

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15105

研究課題名(和文) P糖タンパク質立体構造のNMR解析を可能にする実験法の開発

研究課題名(英文) Development of experimental protocols for NMR analysis of P-glycoprotein structure

研究代表者

加藤 博章 (Kato, Hiroaki)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：90204487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物由来の巨大な膜タンパク質であるP糖タンパク質のNMRによる解析の実現を目指して、安定同位体標識に適した大量発現系の構築と限定的な同位体標識法を検討した。その結果、メタノール資化性酵母*Pichia pastoris*を用いることにより、¹⁵N標識を行って、数十ミリグラムレベルの標識試料タンパク質を精製することができた。また、そのタンパク質を用いてNMR測定を行うことにより、動的構造の解析に適すると考えられるスペクトルを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：P-glycoprotein is an ATP Binding Cassette multidrug transporter which is a large membrane protein that works in eukaryotic cells. Thus, it is difficult to have a large amount of its ¹⁵N-labeled preparation suitable to measure NMR spectrum. To overcome this obstacle, we tried to develop a over-production system of ¹⁵N-labeled P-glycoprotein using a methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. We obtained several ten milli-gram of purified preparation of ¹⁵N-labeled P-glycoprotein from a thermophilic eukaryote, *Cyanidioschyzon merolae*. We measured ¹H-¹⁵N TROSY spectrum, suggesting normally folded protein behavior and the specimen is suitable for an analysis of dynamic structure.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜タンパク質 NMR 多剤耐性 ATP トランスポーター 構造生物学 薬理学 好熱性真核生物

1. 研究開始当初の背景

P糖タンパク質 (ABCB1)は、外来化合物から生体を防御する一方で、医薬品も排出することから、抗癌剤治療などの障害となっている多剤排出トランスポーターであり、その多剤認識と排出メカニズムの解明が希求されている。分子メカニズムの解明には、詳細な立体構造の把握が必須である。最近いくつかの ATP Binding Cassette (ABC)トランスポーターの X線結晶構造が明らかとなったが (*Science* **323**, 1718, 2009; *Nature* **490**, 566, 2012; *PNAS* **110**, 13386, 2013)、マウスの ABCB1 ホモログの結晶構造解析結果では 3.8 オングストロームと分解能が低いためメカニズムの詳細を明らかにできていない。そこで我々は、遺伝子配列だけでなく、薬理的な性質もヒト ABCB1 とよく似た CmABCB1 を温泉に棲む好熱性真核生物 *Cyanidioschyzon merolae* から発見し、これまでで最高となる 2.4 オングストローム分解能で X線結晶構造解析を達成することに成功した (*PNAS* **111**, 4049, 2014)。その構造は、細胞質側に開口部をもつ、いわゆる「内向型」状態の構造であるが、さらに最近、基質を細胞外へと排出した後の状態「外向型」構造を 2.1 オングストローム分解能で結晶解析することにも成功しつつある。これまでトランスポーターの両状態の構造を同一の分子について決定した例は、SLC 型 LeuT だけであり (*Nature* **448**, 952, 2007; *Nature* **481**, 469, 2012)、他には、ABC フリップパーゼ MsbA で曖昧な構造 (5.3, 3.8 オングストローム) が異なる細菌のホモログ同士について報告されている (*PNAS* **104**, 19005, 2007) もの、分子メカニズムの解明には至っていない。したがって、同一の CmABCB1 分子の内向型と外向型構造の決定は、ABCB1 のメカニズム解析の起点として非常に重要な位置を占めると言える。

