

感染症原因菌の悪性化を統御するクオラムシグナル受容体膜タンパク質複合体の  
結晶構造解析Crystal structure analysis of the quorum-receptor complex that controls the  
expression of virulence factor in the pathogen *Enterococcus faecalis*

永田宏次\*, 田之倉優

東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Koji Nagata\* and Masaru Tanokura

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi,  
Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

## 1 はじめに

同一種の菌体の密度に依存して遺伝子発現が制御される機構を、クオラムセンシング（菌体密度依存的遺伝子発現制御機構）と呼ぶ。病原性細菌の病原因子発現がクオラムセンシングにより制御されている例が多いことから、この現象に着目した種特異的に作用する新規拮抗剤の開発が期待されている。腸球菌 *Enterococcus faecalis* は、ヒトを含む哺乳類の腸管内に存在する常在菌であり、病原性は弱く通常であれば害はないが、抵抗力が低下した患者に対して日和見感染する例が知られ、敗血症などを引き起こす。

本研究は、腸球菌の病原因子（分泌性ゼラチナーゼ）の発現を制御するペプチドクオラムシグナル GBAP とその受容体膜タンパク質 FsrC との複合体の結晶構造を決定することにより、GBAP と FsrC の分子認識機構を原子レベルで明らかにし、GBAP 拮抗阻害剤の分子設計[1]のさらなる改善に役立てることを目的としている。クオラムシグナル拮抗阻害剤は、既存の微生物群の生育状態に影響を与えずに、種特異的に作用し、病原性の発現のみを遮断する効果が期待される。ヒトに有益な菌と有害な菌とを区別せずに攻撃する従来の抗生物質と異なり、このようなクオラムシグナル拮抗阻害剤は病原性の発現のみを遮断するという点で画期的である。

## 2 実験

蒸気拡散法により得られた FsrC-GBAP 複合体結晶の X 線回折実験を Photon Factory Advanced Ring NE3A にて行った。

## 3 結果および考察

同一前課題（2012G103）において、NE3A にて取得した FsrC-GBAP 複合体結晶の X 線回折データ（分解能 4.1 Å、空間群 R3 または R32、と格子定数  $a = b = 144.3$  Å,  $c = 512.5$  Å）よりも高分解能の X 線回折データを取得すべく、精製や結晶化条件の改善を進めていたが、この回折データについて大腸菌の異

物排出に関わる膜タンパク質 AcrB の結晶の空間群・格子定数との類似性を指摘され、分子置換による構造解析を行った結果、本結晶は FsrC-GBAP 複合体のものではなく、大腸菌を宿主として発現・精製した FsrC 試料に微量混在していた AcrB のものであることが判明した。

この結果を受けて FsrC 調製法を見直したところ、AcrB は Ni アフィニティおよびゲルろ過の 2 段階のクロマトグラフィでも FsrC と分離できないことが判明したため、FsrC 発現用の宿主を大腸菌 C41(DE3) から C41(DE3)  $\Delta$ acrB に変更し、その後の FsrC 調製に用いた。

C41(DE3)  $\Delta$ acrB にて発現した FsrC 試料を用いて FsrC-GBAP 複合体の結晶化条件の探索からやり直し、安定性向上変異体も数種類作製したが、実験期間内に十分な回折能を有する結晶を得ることができなかった。今後、FsrC の安定性を向上させた変異体の取得を体系的に進め、良質の結晶が得られるようになった段階で、再度、同一課題での申請を行いたいと考えている。

## 4 まとめ

FsrC-GBAP 複合体結晶と思っていたものが AcrB 結晶であると実験期間中に判明したため、試料調製法の検証と、AcrB を含まない FsrC-GBAP 試料の結晶化条件探索を進めた。今後、良質結晶取得のために、FsrC の安定性向上変異導入を進める。

## 謝辞

Photon Factory のビームラインスタッフの皆様へたいへんお世話になりました。心より感謝申し上げます。

## 参考文献

[1] J. Nakayama, R. Yokohata, M. Sato, T. Suzuki, T. Matsufuji, K. Nishiguchi, T. Kawai, Y. Yamanaka, K. Nagata, M. Tanokura and K. Sonomoto. *ACS Chem. Biol.* **8**, 804-811 (2013).

\* aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

