>lacZ</i> .
pUCBgIIIR	5' -GAATT <u>CGAGATCT</u> GGGTCATA-3' BglII	Template: pUC118; <i>BglII</i> is introduced before <i>EcoRI</i> in multicloning site. N-terminal (MTMIT-) of <i>LacZ</i> is changed to MTQIS-.
pUCAorI264R	5' -GGT <u>GAGCGCT</u> AAACAGGA-3' Aor51HI	Template: pUC118; <i>Aor51HI</i> is introduced on the region corresponding to a signal sequence of β -lactamase. Phe(-2) is changed to Ser.
pUCSalI1074R	5' -ATATGAGT <u>CGACTT</u> GGTC-3' SalI	Template: pUC118; <i>SalI</i> is introduced behind the stop codon for β -lactamase.
AorI1258R	5' -AACTA <u>AGCGCT</u> TGTCTC-3' Aor51HI	Template: pCT1184; <i>Aor51HI</i> is introduced on the 3' end (codons for Ser400-Ala401) of the <i>tetA</i> gene. No amino acid changes.
DNdeI	5' -AGGA <u>ACTCATATG</u> ATCA-3' NdeI	Template: pDHA51; NdeI overlaps ATG for <i>folA</i> .
DAorI	5' -AGGAGGA <u>AGCGCT</u> ATGATCAG-3' Aor51HI	Template: pDHA51; <i>Aor51HI</i> is introduced before ATG for <i>folA</i> .

Figure 8-1は、DHFR-TetA融合蛋白遺伝子を*lac*プロモーター支配下にコードするプラスミド、pUFDTの構築方法を示している。簡単に述べると、

①pTP70-1はssDNAを調製することができないので、このプラスミドから*folA*遺伝子を含む*HindIII*-*Aor51HI*切断断片を調製し、pUC118の*HincII*-*HindIII*ベクターに挿入し、pDHA51を構築した。

②pDHA51を鋳型として、DNdeIプライマーを用いて変異導入を行い、DHFRの開始コドンに重複するNdeI切断部位をもつpDHA51Nを作成した。

③pUC118を鋳型として、pUCBgIIIRプライマーを用いて変異導入を行い、マルチクローニングサイトの*EcoRI*切断部位の前に*BglII*切断部位をもつpUC118Bgを作成した。このプラスミドでは*LacZ*のN末端がMet-Thr-Met-Ile-ThrからMet-Thr-Gln-Ile-Serに置換されている。

④pCT1184から*tetA*遺伝子を含む*EcoRI*-*BamHI*切断断片を調製し、pUC118Bgの*EcoRI*-*BamHI*ベクターに挿入し、pSYTETBgを構築した。

⑤pUC118を鋳型として、pUCNdeIRプライマーを用いて変異導入を行い、*LacZ*の開始コドンと重複するNdeI切断部位をもつpUC118Ndを作成した。

⑥pUC118NdのNdeI-*HindIII*ベクターに、pDHA51Nから調製されたNdeI-*BglII*切断断片とpSYTETBgから調製された*BglII*-*HindIII*切断断片とを挿入し、pUFDTを構築した。

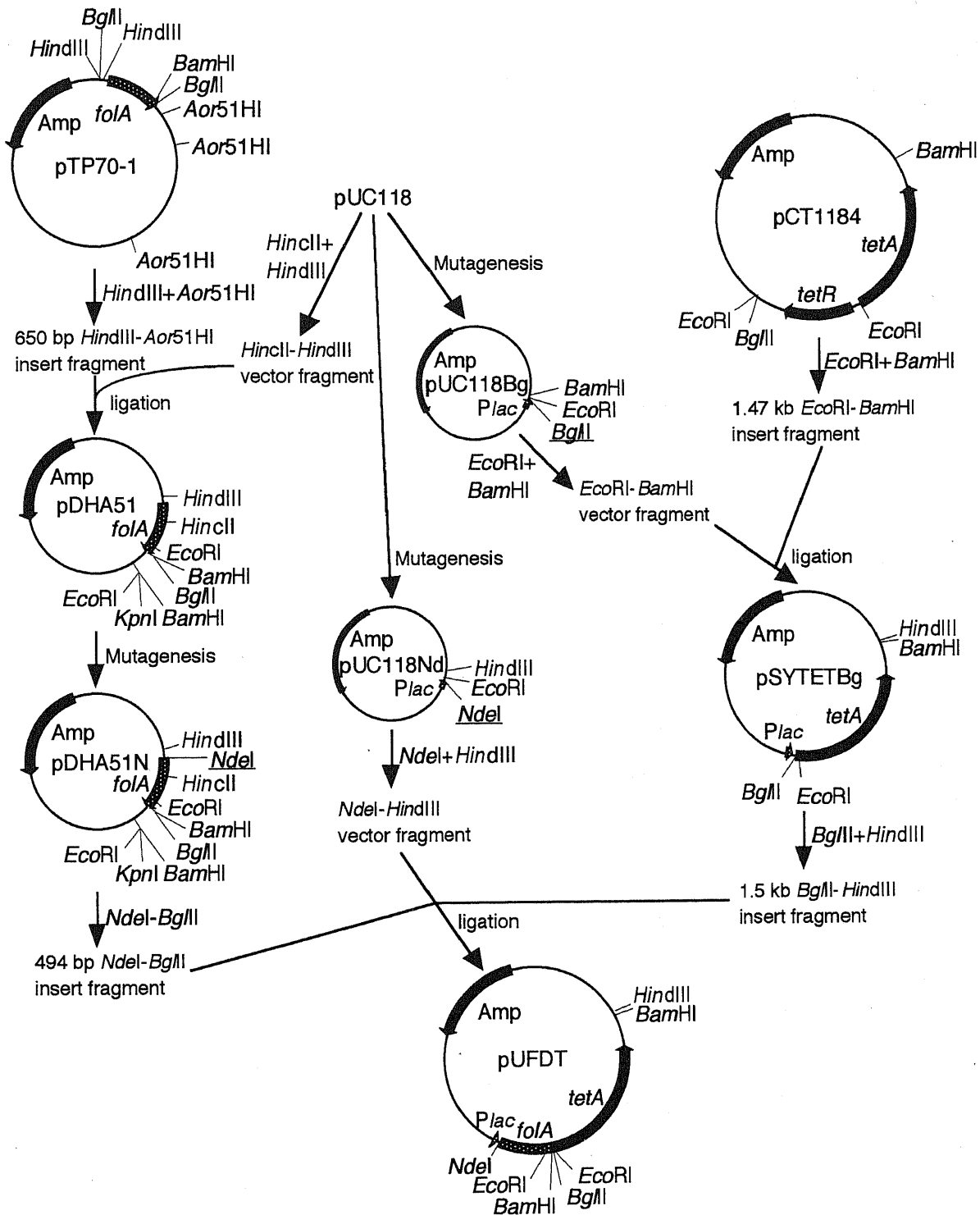


Figure 8-1. Construction of pUFDT encoding the DHFR-TetA fusion protein. pTP70-1 (210, 211) encodes the *E. coli* chromosomal DHFR gene (*folA*). For mutagenesis, the promoter-less *folA* gene from pTP70-1 was subcloned in pUC118, resulting in pDHA51. Underlines indicate new restriction sites introduced by site-directed mutagenesis. pDHA51N has the *NdeI* site which overlaps the ATG codon for DHFR. pUC118Bg and pUC118Nd are derivatives of pUC118 which have the *BglII* site and the *NdeI* site upstream of the multicloning site, respectively. pSYTETBg was constructed by cloning the *EcoRI*-*BamHI* *tetA* fragment from pCT1184 to pUC118Bg. pUFDT was constructed by the co-insertion of the *NdeI*-*BglII* *folA* fragment from pDHA51N and the *BglII*-*HindIII* *tetA* fragment from pSYTETBg to pUC118Nd.

Figure 8-2は、TetA-DHFR融合遺伝子を*lac*プロモーター支配下にコードするプラスミド、pUFTDの構築方法である。

①pCT1184を鋳型として、AorI258Rを用いて変異導入を行い、TetAのC末端Ser400-Ala401のコードに重複するAor51HI切断部位をもつpCT1184Aを作成した。

②pDHA51を鋳型として、DAorIプライマーを用いて変異導入を行い、DHFRの開始コードの直前にAor51HI切断部位をもつpDHA51Aを作成した。

③pUC118のEcoRI-KpnIベクターに、pCT1184Aから調製されたEcoRI-Aor51HI切断断片とpDHA51Aから調製されたAor51HI-KpnI切断断片とを挿入し、pUFTDを構築した。

Figure 8-3には、TetA- β -lactamase融合蛋白遺伝子を*lac*プロモーター支配下にコードするプラスミド、pHFTBの構築方法を示した。

①pUC118を鋳型として、pUCAorI264RプライマーとpUCSalII1074Rプライマーとを用いて変異導入を行い、pUC118ASを構築した。このプラスミドは、 β -ラクタマーゼのシグナル配列切断部位近傍に対応する遺伝子領域にAor51HI切断部位をもつ。その結果、シグナル配列中のPhe(-2)がSerに置換されるが、アンピシリン耐性に顕著な影響は見られなかった。また、終止コドン下流にSalI切断部位が導入されている。

②クロラムフェニコール耐性遺伝子を有するマルチコピープラスミドpHSG398のEcoRI-SalIベクターに、pCT1184Aから調製されたEcoRI-Aor51HI切断断片とpUC118ASから調製されたAor51HI-SalI切断断片とを挿入し、pHFTBを構築した。

Figure 8-4に3種の融合遺伝子から発現する融合蛋白のアミノ酸配列の一部を示した。

構築された3種の融合遺伝子から融合蛋白が大量発現するかを確認するために、それぞれのプラスミドを大腸菌RB791株に導入し、終濃度0.1mMのIPTGで2時間誘導後、反転膜小胞を調製した。Figure 8-5はそのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動パターンである。3種のプラスミドいずれからもそれぞれの融合蛋白が、pSYTETからのTetAの大量発現 (Figure 7-3) (395)に匹敵する程大量発現しているのが確認された。融合蛋白の分子量は、DHFR-TetAが約61kDa、TetA-DHFRが約64kDa、TetA- β -lactamaseが約70kDaと推定された。TetAのC末端に対する特異抗体を用いてイムノブロットティングにより融合蛋白の検出を試みたところ、DHFR-TetAに対応する蛋白しか検出されなかった (data not shown)。一方、第7章で陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製されたTetAを抗原として調製された抗血清は、すべての融合蛋白と反応した (data not shown)。従って、TetA-DHFRおよびTetA- β -lactamaseではエピトープ部分以降にもペプチド鎖が続いているので、高次構造が変化したためにC末端特異抗体で検出されなかったと考えられる。

次に、融合蛋白が活性を保持しているかどうかを検討した。まず、Figure 8-6で反転膜小胞でのテトラサイクリン輸送活性を測定した。いずれの融合蛋白においても輸送活性が認められたが、TetAの輸送活性よりも低下する傾向にあった。特にTetA- β -lactamase融合蛋白のテトラサイクリン輸送活性はTetAの半分程度であり顕著であるが、テトラサイクリン輸送を保持していたことは親水性酵素部分がTetA部分のコンフォメーションに致命的な影響を与えていないことを示していると考えられる。次に、それぞれの酵素活性を測定し、Table 8-2およびTable 8-3にまとめた。

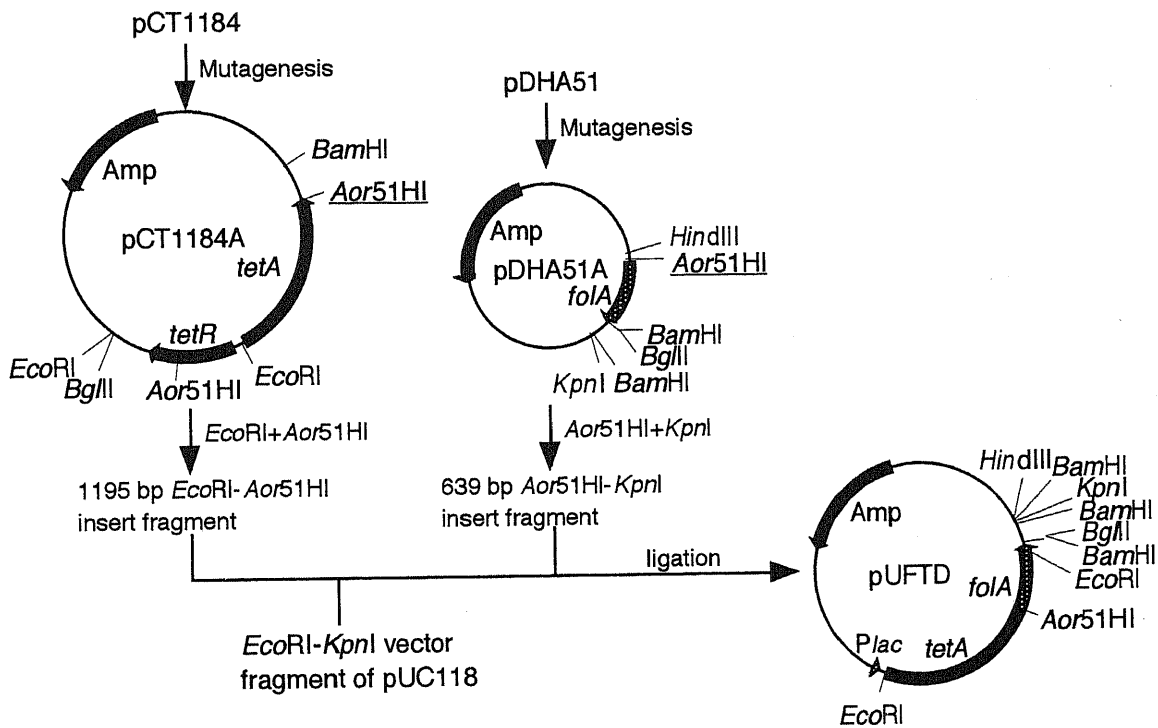


Figure 8-2. Construction of pUFTD encoding the TetA-DHFR fusion protein. Underlines indicate new restriction sites introduced by site-directed mutagenesis. pCT1184A has the *Aor51HI* site which overlaps the 400th and 401st codons of the *tetA* gene. pDHA51A has the *Aor51HI* site before the ATG codon of the *folA* gene. pUFTD was constructed by the co-insertion of the *EcoRI*-*Aor51HI* *tetA* fragment from pCT1184A and the *Aor51HI*-*KpnI* *folA* fragment from pDHA51 to the *EcoRI*-*KpnI* vector fragment of pUC118.

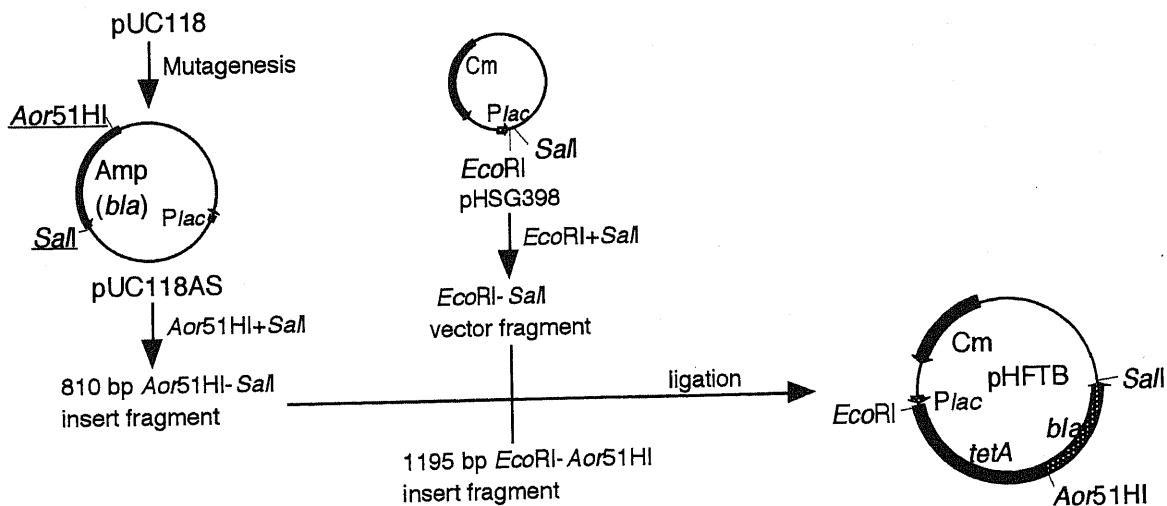


Figure 8-3. Construction of pHFTB encoding the TetA- β -lactamase fusion protein. Underlines indicate new restriction sites introduced by site-directed mutagenesis. pUC118S has the *Aor51HI* site, which overlaps the -2nd and -1st codons, and the *SalI* site behind the stop codon of the *bla* gene. pHFTB was constructed by the co-insertion of the *EcoRI*-*Aor51HI* *tetA* fragment from pCT1184A and the *Aor51HI*-*SalI* *bla* fragment from pUC118AS to the *EcoRI*-*SalI* vector fragment of pHSG398.

Teta encoded by Tn10
¹MNSSTK-----KQETSA⁴⁰¹

Teta encoded by pSYTET
¹M-TMIT-²NSSTK-----KQETSA⁴⁰¹

DHFR encoded by *E. coli* chromosome
¹MISLIA-----YCFEILERR¹⁵⁹

DHFR encoded by pTF70-1
¹MISLIA-----YEFELLERR¹⁵⁹IQI¹⁶²

β -lactamase encoded by pUC118
-23MSIQ-----VFA⁻¹/¹HPETLV-----SLIKHW²⁶³

β -lactamase encoded by pUC118AS
-23MSIQ-----VSA⁻¹/¹HPETLV-----SLIKHW²⁶³

DHFR-Teta encoded by pUFDI
¹MISLIA-----YEFELLERR¹⁵⁹IQI¹⁶²-s-²NSSTK-----KQETSA⁴⁰¹

Teta-DHFR encoded by pUFTD
¹M-TMIT-²NSSTK-----KQETSA⁴⁰¹-¹MISLIA-----YEFELLERR¹⁵⁹IQI¹⁶²

Teta- β -lactamase encoded by pHFTB
¹M-TMIT-²NSSTK-----KQETSA⁴⁰¹-¹HPETLV-----SLIKHW²⁶³

Figure 8-4. Amino acid sequences of TetA, DHFR, β -lactamase, and fusion proteins. The TMIT sequence of TetA encoded by pSYTET, TetA-DHFR and TetA- β -lactamase is derived from β -galactosidase (LacZ). DHFR encoded by pTF70-1 has two mutations; the Cys152 \rightarrow Glu substitution and the addition of IQI sequence to the C-terminal tail. Slashes in amino acid sequences of β -lactamase indicate the sites processed by the signal peptidase. β -lactamase encoded by pUC118AS has the Phe(-2) \rightarrow Ser mutation. This mutation did not seem to affect the resistance to ampicillin. DHFR-Teta fusion has 563 amino acid residues, TetA-DHFR fusion 567 residues, and TetA- β -lactamase fusion 668 residues.

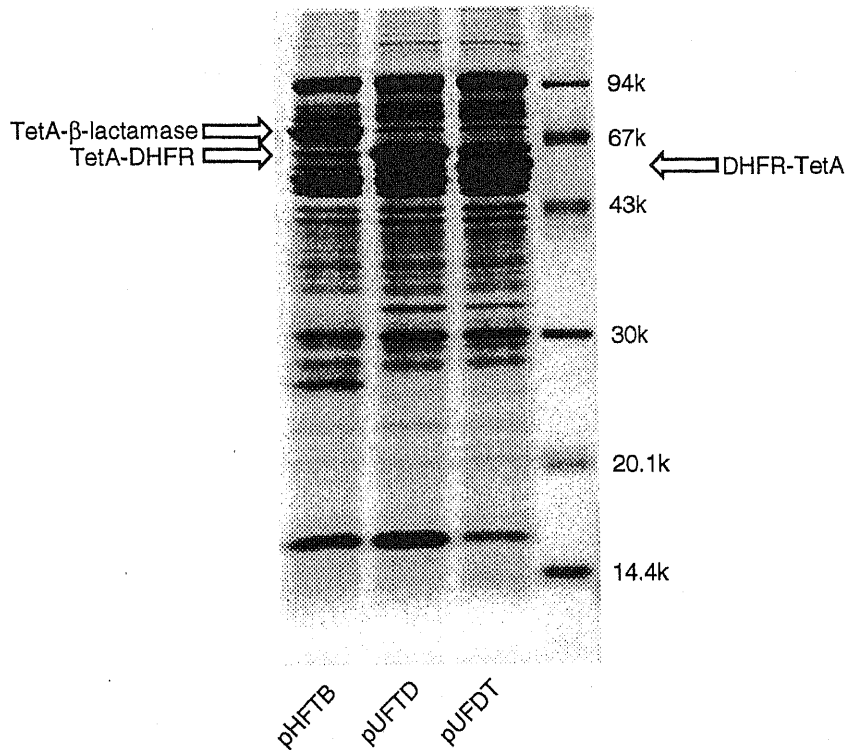


Figure 8-5. Overexpression of three fusion proteins in the membranes. French press vesicles were prepared from *E. coli* RB791 cells harboring pUFTD, pUFTD, or pHFTB after induction of the gene expression with 0.1 mM IPTG. Fifty μ g of membrane proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

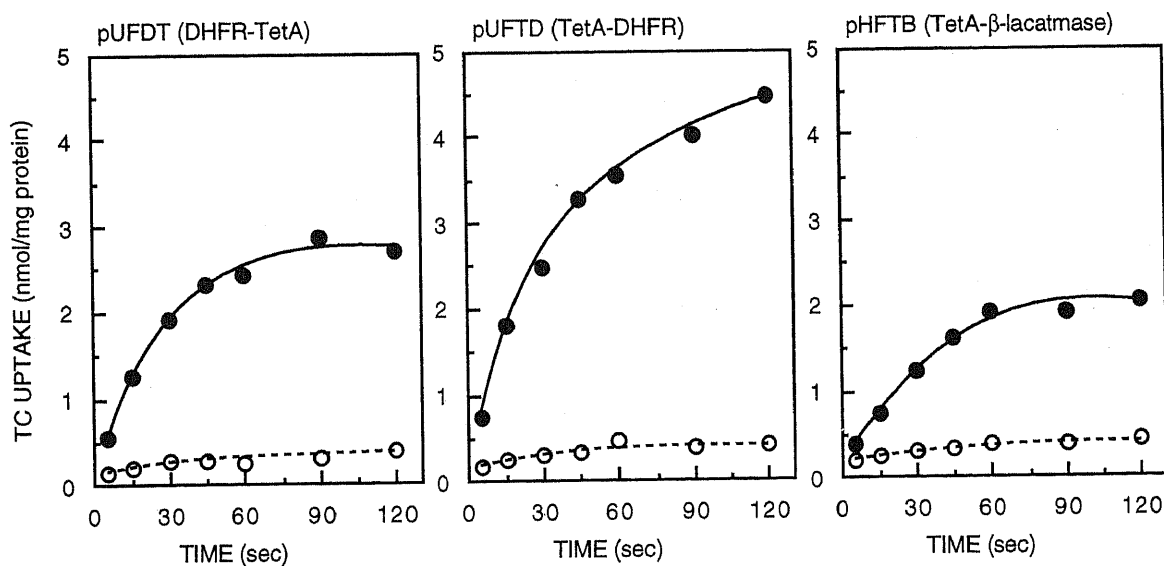


Figure 8-6. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* RB791 cells harboring plasmids encoding fusion proteins. Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl_2 .

