

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03664

研究課題名(和文) ABCトランスポーター能動輸送のポンプ収縮弛緩と逆止弁メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of contraction and backflow prevention by check valves in ABC transporter pump

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ガンの多剤耐性の原因となっている多剤排出トランスポーターP糖タンパク質は、内向型状態から外向型状態へと分子全体が大きくコンフォメーション変化することで多種多様な薬物を細胞外へ排出している。これまでのところ、X線結晶構造解析により内向型状態の立体構造が決定されてきたが、ATPと結合する外向型状態の結晶は得られていなかった。我々は、内向型状態の構造安定化メカニズムを推定し、アミノ酸置換を導入して改良することにより、外向型状態を結晶化することに初めて成功し、多剤排出トランスポーターとしては世界最高の精度(1.9オングストローム)で立体構造を決定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

P糖タンパク質は、再発したガンがあらゆる抗がん剤に対して耐性を示して薬物治療を不可能にする原因分子であり、その制御は学術的にも社会的にも大きな意義を有している。今回の研究によって、P糖タンパク質の機能に必要な立体構造変化の詳細が明らかになったことから、どのようにして、この分子が多種多様な化合物を認識して排出することができるのかが解明された。すなわち、分子内部に大きな空洞を有しており、そこへ様々な大きさや化学構造の分子を捉え、排出の際には、その空洞を絞り出すように薬物を押し出していることが明らかになった。薬物分子設計の指針が得られたことは、将来の医薬品開発にとって大きな成果であるといえる。

研究成果の概要(英文)：Multidrug transporter P-glycoprotein extrudes a large variety of xenobiotics from cells. To understand the mechanism of the multidrug transport, we need reliable structural information of each conformational state of the pumping action. Although several crystal structures of P-glycoproteins have been determined in an inward-facing conformation, no outward-facing structure was previously available. In order to fill the gap, we discovered a new eukaryotic homolog, CmABCB1 from *Cyanidioschyzon merolae*, with similar ATPase kinetics and multidrug transport function to mammalian P-glycoproteins. To obtain the outward-facing conformation of CmABCB1 in a crystalline state, we introduced mutations that shifted the conformational equilibrium toward the outward-facing state. We determined crystal structure of CmABCB1 in the outward-facing conformation at 1.9 Å resolution.

研究分野：構造薬理学

キーワード：多剤耐性 薬物動態 膜タンパク質 薬物トランスポーター ATP X線結晶解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の身体には、外からの異物(物質)の侵入を防ぐ機能が備わっている。この機能のおかげで、食べ物や飲み物とともに余計な物質が消化管に入ってきて細胞内部へはほとんど入らない。これは、小腸上皮細胞の細胞膜に埋め込まれている多剤排出トランスポーターが異物をくみ出しているからである。同じ分子は、肝臓や腎臓、生殖器、そして、血液脳関門の細胞膜にも存在して、それら重要な臓器の細胞内に異物が侵入することを防いでいる。すなわち、多剤排出トランスポーターは、外界から細胞内へと侵入する異物を細胞外へと排出する生体防御の最終バリアーである。ところが、医薬も生体にとっては異物であるため、同様に排出されてしまうことから、薬物治療を阻む原因となっている。ヒトの多剤排出トランスポーターには P 糖タンパク質 (ABC B1 と呼ばれる) を代表とする ATP Binding Cassette (ABC) 型と Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE) 型が知られている。ABC トランスポーターは、ATP の加水分解によって生じるエネルギーを利用して、生体膜を介した薬物(輸送基質)の能動輸送を行う。その基本構造は 12 回の膜貫通ヘリックスで構成されるドメイン(TM ドメイン)と 2 つの ATP 加水分解ドメイン(ABC or NBD) から構成される。一般に、膜貫通型トランスポーターは、細胞外に口を開いた外向型状態と細胞内部に開いた内向型状態の 2 つのコンフォメーションの間で大きく構造変化することにより、基質を輸送すると考えられている(Jardetzky, O. (1966) *Nature*, **211**, 969-70)。ABC 型、MATE 型とも多剤排出トランスポーターは、X 線結晶解析によってすでに立体構造が決定されている。しかし、決定されたのは、ABC 型は内向型のみ、MATE 型は外向型のみ構造に限られており、同一分子で、両方のコンフォメーションが解析された例はなかった。ただし、ABC 型では、原核生物由来のホモログが知られており、その場合は、外向型構造が決定されていた(Dawson, R. J. & Locher, K. P. (2006) *Nature*, **443**, 180-5)。しかし、その分子のアミノ酸配列は、ABC ドメインが真核生物由来の分子とよく似ているものの、TM ドメインはほとんど似ておらず、輸送活性も大きく異なっているため、原核生物のホモログの外向型構造が真核生物の P 糖タンパク質のモデルとなりうるかについては疑問があった。したがって、真核生物の多剤排出トランスポーターのメカニズムを解明するためには、同一分子の外向型と内向型の両方のコンフォメーションを結晶解析することが広く求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、多剤排出トランスポーターの輸送メカニズム解明の基盤となる内向型と外向型の両状態の立体構造を同一分子で初めて決定することであった。それにより、薬物が輸送されるメカニズムに対する分子構造基盤が原子レベルで明らかになるものと期待された。多剤排出トランスポーターは、数100から数1000に至る分子量の多種多様な薬物を認識して捕え輸送することができる。このメカニズムは、酵素、抗体、受容体のように、特定の分子構造だけを特異的に認識する分子装置とは真逆であり、学術的に興味深い研究対象となっている。さらに、多剤排出作用は、病原菌の薬剤耐性や癌の獲得多剤耐性の原因となっており、この作用メカニズムが判明すれば、医薬品設計の指針に革新がもたらされるものと期待される。