トランスポーターの分子メカニズムの特徴は、内向型と外向型の間を往復運動して基質排出を実施する点であるが、多様な基質をいかにして認識しているのかを捉えるためには、動きの基点となる静止状態の両構造だけでなく、その途中状態の立体構造、すなわち、動的な構造あるいは構造変化を直接捉えることが重要である。基質の構造の違いが、中間状態構造の違いに基づくのか、基質が変わっても同じ構造で捉えることが可能なのか、疑問は尽きない。しかし、X線結晶構造解析は、動的構造の解析には不向きな手法であり、核磁気共鳴スペクトル (NMR) 解析が適していると考えられる。ただし、NMR は、試料の分子量が 3 万程度でなければ解析不可能であると言われており、脂質膜や界面活性剤ミセルに包含された状態の巨大な膜タンパク質の解析は見送られてきた。また、NMR 解析には、¹³C や ¹⁵N で試料を同位体標識することが必須であり、試料調製が難しく、大腸菌や無細胞系でのタンパク質発現が

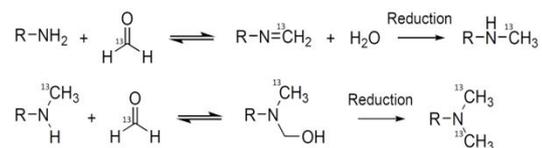
困難な場合は、そもそも試料調製ができないことになってしまうという問題がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子量 13 万を超える巨大な膜タンパク質 - 界面活性剤ミセル複合体となる P糖タンパク質 ABCB1 の NMR による動的構造解析を可能にするための実験法を確立することである。すなわち、すでに申請者が立体構造を明らかにしている P糖タンパク質ホモログ CmABCB1 の内向型と外向型の結晶構造情報を活用することにより、特定のアミノ酸残基のみに限定的な同位体修飾を施すことで NMR スペクトルを単純化して、結晶構造を参照しながらの NMR 解析を可能にできるのではないかというアイデアに挑戦する。そのために、3つの実験系の構築を試みた。すなわち (1) 化学修飾による ¹³C 標識体の調製と NMR 解析、(2) ¹⁵N 標識を目指したメタノール酵母 *Pichia pastoris* 発現系の構築、(3) ¹⁵N-トリプトファン (Trp) のスペクトル解析による CmABCB1 の動的構造解析の可能性の検討である。NMR 解析では、1回の測定に最低でも 0.1 mM 程度の濃度の試料が 0.2 mL 必要である。したがって、CmABCB1 の場合は、約 3mg となる。これは結晶化に必要な量を 1回の測定だけで消費することを示しており、実用的な試料調製法の確立が研究の是非を左右することを表している。一方、機能解析の結果、Trp 残基の変異は CmABCB1 の基質排出活性を低下させることから、重要な役割を果たしていることが判明している。また、Trp 残基は内向型と外向型の構造変化の要となる膜貫通アルファ - ヘリックスに存在することが判明しており、その動きを NMR で捉えることができれば、構造変化の経路解析によって、基質輸送と構造変化の相関解明に大きな進展が期待される。Trp 残基のインドール側鎖の NH 基は、特徴的な化学シフトの位置に観測されることが知られており、NMR 解析の可能性を判断するためには優れた性質を持っている。

3. 研究の方法

(1) 化学修飾による ¹³C 標識体の調製と NMR 解析: タンパク質のリシン (Lys) 残基は以下の図のように ¹³C ラベル化ホルムアルデヒドと反応させることにより、¹³C ジメチル化を行うことができる。しかし、巨大な膜タンパク質でこの反応が試みられた例は知られておらず、また、¹³C ラベル化した Lys 残基が NMR 解析で検出可能かどうかについても前例がない。



CmABCB1 には、サブユニット当り 16 残基の

Lysがある。結晶構造からLysの場所は特定できており、周囲の環境についての情報も得られていることから、NMRスペクトルの分析を有利に進めることができる。したがって、この反応による¹³C標識体のNMR解析が可能かどうかかわれば、巨大膜タンパク質のNMR解析に突破口が開かれることになるだろう。16残基それぞれのLysが就職されたかどうかは、修飾反応後のCmABCB1をトリプシン消化した後LC-MS解析を行い、標識の有無を確かめた。ジメチル化標識資料については、¹H-¹³C-TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy) NMR解析を行なった。NMRシグナルの帰属を行うため、阻害剤の添加によってNMRスペクトルが変化するかどうかを調べた。