Table 8-2. Dihydrofolate reductase (DHFR) activity of soluble and membrane fractions from various *E. coli* cells. Cells were disrupted by passing through a French pressure cell and unbroken cells were removed. After ultracentrifugation, the supernatant (soluble fraction) was separated with French press vesicles (membrane fraction). DHFR activity was measured in 50 mM KPi buffer (pH 7.0) containing 50 μ M dihydrofolate, 60 μ M NADPH and 12 mM 2-mercaptoethanol at 30 °C. The reaction rate was monitored at 340 nm. One unit of the enzyme is defined as the amount of the enzyme required to produce 1 μ mol of tetrahydrofolate per min, using a molar extinction coefficient of $1.18 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for calculation. Specific activity of the enzyme is defined as units per mg of protein.

<i>E. coli</i> cells	Specific activity (units/mg protein)	
	Soluble fraction	Membrane fraction
HB101/pTP70-1	74.1	0.13
RB791	0.11	0.07
RB791/pUFDT	0.10	1.8
RB791/pUFTD	0.10	1.9

Table 8-3. β -lactamase activity of soluble and membrane fractions from various *E. coli* cells. Soluble fraction and membrane fraction were prepared as described in Table 8-2. β -lactamase activity was measured in 50 mM KPi buffer (pH 7.0) containing 200 μ M benzylpenicillin (PCG) or cephalothin (CET) and 12 mM 2-mercaptoethanol at 30 °C. The reaction rate was monitored at 235 nm. One unit of the enzyme is defined as the amount of the enzyme required to hydrolyze 1 μ mol of β -lactam per min, using a molar extinction coefficient of $0.94 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (PCG) or $7.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (CET) for calculation. Specific activity of the enzyme is defined as units per mg of protein.

<i>E. coli</i> cells	Specific activity (units/mg protein)			
	PCG		CET	
	Soluble fraction	Membrane fraction	Soluble fraction	Membrane fraction
TG1/pUC118	92.0	0	5.0	0
RB791	0	0	0	0
RB791/pHFTB	0	7.7	0	0.7

DHFR-TetA融合蛋白およびTetA-DHFR融合蛋白のDHFR活性、TetA- β -lactamase融合蛋白の β -ラクタマーゼ活性は、それぞれpTP70-1から発現される遊離のDHFRの活性、pUC118に由来する β -ラクタマーゼの活性に比べ著しく低い。この結果は、DHFRや β -ラクタマーゼはN末端あるいはC末端N末端が固定されると酵素活性が阻害されることを示していると考えられる。いずれにしても、有意のテトラサイクリン輸送活性およびDHFR活性あるいは β -ラクタマーゼ活性が認められたので、TetAに類似したコンフォメーションを融合蛋白も採っていると判断した。

第3節 融合蛋白の精製

融合蛋白の3次元結晶を作成することを目指し、その精製系について検討した。TetAはDEAE陰イオン交換クロマトグラフィー一段階でかなりの精製度で精製することができた(394)が、DHFR-TetA融合蛋白およびTetA-DHFR融合蛋白は同様の方法で良好な分離が得られなかった (data not shown) ので、別の方法を試みることにした。DHFRの酵素活性はメトトレキセート (MTX) によって阻害されるので、MTXをリガンドとした担体によりDHFRをアフィニティ精製することが可能である(211)。現在、SigmaよりMTX-アガロース (MTXをSephrose 4BにCNBr法により固定化したもの) が市販されており、頻用されている。そこで、DHFR融合蛋白の精製にMTX-アガロースを用いることにした。担体をBio-Radのエコノカラム (1×10cm) に充填し (ベッド体積はおよそ7ml)、0.1% DMを含む緩衝液 (10mMリン酸カリウム (pH 7.0)、1M塩化カリウム、0.1mM EDTA、14mM β -メルカプトエタノール) で平衡化した。2% TX100あるいは2% DMでEDTA処理された内膜画分を可溶化し、その超遠心上清をカラムに添加し、同緩衝液約30mlで洗浄した。次いで、3mM葉酸を含む同緩衝液約20mlを用いてMTX-アガロースに結合していたDHFR融合蛋白を溶出させた。この方法により、DHFR融合蛋白は特異的にMTX-アガロースに結合し、葉酸によって溶出され、ほぼ完全に精製されるが、その溶出パターンはブロードになり、結果的に蛋白濃度が低くなってしまった。Figure 8-7にTetA-DHFR融合蛋白の精製過程の各画分のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動パターンを示した。精製された融合蛋白の濃度は0.2mg/ml程度であった。DHFR-TetA融合蛋白についても同様の結果であった (data not shown)。

この対処法として、(1)塩濃度を変えてみる、(2)カラムのベッド体積を小さくする、(3)カラムのサイズを太く短いものにする、(4)バッチ法での精製を試みる、などが挙げられ、今後の検討を要する。

また、TetA- β -lactamase融合蛋白の精製についても検討中であるが、Sigmaより*m*-アミノフェニルボロン酸-アガロース、ペニシロイン酸-アガロースが、ホクスイブラウンよりイモビライズドアンピシリナーゼが市販されており、アフィニティ精製、イムノアフィニティ精製が可能な状況となっている。

第4節 考察

本章では、現在までにX線結晶構造解析により立体構造が解明されている膜蛋白質が比較的親水性部分を多く含んでいることに着目し、TetAに親水性酵素を融合した蛋白を作成することにした。これにより、親水性酵素部分が結晶化のための「たね」となり、結晶化が促進すると考えられる。この発想は、*Paracoccus denitrificans*のチトクローム *c* 酸化酵素の結晶化においても実証され、Iwataらは特異抗体のFv断片とともに結晶化、X線結晶構造解析に成功している(366)。また、Priveらも大腸菌ラクトース輸送体の中央に大腸菌のチトクローム *b*₅₆₂を挿入した融合蛋白を作成し、結晶化を目指している(395)。

本研究では親水性蛋白として大腸菌のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) とプラスミド性TEM1 β -ラクタマーゼを選び、3種の融合蛋白を作成した。これら2つの酵素はすでにX線結晶構造解析がなされており、詳細な立体構造が明らかにされているものである(391-393)。作成された融合蛋白はいずれも膜に組み込まれ、テトラサイクリン輸送活性を保持しているばかりでなく、DHFR活性あるいは β -ラクタマーゼ活性を保持しており、酵素の融合がTetAの機能に致命的な影響を与えていないと判断される。また、当研究室ではヒトP-糖蛋白 (MDR1) の2つのATP結合部位をTetAの中央ループ領域とC末端に挿入した融合蛋白が作成され、顕著なレベルのテトラサイクリン耐性を与えることが観察されている(396)。従って、TetAの親水性領域 (中央ループ領域とC末端) への比較的大きなペプチドの挿入はそれほど蛋白構造に影響しないと言える。

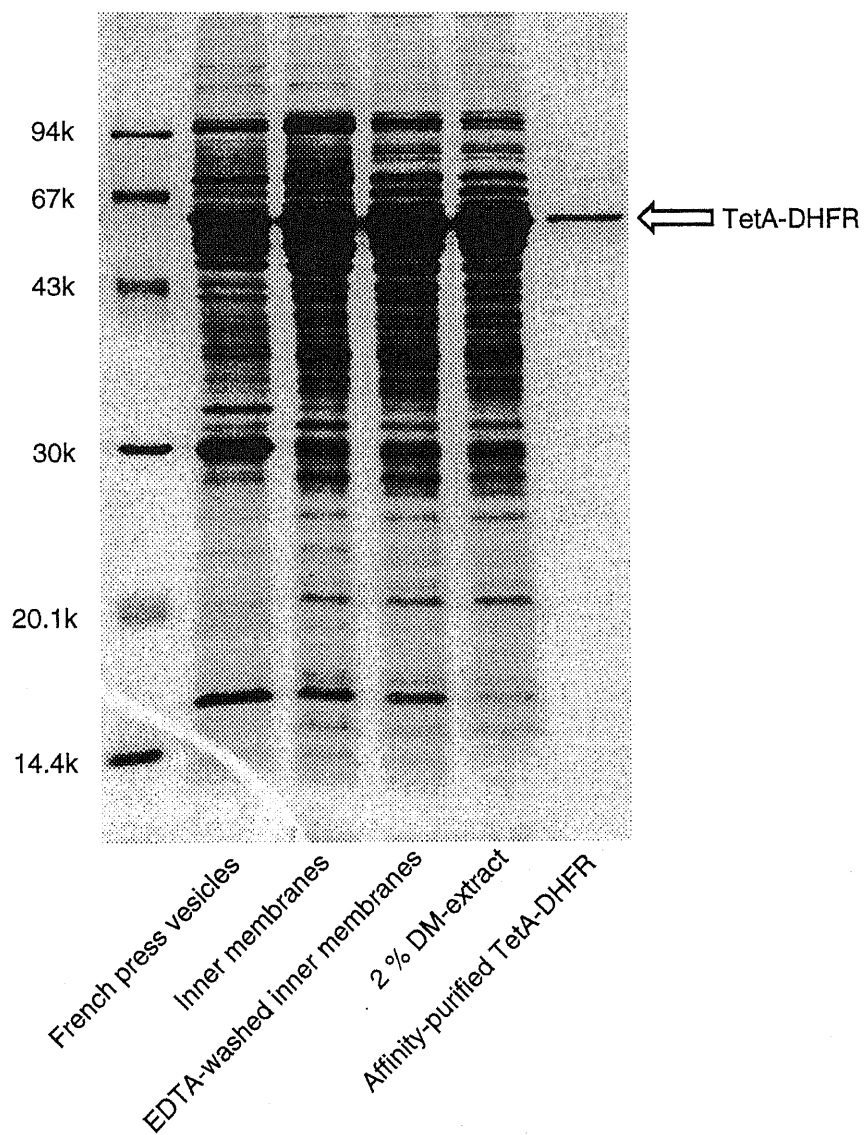


Figure 8-7. Purification of TetA-DHFR fusion proteins. French press vesicles were prepared from *E. coli* RB791/pUFTD cells after induction of the gene expression with 0.1 mM IPTG. Inner membranes were separated from outer membranes by sucrose density gradient centrifugation, and washed with a low ionic strength buffer containing 0.5 mM EDTA. After solubilization with 2 % dodecyl maltoside (DM), TetA-DHFR fusion proteins were purified with affinity chromatography using methotrexate (MTX)-agarose gels.

2種類のDHFR融合蛋白について、MTX-アガロースによるアフィニティ精製を試みたところ、ほぼ完全に精製蛋白が得られるもののその濃度は低く、幾つかの点で今後検討しなければならない。 β -ラクタマーゼ融合蛋白も市販されている担体を用いてアフィニティ精製が可能であるが、現在検討中である。

最近には種々の融合蛋白作成用のベクターが各社 (Pharmacia、Clontech、Novagenなど) から市販されており、様々な膜蛋白質のワンステップ精製に用いられている(376,388,397-403)。アルカリ性フォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、緑色蛍光蛋白など別の蛋白を融合させるものや、ポリヒスチジンタグを融合させるものなどがあり、またそれに対応するアフィニティ担体も市販されている。結晶化は微妙な条件によって左右されるので、TetAについても様々な融合蛋白を作成し、結晶化を検討していく必要があると思われる。

第1節 はじめに

*TetA*に限らず、多くの12回膜貫通型二次性能動輸送体やABC輸送体に属する一次性能動輸送体は、N末側6本の領域(α 領域)とC末側6本の領域(β 領域)とがアミノ酸一次配列において相同であるので、それらは6本の膜貫通領域のみをコードする単一の遺伝子が重複して進化したとするtandem duplication説が一般に受け入れられている(39,40)。このことはまた、12本の膜貫通領域がひとつのポリペプチドを形成せず、6本のみのユニットでも機能しうることを示唆している。実際、幾つかの輸送体では、同一のあるいは相同な6本の膜貫通領域からなる蛋白が2分子会合し、物質輸送を仲介している。更にこのことから、現在12本の膜貫通領域をもつ蛋白が人工的に2つの6本の膜貫通領域からなる断片に分割されても機能を保持する可能性が考えられる。

Levyのグループは*TetA*において、 α 領域、 β 領域のそれぞれに機能的欠失をもたらすアミノ酸置換がある2種の変異蛋白を同一の細胞で同時に発現させると機能的な相補が起こり、テトラサイクリン耐性を回復することを報告している(70-73)。この結果は別々のポリペプチドから正常な α 領域と β 領域とが供与され、機能的な蛋白分子が形成されていることを示唆し、*TetA*は二量体で機能しているとする根拠になっている(72)。この結果はまた、*TetA*が二分割されても機能を保持することを示唆するが、実際、Rubin and Levyは、*tetA(B)*遺伝子中央に4塩基が挿入されるフレームシフト変異を導入しても野生型の20%程度のテトラサイクリン耐性を与えることを観察し、二分割蛋白が機能を保持することを報告している(74)。しかし、この報告では、4塩基の挿入から考えて正常な蛋白は産生されないと言えるが、 α 領域ペプチドと β 領域ペプチドが検出されていない。また、 β 領域ペプチドの開始点が明確にされていないなどの問題点を残している。

そこで、本研究では、*TetA*の α 領域と β 領域を明確に二分割発現させることを考慮し、*tetA(B)*遺伝子を二分割して α 領域、 β 領域に対応する遺伝子領域をそれぞれを別々の*lac*プロモーター支配下に置き、それぞれの単独発現プラスミドおよび同時発現プラスミドを構築した。 α 領域、 β 領域は単独でもテトラサイクリン輸送を仲介するのか、両領域が分割された場合に輸送活性は保持されるのかについて、また、細胞質膜への分子集合について検討した。

第2節 二分割 *tetA* 遺伝子の単独及び同時発現系の構築

α 領域、 β 領域それぞれの単独発現プラスミドおよび同時発現プラスミドの構築はFigure 9-1に示すように行った。このとき用いられた合成オリゴヌクレオチドをTable 9-1にまとめた。変異導入はKunkel法に従って行った。

Table 9-1. Mutagenic primers used for site-directed mutagenesis.

Asterisks (*) and underlines indicate mismatches and new restriction sites, respectively.

Primer	Nucleotide sequence	Note
SBGR	5'-TTTAAATAAAGGGATCCAGGCCTAGTTCGATTG-3' * ** * * <u>BamHI</u> <u>StuI</u>	Template: pCT1184; A stop codon is introduced at the 201st codon. <i>Bam</i> HI and <i>Stu</i> I are introduced behind that.
B2GR	5'-TCCAGTCGGAGATCTGTGCGTGCC-3' * * <u>Bgl</u> II	Template: pCT1182; <i>Bgl</i> II is introduced upstream of the <i>lac</i> promoter.

α 領域単独発現プラスミド、pSYTET α は次のような手順で構築した。

①pCT1184を鋳型として、SBGRプライマーを用いて変異導入を行い、201番目のコドンが終止コドンに変わり、その直後に*Bam*HIおよび*Stu*I切断部位をもつpCT118 α を作成した。

②pCT118 α を*Eco*RIと*Bam*HIで消化後、*ori*領域、Ampマーカを含むベクター断片と α 領域をコードする領域 (*tetA*(α)) を含む断片を調製し、それらを連結させ、pSYTET α を構築した。

β 領域単独発現プラスミド、pSYTET β の構築は次のように行った。

①pCT1182を鋳型として、B2GRプライマーを用いて変異導入を行い、*lac*プロモーター上流に*Bgl*II切断部位をもつpCT118 β を作成した。

②pCT118 β を*Eco*RIで消化後、そのベクター断片のみを調製し、セルフライゲーションさせ、pSYTET β を構築した。

α 領域と β 領域の同時発現プラスミド、pSYTET α/β の構築は次のように行った。

①pLG339(207)の*Eco*RI切断部位が*Bgl*IIに変えられたpLG3392(54)の*Bgl*II-*Bam*HIベクターに、pSYTET β から調製された*tetA*(β)を含む*Bgl*II-*Bam*HI切断断片を挿入し、pLG3392 β を作成した。

②pSYTET α を*Stu*Iと*Bam*HIで消化してベクターを調製し、pLG3392 β からKmマーカと*tetA*(β)を含む*Pvu*II-*Bam*HI切断断片を調製し、それらを連結させ、pSYTET α/β を構築した。

*lac*プロモーターが同一プラスミド上に2つ存在すると、それらの間で相同組み換えを起こすことが考えられる。これを回避するために、pSYTET α/β には2種の薬剤耐性マーカ (AmpとKm) が組み込まれている。

それぞれのプラスミドの*lac*プロモーター下流域の塩基配列の一部と、それに対応するポリペプチドのアミノ酸配列の一部をFigure 9-2に示した。 α 領域ペプチド、 β 領域ペプチドとも β -ガラクトシダーゼの開始コドンを利用するので、それに由来する4アミノ酸残基がN末端に挿入されていることが予想される。

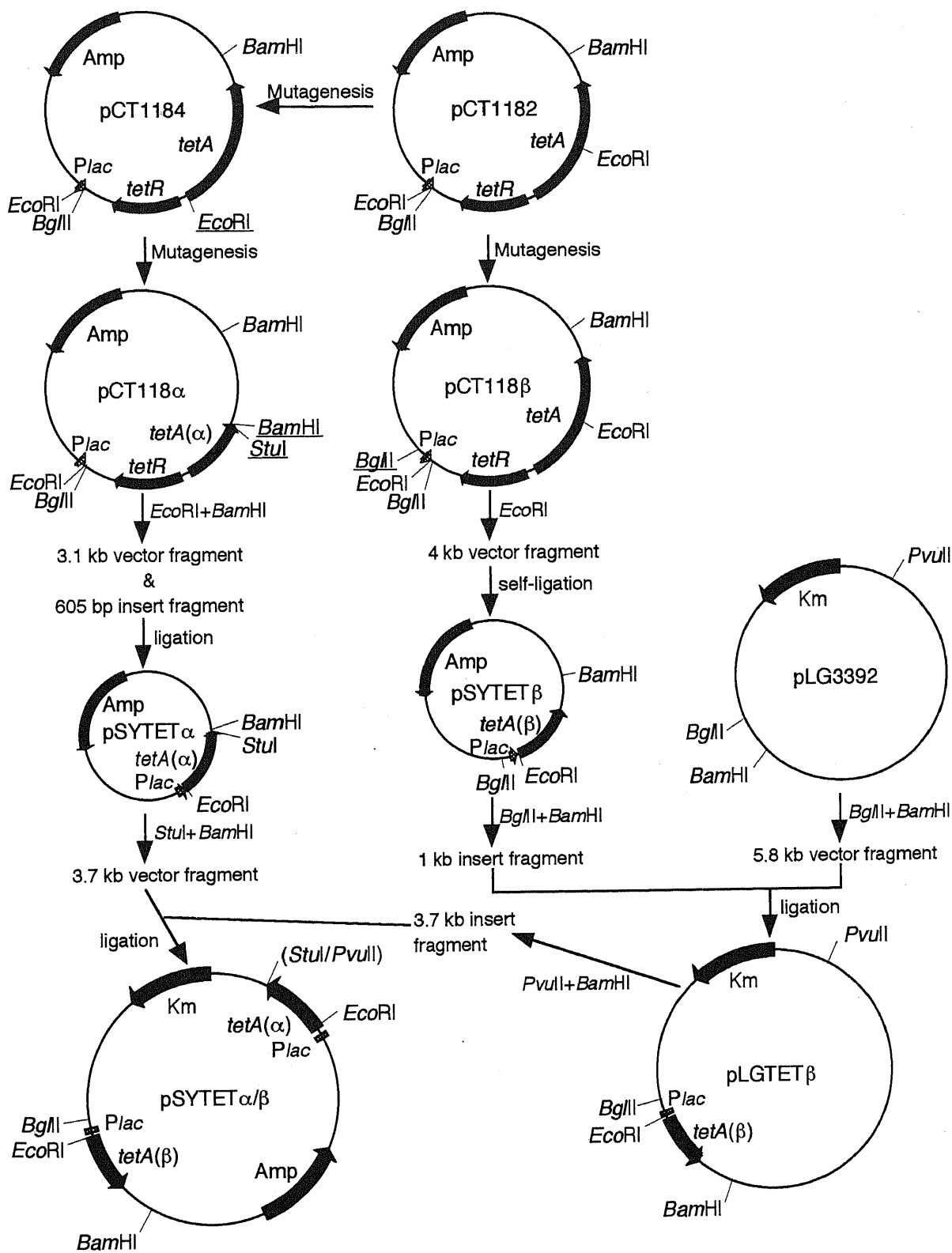


Figure 9-1. Construction of plasmids carrying the *tetA* gene fragments. pCT118α contains a stop codon at the 201st position, constructed from pCT1184 by site-directed mutagenesis. pSYTETα was constructed by the insertion of the *Eco*RI-*Bam*HI *tetA*(α) fragment from pCT118α to the *Eco*RI-*Bam*HI vector fragment from pCT118α. pCT118β has the *Bgl*II site upstream of the *lac* promoter, constructed from pCT1182. pSYTET β was constructed by self-ligation of the *Eco*RI fragment from pCT118β. The *Bgl*II-*Bam*HI *tetA*(β) fragment from pSYTET β was transferred to pLG3392 (51), resulting in pLG TET β. pSYTET α/β was constructed by ligation of the *Stu*I-*Bam*HI vector fragment from pSYTETα and the *Pvu*II-*Bam*HI insert fragment from pLG TET β.

```

Plac on pUC118->
1 10 20 30 40 50 60 70 74
TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTCTGTGGAAATTGTGACGGGATACAAATTTTCACACAGGAAACACGCT
-35 Promoter -10 | Operator |SD
lacZ- > / tetA->
75
pCT1182: ATGACCATGATTACGAAATTCAGATCTG---(tetR)---P/Otet---AGAGAAAAGTGAATGAATAGTTCG-----CAATCGAATTCGGTATACATCACT-----AGTGCCTTAG
EcoRI BgIII SD EcoRI
MetAsnSerSer-----GlnSerAsnSerValTyrIleThr-----SerAla***

pCT1184: ATGACCATGATTACGAAATTCAGATCTG---(tetR)---P/Otet---AGAGAAAAGTGAATGAATTCCTCG-----CAATCGAATTCGGTATACATCACT-----AGTGCCTTAG
EcoRI BgIII SD EcoRI
MetAsnSerSer-----GlnSerAsnSerValTyrIleThr-----SerAla***

pSYTET: ATGACCATGATTACG/ <- deletion --> /AATTCCTCG-----CAATCGAATTCGGTATACATCACT-----AGTGCCTTAG
EcoRI EcoRI
MetThrMetIleThr AsnSerSer-----GlnSerAsnSerValTyrIleThr-----SerAla***

pSYTETα: ATGACCATGATTACG/ <- deletion --> /AATTCCTCG-----CAATCGAATTCGGCTGGATCC/ <-pUC118
EcoRI EcoRI StuI BamHI
MetThrMetIleThr AsnSerSer-----GlnSerAsn***

pSYTETβ: ATGACCATGATTACG/ <- deletion --> /AATTCGGTATACATCACT-----AGTGCCTTAG
EcoRI EcoRI
MetThrMetIleThr AsnSerValTyrIleThr-----SerAla***

```

Figure 9-2. Nucleotide sequences around the cloning sites of the *tet* genes on pUC118. See Figure 7-1 for construction of pSYTET, and Figure 9-1 for construction of pSYTETα and pSYTETβ.