### 3. 研究の方法

X 線結晶構造解析を実施する研究対象には、我々が好温性の真核生物 *Cyanidioschyzon merolae* から発見した多剤排出 ABC トランスポーター(CmABC B1)を用いた。なぜなら、CmABC B1 の内向型構造は、すでに我々が 2.4 Å 分解能で決定しており(Kodan, A. *et al.* (2014) *Proc Natl Acad Sci USA*, **111**, 4049-54)、その遺伝子(アミノ酸)配列と多剤認識と輸送のメカニズムは、ヒト P 糖タンパク質とよく似ているからである。さらに、CmABC B1 はメタノール酵母を用いて大量発現が容易であり、アミノ酸改変体を作成する実験に適しているからである。計画通り両方のコンフォメーションが判明すれば、その構造変化を担うアミノ酸残基が推定できると期待されることから、その部位を改変して、予想メカニズムの正しさを検証することも達成できると考えられた。このメタノール酵母を用いた大量発現系を用いれば、100mg 規模の精製標品を 2 週間ほどで確保できることから、将来は、NMR による構造解析などにも発展可能であるなど、この実験系は優れた特徴を有している。X 線結晶構造解析には、大型放射光施設 SPring-8 のビームラインから得られる高輝度 X 線を用いた。SPring-8 のアンジュレータービームラインを用いることで、回折強度の測定が難しい膜タンパク質の結晶でも、高分解能での構造解析に挑戦できた。

### 4. 研究成果

#### (1) 不安定な外向型コンフォメーションの安定化による結晶化

研究開始時点で結晶構造が決定されていた P 糖タンパク質は、すべて内向型状態に限られていたことから、P 糖タンパク質の構造には内向型状態を安定化するメカニズムが存在すると予想された。そこで、すでに決定していた CmABC B1 の内向型構造を分析したところ、TM ドメインの細胞外側のヘリックス TM1 と TM6 を強く結びつけている水素結合ネットワークを発見した。そこで、その水素結合を切断するため、ネットワークの中核となっている 147 番目のグルタミン残