(2) ¹⁵N標識を目指したメタノール酵母 *Pichia pastoris* 発現系の構築：CmABCB1は真核生物由来であることからNMR用の胞体たい標識に関して実績のある大腸菌は利用することができないため、*P. pastoris*による培養系を¹⁵N標識に適した条件に最適化することが必要となる。そこで、同位体の中では比較的安価な¹⁵N標識塩化アンモニウムを用いて、培養条件の検討を行なった。培養には、培養フラスコまたはジャーファーマンターを用いて、目的タンパク質の発現量と生産性の向上を検討した。また、得られた¹⁵Nラベル体は、Hisタグを利用する親和修飾クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを用いてSDS電気泳動で単一バンドが得られるまで精製した。

(3) ¹⁵N-Trpのスペクトル解析によるCmABCB1の動的構造解析の可能性の検討：CmABCB1には、6残基のTrpが存在する。Trp残基は以下の2点からNMR解析の対象として優れていると考えられる。すなわち、Trp側鎖のNH 1由来のシグナルは低磁場領域 (H = 10-12 ppm, N = 129-135 ppm) に特徴的に出現するため、均一¹⁵N標識試料を用いてもシグナルを同定することができると思われる。CmABCB1モノマー中に6つあるTrpのうち、Trp400が機能に重要であることが知られている。そこで、各Trpに由来するNMRシグナルを帰属するため、Trpをチロシン(Tyr)に置換した変異体を作成した。さらに、Trpが基質排出機能と関係するかどうかを確認するため、それぞれの変異体を含む酵母が薬物耐性を向上させるか否かを利用して活性評価を行なった。Trp-Tyr置換変異体は(2)で確立した方法を用いて¹⁵N標識を行なった。さらに精製を行なったのちにNMRスペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1) Lys側鎖を¹³C-ジメチル化するために、CmABCB1精製標品に対して¹³Cホルムアルデヒドを用いた還元的アルキル化反応処理を行なったところ、95%を超えるLysがアルキル化を受けていることが判明した。すな

わち、¹³Cジメチル化反応後の見反応のアミンの割合を定量したところ、3%程度であることが明らかとなった。¹³C-ジメチル化したCmABCB1試料を用いて、¹³C-ジメチル化Lysのメチル基の¹H-¹³C TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy) NMR解析を行なった。まず生理的条件であるpH 7.5で測定を行なったところ、ジメチル化されたLys由来のメチルシグナル領域 (H = 2.5-3.0 ppm, C = 43-46 ppm) でシグナルが観測された。ピークの分布を見ると H = 2.7-3.0 ppm, C = 45-46 ppm 付近で多くのピークが重なっており、このままでは帰属が困難になると考えられた。Lys側鎖のpKaは9.3-13.2であり、この付近のpHでは周囲の環境のわずかな違いがスペクトルに現れることが知られていることから、pHを上げて測定を試みたところ、pH 7.5では多くのピークがそれぞれ重なっていたが、pHを上げるにつれてピークの分離が良くなり、pH 9.0で測定することでそれら重なったピークを分離することができた。ついで、ある阻害剤と相互作用することが判明しているLys162に由来するNMRシグナルの同定を試みた。その結果、4つのピークで化学シフト変化が観測されタコことから、この変化したピークのいずれかがLys162由来のシグナルであることが示唆された。さらに、Lys162をArgに置換したK162R変異体作製し、精製標品を調製後、¹³C-ジメチル化してNMR測定を行なった。その結果、阻害剤の添加による化学シフト変化が見られたピークのうち、1つのピークが消失したことが明らかとなった。未だ、全てのシグナルを帰属するには至っていないが、これまでの結果から、¹³C-ジメチル化CmABCB1はLysへの単変異導入による帰属が実験的に可能であり、これを実行すればNMR解析が可能であることが示唆される結果が得られた。