第3節 二分割蛋白の発現

構築された3種のプラスミドはそれぞれ大腸菌RB791株に導入された。蛋白の発現を確認するため、それぞれの反転膜小胞を調製した。この際、遺伝子発現は終濃度0.5mMのIPTGを添加して誘導した。比較のためにRB791株およびRB791/pSYTET株の反転膜小胞も調製した。10 μ gの膜蛋白を含む反転膜小胞をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に用い、ゲルをクマジーブリリアントブルー染色した。Figure 9-3Aに示したように、pSYTET由来のTetAが濃いバンドとして観察される他、pSYTET α およびpSYTET α/β 由来の反転膜小胞にはおよそ20kDaの分子量をもつペプチドが認められ、 α 領域の大量発現と考えられる。一方、pSYTET β からの反転膜小胞には β 領域と推定されるバンドは認められなかった。従って、 β 領域ペプチドは α 領域ペプチドに比べて細胞質膜への組み込みが悪いと考えられる。

Figure 9-3Bでは0.2 μ gの膜蛋白を含む反転膜小胞をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に用い、抗C末端特異抗体 (anti-Ct14) を用いたイムノプロットングにより蛋白の検出を試みている。これにより、pSYTET β およびpSYTET α/β の反転膜小胞に β 領域ペプチドが発現していることが確認された。

単独発現株と同時発現株での α 領域、 β 領域の発現量を比較すると、 α 領域ペプチドについては、同時発現株では単独発現株よりも発現量がわずかに減少している (Figure 9-3A) のに対し、 β 領域ペプチドの発現量は、Figure 9-3Bで見ると、明らかに単独発現株よりも同時発現株で増加していることが分かる。バンドの濃さを定量化したところ、増加量はおよそ1.5倍であった。これらの結果は、 α 領域ペプチドは β 領域ペプチドの存在、非存在にかかわらず膜に組み込まれるが、 β 領域ペプチドが膜に組み込まれ安定に存在するためには α 領域ペプチドの存在が必要であることを示している。

α 領域ペプチドを特異的に検出できるように、 α 領域ペプチドのC末端に相当する14アミノ酸残基からなる合成ペプチド (N-187Asp-Asn-Thr-Asp-Thr-Glu-Val-Gly-Val-Glu-Thr-Gln-Ser-Asn²⁰⁰-C) に対する抗血清 (anti-ML14) を調製した。また、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製されたTetA (Figure 7-5) (394)に対する抗血清 (anti-TetA) も調製した。Figure 9-4には、これらの抗血清を用いてTetAおよび α 領域ペプチドの検出を行った結果が示されている。標品はRB791/pSYTET α/β 株、RB791/pSYTET株およびRB791株の反転膜小胞である。Figure 9-4Aはanti-Ct14による検出結果で、Figure 9-3Bと同じである。Figure 9-4Bはanti-ML14を用いた結果であるが、pSYTETに由来するTetAは検出されず、pSYTET α/β に由来する α 領域ペプチドのみが検出されている。pSYTET α の α 領域ペプチドも同程度検出されている (data not shown)。TetAはanti-ML14のエピトープに相当するアミノ酸配列をもっているにもかかわらず全く反応しなかったことになる。この反応性の差は、 α 領域ペプチドではエピトープ部分がC末端尾部として自由度が高いのに対し、TetAでは膜貫通領域をつなぐループ領域にあり、両者でその部分の立体構造が異なっているためと考えられる。

一方、anti-TetAはTetAのみならず、分割ペプチドに対してもよく反応した (Figure 9-4C)。また、pSYTET α 由来の α 領域ペプチド、pSYTET β 由来の β 領域ペプチドとも反応し (data not shown)、これらで検出されたバンドの位置を比較することで、pSYTET α/β の反転膜小胞で検出される2つのバンドは、上側が α 領域ペプチド、下側が β 領域ペプチドに対応することがわかった。また、この2つのバンドの濃さはほぼ同じであるように見え、ゲルのクマジーブリリアントブルー染色のパターンとは著しく異なっている。 α 領域と β 領域は同一のエピトープをもっていないので確定的な結論は下せないが、2つの領域は同程度産生するが、 β 領域ペプチドが α 領域ペプチドよりもクマジーブリリアントブルー染色されにくい可能性、 α 領域ペプチドの方が β 領域ペプチドよりも多く産生するが、anti-TetAに対する反応性が β 領域ペプチドの方が高い可能性が考えられる。

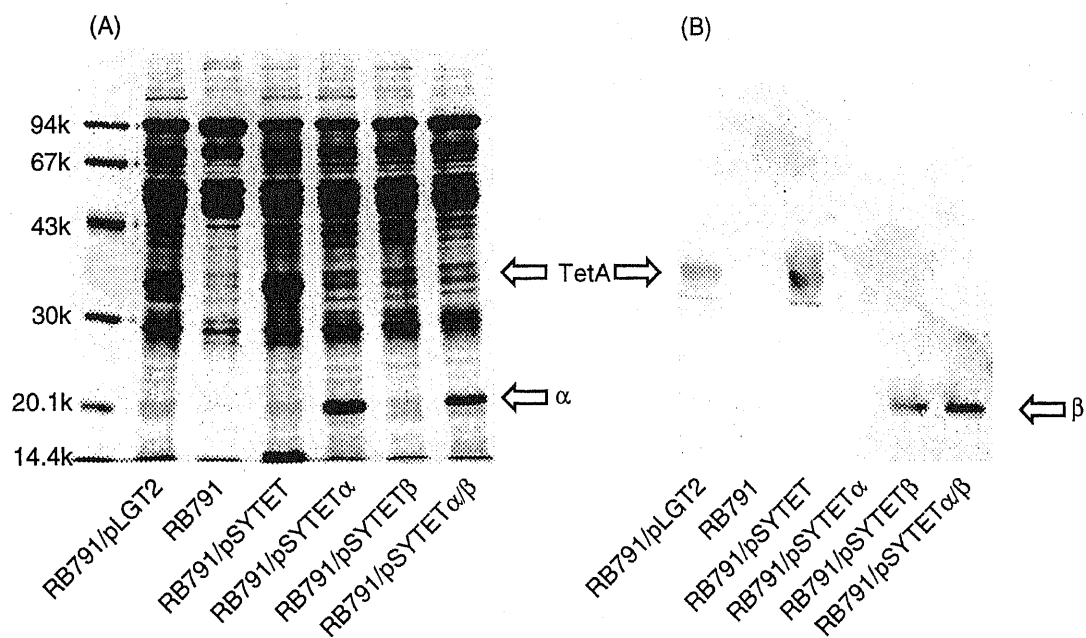


Figure 9-3. Expression of α domain peptides and β domain peptides in membranes. French press vesicles were prepared from RB791/pLGT2, RB791, RB791/pSYTET, RB791/pSYTET α , RB791/pSYTET β , and RB791/pSYTET α/β . (A) Ten μg of protein were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the gel was stained with Coomassie brilliant blue. (B) 0.5 μg of proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a nitricellulose membrane. Proteins were detected by anti-Ct14.

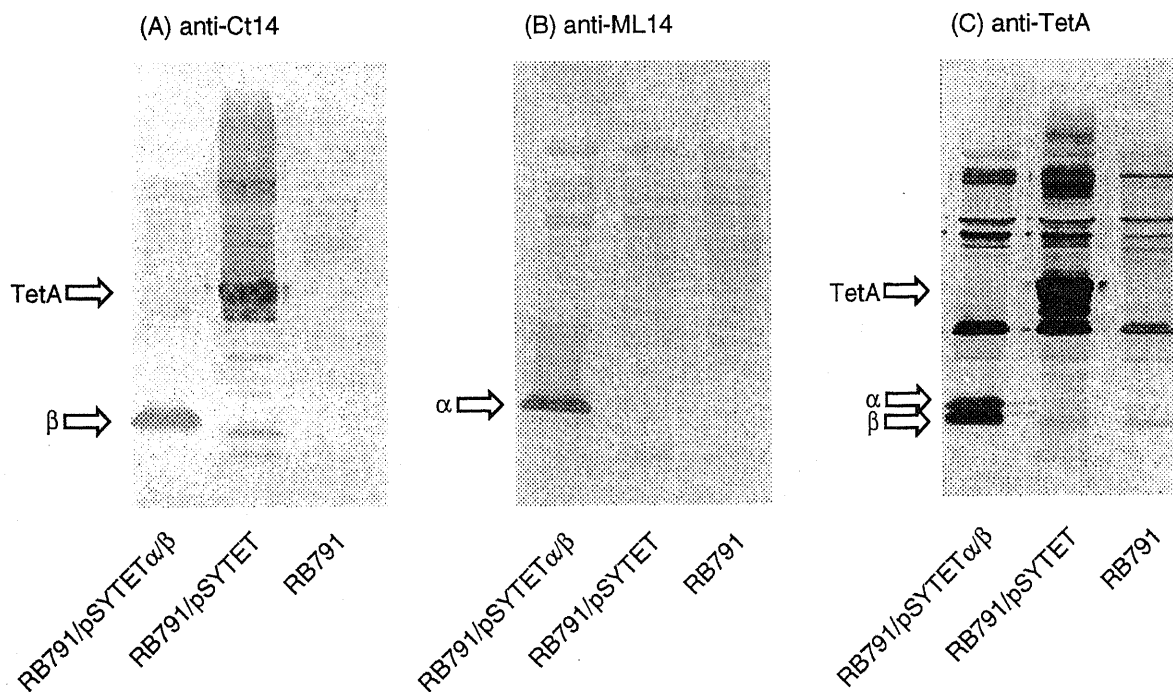


Figure 9-4. Detection of intact TetA, α domain peptides and β domain peptides by immunoblotting. French press vesicles (5 μg of protein) from RB791/pSYTET α/β , RB791/pSYTET and RB791 were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by immunoblotting using (A) anti-Ct14, (B) anti-ML14, or (C) anti-TetA.

第4節 二分割蛋白の機能

3種の分割発現プラスミドを保持する大腸菌株から調製された反転膜小胞へのテトラサイクリンの取り込みを測定した。Figure 9-5に示すように、 α 領域あるいは β 領域単独ではいずれもテトラサイクリン輸送を仲介することができないが、それらが同時に存在すると、顕著なテトラサイクリン輸送が観察され、TetAの約20%の活性を維持していた。pSYTET α/β 由来の反転膜小胞での分割蛋白発現量はpSYTET由来の反転膜小胞でのTetAの発現量に比べ著しく低い (Figure 9-3) ので、輸送活性をC末端量で補正すると、分割蛋白の輸送活性はTetAの約50%に相当することになる。また、テトラサイクリンに依存したプロトン輸送も認められ (data not shown)、共役した基質輸送能を保持していることが確認された。以上の結果はテトラサイクリン輸送には α 領域、 β 領域の2つの領域が必要であることを示すとともに、分割された蛋白が細胞質膜において分子集合し、機能的な複合体を形成していることを示している。

ここで、TetAおよび分割蛋白の輸送活性への抗体結合の影響を検討した。pSYTET由来の反転膜小胞、pSYTET α/β 由来の反転膜小胞 (5mg protein/ml) 100 μ lを、血清 (免疫前血清、anti-Ct14、anti-ML14、anti-TetA) 100 μ lと混合して、室温で1時間処理し、反転膜小胞を回収後輸送活性を測定したところ、未処理の反転膜小胞で観察された輸送活性と全く変化が認められなかった (data not shown)。同様に血清で処理し、超遠心で回収された反転膜小胞を可溶化後、Pansorbin cellと混和すると、TetAや分割蛋白がそれぞれ反応する抗体により免疫沈降されるので、輸送活性測定時に抗体が結合していないとは考えにくい。anti-Ct14およびanti-ML14のエピトープ部分は明らかに親水性領域であり、しかも反転膜小胞の外側にある。anti-Ct14がTetAおよび分割蛋白の輸送活性に影響しなかったこと、anti-ML14が分割蛋白の活性に影響しなかったことから、これらのエピトープを含む中央ループ領域 (ループ6-7) とC末端は機能に関与しない領域、また、輸送経路からは離れた領域と考えられる。また、anti-TetAが活性に影響を与えないことから、この血清中の抗体のエピトープは活性に関与しない領域であることが示唆される。

第5節 考察

本章では、tetA(B)遺伝子を二等分し、2つの遺伝子断片を別々にlacプロモーター支配下において発現させることを試みた。 α 領域、 β 領域それぞれの単独発現プラスミド、両領域の同時発現プラスミドを構築し、テトラサイクリン輸送活性、細胞質膜への組み込みについて検討した。

テトラサイクリン輸送活性に関しては、 α 領域あるいは β 領域単独ではテトラサイクリン輸送を仲介しないが、2つの領域が同時に存在することにより顕著なレベルの輸送活性が認められ (Figure 9-5)、機能には2つの領域が必要であることが分かった。また、この結果はTetAが二分割され、2つの領域が別々のポリペプチドとして作られても、細胞質膜において分子集合し、機能的な複合体を形成することを示している。これは α 領域と β 領域との間の相互作用を示しているが、最近、McMurry and Levyは類似の分割発現系を用いて、2つの α 領域の間に相互作用があることを示し、TetAが二量体として機能していることを述べている(405)。また、 α 領域と β 領域との間の相互作用は、pBR322にコードされるクラスCのTetAについて抑圧変異体の解析により示唆された(406)。

また、細胞質膜への組み込みについて、SDS-ポリアクリルアミドゲルのクマジー染色とanti-Ct14を用いたイムノプロットングにより検討したところ、 α 領域は比較的大量に発現し、 β 領域の存在、非存

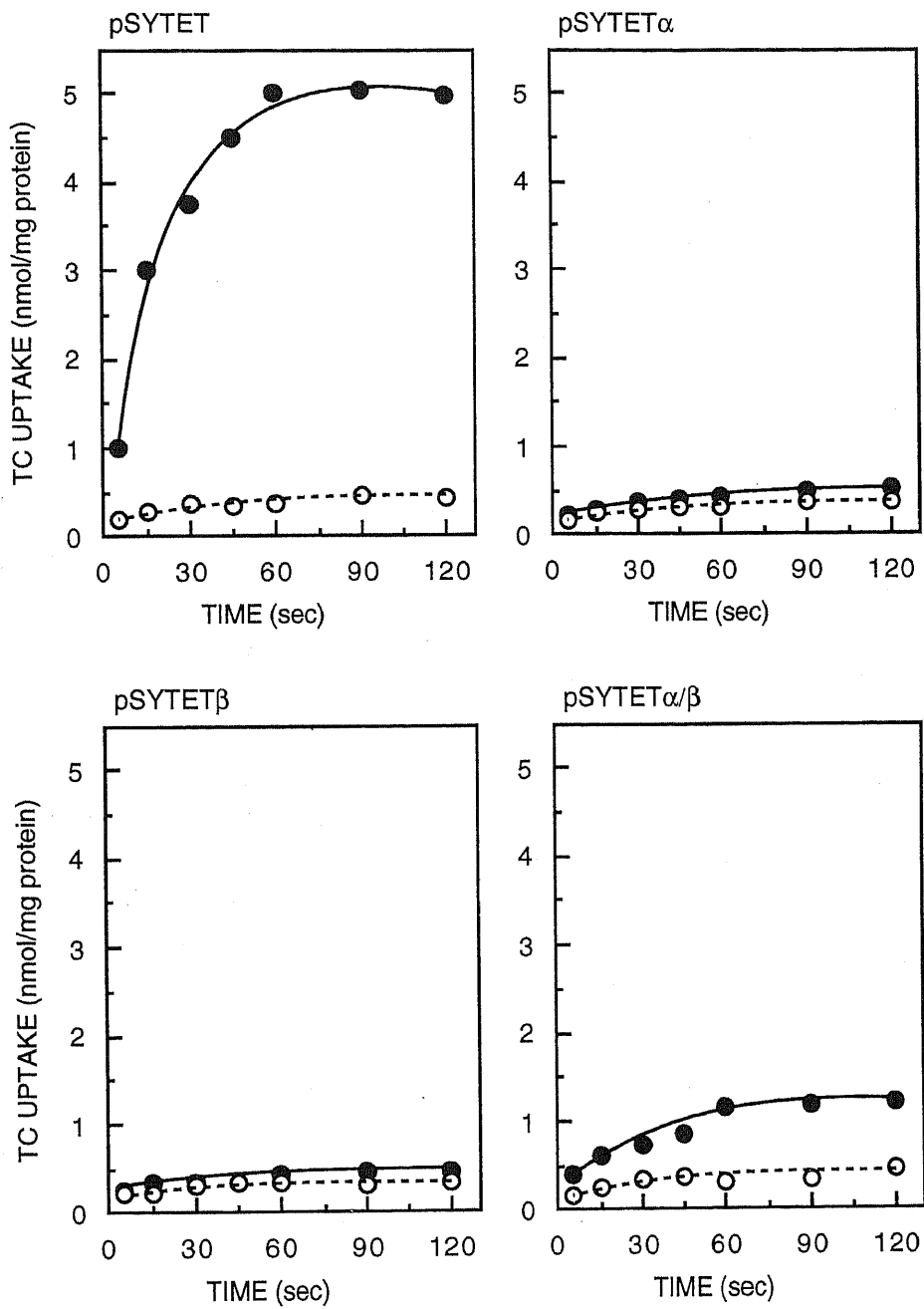


Figure 9-5. Tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* RB791 cells harboring pSYTET, pSYTET α , pSYTET β , or pSYTET α/β . Assays were performed in the presence of 10 μ M tetracycline and 50 μ M CoCl₂.

在にかかわらず膜へ組み込まれるのに対し、 β 領域はイムノブロッティングで検出されるが、ゲルのクマジー染色では認められなかった (Figure 9-3)。更に、 β 領域は α 領域が存在することにより組み込み量が約1.5倍増加することが分かり、 β 領域単独では不安定であることが示唆された。ところが、anti-ML14およびanti-TetAでイムノブロッティングを行ったところ、同時発現株から調製された反転膜小胞において α 領域と β 領域の量にそれほど差は見られなかった (Figure 9-4)。これに対し、 β 領域が α 領域に比べクマジー染色を受けにくい可能性、あるいはanti-ML14、anti-TetAが α 領域に対して反応性が低い可能性が考えられる。

これまで、二分割蛋白が活性を保持する例が幾つかの膜蛋白質において報告されている。大腸菌ラクトース輸送体は多くの分割蛋白が作成されている(407-410)。その結果、切断部位が親水性領域にあるとき、分割蛋白は活性を保持するが、切断部位が膜貫通領域にある場合には活性が消失することが見いだされ、膜貫通部分と親水性領域とを区別することに応用できる可能性を示している(410)。また、概してC末端側のペプチドはN末端側ペプチドよりも不安定であり、正菌体におけるその膜内存在量、安定性がN末端側ペプチドに依存していた。この結果は本研究の結果と一致しており、膜への組み込みのシグナルとなるような情報が主としてN末端側、おそらくは第1膜貫通領域近傍に含まれていることを示唆していると考えられる。そのほか、バクテリオロドプシン(411-413)、ロドプシン(414)、 β_2 アドレナリンレセプター(415)、ムスカリンレセプター(416)、 Na^+ チャンネル(417)、ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼ(418)、アデニル酸シクラーゼ(419)、酵母 α 因子輸送体STE6(420)、P-糖蛋白(421)、グルコース輸送体GLUT1(422)でも分割蛋白が作成され、いずれの場合も機能を保持していることが観察されている。このような性質は脂質二重層に半ば固定されている膜蛋白質に特徴的なものかもしれない。

分割蛋白は残基間の相対的な位置関係を推定することに応用することができる。例えば、 α 領域、 β 領域それぞれにCys残基をにとつずつ導入し、2価性SH架橋試薬によりそれらの間で架橋が形成されるかどうかを分子量の増加で簡単に判定することができる。この実験を系統的に行うことによっても立体構造に関する情報が得られると期待される。

また、近年蛋白分子のNMR解析技術が進展してきている。分割蛋白のそれぞれの断片への基質結合などを測定するのによい系となるかもしれない。また、分割蛋白の精製、再構成、3次元結晶化も興味ある課題である。

第1節 はじめに

テトラサイクリン系抗生物質は広域抗菌スペクトラムをもつ優れた薬剤であるが、テトラサイクリン耐性菌の蔓延によってその使用が制限されてきている。Table 2に示したように、テトラサイクリン耐性の主たる要因は、細胞質膜に存在するテトラサイクリン排出蛋白が仲介する、薬剤の菌体外への能動的排出である。現在臨床で使用されているテトラサイクリン系抗生物質（テトラサイクリン、ミノサイクリンなど）はこのような耐性菌に対して最早効力を発揮することができなくなっている。

近年、グリシルサイクリンと総称される、テトラサイクリン母核9位に修飾基（ジメチルグリシルアミド基）が導入された新規テトラサイクリン系抗生剤（Figure 10-1）が開発された(75)。グリシルサイクリンはテトラサイクリン感受性菌ばかりでなく、耐性菌に対しても高い抗菌力を発揮することが示されている(423-432)。それ故、特にTet(K)によりテトラサイクリン耐性が付与されているMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）に対して、新しい世代のテトラサイクリン系抗生剤として注目された。

本研究では、グリシルサイクリンの優れた抗菌活性の原因を、クラスBのテトラサイクリン排出蛋白（TetA(B)）を産生する大腸菌正菌体およびその反転膜小胞を用いて生化学的解析により明らかにした。

第2節 グリシルサイクリンの抗菌活性

まず、2種のグリシルサイクリン（DMG-DMDOT、DMG-MINO）の抗菌活性を確認するため、TetA(B)を産生する大腸菌株に対するグリシルサイクリンのMICを測定した（Table 10-1）。併せて、従来のテトラサイクリン系抗生剤（テトラサイクリン、ミノサイクリン）のMICも測定した。

Table 10-1. Drug resistance levels of *E. coli* W3104 cells and ones harboring pLGT2 carrying the class B tetracycline resistance determinant from the transposon Tn10.