基 (Gln147) と 381 番目のスレオニン残基 (Thr381) をアラニン (Ala) 残基へ改変した (図 1)。その改変体を QTA 変異体と命名し、それを用いて結晶化を行うことで、ATP アナログ AMP-PNP と Mg イオンとの複合体として外向型状態の P 糖タンパク質の結晶化に初めて成功した。また、野生型 CmABCB1 の内向型状態の結晶化条件を用いることで、QTA 変異体の内向型状態の結晶化にも成功した。そして、それぞれの結晶構造は、内向型構造 3.0 オングストローム、外向型構造 1.9 オングストローム分解能で決定することができた。外向型構造の分解能は、多剤排出トランスポーターとしては世界最高の精度を達成した。さらに、QTA 変異体の ATP 加水分解活性や薬物排出活性を測定したところ、野生型と同等の活性を保持していることから、QTA 変異体は、多剤排出トランスポーターとしての機能を保持していることが明らかとなった (Kodan, A. *et al.* (2019) *Nature communications*, 10, 88)。

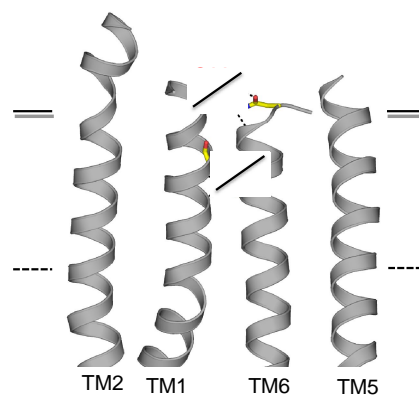


図 1. QTA (Q147A/T381A) 変異の導入

### (2) 内向型と外向型コンフォーメーションの X 線結晶構造解析

内向型 CmABCB1 の立体構造は、QTA 変異体と野生型との間で大きな違いは見いだされなかった。すなわち、QTA 変異の立体構造全体への影響は、限定的であることが確認された。一方、外向型状態の構造は、原核生物のホモログの立体構造とは大きく異なっており、細胞外側に開いた角度が狭くなっていた。さらに、内向型構造では TM ドメイン領域の分子内部の巨大な内腔 (inner chamber) が収縮しており、もはや TM ドメイン領域の分子内部には基質が結合できる空間が無くなっていた。一方、ABC ドメイン領域では、ATP 結合に伴い、ABC ドメインの二量体化ができた状態とその前の単量体状態で、立体構造が変化する様子が高精度で捕らえられた。特に、これまでに知られていない、二量体を安定化する掛け金と留め金の関係が、一方の ABC ドメインのグルタミン酸 (Glu620) 側鎖と他方の ABC ドメインのアルギニン (Arg644) 側鎖との間に見つかり、RE-latch と命名した。また、従来から Q-loop と呼ばれているループ構造上に存在するグルタミン残基 (Gln529) は、ATP 結合部位の Mg イオン結合部位を形成していることが判明した。Mg との結合は Q-loop の構造変化を引き起こし、ATP 結合による ABC ドメインの構造変化が、Q-loop を介して TM ドメインに伝えられる一連の構造変化のリレーが観測された。さらに、ABC ドメインに対する ATP の結合様式を観察すると、ADP までの領域は片方の ABC ドメインと結合しているが、加水分解されるリン酸基は他方のサブユニットの ABC ドメインと結合していることから、ATP が加水分解されると、ABC ドメインの二量体は、解離できるように設計されていることが示唆された。

### (3) 決定した立体構造と機能解析から洞察された多剤排出メカニズム

内向型と外向型の立体構造の比較から、以下のような多剤排出のメカニズムが明らかとなった。まず、基質の取り込み口は 2 つあり、1 つは TM4 と TM6 の間にできており、トランスポーター分子の側面で脂質二重層の内葉から基質を取り込むようにできている。もう一つは、TM3 と TM4 の間にあり、分子の真下に向けて細胞質に対して開いている。それらの入り口は、いずれも内向型構造では開いているが、外向型構造では閉まるようにできている。特に、TM3 と TM4 の間の入り口は、Tyr233 と Gln229 の側鎖間相互作用を用いて厳重に閉じるようにできている。一方、基質排出口は、細胞膜の細胞外側付近で TM1 と TM6 の間にできており、内向型では、チロシンやフェニルアラニンなど芳香族アミノ酸側鎖によって空間が塞がっている。そして、外向型構造では、TM1 と TM6 の構造変化に伴い、それら芳香族アミノ酸側鎖は横方向へ移動して分子内部に収納され、排出口の周囲は親水性に変化して疎水性の基質との相互作用が弱まり、排出されやすくなると考えられる。一方、内向型状態で分子内腔に取り込まれた基質は、外向型構造への変化に伴い内腔が下から収縮するため、排出口へと絞り出されるように出口へ向けて輸送される。この仕組みは、基質の大きさや化学構造の違いに対応可能であり、多種多様な化合物を排出するための巧妙なメカニズムであると言える。内腔の収縮は、TM3 の Ala240 と TM6 の Gln398 の側鎖間相互作用によって調節されており、これらアミノ酸に変異を導入することで基質輸送が破損することが実験的に確認された。