(2) CmABCB1の安定同位体標識法として、¹⁵N塩化アンモニウムを窒素源とした酵母組換え発現による均一¹⁵N標識法を用いて、NMR解析によるTrp残基由来シグナルの検出を試みた。¹⁵N塩化アンモニウムを含む基礎塩培地で*P. pastoris*にCmABCB1を組換え発現させ、得られた菌体を用いて精製した結果、8L培養から4回分の測定に相当する約10 mgの均一¹⁵N標識CmABCB1を取得することができた。これにより、真核生物に由来する分子量13万を越える巨大膜タンパク質の¹⁵N安定同位体ラベル試料を測定に十分な量取得し、NMRスペクトルを観測することができた。これにより、大腸菌では発現が困難な真核生物由来の膜タンパク質のNMR試料を調製する実験系を確立することができた。

(3) 均一¹⁵N安定同位体標識したCmABCB1を用いて、¹H-¹⁵N TROSY NMR解析を行なうことができた。その結果、シグナルが広範囲に広がっており、ランダムコイル領域 (H = 8.0-8.6 ppm) 以外にもシグナルが観測されていることから、タンパク質のフォールディン

グは保たれていることが示唆されるスペクトルが観測されたと考えられた。ついで、機能に必須である Trp400 のシグナルを同定するため、Trp400 以外の5つの Trp を Tyr に置換した変異体を用いて NMR 測定を行なった。すなわち、均一 ^{15}N 標識の当該変異体試料を調製して測定したところ、 $^1\text{H} = 10.13 \text{ ppm}$, $^{15}\text{N} = 130.5 \text{ ppm}$ にシグナルが得られた。したがって、このシグナルが Trp400 由来のものだと同定することができたと考えられる。この測定に対して、ATP アナログや輸送基質を加えてみたところ、顕著なスペクトルの変化が観測された。このことは、Trp400 がトランスポーター活性に必須であることを反映していると示唆された。これらの結果から、均一 ^{15}N 標識した CmABC B1 の NMR 測定によって動的構造変化の解析が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

宇都宮裕人、山口知宏、宮ノ入洋平、小田健人、中津亨、甲斐荘正恒、加藤博章、メタノール資化性酵母発現系を用いて ^{15}N 安定同位体標識した ABC トランスポーターの NMR 解析、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 7 日~9 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)ポスター発表

小田健人、山口知宏、宮ノ入洋平、宇都宮裕人、中津亨、甲斐荘正恒、加藤博章、 $[\text{e-}^{13}\text{C}]$ メチオニン標識した ABC トランスポーター MsbA の調製と NMR 解析、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 7 日~9 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)ポスター発表

加藤博章(招待講演) P 糖タンパク質のメカニズムから薬物動態の分子構造基盤をさぐる、フォーラム富山創薬第 45 回研究会、2017 年 5 月 18 日、富山県民会館(富山市)

松岡敬太、山口知宏、中津亨、加藤博章、P 糖タンパク質の基質排出ゲート開閉の構造基盤、第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017 年 6 月 20 日~22 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)ポスター発表

大城悠暉、山口知宏、松岡敬太、宇都宮裕人、中津亨、加藤博章、トリプトファンの蛍光を利用した ABC 多剤排出トランスポーターとリガンドとの相互作用解析、第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2017 年 10 月 17 日、兵庫医療大学(神戸市)ポスター発表

H. Kato (招待講演), X-Ray Structures of CmABC B1 in outward- and inward-facing states reveal a conformational exchange allowing the efflux of multidrug, 7th FEBS Special Meeting on ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases – ABC2018, 2018 年 3 月 6 日~3 月 12 日 (Innsbruck, Austria)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
加藤 博章 (KATO Hiroaki)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 9 0 2 0 4 4 8 7

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者
宮ノ入 洋平 (MIYANOIRI Yohei)
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号: 8 0 5 4 7 5 2 1

(4) 研究協力者

()