Strain	Minimum inhibitory concentrations of: ($\mu\text{g/ml}$)			
	Tetracycline	Minocycline	DMG-DMDOT	DMG-MINO
W3104	0.8	0.8	0.8	0.8
W3104/pLGT2	200	25	0.8	0.8

その結果、TetA(B)はテトラサイクリン、ミノサイクリンに対して高い耐性を与えることができるが、DMG-DMDOT、DMG-MINOに対しては耐性を全く与えることができず、それらの優れた抗菌力を明らかにしている。

グラム陰性細菌由来のテトラサイクリン耐性因子は構造遺伝子 *tetA* と調節遺伝子 *tetR* とから成り、TetRへの基質の結合によりTetAの発現が誘導される（Figure 2）(29)。従って、2種のグリシルサイクリンに対してクラスBテトラサイクリン耐性因子が耐性を与えない原因として、グリシルサイクリンがTetRに結合できないために、TetAの発現が誘導されない可能性と、グリシルサイクリンはTetRに結合し、TetAの発現が誘導されるが、TetAがグリシルサイクリンを輸送基質として認識できない可能性の2つが考えられる。そこで、この2つの可能性について次に検討した。

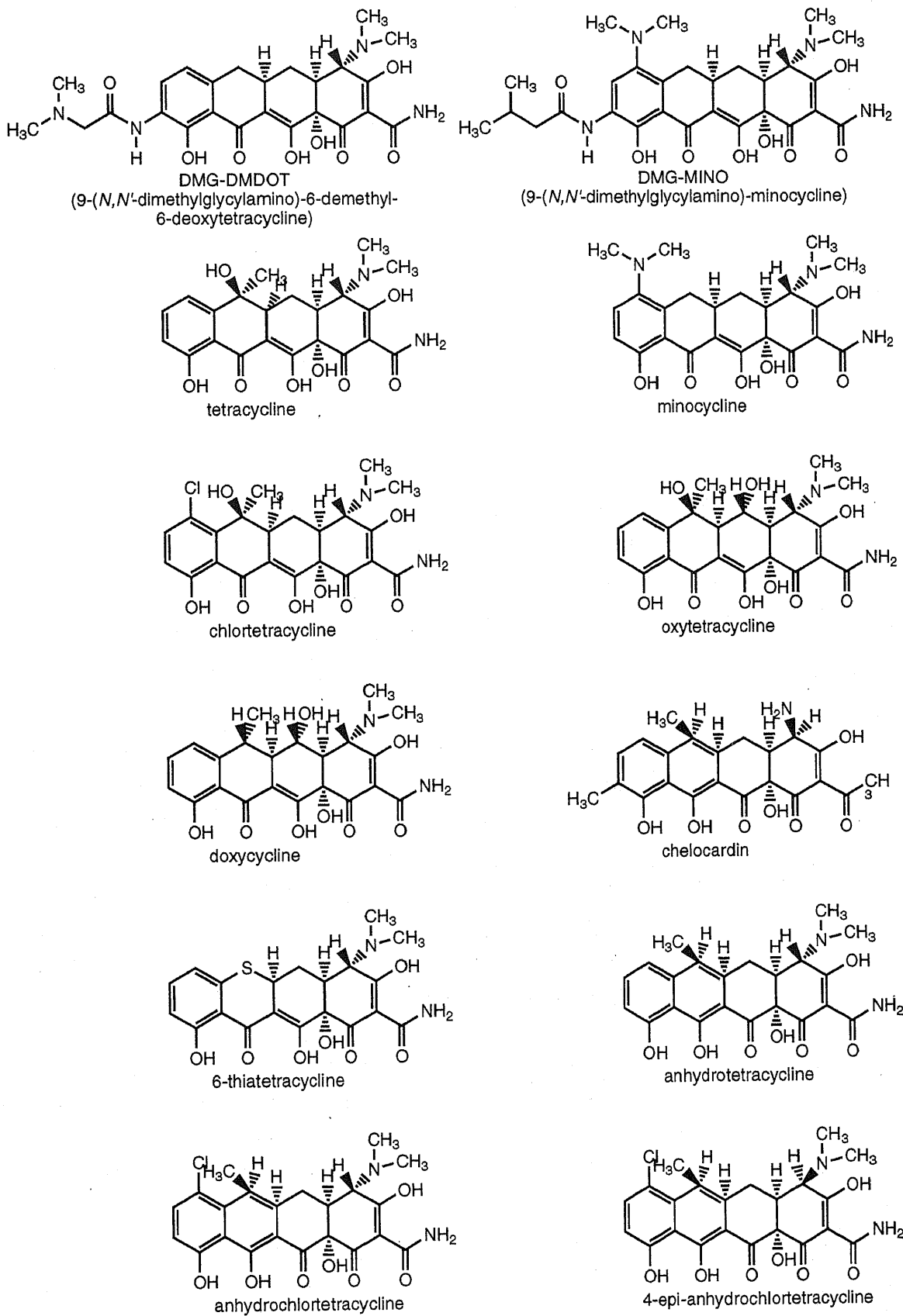


Figure 10-1. Chemical structures of glycytyclines and tetracycline derivatives.

第3節 グリシルサイクリンによるテトラサイクリン耐性遺伝子の発現誘導

まず、グリシルサイクリンがテトラサイクリン耐性遺伝子の発現を誘導するかどうかを検討した。クラスB耐性因子をもつプラスミドpLGT2を保持する大腸菌W3104株を $OD_{530}=0.4$ まで培養し、テトラサイクリン、ミノサイクリン、DMG-DMDOTあるいはDMG-MINOを終濃度0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 μ g/ml加えて更に2時間培養を続けた後、膜画分を単離した。10 μ gの蛋白を含む膜画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に用い、C末端特異抗体によるイムノブロットングを行い、TetA産生を確認した。Figure 10-2に示すように、テトラサイクリン、ミノサイクリンはクラスB耐性因子に耐性になること一致して、TetA(B)の産生を誘導している。テトラサイクリンよりもミノサイクリンの方が低濃度でTetAを大量に産生させることができ、誘導能において優れていると言える。一方、2種のグリシルサイクリンもTetA(B)の産生を誘導し、その能力はミノサイクリンに匹敵した。従って、グリシルサイクリンはTetRによって認識され、その基質となることが判明した。

第4節 輸送基質としてのグリシルサイクリンの評価

次に、pLGT2を保持する大腸菌W3104株より反転膜小胞を調製し、薬剤の取り込みを測定した。Figure 10-3には、テトラサイクリンあるいはDMG-DMDOTの反転膜小胞への取り込みが示されている。テトラサイクリンは良好基質としてTetA(B)によりよく輸送されるが、DMG-DMDOTは全く輸送されないことが分かる。従って、DMG-DMDOTの高い抗菌活性はテトラサイクリン排出蛋白がそれを輸送できないためであると言える。

TetA(B)がグリシルサイクリンを輸送できないことに対して、2つの可能性、すなわち、TetA(B)がグリシルサイクリンを認識しない可能性、TetA(B)がグリシルサイクリンを認識し結合しても、輸送反応が起こらない可能性が考えられる。そこで、反転膜小胞へのテトラサイクリン取り込みに対して、過剰量のグリシルサイクリンが影響を及ぼすかどうかを検討した。Figure 10-4はその結果であるが、10 μ Mのテトラサイクリンに対して100 μ MのDMG-DMDOTあるいはDMG-MINOが共存しても、テトラサイクリン取り込みはFigure 10-3の結果と比較してほとんど影響を受けていないことが分かる。一方、ミノサイクリンはTetA(B)の輸送基質となるが、これが100 μ M共存する場合には、顕著にテトラサイクリン取り込みが阻害されているのが分かる。以上の結果より、グリシルサイクリンはテトラサイクリン排出蛋白により認識されないために高い抗菌力を発揮すると言える。グリシルサイクリンやミノサイクリンが高濃度存在するとエネルギーなしのバックグラウンドの取り込みが上昇するが、これは薬剤の高い疎水性による膜障害性を反映しているものと思われる。特に、DMG-MINOで顕著である。

しかし、これに対しまたひとつの疑問が生じる。TetA(B)の真の輸送基質はテトラサイクリンと2価カチオンとのキレート体である(5)ので、グリシルサイクリンがテトラサイクリン排出蛋白により認識されないのは2価カチオンとキレート体を形成しないためであることも考えられる。テトラサイクリンは2価カチオンが存在しないところでは、360nm付近に極大吸収をもつが、2価カチオンの濃度上昇とともに極大吸収が長波長側に移動する(5,283)。これにより薬剤と2価カチオンとのキレート体の解離定数が求められる。テトラサイクリンと Co^{2+} とのキレート体形成において、その解離定数は23 μ Mであった。一方、DMG-DMDOTは350nm付近に極大吸収をもち、 Co^{2+} の濃度上昇に依存して、長波長側への極大吸収の移動が観察された (data not shown)。これにより解離定数は17 μ Mと計算され、テトラサイクリンと同様にキレート体を形成することが明らかになった。TetRも実はテトラサイクリンと2価カチオンとのキレート体を認識し結合する(433,434)ので、この結果は当然であるとも言える。従って、グリシルサイク

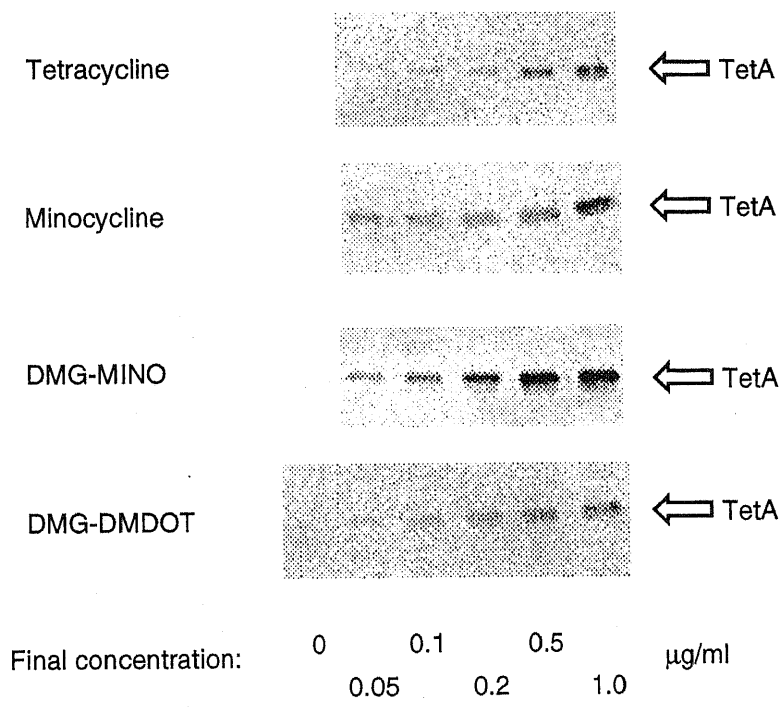


Figure 10-2. Induction of the *tet* gene expression by glycylicyclines. *E. coli* W3104 cells harboring pLGT2 carrying the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance determinant were incubated with the indicated concentrations of tetracycline, minocycline, DMG-MINO or DMG-DMDOT for 2 hr. Five µg of membrane proteins from each sample were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by immunoblotting using anti-Ct14 antiserum.

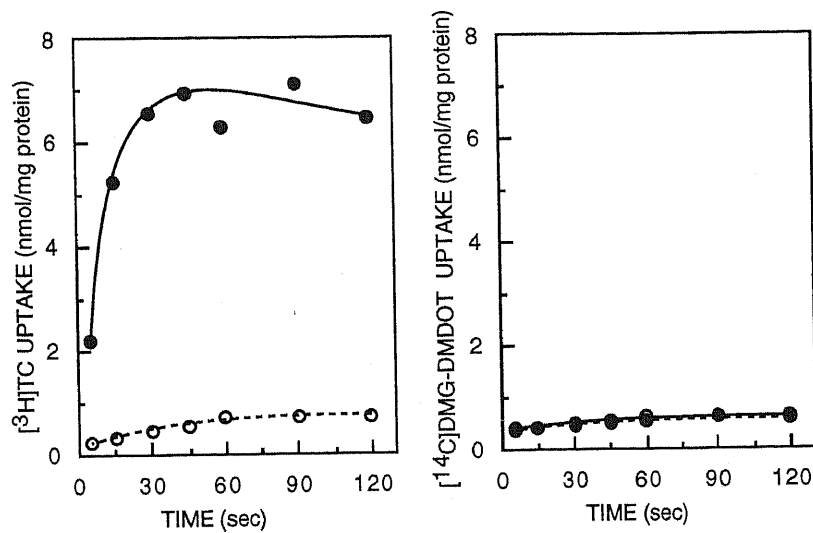


Figure 10-3. Uptake of tetracycline and DMG-DMDOT by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring pLGT2 carrying the entire *tetR* and *tetA* genes encoded by the transposon Tn10. Assays were performed in the presence of $10\ \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ tetracycline or $[^{14}\text{C}]$ DMG-DMDOT and $500\ \mu\text{M}$ CoCl_2 .

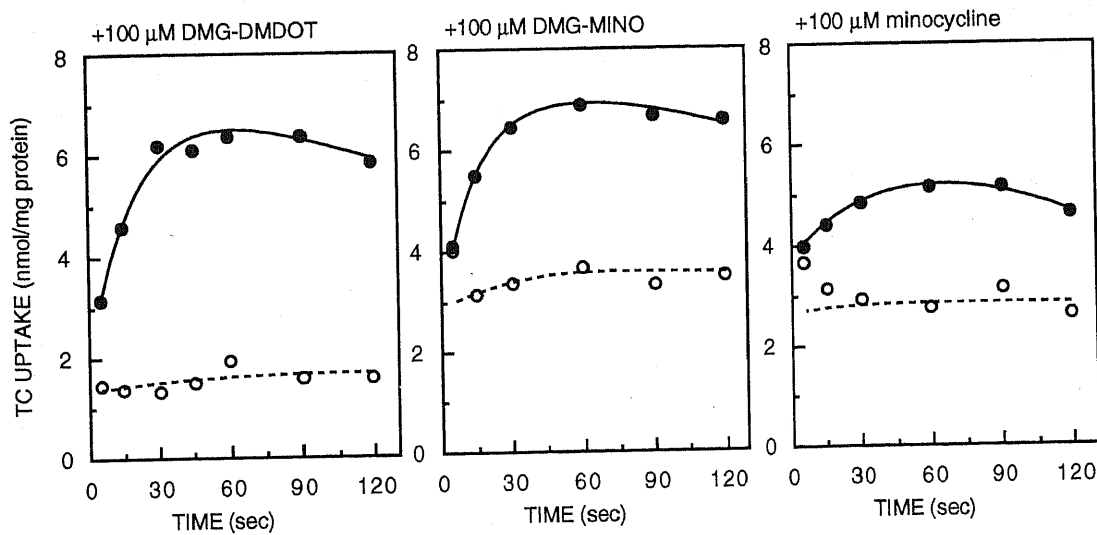


Figure 10-4. Effects of DMG-DMDOT, DMG-MINO and minocycline on tetracycline uptake by inverted membrane vesicles from *E. coli* W3104 cells harboring pLGT2. Assays were performed in the presence of $10\ \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ tetracycline, $100\ \mu\text{M}$ nonlabeled derivative and $500\ \mu\text{M}$ CoCl_2 .

リンは2価カチオンとのキレート体を形成するにもかかわらず、テトラサイクリン排出蛋白はそれを基質として認識できないと結論される。

第5節 考察

本章では、2種のグリシルサイクリン (DMG-DMDOT、DMG-MINO) が優れた抗菌活性を有する要因について明らかにした。その結果、グリシルサイクリンは、2価カチオンとのキレート体を形成し、TetRによって認識され、TetAの発現を誘導することができるにもかかわらず、TetAの輸送基質として認識されないことが見いだされた。従って、グリシルサイクリンの高い抗菌力は基質として認識されないことが原因であると結論される。

これまで多くのテトラサイクリン誘導体が開発されている。これらはその作用機作により2つのグループに分けられている(434)。ひとつは静菌的な作用をもつ典型的なテトラサイクリン系抗生物質であり、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、ミノサイクリン、ドキシサイクリン、オキシテトラサイクリンが含まれる。もうひとつは殺菌的作用をもつ非典型的なテトラサイクリン系物質であり、キロカルジン、アンヒドロテトラサイクリン、6-チアテトラサイクリン、アンヒドロクロルテトラサイクリン、4-エピ-アンヒドロテトラサイクリンが含まれる(構造式はFigure 10-1)。後者のグループはテトラサイクリン母核が修飾されている。これらはリボゾームを標的とせず、細胞質膜を障害し抗菌力を発揮する。しかし、このために重篤な副作用がもたらされ、臨床使用されるに至っていない(25)。グリシルサイクリン (DMG-DMDOT、DMG-MINO) は化学構造式から第一のグループに属するが、テトラサイクリン母核9位にジメチルグリシルアミド基をもつ点において特徴的である。これまで9位に修飾基が導入された誘導体は、非典型的誘導体のキロカルジンが9位にメチル基を持つのを除いて、典型的なテトラサイクリンにはなく、この部位の修飾が高い抗菌力を発揮するのに効果的であると言える。DMG-DMDOTおよびDMG-MINOは、恐らくFigure 10-4からも示唆された高い膜障害性により、臨床使用することができなくなったが、テトラサイクリン母核9位の修飾が有効であるという発見は、新たな誘導体開発の可能性を依然残すものと期待される。また、新たなテトラサイクリン系抗生物質としては、耐性因子を誘導しないもの、膜障害性が低いものが望まれる。

細菌のテトラサイクリン耐性の主たる要因となっているテトラサイクリン排出蛋白 (TetA) は細胞質膜に存在し、 H^+ との1対1のアンチポートにより薬剤を菌体外に排出している(25)。TetAは、アミノ酸一次配列のハイドロパシー解析等により、細胞質膜を12回貫通する二次構造が推定されている (Figure 3) (34-38)。これは生物界に普遍的に存在する二次性能動輸送体に共通の構造である(43-48)。更に詳細に様々な二次性能動輸送体のアミノ酸配列を比較すると、輸送基質、共役方法にかかわらず保存されるアミノ酸配列モチーフが数種存在することに気付く。このことは、これらモチーフがすべての二次性能動輸送体において、共通の役割を担っていることを示唆している。TetAは細菌の蛋白であり、特定の宿主株を必要としないなど、遺伝子操作、生化学的解析に好都合である。TetAにもこのようなアミノ酸配列モチーフが保存されているので、本蛋白での解析結果は二次性能動輸送体に広く受け入れられるものと期待される。

本研究ではまず、二次性能動輸送体に保存されるアミノ酸配列モチーフの中でも最も明確なモチーフ、第2膜貫通領域と第3膜貫通領域を結ぶ細胞質親水性領域 (ループ2-3) に存在する、Gly-X-X-X-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Argの役割に関する研究を行った (第2章) (279)。その手段として、ループ2-3の10アミノ酸残基すべてを標的として、合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異導入を行い、種々のアミノ酸置換を導入した。変異蛋白の性質を見るため、薬剤耐性レベルの測定、反転膜小胞でのテトラサイクリン輸送活性の測定を行い、野生型蛋白の性質と比較した。その結果、この領域に4つの重要残基 (Gly62、Asp66、Gly69、Arg70) を見いだした。そのうち、2つの保存性Gly残基はこのループの構造形成、維持に重要であった。中央の保存性Asp66残基は、正味1価カチオンのテトラサイクリン-2価カチオンキレート体が輸送糧の最初の段階において相互作用する部位であると推察され、その負電荷が機能に必須の役割を果たしている(49)。また、このモチーフには塩基性残基が3つ保存され、ループ2-3は全体としてポリカチオニックな性質を持っている。そのうちArg67残基およびArg71残基はアミノ酸置換を導入しても野生型とあまり変わらない性質を保持し、機能に必須ではなかった。Arg70残基は明らかにこれらとは対照的であった。第2章ではArg70残基をLys、Ala、Ser、Asp、LeuおよびTrpに置換した結果、Lys変異体のみ野生型のおよそ30%の輸送活性を維持していたので、70位の正電荷が機能に重要であると結論した。第3章でArg70残基のCys変異体を作成したところ、側鎖が類似するAla変異体あるいはSer変異体よりも高い輸送活性をもち、Lys変異体に近い性質を示すことが明らかになった。この原因について、Cys残基側鎖のSH基が重金属イオンと高い親和性をもつことに着目し、 Hg^{2+} のテトラサイクリン輸送活性への影響を検討した。野生型、Lys変異体およびAla変異体の輸送活性は Hg^{2+} (10 μM) により影響されなかったが、Cys変異体の輸送活性は顕著に上昇し、輸送の初速で約3倍の活性化が見られた。しかも、この条件においてLys変異体の活性よりも高くなっていた。 Hg^{2+} による活性化はSH修飾試薬の前処理により起こらなくなること、SH修飾試薬の70位Cys残基への結合に対して Hg^{2+} が拮抗的に作用することから、 Hg^{2+} の標的は70位Cys残基側鎖のSH基であることは明らかである。従って、Cys70変異体は Hg^{2+} がCys残基側鎖のSH基に結合してメルカプチド ($-SHg^+$) を形成し、正荷電側鎖として機能していることが示された。この結果から、通常の条件で測定されたCys70変異体の高い輸送活性は、アッセイ溶液中の Co^{2+} がメルカプチド形成に寄与しているためであると結論した(344)。

ループ2-3の10残基のうちGly62残基、Asp66残基を除いてCys変異体を構築したので、SH修飾試薬の効果を検討した。SH修飾試薬としてN-エチルマレイミド (NEM) を用いたところ、輸送活性が阻害されるのはSer65残基のCys変異体とArg70残基のCys変異体のみであった(279,344)。Cys65変異体はNEMによりほぼ完全に活性が阻害されるのに対し、NEMよりも修飾側鎖が小さいメチルメタンチオスルフォネート (MMTS) では阻害の程度は大きく低下し、約60%の活性が残存した(49)。65位のAla、Met変異体が活性

を残存し、Phe変異体が失活している⁽²³¹⁾ことも考慮すると、65位変異体の輸送活性は側鎖容積に依存していると言える。一方、Cys70変異体の輸送活性はNEMでもMMTSでもほぼ90%阻害され、側鎖容積には依存していなかった。むしろ、SH基へのCo²⁺結合が阻害されたためであると考えられた⁽³⁴⁴⁾。以上の部位特異的変異導入解析の結果から、ループ2-3は、Asp66残基の負電荷を基質との一時的な相互作用部位とする、基質輸送経路のゲートとして機能していると推定した^(49,279,231-233)。

第4章では更にCys70変異体を用いて、その抑圧変異体の解析を行った⁽³⁴⁷⁾。Cys70変異体は中程度のテトラサイクリン耐性を与えることができるが、第6膜貫通領域のThr171残基がSerに置換されることで、野生型レベルの耐性を与えることができるようになることが明らかになった。Thr171残基の部位特異的変異導入の結果、Cys70変異を抑圧し、耐性レベルを上昇させるには171位のアミノ酸残基の側鎖がThrよりも小さくなる必要があることが明らかにされた。一方、Ser171変異は70位の様々な変異に対して一様に耐性上昇効果を示し、推定二次構造からも分かるように70位と171位とは立体構造上近傍にはないと推察された。171位残基の置換は野生型に対しても輸送の素過程に影響を与えることから、蛋白構造に微妙な変化をもたらしていることが示唆される。このことと70位変異を抑圧するためには171残基はThrよりも小さい側鎖をもつことを考慮すると、抑圧変異体においては171位側鎖の容積変化が蛋白のコンフォメーション変化を誘起し、その変化が70位近傍に伝達されていると考えられた。この際、70位近傍の正電荷残基が失われた70位の正電荷の機能を代替している可能性を挙げ、Arg67残基およびArg71残基の置換が171位変異による抑圧効果に及ぼす影響について更に検討した。種々の変異体を構築したところ、Ala70/Cys71/Ser171三重変異体が特徴的な性質を示すことが明らかになった。すなわち、この変異体のみ、Hg²⁺によりテトラサイクリン輸送の初速が約3倍上昇した。Cys71単独変異体、Cys71/Ser171二重変異体の輸送活性はむしろHg²⁺により阻害される傾向にあったことからそれが顕著であることが分かる。従って、抑圧変異体においては、70位の正電荷の代わりに71位の正電荷が機能を代替していると結論した。

以上により、70位の正電荷の重要性が示された。輸送基質が1価カチオンであることから、70位の正電荷が基質と直接相互作用する可能性は低いと考えられた。そこで、70位の正電荷が近傍の負電荷と相互作用する可能性を考えた。この候補となったのは、ループ2-3に隣接するループ4-5のAsp120残基である (Figure 3)。この残基は以前の研究によりループ2-3のAsp66残基に次いで機能に重要であることが示されたものであり⁽³⁴⁸⁾、また二次性能動輸送体に保存される残基である⁽⁴⁴⁾ということからも注目された。Ala70/Asn120二重変異体の輸送活性はAla70単独変異体の輸送活性よりも著しく上昇しており、70位正電荷と120位負電荷との間での相互作用が示唆された。ループ2-3が基質輸送経路の入り口ゲートであることを考慮すると、70位と120位との相互作用の形成と解離がゲートの開閉と密接に関連している可能性が考えられる (第5章)。

第6章では、膜貫通領域に存在する必須酸性残基Asp285残基のAsn変異体から得られた抑圧変異体の解析を行った⁽³⁵⁹⁾。膜貫通領域にはAsp285残基の他、Asp15残基とAsp84残基が存在するが、Asn285変異体のみテトラサイクリン耐性を全く与えなくなることから、285位のAsp残基は特に重要である⁽⁵¹⁾。Asn285変異体から分離された野生型レベルのテトラサイクリン耐性を与える抑圧変異体は、第7膜貫通領域のAla220残基のGlu置換を第二変異としてもっていた。従って、負電荷の消失が新たな負電荷の導入により機能相補が生じたことを示している。また、220位も285位も膜貫通領域のほぼ中央に位置すると推定され (Figure 3)、両者が立体構造上極近傍に位置することが推測された。220位の部位特異置換によりAsn285変異を抑圧するためには酸性残基の導入が必要であることが分かった^(359,360)。しかし、220位の酸性残基はLys285変異体の耐性レベルを上昇させることができず、220位の負電荷と285位の正電荷とが相互作用していることが示唆された⁽³⁶⁰⁾。また、第二変異の位置特異性について検討したところ、220位だけでなく、224位あるいは227位のGlu変異もAsn285変異を抑圧し、顕著に耐性レベルを

上昇させ、その抑圧効果の程度は220位から離れるに従って低下していた(360)。これら3つの部位は第7膜貫通領域の同一側面上に位置し、この側面が基質輸送経路を構成していることが示唆された。以上の部位特異的変異導入解析、抑圧変異体の解析により、テトラサイクリン/H⁺アンチポートの分子機構に関して、ゲート付き単一チャンネルによる直接共役説を提唱した(Figure 6-5)。このモデルの原理は、輸送基質と共役イオンの透過経路(チャンネル)は共通で、膜内に重複した結合部位をもち、それらの結合が拮抗していること、チャンネルの両脇(細胞質側、ペリプラズム側)には親水性ループ領域によって構成されるゲートがあり、交互に開閉すること、である。本研究で標的としたAsp285残基は膜内の必須残基であり、基質およびH⁺の認識、結合、輸送に関与していると考えられる。また、ループ2-3が細胞質側ゲートの中心的な役割を担っており、Asp66残基の負電荷が基質との初発相互作用部位であると考えられている。更に、Arg70残基とループ4-5のAsp120残基の相互作用がゲートの開閉と密接に関係していると考えられる。

しかしながら、このようなモデルを証明するためには、蛋白の立体構造の解明が必要である。現在、立体構造が解明された膜蛋白質は限られた例しかない(361-367)。膜蛋白質は疎水性が強く、3次元結晶を形成しにくいことがその主たる原因として考えられる。本研究では、TetAの3次元立体構造解析に向け、目的蛋白を大量に得るため、大量発現系の構築を行った(394)。また、蛋白の強い疎水性を改善するために3次元構造既知の親水性酵素の融合蛋白の大量発現系の構築も併せて行うことにした。第7章ではまず、TetAの大量発現系を構築し、迅速且つ簡便な大量精製法を確立した。また、精製された大腸菌F₀F₁-ATPaseをエネルギー供給源として用いることでTetAの機能的再構成系を初めて成功させた(394)。これにより、TetAのみがテトラサイクリン輸送を仲介する因子であることが明らかになり、本蛋白の物理化学的研究への道が開けたと言える。第8章ではとジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)、β-ラクタマーゼとの融合蛋白の大量発現系を構築した。DHFR融合蛋白は2種類、β-ラクタマーゼ融合蛋白は1種類作成し、いずれもテトラサイクリン輸送活性を保持し、DHFR活性あるいはβ-ラクタマーゼ活性も保持していたので、親水性酵素の融合がTetA部分の構造にあまり影響を与えていないと判断し、3次元結晶化を目指すことにした。現在、DHFR融合蛋白についてはメトトレキセート-アガロースを用いたアフィニティ精製が可能となっている。これらは3次元結晶構造解析に最も期待されるものである。

続く第9章では上記大量発現系を用いてTetAの二分割蛋白の発現系を構築した(435)。その結果、TetAは二分割されても顕著なテトラサイクリン輸送活性を保持し、別々のポリペプチドとして発現されても膜内において分子集合し、機能的な複合体を形成することが見いだされた。この分割蛋白も3次元結晶化の材料として興味深い。また、分割蛋白にCys変異を導入し、2価性SH修飾試薬で架橋を形成させることにより、アミノ酸残基間の相対的な位置関係を解明することが可能であり、立体構造に関する情報が得られるものと期待される。

最後の第10章はTetAの機能解析ではなく、新規テトラサイクリン系抗生剤の抗菌力の評価とその要因についての解析を行った(436)。その結果、グリシルサイクリンと総称される新規抗生剤が排出によるテトラサイクリン耐性に有効であるのは、薬剤がTetAによって認識されないことが原因であることが分かった。グリシルサイクリンは依然2価カチオンとのキレート体を形成し、調節蛋白TetRにより認識されるので、これらの点を改善した新規薬剤の開発が望まれる。また、グリシルサイクリンはテトラサイクリン母核9位に初めて修飾基が導入された典型的テトラサイクリン誘導体であり、今後の開発にも重要な情報が得られたものとする。

謝辞

本研究を行うに当たり、終始御指導と御助言を賜りました千葉大学薬学部澤井哲夫教授、山口明人助教授に心より感謝申し上げます。

精製、再構成実験を行うに当たり、御指導、御助言を賜り、大腸菌DK8/pBWU13株を御分与下さいました大阪大学産業科学研究所二井將光教授、森山芳則博士（現広島大学理学部助教授）に深く感謝申し上げます。大腸菌HB101/pTP70-1株を御分与下さいました通商産業省工業技術院巖倉正寛博士に感謝いたします。

本研究の一部は大谷内理香氏、丹羽晶子氏、本柳綾子氏との共同で行われました。諸氏に深い感謝の意を表します。

数々の御助言、御協力を頂きました塚本喜久雄博士（現名古屋市立大学薬学部講師）、小野信和氏、赤坂高明氏、額賀路嘉氏、坂井映美氏、仲谷麻里子氏、木村友美氏をはじめ、微生物薬品化学研究室員の方々に感謝いたします。

参考文献

- 1) Krämer, R. (1994) Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* **1185**, 1-34.
- 2) Levy, S. B., and McMurry, L. (1978) Plasmid-mediated tetracycline resistance involves alternative transport systems for tetracycline. *Nature* **276**, 90-92.
- 3) McMurry, L., Petrucci, R. E., Jr., and Levy, S. B. (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3974-3977.
- 4) Kaneko, M., Yamaguchi, A., and Sawai, T. (1985) Energetics of tetracycline efflux system encoded by Tn10 in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **193**, 194-198.
- 5) Yamaguchi, A., Udagawa, T., and Sawai, T. (1990) Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 4809-4813.
- 6) Neu, H. C. (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064-1073.
- 7) Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375-382.
- 8) Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382-388.
- 9) Spratt, B. G. (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* **264**, 388-393.
- 10) Levy, S. B. (1992) Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 695-703.
- 11) 染谷雄一、山口明人 (1995) 細菌の薬剤排出蛋白 日本細菌学雑誌 50, 403-421.
- 12) Tsuruo, T. (1988) Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **79**, 285-296.
- 13) Endicott, J. A., and Ling, V. (1989) The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 137-171.
- 14) Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 385-427.
- 15) Cole, S. P. C., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. V., and Deeley, R. G. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-1654.
- 16) Grant, C. E., Valdimarsson, G., Hipfner, D. R., Almquist, K. C., Cole, S. P. C., and Deeley, R. G. (1994) Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* **54**, 357-361.
- 17) Zaman, G. J. R., Flens, M. J., van Leusden, M. R., de Haas, M., Mulder, H. S., Lankelma, J., Pinedo, H. M., Scheper, R. J., Baas, F., Broxterman, H. J., and Borst, P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8822-8826.
- 18) Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Cole, S. P. C., Deeley, R. G., and Keppler, D. (1994) The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.* **269**, 27807-27810.
- 19) Scheper, R. J., Broxterman, H. J., Sceffer, G. L., Kaaijk, P., Dalton, W. S., van Heijningen, T. H. M., van Kalken, C. K., Slovak, M. L., de Vries, E. G. E., van der Valk, P., Meijer, C. J. L. M., and Pinedo, H. M. (1993) Overexpression of a M_r 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* **53**, 1475-1479.
- 20) Slovak, M. L., Ho, J. P., Cole, S. P. C., Deeley, R. G., Greenberger, L., de Vries, E. G. E., Broxterman, H. J., Scheffer, G. L., and Scheper, R. J. (1995) The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res.* **55**, 4214-4219.
- 21) Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Privé, G. G., Eisenberg, D., Brecha, N., and Edwards, R. H. (1992) A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encoded a vesicular amine transporter. *Cell* **70**, 539-551.
- 22) Moriyama, Y., Amakatsu, K., and Futai, M. (1993) Uptake of the neurotoxin, 4-methyl-phenylpyridinium, into chromaffin granules and synaptic vesicles: A proton gradient drives its uptake through monoamine transporter. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 271-277.

- 23) Gründemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Veyhl, M., and Koepsell, H. (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**, 549-552.
- 24) Levy, S. B., McMurry, L. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., and Taylor, D. E. (1989) Nomenclature for tetracycline resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1373-1374.
- 25) Chopra, I., Hawkey, P. M., and Hinton, M. (1992) Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrobial Chemother.* **29**, 245-277.
- 26) Khan, S. A., and Novick, R. P. (1983) *Plasmid* **10**, 251-259.
- 27) Hoshino, T., Ikeda, T., Tomizuka, N., and Furukawa, K. (1985) Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pTHT15, a thermophilic *Bacillus* plasmid: comparison with staphylococcal Tc^R controls. *Gene* **37**, 131-138.
- 28) Noguchi, N., Aoki, T., Sasatsu, M., Kono, M., Shishido, K., and Ando, T. (1986) Determination of the complete nucleotide sequence of pNS1, a staphylococcal tetracycline-resistance plasmid propagated in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **37**, 283-288.
- 29) Hillen, W., and Berens, C. (1994) *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 345-369.
- 30) Izaki, K., and Arima, K. (1963) Disappearance of oxytetracycline accumulation in the cells of multiple drug resistant *Escherichia coli*. *Nature* **200**, 384-385.
- 31) Yamaguchi, A., Ohmori, H., Kaneko-Ohdera, M., Nomura, T., and Sawai, T. (1991) DpH-dependent accumulation of tetracycline in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 53-56.
- 32) Chopra, I., and Howe, T. G. B. (1978) Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microbiol. Rev.* **42**, 707-724.
- 33) Jones, J. G., and Morrison, G. A. (1962) The bacteriostatic actions of tetracycline and oxytetracycline. *J. Pharm. Pharmacol.* **14**, 808-824.
- 34) Hillen, W., and Schollmeier, K. (1983) Nucleotide sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene. *Nucleic Acids Res.* **11**, 525-539.
- 35) Nguyen, T. T., Postle, K., and Bertrand, K. P. (1983) Sequence homology between the tetracycline-resistance determinants of Tn10 and pBR322. *Gene* **25**, 83-92.
- 36) Eckert, B., and Beck, C. F. (1989) Topology of the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein within the inner membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 11663-11670.
- 37) Yamaguchi, A., Adachi, K., and Sawai, T. (1990) Orientation of the carboxy terminus of the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **265**, 17-19.
- 38) Allard, J. D., and Bertrand, K. P. (1992) Membrane topology of the pBR322 tetracycline resistance protein: TetA-PhoA gene fusions and implications for the mechanism of TetA membrane insertion. *J. Biol. Chem.* **267**, 17809-17819.
- 39) Doolittle, R. F. (1981) Similar amino acid sequences: Chance or common ancestry? *Science* **214**, 149-159.
- 40) Rubin, R. A., Levy, S. B., Heinrikson, R. L., and Kézdy, F. J. (1990) Gene duplication in the evolution of the two complementing domains of Gram-negative bacterial tetracycline efflux proteins. *Gene* **87**, 7-13.
- 41) Guay, G. G., Khan, S. A., and Rothstein, D. M. (1993) The tet(K) gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. *Plasmid* **30**, 163-166.
- 42) Sheridan, R. P., and Chopra, I. (1991) Origin of tetracycline efflux proteins: conclusions from nucleotide sequence analysis. *Mol. Microbiol.* **5**, 895-900.
- 43) Maiden, M. C. J., Davis, E. O., Baldwin, S. A., Moore, D. C. M., and Henderson, P. J. F. (1987) Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* **325**, 641-643.
- 44) Henderson, P. J. F. (1990) Proton-linked sugar transport systems in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 525-569.
- 45) Griffith, J. K., Baker, M. E., Rouch, D. A., Page, M. G., Skurray, R. A., Paulsen, I. T., Chater, K. F., Baldwin, S. A., and Henderson, P. J. F. (1992) Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 684-695.
- 46) Henderson, P. J. F. (1993) The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 708-721.
- 47) Marger, M. D., and Saier, M. H., Jr. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 13-20.
- 48) Goswitz, V. C., and Brooker, R. J. (1995) Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily. *Protein Sci.* **4**, 534-537.

- 49) Yamaguchi, A., Ono, N., Akasaka, T., Noumi, T., and Sawai, T. (1990) Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon, Tn10: The role of the conserved dipeptide, Ser⁶⁵-Asp⁶⁶, in tetracycline transport. *J. Biol. Chem.* **265**, 15525-15530.
- 50) Chopra, I. (1986) Genetic and biochemical basis of tetracycline resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**, Suppl. C, 51-56.
- 51) Yamaguchi, A., Akasaka, T., Ono, N., Someya, Y., Nakatani, M., and Sawai, T. (1992) Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by transposon Tn10: Roles of the aspartyl residues located in the putative transmembrane helices. *J. Biol. Chem.* **267**, 7490-7498.
- 52) Yamaguchi, A., Adachi, K., Akasaka, T., Ono, N., and Sawai, T. (1991) Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by transposon a Tn10: Histidine 257 plays an essential role in H⁺ translocation. *J. Biol. Chem.* **266**, 6045-6051.
- 53) Yamaguchi, A., Samajima, T., Kimura, T., and Sawai, T. His-257 is a uniquely important histidine residue for tetracycline/H⁺ antiport function but not mandatory for full activity of the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter. (submitted for publication)
- 54) Püttner, I. B., Sarker, H. K., Poonian, M. S., and Kaback, H. R. (1986) *Lac* permease of *Escherichia coli*: Histidine-205 and histidine-322 play different roles in lactose/H⁺ symport. *Biochemistry* **25**, 4483-4485.
- 55) Carrasco, N., Antes, L. M., Poonian, M. S., and Kaback, H. R. (1986) *Lac* permease of *Escherichia coli*: Histidine-322 and glutamic acid-325 may be components of a charge-relay system. *Biochemistry* **25**, 4486-4488.
- 56) Menick, D. R., Carrasco, N., Antes, L., Patel, L., and Kaback, H. R. (1987) *lac* permease of *Escherichia coli*: Arginine-302 as a component of the postulated proton relay. *Biochemistry* **26**, 6638-6644.
- 57) Püttner, I. B., Sarker, H. K., Padan, E., Lolkema, J. S., and Kaback, H. R. (1989) Characterization of site-directed mutants in the *lac* permease of *Escherichia coli*. 1. Replacement of histidine residues. *Biochemistry* **28**, 2525-2533.
- 58) Carrasco, N., Püttner, I. B., Antes, L. M., Lee, J. A., Larigan, J. D., Lolkema, J. S., Roepe, P. D., and Kaback, H. R. (1989) Characterization of site-directed mutants in the *lac* permease of *Escherichia coli*. 2. Glutamate-325 replacements. *Biochemistry* **28**, 2533-2539.
- 59) Lee, J. A., Püttner, I. B., and Kaback, H. R. (1989) Effect of distance and orientation between arginine-302, histidine-322, and glutamate-325 on the activity of *lac* permease from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **28**, 2540-2544.
- 60) King, S. C., and Wilson, T. H. (1989) Galactoside-dependent proton transport by mutants of the *Escherichia coli* lactose carrier: Replacement of histidine 322 by tyrosine or phenylalanine. *J. Biol. Chem.* **264**, 7390-7394.
- 61) King, S. C., and Wilson, T. H. (1989) Galactoside-dependent proton transport by mutants of the *Escherichia coli* lactose carrier: substitution of tyrosine for histidine-322 and of leucine for Ser-306. *Biochim. Biophys. Acta* **982**, 253-264.
- 62) King, S. C., and Wilson, T. H. (1990) Sensitivity of efflux-driven carrier turnover to external pH in mutants of the *Escherichia coli* lactose carrier that have tyrosine or phenylalanine substituted for histidine-322: A comparison of lactose and melibiose. *J. Biol. Chem.* **265**, 3153-3160.
- 63) Franco, P. J., and Brooker, R. J. (1991) Evidence that the asparagine 322 mutant of the lactose permease transports protons and lactose with a normal stoichiometry and accumulates lactose against a concentration gradient. *J. Biol. Chem.* **266**, 6693-6699.
- 64) Yamaguchi, A., Akasaka, T., Kimura, T., Sakai, T., Adachi, Y., and Sawai, T. (1993) Role of the conserved quartets of residues located in the N- and C-terminal halves of the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline /H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**, 5698-5704.
- 65) Yamaguchi, A., Samejima, T., Adachi, Y., Akasaka, T., Sakai, T., and Sawai, T. Site-directed mutagenesis of the His-257 residue to 19 different amino acid residues. (unpublished data)
- 66) Coleman, D. C., and Foster, T. J. (1981) Analysis of the reduction in expression of tetracycline resistance determined transposon Tn10 in the multicopy state. *Mol. Gen. Genet.* **182**, 171-177.
- 67) Moyed, H. S., Nguyen, T. T., and Bertrand, K. P. (1983) Multicopy Tn10 *tet* plasmids confer sensitivity to induction of *tet* gene expression. *J. Bacteriol.* **155**, 549-556.

- 68) Moyed, H. S., and Bertrand, K. P. (1983) Mutations in multicopy Tn10 tet plasmids that confer resistance to inhibitory effects of inducers of tet gene expression. *J. Bacteriol.* **155**, 557-564.
- 69) Eckert, B., and Beck, C. F. (1989) Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J. Bacteriol.* **171**, 3557-3559.
- 70) Curiale, M. S., and Levy, S. B. (1982) Two complementary groups mediate tetracycline resistance determined by Tn10. *J. Bacteriol.* **151**, 209-215.
- 71) Curiale, M. S., McMurphy, L. M., and Levy, S. B. (1984) Intracistronic complementation of the tetracycline resistance membrane protein of Tn10. *J. Bacteriol.* **157**, 211-217.
- 72) Hickman, R. K., and Levy, S. B. (1988) Evidence that TET protein functions as a multimer in the inner membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 1715-1720.
- 73) Rubin, R. A., and Levy, S. B. (1990) Interdomain hybrid Tet proteins confer tetracycline resistance only when they are derived from closely related members of the tet gene family. *J. Bacteriol.* **172**, 2303-2312.
- 74) Rubin, R. A., and Levy, S. B. (1991) Tet protein domains interact productively to mediate tetracycline resistance when present on separate polypeptides. *J. Bacteriol.* **173**, 4503-4509.
- 75) Sum, P.-E., Lee, V. J., Testa, R. T., Hlavka, J. J., Ellestad, G. A., Bloom, J. D., Gluzman, Y., and Tally, F. P. (1994) Glycylcyclines. 1. A new generation of potent antibacterial agents through modification of 9-aminotetracycline. *J. Med. Chem.* **37**, 184-488.
- 76) Dorman, C. J., Foster, T. J., and Shaw, W. V. (1986) Nucleotide sequence of the R26 chloramphenicol resistance determinant and identification of its gene product. *Gene* **41**, 349-353.
- 77) Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J.-P., and Roy, P. H. (1991) Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmlA*) gene of the In4 integron of Tn1696: Similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J. Bacteriol.* **173**, 4493-4502.
- 78) Stokes, H. W., and Hall, R. M. (1991) Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translational attenuation. *Plasmid* **26**, 10-19.
- 79) Bentley, J., Hyatt, L. S., Ainley, K., Parish, J. H., Herbert, R. B., and White, G. R. (1993) Cloning and sequence analysis of an *Escherichia coli* gene conferring bicyclomycin resistance. *Gene* **127**, 117-120.
- 80) Naroditskaya, V., Schlosser, M. J., Fang, N. Y., and Lewis, K. (1993) An *E. coli* gene *emrD* is involved in adaptation to low energy shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 803-809.
- 81) Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., and Konno, M. (1990) Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* **172**, 6942-6949.
- 82) Ohshita, Y., Hiramatsu, K., and Yokota, T. (1990) A point mutation in *norA* gene is responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 1028-1034.
- 83) Neyfakh, A. A., Borsch, C. M., and Kaatz, G. W. (1993) Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 128-129.
- 84) Kaatz, G. W., Seo, S. M., and Ruble, C. A. (1993) Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1086-1094.
- 85) Neyfakh, A. A., Bidnenko, V. E., and Chen, L. B. (1991) Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4781-4785.
- 86) Neyfakh, A. A. (1992) The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus aureus* NorA protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 484-485.
- 87) Ahmed, M., Borsch, C. M., Taylor, S. S., Vázquez-Laslop, N., and Neyfakh, A. A. (1994) A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. *J. Biol. Chem.* **269**, 28506-28513.
- 88) Ahmed, M., Lyass, L., Markham, P. N., Taylor, S. S., Vázquez-Laslop, N., and Neyfakh, A. A. (1995) Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. Bacteriol.* **177**, 3904-3910.
- 89) Bolhuis, H., Poelarends, G., van Veen, H. W., Poolman, B., Driessen, A. J. M., and Konings, W. N. (1995) The lactococcal *lmrP* gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 26092-26098.

- 90) Desomer, J., Vereecke, D., Crespi, M., and van Montagu, M. (1992) The plasmid-encoded chloramphenicol-resistance protein of *Rhodococcus fascians* is homologous to the transmembrane tetracycline efflux protein. *Mol. Microbiol.* **6**, 2377-2385.
- 91) Dittrich, W., Betzler, M., and Schrempf, H. (1993) An amplifiable and deletable chloramphenicol-resistance determinant of *Streptomyces lividans* 1326 encodes a putative transmembrane protein. *Mol. Microbiol.* **5**, 2789-2797.
- 92) Tennent, J. M., Lyon, B. R., Gillespie, M. T., May, J. W., and Skurray, R. A. (1985) Cloning and expression of lasmid-mediated quaternary ammonium resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 79-83.
- 93) Rouch, D. A., Cram, D. S., DiBerardino, D., Littlejohn, T. G., and Skurray, R. A. (1990) Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol. Microbiol.* **4**, 2051-2062.
- 94) Littlejohn, T. G., Paulsen, I. T., Gillespie, M. T., Tennent, J. M., Midgley, M., Jones, I. G., Purewal, A. S., and Skurray, R. A. (1992) Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **95**, 259-266.
- 95) Paulsen, I. T., and Skurray, R. A. (1993) Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes—an analysis. *Gene* **124**, 1-11.
- 96) Lomovskaya, O., and Lewis, K. (1992) *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8938-8942.
- 97) Lomovskaya, O., Lewis, K., and Matin, A. (1995) EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J. Bacteriol.* **177**, 2328-2334.
- 98) Neal, R. J., and Chater, K. F. (1987) Nucleotide sequence analysis reveals similarities between proteins determining methylenomycin A resistance in *Streptomyces* and tetracycline resistance in eubacteria. *Gene* **58**, 229-241.
- 99) Guifoile, P. G., and Hutchinson, C. R. (1992) Sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces glaucescens tcmAR* tetracenomycin C resistance and repressor gene loci. *J. Bacteriol.* **174**, 3651-3658.
- 100) Guifoile, P. G., and Hutchinson, C. R. (1992) The *Streptomyces glaucescens TcmR* protein represses transcription of the divergently oriented *tcmR* and *tcmA* genes by binding to an intergenic operator region. *J. Bacteriol.* **174**, 3659-3666.
- 101) Zhang, H. Z., Schmidt, H., and Piepersberg, W. (1992) Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* **6**, 2147-2157.
- 102) Fernández-Moreno, M. A., Caballero, J. L., Hopeood, D. A., and Malpartida, F. (1991) The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* **66**, 469-780.
- 103) Caballero, J. L., Martinez, E., Malpartida, F., and Hopeood, D. A. (1991) Organization and functions of the *actVA* region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 401-412.
- 104) Tercero, J. A., Lacalle, R. A., and Jimenez, A. (1993) The *pur8* gene from the *pur* cluster of *Streptomyces alboniger* encodes a highly hydrophobic polypeptide which confers resistance to puromycin. *Eur. J. Biochem.* **218**, 963-971.
- 105) Coque, J. J., Liras, P., and Martin, J. F. (1993) Genes for a β -lactamase, a penicillin-binding protein and a transmembrane protein are clustered with the cephamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans*. *EMBO J.* **12**, 631-639.
- 106) Ohnuki, T., Katoh, T., Imanaka, T., and Aiba, S. (1985) Molecular cloning of tetracycline resistance genes from *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces griseus* and characterization of the cloned genes. *J. Bacteriol.* **161**, 1010-1016.
- 107) Reynes, J. P., Calmels, T., Drocourt, D., and Tiraby, G. (1988) Cloning, expression in *Escherichia coli* and nucleotide sequence of a tetracycline-resistance gene from *Streptomyces rimosus*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 585-598.
- 108) Purewal, A. S. (1991) Nucleotide sequence of the ethidium efflux gene from *Escherichia coli*. *FEMS*

- 109) Morimyo, M., Hongo, E., Hama-Inaba, H., and Machida, I. (1992) Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3159-3165.
- 110) Paulsen, I. T., Littlejohn, T. G., Rådström, P., Sundström, L., Sköld, O., Swedberg, G., and Skurray, R. A. (1993) The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 761-768.
- 111) Sasatsu, M., Shima, K., Shibata, Y., and Kono, M. (1989) Nucleotide sequence of a gene that encodes resistance to ethidium bromide from a transferable plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **17**, 10103.
- 112) Littlejohn, T. G., DiBerardino, D., Messerotti, L. J., Spiers, S. J., and Skurray, R. A. (1990) Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* **101**, 59-66.
- 113) Sasatsu, M., Shibata, Y., Noguchi, N., and Kono, M. (1992) High-level resistance to ethidium bromide and antiseptics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**, 109-113.
- 114) Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., and Hearst, J. E. (1993) Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 6299-6313.
- 115) Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., and Hearst, J. E. (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**, 45-55.
- 116) Klein, J. R., Henrich, B., and Plapp, R. (1991) Molecular analysis and nucleotide sequence of the *envCD* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 230-240.
- 117) Poole, K., Krebs, K., McNally, C., and Neshat, S. (1993) Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* **175**, 7363-7372.
- 118) Poole, K., Heinrichs, D. E., and Neshat, S. (1993) Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* **10**, 529-544.
- 119) Poole, K. (1994) Bacterial multidrug resistance—emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**, 453-456.
- 120) Li, X.-Z., Livermore, D. M., and Nikaido, H. (1994) Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1732-1741.
- 121) Li, X.-Z., Ma, D., Livermore, D. M., and Nikaido, H. (1994) Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Active efflux as a contributing factor to β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1742-1752.
- 122) Li, X.-Z., Nikaido, H., and Poole, K. (1995) Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1948-1953.
- 123) Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J.-I., and Nishino, T. (1995) The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2567-2569.
- 124) Pan, W., and Spratt, B. G. (1994) Regulation of the permeability of the gonococcal cell envelope by the *mtr* system. *Mol. Microbiol.* **11**, 769-775.
- 125) Hagman, K. E., Pan, W., Spratt, B. G., Balthazar, J. T., Judd, R. C., and Shafer, W. M. (1995) Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* **141**, 611-622.
- 126) Lampson, B. C., von David, W., and Parisi, J. T. (1986) Novel mechanism for plasmid-mediated erythromycin resistance by pNE24 from *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 653-658.
- 127) Goldman, R. C., and Capobianco, J. O. (1990) Role of an energy-dependent efflux pump in plasmid pNE24-mediated resistance to 14- and 15-membered macrolides in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1973-1980.
- 128) Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., Cunliffe, W. J., Baumberg, S., and Wootton, J. C. (1990) Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene

- family. *Mol. Microbiol.* **4**, 1207-1214.
- 129) Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., and Baumberg, S. (1995) Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene* **153**, 93-98.
 - 130) Guifoile, P. G., and Hutchinson, C. R. (1991) A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8553-8557.
 - 131) Rosteck, P. R., Jr., Reynolds, P. A., and Hershberger, C. L. (1991) Homology between proteins controlling *Streptomyces fradiae* tylosin resistance and ATP-binding transport. *Gene* **102**, 27-32.
 - 132) Schoner, B., Geistlich, M., Rosteck, P., Rao, R. N., Seno, E., Reynolds, P., Cox, K., Burgett, S., and Hershberger, C. (1992) Sequence similarity between macrolide-resistance determinants and ATP-binding transport proteins. *Gene* **115**, 93-96.
 - 133) Geistlich, M., Losick, R., Turner, J. R., Rao, R. N. (1992) Characterization of a novel regulatory gene governing the expression of a polyketide synthase gene in *Streptomyces ambofaciens*. *Mol. Microbiol.* **6**, 2019-2029.
 - 134) Rodriguez, A. M., Olano, C., Vilches, C., Mendez, C., and Salas, J. A. (1993) *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. *Mol. Microbiol.* **8**, 571-582.
 - 135) Linton, K. J., Cooper, H. N., Hunter, I. S., and Leadlay, P. F. (1994) An ABC-transporter from *Streptomyces longisporoflavus* confers resistance to the polyether-ionophore antibiotic tetronasin. *Mol. Microbiol.* **11**, 777-785.
 - 136) Barrasa, M. I., Tercero, J. A., Lacalle, R. A., and Jimenez, A. (1995) The *ard1* gene from *Streptomyces capreolus* encodes a polypeptide of the ABC-transporters superfamily which confers resistance to the aminonucleoside antibiotic A201A. *Eur. J. Biochem.* **228**, 562-569.
 - 137) Allikmets, R., Gerrard, B., Court, D., and Dean, M. (1993) Cloning and organization of the *abc* and *mdl* genes of *Escherichia coli*: relationship to eukaryotic multidrug resistance. *Gene* **136**, 231-236.
 - 138) Ishikawa, T., and Ali-Osman, F. (1993) Glutathione-associated *cis*-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells: Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J. Biol. Chem.* **268**, 20116-20125.
 - 139) Ishikawa, T., Wright, C. D., and Ishizuka, H. (1994) *GS-X* pump is functionally overexpressed in *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **269**, 29085-29093.
 - 140) Pikula, S., Hayden, J. B., Awasthi, S., Awasthi, Y. C., and Zimniak, P. (1994) Organic anion-transporting ATPase of rat liver: I. Purification, photoaffinity labeling, and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **269**, 27566-27573.
 - 141) Pikula, S., Hayden, J. B., Awasthi, S., Awasthi, Y. C., and Zimniak, P. (1994) Organic anion-transporting ATPase of rat liver: II. Functional reconstitution of active transport and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **269**, 27574-27579.
 - 142) George, A. M., and Levy, S. B. (1983) Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: Involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J. Bacteriol.* **155**, 531-540.
 - 143) George, A. M., and Levy, S. B. (1983) *Gnen* in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J. Bacteriol.* **155**, 541-548.
 - 144) Cohen, S. P., Hächler, H., and Levy, S. B. (1993) Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 1484-1492.
 - 145) Gambino, L., Gracheck, S. J., and Miller, P. F. (1993) Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 2888-2894.
 - 146) Sulavik, M. C., Gambino, L. F., and Miller, P. F. (1994) Analysis of the genetic requirements for inducible multiple-antibiotic resistance associated with the *mar* locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 7754-7756.
 - 147) George, A. M., Hall, R. M., and Stokes, H. W. (1995) Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a

- novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology* **41**, 1909-1920.
- 148) Altenbuchner, J., Schmiid, K., and Schmitt, R. (1983) Tn1721-encoded tetracycline resistance: Mapping of structural and regulatory genes mediating resistance. *J. Bacteriol.* **153**, 116-123.
 - 149) Waters, S. H., Rogowsky, P., Grinsted, J., Altenbuchner, J., and Schmitt, R. (1983) The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721: nucleotide sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6089-6105.
 - 150) Postle, K., Nguyen, T. T., and Bertrand, K. P. (1984) Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. *Nucleic Acids Res.* **12**, 4849-4863.
 - 151) Heuer, C., Hickman, R. K., Curiale, M. S., Hillen, W., and Levy, S. B. (1987) Constitutive expression of tetracycline resistance mediated by a Tn10-like element in *Haemophilus parainfluenzae* results from a mutation in the repressor gene. *J. Bacteriol.* **169**, 990-994.
 - 152) Sutcliffe, J. G. (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**, 77-90.
 - 153) Peden, K. W. (1983) Revised sequence of the tetracycline-resistance gene of pBR322. *Gene* **22**, 277-280.
 - 154) Unger, B., Becker, J., and Hillen, W. (1984) Nucleotide sequence of the gene, protein purification and characterization of the pSC101-encoded tetracycline resistance-gene-repressor. *Gene* **31**, 103-108.
 - 155) Unger, B., Klock, G., and Hillen, W. (1984) Nucleotide sequence of the repressor gene of the RA1 tetracycline resistance determinant: Structural and functional comparison with three related Tet repressor genes. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7693-7703.
 - 156) Aoki, T., and Takahashi, A. (1987) Class D tetracycline resistance determinants of R plasmids from the fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, and *Pasteurella piscicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1278-1280.
 - 157) Varela, M. F., and Griffith, J. K. (1993) Nucleotide and deduced protein sequence of the class D tetracycline resistance determinant: Relationship to other antimicrobial transport proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1253-1258.
 - 158) Allard, J. D., Gibson, M. L., Vu, L. H., Nguyen, T. T., and Bertrand, K. P. (1993) Nucleotide sequence of class D tetracycline resistance genes from *Salmonella ordonez*. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 301-305.
 - 159) Tovar, K., Ernst, A., and Hillen, W. (1988) Identification and nucleotide sequence of the class E *tet* regulatory elements and operator and inducer binding of the encoded purified Tet repressor. *Mol. Gen. Genet.* **215**, 76-80.
 - 160) Sørum, H., Roberts, M. C., and Crosa, J. H. (1992) Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 611-615.
 - 161) Allard, J. D., and Bertrand, K. P. (1993) Sequence of a class E tetracycline resistance gene from *Escherichia coli* and comparison of related tetracycline efflux proteins. *J. Bacteriol.* **175**, 4554-4560.
 - 162) Aoki, T., Satoh, T., and Kitao, T. (1987) New tetracycline resistance determinant on R plasmids from *Vibrio anguillarum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1446-1449.
 - 163) Zhao, J., and Aoki, T. (1992) Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from *Vibrio anguillarum*. *Microbiol. Immunol.* **36**, 1051-1060.
 - 164) Hansen, L. M., McMurry, L. M., Levy, S. B., and Hirsh, D. C. (1993) A new tetracycline resistance determinant, Tet H, from *Pasteurella multocida* specifying active efflux of tetracycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2699-2705.
 - 165) Sakaguchi, R., Shishido, K., Hoshino, T., and Furukawa, K. (1986) The nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of plasmid pNS1981 from *Bacillus subtilis* differs from pTHT15 from a thermophilic *Bacillus* by two base pairs. *Plasmid* **16**, 72-73.
 - 166) Lacks, S. A., Lopez, P., Greenberg, B., and Espinosa, M. (1986) Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J. Mol. Biol.* **192**, 753-765.
 - 167) Sakaguchi, R., and Shishido, K. (1988) Molecular cloning of a tetracycline-resistance determinant from *Bacillus subtilis* chromosomal DNA and its expression in *Escherichia coli* and *B. subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **949**, 49-57.
 - 168) Sakaguchi, R., Amano, H., and Shishido, K. (1988) Nucleotide sequence homology of the tetracycline-resistance determinant naturally maintained in *Bacillus subtilis* Marburg 168 chromosome and the tetracycline-resistance gene of *B. subtilis* plasmid pNS1981. *Biochim. Biophys. Acta* **950**, 441-444.

- 169) Palva, A., Vigren, G., Simonen, M., Rintala, H., and Laamanen, P. (1990) Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pBC16 from *Bacillus cereus*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1635.
- 170) Ives, C. L., and Bott, K. F. (1990) Analysis of the *tet* gene of plasmid pCIS7 isolated from *Bacillus subtilis*. *Gene* **94**, 115-119.
- 171) Schwarz, S., Cardoso, M., and Wegener, H. C. (1992) Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 580-588.
- 172) Platteeuw, C., Michiels, F., Joos, H., Seurinck, J., and de Vos, W. M. (1995) Characterization and heterologous expression of the *tetL* gene and identification of iso-ISS1 elements from *Enterococcus faecalis* plasmid pJH1. *Gene* **160**, 89-93.
- 173) Martin, P., Trieu-Cuot, P., and Courvalin, P. (1986) Nucleotide sequence of the *tetM* tetracycline resistance determinant of the streptococcal conjugative shuttle transposon Tn1545. *Nucleic Acids Res.* **14**, 7047-7058.
- 174) Sanchez-Pescador, R., Brown, J. T., Roberts, M., and Urdea, M. S. (1988) The nucleotide sequence of the tetracycline resistance determinant *tetM* from *Ureaplasma urealyticum*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1216-1217.
- 175) Nesin, M., Svec, P., Lupski, J. R., Godson, G. N., Kreiswirth, B., Kornblum, J., and Projan, A. J. (1990) Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, *tetA(M)*, from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2273-2276.
- 176) Burdett, V. (1990) Nucleotide sequence of the *tet(M)* gene of Tn916. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6137.
- 177) Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., Carlier, C., and Courvalin, P. (1991) Nucleotide sequences specific for Tn1545-like conjugative transposons in pneumococci and staphylococci resistant to tetracycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1657-1660.
- 178) Gascoyne-Binzi, D. M., Heritage, J., and Hawkey, P. M. (1993) Nucleotide sequences of the *tet(M)* genes from the American and Dutch type tetracycline resistance plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**, 667-676.
- 179) Burdett, V. (1993) tRNA modification activity is necessary for Tet(M)-mediated tetracycline resistance. *J. Bacteriol.* **175**, 7209-7215.
- 180) Sougakoff, W., Papadopoulou, B., Nordmann, P., and Courvalin, P. (1987) Nucleotide sequence and distribution of gene *tetO* encoding tetracycline resistance in *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**, 153-159.
- 181) LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Titmas, B. M., Smith, C. J., and Tenover, F. C. (1988) Nucleotide sequence analysis of tetracycline resistance gene *tetO* from *Streptococcus mutans* DL5. *J. Bacteriol.* **170**, 3618-3626.
- 182) Manavathu, E. K., Hiratsuka, K., and Taylor, D. E. (1988) Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from *Campylobacter jejuni*. *Gene* **62**, 17-26.
- 183) Abraham, L. J., and Rood, J. I. (1985) Cloning and analysis of the *Clostridium perfringens* tetracycline resistance plasmid, pCW3. *Plasmid* **13**, 155-162.
- 184) Abraham, L. J., and Rood, J. I. (1985) Molecular analysis of transferable tetracycline resistance plasmids from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **161**, 636-640.
- 185) Sloan, J., McMurry, L. M., Lyras, D., Levy, S. B., and Rood, J. I. (1994) The *Clostridium perfringens* Tet P determinant comprises two overlapping genes: *tetA(P)*, which mediates active tetracycline efflux, and *tetB(P)*, which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants. *Mol. Microbiol.* **11**, 403-415.
- 186) Nikolich, M. P., Shoemaker, N. B., and Salyers, A. A. (1992) A *Bacteroides* tetracycline resistance gene represents a new class of ribosome protection tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1005-1012.
- 187) Lépine, G., Lacroix, J.-M., Walker, C. B., and Progulske-Fox, A. (1993) Sequencing of a *tet(Q)* gene isolated from *Bacteroides fragilis* 1126. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2037-2041.
- 188) Charpentier, E., Gerbaud, G., and Courvalin, P. (1993) Characterization of a new class of tetracycline-resistance gene *tet(S)* in *Listeria monocytogenes* BM4210. *Gene* **131**, 27-34.
- 189) Charpentier, E., Gerbaud, G., and Courvalin, P. (1994) Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene *tet(S)* in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2330-2335.

- 190) Guiney, D. G., Hasegawa, P., and Davis C. E. (1984) Expression in *Escherichia coli* of cryptic tetracycline resistance genes from bacteroides R plasmids. *Plasmid* **11**, 248-252.
- 191) Speer, B. S., and Salyers, A. (1988) Characterization of a novel tetracycline resistance that functions only in aerobically grown *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 1423-1429.
- 192) Park, B. H., and Levy, S. B. (1988) The cryptic tetracycline resistance determinant on Tn4400 mediates tetracycline degradation as well as tetracycline efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1797-1800.
- 193) Speer, B. S., and Salyers, A. A. (1989) Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. *J. Bacteriol.* **171**, 148-153.
- 194) Speer, B. S., Bedzyk, L., and Salyers, A. A. (1991) Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J. Bacteriol.* **173**, 176-183.
- 195) Yamaguchi, A., Shiina, Y., Kimura, T., and Sawai, T. Cys-scanning mutagenesis of putative transmembrane domain III and its flanking loop regions of the Tn10-encoded TetA. (manuscript in preparation)
- 196) Kimura, T., Suzuki, M., Sawai, T., and Yamaguchi, A. Determination of a transmembrane segment using cysteine-scanning mutants of transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter. (submitted for publication)
- 197) Taylor, J. W., Ott, J., and Eckstein, F. (1985) The rapid generation of oligonucleotide-directed mutagenesis at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. *Nucleic Acids Res.* **13**, 8764-8785.
- 198) Yamamoto, T., Tanaka, M., Nohara, C., Fukunaga, Y., and Yamagishi, S. (1981) Transposition of the oxacillin-hydrolyzing penicillinase gene. *J. Bacteriol.* **145**, 808-813.
- 199) Vieira, J., and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- 200) Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vector and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- 201) Kunkel, T. A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492.
- 202) Kunkel, T. A., Roberts, J. D., and Richard, A. Z. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.
- 203) Brent, R., and Ptashne, M. (1981) Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4204-4208.
- 204) Klionsky, D. J., Brusilow, W. S. A., and Simoni, R. D. (1984) In vivo evidence for the role of the ϵ subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**, 1055-1060.
- 205) Iwamoto, A., Omote, H., Hanada, H., Tomioka, N., Itai, A., Maeda, M., and Futai, M. (1991) Mutations in Ser¹⁷⁴ and the glycine-rich sequence (Gly¹⁴⁹, Gly¹⁵⁰, and Thr¹⁵⁶) in the β subunit of *Escherichia coli* H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **266**, 16350-16355.
- 206) Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M., and Futai, M. (1991) One-step purification of *Escherichia coli* H⁺-ATPase (F₀F₁) and its reconstitution into liposomes with neurotransmitter transporters. *J. Biol. Chem.* **266**, 22141-22146.
- 207) Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Masahashi, W., and Hashimoto-Gotoh, T. (1987) High-copy-number and low-copy-number vectors for *lacZ* α -complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* **61**, 63-74.
- 208) Stoker, N. G., Fairweather, N. F., and Spratt, B. G. (1982) Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* **18**, 335-341.
- 209) Harayama, S., Oguchi, T., and Iino, T. (1984) Does Tn10 transpose via the cointegrate molecule? *Mol. Gen. Genet.* **194**, 444-450.
- 210) Iwakura, M., and Tanaka, T. (1992) Dihydrofolate reductase gene as a versatile expression marker. *J. Biochem. (Tokyo)* **111**, 31-36.
- 211) Iwakura, M., Furusawa, K., Kokubu, T., Ohashi, S., Tanaka, Y., Shimura, Y., and Tsuda, K. (1992) Dihydrofolate reductase as a new "affinity handle". *J. Biochem. (Tokyo)* **111**, 37-45.
- 212) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A laboratory manual* (Second edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 213) 大寺美登里 (1987) Rプラスミド支配テトラサイクリン耐性機構の研究 (千葉大学・薬学部、博士論文)

- 214) Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- 215) Nakamaye, K., and Eckstein, F. (1986) Inhibition of restriction endonuclease *NciI* cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **14**, 9679-9698.
- 216) Sanger, F., Nickler, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- 217) Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
- 218) Osborn, M. J., Gander, J. E., Paris, E., and Carson, J. (1972) Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* **247**, 3962-3972.
- 219) Kanazawa, H., Miki, T., Tamura, F., Yura, T., and Futai, M. (1979) Specialized transducing phage λ carrying the genes *fpr* coupling factor of oxidative phosphorylation of *Escherichia coli*: Increased synthesis of coupling factor on induction of phage λ *asn*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1126-1130.
- 220) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- 221) Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**, 502-514.
- 222) Laemmli, V. L. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- 223) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- 224) Towbin, H., and Gordon, J. (1984) Immunoblotting and dot immunoblotting—current status and outlook. *J. Immunol. Meth.* **72**, 313-340.
- 225) Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- 226) Philipson, L., Anderson, P., Olshevsky, U., Weinberg, R., and Baltimore, D. (1978) Translation of MuLV and MSV RNAs in nuclease-treated reticulocyte extracts: Enhancement of the gag-pol polypeptide with yeast suppressor tRNA. *Cell* **13**, 189-199.
- 227) Rosen, B. P. (1986) Ion extrusion systems in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **125**, 328-336.
- 228) Iwakura, M., Shimura, Y., and Tsuda, K. (1982) Cloning of dihydrofolate reductase gene of *Escherichia coli* K12. *J. Biochem. (Tokyo)* **91**, 1205-1212.
- 229) Waley, S. G. (1974) A spectrophotometric assay of β -lactamase on penicillins. *Biochem. J.* **139**, 789-790.
- 230) Yamaguchi, A., Hirata, T., and Sawai, T. (1983) Kinetic studies on investigation of *Citrobacter freundii* cephalosporinase by sulbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**, 23-30.
- 231) Yamaguchi, A., Kimura, T., and Sawai, T. (1994) Hot spots for sulfhydryl inactivation of Cys mutants in the widely conserved sequence motifs of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* **115**, 958-964.
- 232) Kimura, T., Inagaki, Y., Sawai, T., and Yamaguchi, A. (1995) Substrate-induced acceleration of N-ethylmaleimide reaction with the Cys-65 mutant of the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter depends on the interaction of Asp-66 with the substrate. *FEBS Lett.* **362**, 47-49.
- 233) Yamaguchi, A., Kimura, T., and Sawai, T. (1993) Effects of sulfhydryl reagents on the Cys65 mutant of the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **322**, 201-204.
- 234) Erickson, J. D., Varoqui, H., Schäfer, M. K.-H., Modi, W., Diebler, M.-F., Weihe, E., Rand, J., Eiden, L. E., Bonner, T. I., and Usdin, T. B. (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J. Biol. Chem.* **269**, 21929-21932.
- 235) Bejanin, S. B., Cervini, R., Mallet, J., and Berrard, S. (1994) A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J. Biol. Chem.* **269**, 21944-21947.

- 236) Roghani, A., Feldman, J., Kohan, S. A., Shirzadi, A., Gundersen, C. B., Brecha, N., and Edwards, R. H. (1994) Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10620-10624.
- 237) Bajjalieh, S. M., Peterson, K., Shinghal, R., and Scheller, R. H. (1992) SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science* **257**, 1271-1273.
- 238) Bajjalieh, S. M., Peterson, K., Linial, M., and Scheller, R. H. (1993) Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2150-2154.
- 239) Bindra, P. S., Knowles, R., and Buckley, K. M. (1993) Conservation of the amino acid sequence of SV2, a transmembrane transporter in synaptic vesicles and endocrine cells. *Gene* **137**, 299-302.
- 240) Ishiguro, N., and Sato, G. (1985) Nucleotide sequence of the gene determining plasmid-mediated citrate utilization. *J. Bacteriol.* **164**, 977-982.
- 241) Sasatsu, M., Misra, T. K., Chu, L., Laddaga, R., and Silver, S. (1985) Cloning and DNA sequence of a plasmid-determined citrate utilization system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **164**, 983-993.
- 242) Seol, W., and Shatkin, A. J. (1991) *Escherichia coli* *kgtP* encodes an α -ketoglutarate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3802-3806.
- 243) Maiden, M. C. J., Jones-Mortimer, M. C., and Henderson, P. J. F. (1988) The cloning, DNA sequence, and overexpression of the gene *araE* coding for arabinose-proton symport in *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **263**, 8003-8010.
- 244) Davis, E. O., and Henderson, P. J. F. (1987) The cloning and DNA sequence of the gene *xylE* for xylose-proton symport in *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **262**, 13928-13932.
- 245) Büchel, D. E., Gronenborn, B., and Müller-Hill, B. (1980) Sequence of the lactose permease gene. *Nature* **283**, 541-545.
- 246) Bockmann, J., Heuel, H., and Lengeler, J. W. (1992) Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132. *Mol. Gen. Genet.* **235**, 22-32.
- 247) Aslanidis, C., Schmid, K., and Schmitt, R. (1989) Nucleotide sequences and operon structure of plasmid-borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 6753-6763.
- 248) Yazyu, H., Shiota-Niiya, S., Shimamoto, T., Kanazawa, H., Futai, M., and Tsuchiya, T. (1984) Nucleotide sequence of the *melB* gene and characteristics of deduced amino acid sequence of the melibiose carrier in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**, 4320-4326.
- 249) Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., and Lodish, H. F. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**, 941-945.
- 250) Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R. L., Fukushima, Y., Byers, M. G., Shows, T. B., and Bell, G. I. (1988) Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5434-5438.
- 251) Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R. L., Fan, Y.-S., Byers, M. G., Shows, T. B., and Bell, G. I. (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins: Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J. Biol. Chem.* **263**, 15245-15248.
- 252) James, D. E., Strube, M., and Mueckler, M. (1989) Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* **338**, 83-87.
- 253) Inukai, K., Asano, T., Katagiri, H., Ishihara, H., Anai, M., Fukushima, Y., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Yazaki, Y., and Oka, Y. (1993) Cloning and increased expression with fructose feeding of rat jejunal GLUT5. *Endocrinology* **133**, 2009-2014.
- 254) Waddell, I. D., Zomerschoe, A. G., Voice, M. W., and Burchell, A. (1992) Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transport protein: Comparison with liver plasma-membrane glucose-transport protein GLUT2. *Biochem. J.* **286**, 173-177.
- 255) Fei, Y.-J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F. H., Romero, M. F., Singh, S. K., Boron, W. F., and Hediger, M. A. (1994) Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* **368**, 563-566.
- 256) Liang, R., Fei, Y.-J., Prasad, P. D., Ramamoorthy, S., Han, H., Yang-Feng, T. L., Hediger, M. A., Ganapathy, V., and Leibach, F. H. (1995) Human intestinal H⁺/peptide cotransporter: Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* **270**, 6456-6463.

- 257) Szkutnicka, K., Tschopp, J. F., Andrews, L., and Cirillo, V. P. (1989) Sequence and structure of the yeast galactose transporter. *J. Bacteriol.* **171**, 4486-4493.
- 258) Nehlin, J. O., Carlberg, M., and Ronne, H. (1989) Yeast galactose permease is related to yeast and mammalian glucose transporters. *Gene* **85**, 313-319.
- 259) Kruckeberg, A. L., and Bisson, L. F. (1990) The *HXT2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5903-5913.
- 260) Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974) Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**, 222-245.
- 261) Levitt, M. (1978) Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochemistry* **17**, 4277-4285.
- 262) Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- 263) King, S. C., Hansen, C. L., and Wilson, T. H. (1991) The interaction between aspartic acid 237 and lysine 358 in the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1062**, 177-186.
- 264) Lee, J.-I., Hwang, P. P., Hansen, C., and Wilson, T. H. (1992) Possible salt bridges between transmembrane α -helices of the lactose carrier of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 20758-20764.
- 265) Sahin-Tóth, M., Dunten, R. L., Gonzalez, A., and Kaback, H. R. (1992) Functional interactions between putative intramembrane charged residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10547-10551.
- 266) Dunten, R. L., Sahin-Tóth, M., and Kaback, H. R. (1993) Role of the charge pair aspartic acid-237—lysine-358 in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**, 3139-3145.
- 267) Lee, J.-I., Hwang, P. P., and Wilson, T. H. (1993) Lysine 319 interacts with both glutamic acid 269 and aspartic acid 240 in the lactose carrier of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 20007-20015.
- 268) Sahin-Tóth, M., and Kaback, H. R. (1993) Properties of interacting aspartic acid and lysine residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**, 10027-10035.
- 269) Frillingos, S., Sahin-Tóth, M., Lengeler, J. W., and Kaback, H. R. (1995) Helix packing in the sucrose permease of *Escherichia coli*: Properties of engineered charge pairs between helices VII and XI. *Biochemistry* **34**, 9368-9373.
- 270) MaNicholas, P., Chopra, I., and Rothstein, D. M. (1992) Genetic analysis of the *tetA(C)* gene on plasmid pBR322. *J. Bacteriol.* **174**, 7926-7933.
- 271) Seol, W., and Shatkin, J. (1992) Site-directed mutants of *Escherichia coli* α -ketoglutarate permease (KgtP). *Biochemistry* **31**, 3550-3554.
- 272) Jessen-Marshall, A. E., Paul, N. J., and Brooker, R. J. (1995) The conserved motif, GXXX(D/E)(R/K)XG[X](R/X)(R/K), in hydrophilic loop 2/3 of the lactose permease. *J. Biol. Chem.* **270**, 16251-16257.
- 273) Jung, K., Jung, H., Colacurcio, P., and Kaback, H. R. (1995) Role of glycine residues in the structure and function of lactose permease, an *Escherichia coli* membrane transport protein. *Biochemistry* **34**, 1030-1039.
- 274) Merickel, A., Rosandich, P., Peter, D., and Edwards, R. H. (1995) Identification of residues involved in substrate recognition by a vesicular monoamine transporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 25798-25804.
- 275) Yamaguchi, A., Kimura, T., Someya, Y., and Sawai, T. (1993) Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by transposon Tn10: The structural resemblance and functional difference in the role of the duplicated sequence motif between hydrophobic segments 2 and 3 and segments 8 and 9. *J. Biol. Chem.* **268**, 6496-6504.
- 276) Noguchi, N., Emura, A., Sasatsu, M., and Kono, M. (1994) Expression in *Escherichia coli* of a TetK determinant from *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 352-355.
- 277) Yamaguchi, A., Shiina, Y., Fujihira, E., Sawai, T., Noguchi, N., and Sasatsu, M. (1995) The tetracycline efflux protein encoded by the *tet(K)* gene from *Staphylococcus aureus* is a metal-tetracycline/H⁺ antiporter. *FEBS Lett.* **365**, 193-197.
- 278) Yamaguchi, A., Fujihira, E., Kimura, T., and Sawai, T. Site-directed mutagenesis of negatively-charged residues conserved in Tet proteins from Gram-positive bacteria. (unpublished data)
- 279) Yamaguchi, A., Someya, Y., and Sawai, T. (1992) Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by transposon Tn10: The role of a conserved sequence motif, GXXXXRXGRR, in a putative cytoplasmic loop between helices 2 and 3. *J. Biol. Chem.* **267**, 19155-19162.

- 280) 石黒正恒 (1978) 生物化学実験法 8 S H基の化学修飾 (学会出版センター)
- 281) Weissbecker, L. (1956) *Beih. Med. Monatsschr. Z. Allgme Med. Ther.* **15**, 120-138.
- 282) Maines, M. D., and Kappas, A. (1976) Studies on the mechanism of induction of haem oxygenase by cobalt and other metal ions. *Biochem. J.* **154**, 125-131.
- 283) Sakaguchi, T., Taguchi, K., Fukushima, S., and Obi, N. (1958) Metal chelate compounds of tetracycline derivatives. VI. Studies on the behavior of separated metal chelate compounds of chlortetracycline and oxytetracycline. *Yakugaku Zasshi* **78**, 177-182.
- 284) Silver, S., and Misra, T. M. (1988) Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 717-743.
- 285) Sahin-Tóth, M., and Kaback, H. R. (1993) Cysteine scanning mutagenesis of putative transmembrane helices IX and X in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **2**, 1024-1033.
- 286) Dunten, R. L., Sahin-Tóth, M., and Kaback, H. R. (1993) Cysteine scanning mutagenesis of putative helix XI in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**, 12644-12650.
- 287) Sahin-Tóth, M., Persson, B., Schwieger, J., Cohan, P., and Kaback, H. R. (1994) Cysteine scanning mutagenesis of the N-terminal 32 amino acid residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **3**, 240-247.
- 288) Frillingos, S., Sahin-Tóth, M., Persson, B., and Kaback, H. R. (1994) Cysteine scanning mutagenesis of putative helix VII in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 8074-8081.
- 289) Sahin-Tóth, M., Frillingos, S., Bibi, E., Gonzalez, A., and Kaback, H. R. (1994) The role of transmembrane domain III in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **3**, 2302-2310.
- 290) Weitzman, C., and Kaback, H. R. (1995) Cysteine scanning mutagenesis of helix V in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 9374-9379.
- 291) Greenhalgh, D. A., Subramaniam, S., Alexiev, U., Otto, H., Heyn, M. P., and Khorana, H. G. (1992) Effect of introducing different carboxylate-containing side chains at position 85 on chromophore formation and proton transport in bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.* **267**, 25734-25738.
- 292) Omote, H., Le, N. P., Park, M.-Y., Maeda, M., and Futai, M. (1995) β subunit Glu-185 of *Escherichia coli* H⁺-ATPase (ATP synthase) is an essential residue for cooperative catalysis. *J. Biol. Chem.* **270**, 25656-25660.
- 293) Planas, A., and Kirsch, J. F. (1991) Reengineering the catalytic lysine of aspartate aminotransferase by chemical elaboration of a genetically introduced cysteine. *Biochemistry* **30**, 8268-8276.
- 294) Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M., and Karlin, A. (1992) Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* **258**, 307-310.
- 295) Flitsch, S. L., and Khorana, H. G. (1989) Structural studies on transmembrane proteins. 1. Model study using bacteriorhodopsin mutants containing single cysteine residues. *Biochemistry* **28**, 7800-7805.
- 296) Altenbach, C., Flitsch, S. L., Khorana, H. G., and Hubbell, W. L. (1989) Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines. *Biochemistry* **28**, 7806-7812.
- 297) Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H. G., and Hubbell, W. L. (1990) Transmembrane protein structure: Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants. *Science* **248**, 1088-1092.
- 298) Greenhalgh, D. A., Altenbach, C., Hubbell, W. L., and Khorana, H. G. (1991) Locations of Arg-82, Asp-85, and Asp-96 in helix C of bacteriorhodopsin relative to the aqueous boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8626-8630.
- 299) Shin, Y. K., Levinthal, F., Levinthal, C., and Hubbell, W. L. (1993) Colicin E1 binding to membranes: Time-resolved studies of spin-labeled mutants. *Science* **259**, 960-963.
- 300) Resek, J. F., Farahbakhsh, Z. T., Hubbell, W. L., and Khorana, H. G. (1993) Formation of the Meta II photointermediate is accompanied by conformational changes in the cytoplasmic surfaces of rhodopsin. *Biochemistry* **32**, 12025-12032.
- 301) Farahbakhsh, Z. T., Hideg, K., and Hubbell, W. L. (1993) Photoactivated conformational changes in rhodopsin: A time-resolved spin label study. *Science* **262**, 1416-1419.
- 302) Steinhoff, H.-J., Mollaaghababa, R., Altenbach, C., Hideg, K., Krebs, M., Khorana, H. G., and Hubbell, W. L. (1994) Time-resolved detection of structural changes during the photocycle of spin-labeled bacteriorhodopsin.

- 303) Ridge, K. D., Zhang, C., and Khorana, H. G. (1995) Mapping of the amino acids in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin. Chemical reactivity in the dark state following single cysteine replacements. *Biochemistry* **34**, 8804-8811.
- 304) Farahbakhsh, Z. T., Ridge, K. D., Khorana, H. G., and Hubbell, W. L. (1995) Mapping light-dependent structural changes in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin: A site-directed spin labeling study. *Biochemistry* **34**, 8812-8819.
- 305) Steinhoff, H. J., Mollaaghababa, R., Altenbach, C., Khorana, H. G., and Hubbell, W. L. (1995) Site directed spin labeling studies of structure and dynamics in bacteriorhodopsin. *Biophys. Chem.* **56**, 89-84.
- 306) Jung, K., Jung, H., and Kaback, H. R. (1994) Dynamics of lactose permease of *Escherichia coli* determined by site-directed fluorescence labeling. *Biochemistry* **33**, 3980-3985.
- 307) Jung, K., Jung, H., and Kaback, H. R. (1994) A conformational change in the lactose permease of *Escherichia coli* is induced by ligand binding or membrane potential. *Protein Sci.* **3**, 1052-1057.
- 308) Wu, J., and Kaback, H. R. (1994) Cysteine 148 in the lactose permease of *Escherichia coli* is a component of a substrate binding site. 2. Site-directed fluorescence studies. *Biochemistry* **33**, 12166-12171.
- 309) Wu, J., Frillingos, S., Voss, J., and Kaback, H. R. (1994) Ligand-induced conformational changes in the lactose permease of *Escherichia coli*: Evidence for two binding sites. *Protein Sci.* **3**, 2294-2301.
- 310) Wu, J., Frillingos, S., and Kaback, H. R. (1995) Dynamics of lactose permease of *Escherichia coli* determined by site-directed chemical labeling and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 8257-8263.
- 311) Hiratsuka, T. (1992) Movement of Cys-697 in myosin ATPase associated with ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **267**, 14941-14948.
- 312) Hiratsuka, T. (1992) Spatial proximity of ATP-sensitive tryptophanyl residue(s) and Cys-697 in myosin ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 14949-14954.
- 313) Hiratsuka, T. (1993) Behavior of Cys-707 (SH1) in myosin ATPase associated with ATP hydrolysis revealed with a fluorescent probe linked directly to the sulfur atom. *J. Biol. Chem.* **268**, 24742-24750.
- 314) Hiratsuka, T. (1994) Nucleotide-induced closure of the ATP-binding pocket in myosin subfragment-1. *J. Biol. Chem.* **269**, 27251-27257.
- 315) Elling, C. E., Nielsen, S. M., and Schwartz, T. W. (1995) Conversion of antagonist-binding site to metal-ion site in the tachykinin NK-1 receptor. *Nature* **374**, 74-77.
- 316) Jung, K., Voss, J., He, M., Hubbell, W. L., and Kaback, H. R. (1995) Engineering a metal binding site within a polytopic membrane protein, the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 6272-6277.
- 317) Eelkema, J. A., O'Donnell, M. A., and Brooker, R. J. (1991) An analysis of lactose permease "sugar specificity" mutations which also affect the coupling between proton and lactose transport. II. Second site revertants of the thiodigalactoside-dependent proton leak by the Val¹⁷⁷/Asn³¹⁹ permease. *J. Biol. Chem.* **266**, 4139-4144.
- 318) Olsen, S. G., Greene, K. M., and Brooker, R. J. (1993) Lactose permease mutants which transport (malto-)oligosaccharides. *J. Bacteriol.* **175**, 6269-6275.
- 319) Wilson, D. M., Hama, H., and Wilson, T. H. (1995) Gly113→Asp can restore activity to the Asp51→Ser mutant in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 242-249.
- 320) Nelson, D. R., and Douglas, M. G. (1993) Function-based mapping of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator by selection for second site revertants. *J. Mol. Biol.* **230**, 1171-1182.
- 321) Miki, J., Fujiwara, K., Tsuda, M., Tsuchiya, T., and Kanazawa, H. (1990) Suppression mutations in the defective β subunit of F₁-ATPase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 21567-21572.
- 322) Miller, M. J., Oldenburg, M., and Fillingame, R. H. (1991) The essential carboxyl group in subunit c of the F₁F₀ ATP synthase can be moved and H⁺-translocating function retained. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4900-4904.
- 323) Nakamoto, R. K., Maeda, M., and Futai, M. (1993) The γ subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase: Mutations in the carboxyl-terminal region restore energy coupling to the amino-terminal mutant γ Met-23→Lys. *J. Biol. Chem.* **268**, 867-872.
- 324) Iwamoto, A., Park, M.-Y., Maeda, M., and Futai, M. (1993) Domains near ATP γ phosphate in the catalytic site of H⁺-ATPase: Model proposed from mutagenesis and inhibitor studies. *J. Biol. Chem.* **268**, 3156-3160.

- 325) Fraga, D., Hermolin, J., and Fillingame, R. H. (1994) Transmembrane helix-helix-interactions in F₀ suggested by suppressor mutations to Ala²⁴→Asp/Asp⁶¹→Gly mutant of ATP synthase subunit *c*. *J. Biol. Chem.* **269**, 2562-2567.
- 326) Zhang, Y., and Fillingame, R. H. (1994) Essential aspartate in subunit *c* of F₁F₀ ATP synthase: Effect of position 61 substitutions in helix-2 on function of Asp²⁴ in helix-1. *J. Biol. Chem.* **269**, 5473-5479.
- 327) Zhang, Y., Oldenburg, M., and Fillingame, R. H. (1994) Suppressor mutations in F₁ subunit ϵ recouple ATP-driven H⁺ translocation in uncoupled Q42E subunit *c* mutant of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 10221-10224.
- 328) Omote, H., Park, M.-Y., Maeda, M., and Futai, M. (1994) The α/β subunit interaction in H⁺-ATPase (ATP synthase): An *Escherichia coli* α subunit mutation (Arg- α 296 → Cys) restores coupling efficiency to the deleterious subunit β mutant (Ser- β 174 → Phe). *J. Biol. Chem.* **269**, 10265-10269.
- 329) Miki, J., Tsugumi, S., Ikeda, H., and Kanazawa, H. (1994) Intergenic suppression in a β subunit mutant with defective assembly in *Escherichia coli* F₁ATPase. *FEBS Lett.* **344**, 187-190.
- 330) Miki, J., Ishihara, Y., Mano, T., Noumi, T., and Kanazawa, H. (1994) Residues interacting with serine-174 and alanine-295 in the β subunit of *Escherichia coli* H⁺-ATPase: possible ternary structure of the center region of the subunit. *Biochim. Biophys. Acta* **1187**, 67-72.
- 331) Miki, J., Tsugumi, S., and Kanazawa, H. (1994) Reversion mutations in the β subunit mutants of *Escherichia coli* F₁-ATPase with defective subunit assembly: Implications for structure and function of the amino-terminal region. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 317-325.
- 332) Vik, S. B., and Antonio, B. J. (1994) A mechanism of proton translocation by F₁F₀ ATP synthases suggested by double mutants of the *a* subunit. *J. Biol. Chem.* **269**, 30364-30369.
- 333) Hartzog, P. E., and Cain, B. D. (1994) Second-site suppressor mutations at glycine 218 and histidine 245 in the *a* subunit of F₁F₀ ATP synthase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 32313-32317.
- 334) Kanazawa, H., Yabuki, M., Miki, J., Fudemoto, T., Ikeda, H., Noumi, T., and Shin, Y. (1995) Enhancement of *Escherichia coli* H⁺-ATPase caused by binding of monoclonal antibodies is attributed to structural changes of Leu-456 and Ser440 in the α subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 348-356.
- 335) Nakamoto, R. K., Al-Shawi, M., and Futai, M. (1995) The ATP synthase γ subunit: Suppressor mutagenesis reveals three helical regions involved in energy coupling. *J. Biol. Chem.* **270**, 14042-14046.
- 336) Beukelear, C. J.-D., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Maeda, M., and Futai, M. (1995) β - γ subunit interaction is required for catalysis by H⁺-ATPase (ATP synthase): β subunit amino acid replacements suppress a γ subunit mutation having a long unrelated carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **270**, 22850-22854.
- 337) Na, S., Perlin, D. S., Seto-Young, D., Wang, G.-F., and Haber, J. E. (1993) Characterization of yeast plasma membrane H⁺-ATPase mutant *pma1-A135V* and its revertant. *J. Biol. Chem.* **268**, 11792-11797.
- 338) Eraso, P., and Portillo, F. (1994) Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose: Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J. Biol. Chem.* **269**, 10393-10399.
- 339) Anand, S., Seto-Young, D., Perlin, D. S., and Haber, J. E. (1995) Mutations of G158 and their second-site revertants in the plasma membrane H⁺-ATPase gene (*PMA1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1234**, 127-132.
- 340) Rongey, S. H., Paddock, M. L., Feher, G., and Okamura, M. Y. (1993) Pathway of proton transfer in bacterial reaction centers: Second-site mutation Asn-M44 → Asp restores electron and proton transfer in reaction centers from the photosynthetically deficient Asp-L231 → Asn mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1325-1329.
- 341) Kless, H., and Vermaas, W. (1995) Tandem sequence duplications functionally complement deletions in the D1 protein of Photosystem II. *J. Biol. Chem.* **270**, 16536-16541.
- 342) Sebban, P., Maróti, P., Schiffer, M., and Hanson, D. K. (1995) Electrostatic sominoes: Long distance propagation of mutational effects in photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* **34**, 8390-8397.
- 343) Sciffer, M., Ainsworth, C. F., Deng, Y.-L., Johnson, G., Pascoe, F. H., and Hanson, D. K. (1995) Proline in a transmembrane helix compensates for cavities in the photosynthetic reaction center. *J. Mol. Biol.* **252**, 472-482.

- 344) Someya, Y., Sawai, T., and Yamaguchi, A. (1996) Mercaptide formed between the residue Cys70 and Hg²⁺ or Co²⁺ behaves as a functional positively-charged side chain operative in the Arg70 → Cys mutant of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35** (in press)
- 345) Yamaguchi, A., Suzuki, M., Kimura, T., and Sawai, T. Site-directed mutagenesis of the Arg residues conserved in TetA proteins from Gram-negative bacteria. (manuscript in preparation)
- 346) Someya, Y., Sawai, T., and Yamaguchi, A. Tetracycline transport activity of the His-257 → Cys mutant TetA is sensitive to Hg²⁺. (unpublished data)
- 347) Someya, Y., Sawai, T., and Yamaguchi, A. Long-range suppression of the Arg70 mutations by the Thr171 mutations in the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter. (manuscript in preparation)
- 348) Yamaguchi, A., Nakatani, M., and Sawai, T. (1992) Aspartic acid-66 is the only essential negatively charged residue in the putative hydrophilic loop region of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter encoded by transposon Tn10 of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**, 8344-8348.
- 349) Sebald, W., Machleidt, W., and Wachter, E. (1980) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide binds specifically to a single glutamyl residue of the proteolipid subunit of the mitochondrial adenosinetriphosphatase from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 785-789.
- 350) Walker, J. E., Saraste, M., and Gay, N. J. (1984) The *unc* operon: Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 164-200.
- 351) Someya, Y., Sawai, T., and Yamaguchi, A. Tetracycline/H⁺ antiport by the wild-type TetA is not affected by *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD). (unpublished observation)
- 352) Jung, K., Jung, H., Wu, J., Privé, G. G., and Kaback, H. R. (1993) Use of site-directed fluorescence labeling to study proximity relationships in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**, 12273-12278.
- 353) McMurry, L. M., Stephan, M., and Levy, S. B. (1992) Decreased function of the class B tetracycline efflux protein Tet with mutations at aspartate 15, a putative intramembrane residue. *J. Bacteriol.* **174**, 6294-6297.
- 354) Someya, Y., Sawai, T., and Yamaguchi, A. The Asp-15 → Asn/Asp-84 → Asn double mutant TetA does not confer resistance to tetracycline. (unpublished data)
- 355) Schiffer, M., and Edmundson, A. B. (1967) Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* **7**, 121-135.
- 356) Zhukovsky, E. A., Robinson, P. R., and Oprian, D. D. (1992) Changing the location of the Schiff base counterion in rhodopsin. *Biochemistry* **31**, 10400-10405.
- 357) Zvyaga, T. A., Min, K. C., Beck, M., and Sakmar, T. P. (1993) Movement of the retinylidene Schiff base counterion in rhodopsin by one helix turn reverses the pH dependence of the metarhodopsin I to metarhodopsin II transition. *J. Biol. Chem.* **268**, 4661-4667.
- 358) Guay, G. G., Tuckman, M., and Rothstein, D. M. (1994) Mutations in the *tetA(B)* gene that cause a change in substrate specificity of the tetracycline efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 857-860.
- 359) Yamaguchi, A., O'yauchi, R., Someya, Y., Akasaka, T., and Sawai, T. (1993) Second-site mutation of Ala-220 to Glu or Asp suppresses the mutation of Asp-285 to Asn in the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 26990-26995.
- 360) Someya, Y., Niwa, A., Sawai, T., and Yamaguchi, A. (1995) Site-specificity of the second-site suppressor mutation of the Asp-285 → Asn mutant of metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* and the effects of amino acid substitutions at the first and second sites. *Biochemistry* **34**, 7-12.
- 361) Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* **318**, 618-624.
- 362) Cowan, S. W., Scirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N., and Rosenbusch, J. P. (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**, 727-733.
- 363) Krauss, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, C., Wilson, K. S., Witt, H. T., and Saenger, W. (1993) Three-dimensional structure of system I of photosynthesis at 6 Å resolution. *Nature* **361**, 326-331.
- 364) McDermott, G., Prince, S. M., Freer, A. A., Hawthornthwaite-Lawless, A. M., Papiz, M. Z., Cogdell, R. J., and Isaacs, N. W. (1995) Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* **374**, 517-521.

- 365) Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269**, 1069-1074.
- 366) Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669.
- 367) Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628.
- 368) Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K. H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929.
- 369) Toyoshima, C., Sasabe, H., and Stokes, D. L. (1993) Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature* **362**, 469-471.
- 370) Schertler, G. F. X., Villa, C., and Henderson, R. (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature* **362**, 770-772.
- 371) Holzenburg, A., Bewley, M. C., Wilson, F. H., Nicholson, W. V., and Ford, R. C. (1993) Three-dimensional structure of photosystem II. *Nature* **363**, 470-472.
- 372) Karrasch, S., Bullough, P. A., and Ghosh, R. (1995) The 8.5 Å projection map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *EMBO J.* **14**, 631-638.
- 373) Dickson, R., Abelson, J., Barnes, W., and Reznikoff, W. (1975) Genetic regulation: the *lac* control region. *Science* **187**, 27-35.
- 374) Aldema, M. L., McMurry, L. M., Walmsley, A. R., and Levy, S. B. (1996) Purification of the Tn10-specified tetracycline efflux antiporter TetA in a native state as a polyhistidine fusion protein. *Mol. Microbiol.* (in press)
- 375) Kasahara, M., and Hinkle, P. C. (1977) Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **252**, 7384-7390.
- 376) Newman, M. J., Foster, D. L., Wilson, T. H., and Kaback, H. R. (1981) Purification and reconstitution of functional lactose carrier from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**, 11804-11808.
- 377) Foster, D. L., Garcia, M. L., Newman, M. J., Patel, L., and Kaback, H. R. (1982) Lactose-proton symport by purified *lac* carrier protein. *Biochemistry* **21**, 5634-5638.
- 378) Viitanen, P., Newman, M. J., Foster, D. L., Wilson, T. H., and Kaback, H. R. (1986) Purification, reconstitution, and characterization of the *lac* permease of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **125**, 429-452.
- 379) Dent, H. C., Henderson, P. J. F., and Lucas, V. A. (1992) Purification of the galactose/H⁺ symport protein of *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 251S.
- 380) Nakanishi, M., Kagawa, Y., Narita, Y., and Hirata, H. (1994) Purification and reconstitution of an intestinal Na⁺-dependent neutral L-α-amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* **269**, 9325-9329.
- 381) Ambudkar, S. V., Lelong, I. H., Zhang, J., Cardarelli, C. O., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1992) Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: Characterization of the drug-stimulated ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8472-8476.
- 382) Shapiro, A. B., and Ling, V. (1994) ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 3745-3754.
- 383) Shapiro, A. B., and Ling, V. (1995) Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**, 161667-16175.
- 384) O'Riordan, C. R., Erickson, A., Bear, C., Li, C., Manavalan, P., Wang, K. X., Marshall, J., Scheule, R. K., McPherson, J. M., Cheng, S. H., and Smith, A. E. (1995) Purification and characterization of recombinant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from Chinese hamster ovary and insect cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 17033-17043.
- 385) Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., and Kagawa, Y. (1977) Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 936-940.
- 386) Hickman, R. K., McMurry, L. M., and Levy, S. B. (1990) Overproduction and purification of the Tn10-specified inner membrane tetracycline resistance protein Tet using fusions to β-galactosidase. *Mol. Microbiol.* **4**, 1241-1251.

- 387) Nelson, M. L., Park, B. H., Andrews, J. S., Georgian, V. A., Thomas, R. C., and Levy, S. B. (1993) Inhibition of the tetracycline efflux antiporter protein by 13-thio-substituted 5-hydroxy-6-deoxytetracyclines. *J. Med. Chem.* **36**, 370-377.
- 388) Nathans, J. (1992) Rhodopsin: Structure, function, and genetics. *Biochemistry* **31**, 4923-4931.
- 389) Khorana, H. G. (1993) Two light-transducing membrane proteins: Bacteriorhodopsin and the mammalian rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1166-1171.
- 390) Krebs, M. P., and Khorana, H. G. (1993) Mechanism of light-dependent proton translocation by bacteriorhodopsin. *J. Bacteriol.* **175**, 1555-1560.
- 391) Matthews, D. A., Alden, R. A., Bolin, J. T., Freer, S. T., Hamlin, R., Xuong, N., Kraut, J., Poe, M., Williams, M., and Hoogeteen, K. (1977) Dihydrofolate reductase: X-ray structure of the binary complex with methotrexate. *Science* **194**, 452-455.
- 392) Bystroff, C., Oatley, S. J., and Kraut, J. (1990) Crystal structures of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: The NADP⁺ holoenzyme and the folate•NADP⁺ ternary complex. Substrate binding and a model for the transition state. *Biochemistry* **29**, 3263-3277.
- 393) Jelsch, C., Lenfant, F., Masson, J. M., and Samama, J. P. (1992) β -lactamase TEM1 of *E. coli*. Crystal structure determination at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.* **299**, 135-142.
- 394) Someya, Y., Moriyama, Y., Futai, M., Sawai, T., and Yamaguchi, A. (1995) Reconstitution of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in proteoliposomes including F₀F₁-ATPase. *FEBS Lett.* **374**, 72-76.
- 395) Privé, G. G., Verner, G. E., Weitzman, C., Zen, K. H., Eisenberg, D., and Kaback, H. R. (1994) Fusion proteins as tools for crystallization: the lactose permease from *Escherichia coli*. *Acta Cryst.* **D50**, 375-379.
- 396) Someya, Y., Kimura, T., Tsuroo, T., Sawai, T., and Yamaguchi, A. Fusion proteins of TetA and nucleotide binding domain(s) from human MDR1 P-glycoprotein can confer moderate levels of tetracycline resistance. (unpublished data)
- 397) Shimabuku, A. M., Nishimoto, T., Ueda, K., and Komano, T. (1992) P-glycoprotein: ATP hydrolysis by the N-terminal nucleotide-binding domain. *J. Biol. Chem.* **267**, 4308-4311.
- 398) Moutin, M.-J., Cuillel, M., Rapin, C., Miras, R., Anger, M., Lompré, A.-M., and Dupont, Y. (1994) Measurement of ATP binding on the large cytoplasmic loop of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase overexpressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 11147-11154.
- 399) Baubichon-Cortay, H., Baggetto, L. G., Dayan, G., and Pietro, A. D. (1994) Overexpression and purification of the carboxyl-terminal nucleotide-binding domain from mouse P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **269**, 22983-22989.
- 400) Randak, C., Roscher, A. A., Hadorn, H. B., Assfalg-Machleidt, I., Auerswald, E. A., and Machleidt, W. (1995) Expression and functional properties of the second predicted nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator fused to glutathione-S-transferase. *FEBS Lett.* **363**, 189-194.
- 401) Sharma, S., and Rose, D. R. (1995) Cloning, overexpression, purification, and characterization of the carboxyl-terminal nucleotide binding domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**, 14085-14093.
- 402) Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1995) Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently in HEK 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities. *J. Biol. Chem.* **270**, 21449-21452.
- 403) Ko, Y. H., and Pederson, P. L. (1995) The first nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator can function as an active ATPase. *J. Biol. Chem.* **270**, 22093-22096.
- 404) Pourcher, T., Leclercq, S., Brandolin, G., and Leblanc, G. (1995) Melibiose permease of *Escherichia coli*: Large scale purification and evidence that H⁺, Na⁺, and Li⁺ sugar symport is catalyzed by a single polypeptide. *Biochemistry* **34**, 4412-4420.
- 405) McMurry, L. M., and Levy, S. B. (1995) The NH₂-terminal half of the Tn10-specified tetracycline efflux protein TetA contains a dimerization domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 22752-22757.
- 406) McNicholas, P., McGlynn, M., Guay, G. G., and Rothstein, D. M. (1995) Genetic analysis suggests functional interactions between the N- and C-terminal domains of the TetA(C) efflux pump encoded by pBR322. *J. Bacteriol.* **177**, 5355-5357.
- 407) Bibi, E., and Kaback, H. R. (1990) *In vivo* expression of the *lacY* gene in two segments leads to functional *lac*

- permease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4325-4329.
- 408) Wrubel, W., Stoshaj, U., Sonnewald, U., Theres, C., and Ehring, R. (1990) Reconstitution of an active lactose carrier in vivo by simultaneous synthesis of two complementary protein fragments. *J. Bacteriol.* **172**, 5374-5381.
- 409) Wrubel, W., Stochaj, U., and Ehring, R. (1994) Construction and in vivo analysis of new split lactose permeases. *FEBS Lett.* **349**, 433-438.
- 410) Zen, K. H., McKenna, E., Bibi, E., Hardy, D., and Kaback, H. R. (1994) Expression of lactose permease in contiguous fragments as a probe for membrane-spanning domains. *Biochemistry* **33**, 9198-8206.
- 411) Liao, M.-J., Huang, K.-S., and Khorana, H. G. (1984) Regeneration of native bacteriorhodopsin structure from fragments. *J. Biol. Chem.* **259**, 4200-4204.
- 412) Popot, J. L., Gerchman, S. E., and Engelman, D. M. (1987) Refolding of bacteriorhodopsin in lipid bilayers. A thermodynamically controlled two-stage process. *J. Mol. Biol.* **198**, 655-676.
- 413) Kahn, T. W., and Engelman, D. M. (1992) Bacteriorhodopsin can be refolded from two independently stable transmembrane helices and the complementary five-helix fragment. *Biochemistry* **31**, 6144-6151.
- 414) Ridge, K. D., Lee, S. S. J., and Yao, L. L. (1995) In vivo assembly of rhodopsin from expressed polypeptide fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3204-3208.
- 415) Kobilka, B. K., Kobilka, T. S., Daniel, K., Regan, J. W., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1988) Chimeric α_2 - β_2 -adrenergic receptors: Delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science* **240**, 1310-1316.
- 416) Maggio, R., Vogel, Z., and Wess, J. (1993) Reconstitution of functional muscarinic receptors by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragment. *FEBS Lett.* **319**, 195-200.
- 417) Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S. (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **339**, 597-603.
- 418) Yamaguchi, M., and Hatefi, Y. (1991) Mitochondrial energy-transducing nicotinamide nucleotide transhydrogenase: Purification and properties of the proteinase K-sisected enzyme. *J. Biol. Chem.* **266**, 17020-17025.
- 419) Tang, W. J., Krupinski, J., and Gilman, A. G. (1991) Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **266**, 8595-8603.
- 420) Berkower, C., and Michaelis, S. (1991) Mutational analysis of the yeast a-factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. *EMBO J.* **10**, 3777-3785.
- 421) Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1994) Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J. Biol. Chem.* **269**, 7750-7755.
- 422) Cope, D. L., Holman, G. D., Baldwin, S. A., and Wolstenholme, A. J. (1994) Domain assembly of the GLUT1 glucose transporter. *Biochem. J.* **300**, 191-294.
- 423) Tetsta, R. T., Petersen, P. J., Jacobus, N. V., Sum, P.-E., Lee, V. J., and Tally, F. P. (1993) In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycylicyclines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2270-2277.
- 424) Elipoulos, G. M., Wennersten, C. B., Cole, G., and Moellering, R. C. (1994) In vitro activities of two glycylicyclines against Gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 534-541.
- 425) Wise, R., and Andrews, J. M. (1994) In vitro activities of two glycylicyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1096-1102.
- 426) Rasmussen, B. A., Gluzman, Y., and Tally, F. P. (1994) Inhibition of protein synthesis occurring on tetracycline-resistant TetM-protected ribosomes by a novel class of tetracyclines, the glycylicyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1658-1660.
- 427) Goldstein, F. W., Kitzis, M. D., and Acar, J. F. (1994) *N,N*-Dimethylglycyl-amido derivative of minocycline and 6-demethyl-6-desoxytetracycline, two new glycylicyclines highly effective against tetracycline-resistant Gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2218-2220.
- 428) Wexler, H. M., Molitoris, E., and Finegold, S. M. (1994) In vitro activities of two new glycylicyclines, *N,N*-dimethylglycylamido derivatives of minocycline and 6-demethyl-6-deoxytetracycline, against 339 strains of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2513-2515.
- 429) Kenny, G. E., and Cartwright, F. D. (1994) Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma*

- pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to new glycylicyclines in comparison with those to older tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2628-2632.
- 430) Tally, F. T., Ellestad, G. A., and Testa, R. T. (1995) Glycylicyclines: a new generation of tetracyclines. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**, 449-452.
- 431) Fraise, A. P., Brenwald, N., Andrews, J. M., and Wise, R. (1995) In-vitro activity of two glycylicyclines against enterococci resistant to other agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**, 877-891.
- 432) Hinrichs, W., Kisker, C., Düvel, M., Müller, A., Tovar, K., Hillen, W., and Saenger, W. (1994) Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* **264**, 418-420.
- 433) Kisker, C., Hinrichs, W., Tovar, K., Hillen, W., and Saenger, W. (1995) The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg²⁺ reveals mechanism of antibiotic resistance. *J. Mol. Biol.* **247**, 260-280.
- 434) Oliva, B., and Chopra, I. (1992) Tet determinants provide poor protection against some tetracyclines: Further evidence for division of tetracyclines into two classes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 876-878.
- 435) Yamaguchi, A., Someya, Y., and Sawai, T. (1993) The in vivo assembly and function of the N- and C-terminal halves of the Tn10-encoded TetA protein in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **324**, 131-135.
- 436) Someya, Y., Yamaguchi, A., and Sawai, T. (1995) A novel glycylicycline, 9-(*N,N*-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxytetracycline, is neither transported nor recognized by the transposon Tn10-encoded meta-tetracycline/H⁺ antiporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 247-249.

論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Akihito Yamaguchi, Takaaki Akasaka, Nobukazu Ono, Yuichi Someya, Mariko Nakatani, and Tetsuo Sawai (1992) Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli* Encoded by Transposon Tn10: Roles of the aspartyl residues located in the putative transmembrane helices. *J. Biol. Chem.* 267, 7490-7498.
2. Akihito Yamaguchi, Yuichi Someya, and Tetsuo Sawai (1992) Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli* Encoded by Transposon Tn10: The role of a conserved sequence motif, GXXXXRXGRR, in a putative cytoplasmic loop between helices 2 and 3. *J. Biol. Chem.* 267, 19155-19162.
3. Akihito Yamaguchi, Yuichi Someya, and Tetsuo Sawai (1993) The in vivo assembly and function of the N- and C-terminal halves of the Tn10-encoded TetA protein in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 324, 131-135.
4. Akihito Yamaguchi, Rika O'yauchi, Yuichi Someya, Takaaki Akasaka, and Tetsuo Sawai (1993) Second-site Mutation of Ala-220 to Glu or Asp Suppresses the Mutation of Asp-285 to Asn in the Transposon Tn10-encoded Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268, 26990-26995.
5. Yuichi Someya, Akihito Yamaguchi, and Tetsuo Sawai (1995) A Novel Glycylcycline, 9-(*N,N*-Dimethylglycyl-amido)-6-Demethyl-6-Deoxytetracycline, Is neither Transported nor Recognized by the Transposon Tn10-encoded Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 247-249.
6. Yuichi Someya, Tetsuo Sawai, and Akihito Yamaguchi (1995) Site-Specificity of the Second-Site Suppressor Mutation of the Asp-285 → Asn Mutant of Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli* and the Effects of Amino Acid Substitutions at the First and Second Sites. *Biochemistry* 34, 7-12.
7. 染谷雄一、山口明人 (1995) 細菌の薬剤排出蛋白. *日本細菌学雑誌* 50, 403-421.
8. Yuichi Someya, Yoshinori Moriyama, Masamitsu Futai, Tetsuo Sawai, and Akihito Yamaguchi (1995) Reconstitution of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in proteoliposomes including F₀F₁-ATPase. *FEBS Lett.* 374, 72-76.
9. Yuichi Someya, Tetsuo Sawai, and Akihito Yamaguchi (1996) Mercaptide Formed between the Residue Cys70 and Hg²⁺ or Co²⁺ Behaves as a Functional Positively-Charged Side Chain Operative in the Arg70 → Cys Mutant of the Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 35 (in press).

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	澤井哲夫
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	渡辺和夫
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	畝本 力
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	五十嵐一衛
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	斎藤和季