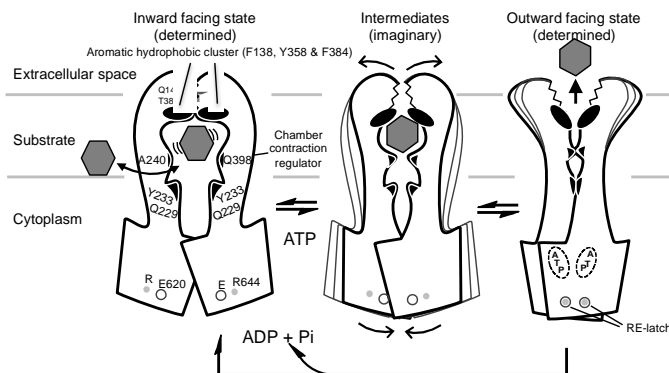


図 2. CmABCB1 の多剤排出メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kodan Atsushi, Yamaguchi Tomohiro, Nakatsu Toru, Matsuoka Keita, Kimura Yasuhisa, Ueda Kazumitsu, Kato Hiroaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABCB1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-08007-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Chen, Yue、山口知宏、中津亨、加藤博章
2. 発表標題 ATP binding cassette transporter, CmABCB1を含有したナノディスクの調製
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Chen, Yue、潘東青、筒井隼一、菅裕明、加藤博章
2. 発表標題 P糖タンパク質CmABCB1特異的ペプチド阻害剤の作用に対するナノディスクの影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小田島 圭、潘 東青、三和 空知、水沼 諒、瀧川 紘、高須 清誠、加藤 博章
2. 発表標題 親和性標識によるP糖タンパク質CmABCB1の基質結合部位の多様性の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 水沼 諒、井上 善貴、松岡 敬太、潘 東青、中津 亨、加藤 博章
2. 発表標題 好熱性P糖タンパク質CmABC1における膜貫通第4ヘリックス(TM4)の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Hiroshi Takikawa, Sorachi Miwa, Rina Takeuchi, Yousuke Yamaoka, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato and Kiyosei Takasu
2. 発表標題 Synthesis and structure-ATPase activity relationship of rhodamine derivatives against Pglycoprotein CmABC1
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 瀧川 紘、三和空知、山岡庸介、山口知宏、中津亨、加藤博章、高須清誠
2. 発表標題 P糖タンパク質CmABC1の輸送基質としてのローダミン誘導体の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 井上善貴、山口知宏、大城悠暉、松岡敬太、加藤博章
2. 発表標題 Trp蛍光を利用したP糖タンパク質分子内の基質結合部位の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 加藤博章
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松岡敬太、山口知宏、中津亨、加藤博章
2. 発表標題 P糖タンパク質の基質排出ゲート開閉の構造基盤
3. 学会等名 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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大城悠暉、山口知宏、松岡敬太、宇都宮裕人、中津亨、加藤博章
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Kato
2. 発表標題 X-Ray Structures of CmABC1 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
3. 学会等名 ABC2018, 2018年3月6日～3月12日（Innsbruck, Austria）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

多剤排出ポンプが薬を輸送するメカニズムを解明 - 世界初の結晶構造が示すどんな薬でも絞り出す仕組み -  
[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2018/190108\\_2.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/190108_2.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中津 亨  (Nakatsu Toru)  (50293949)	京都大学・薬学研究科・准教授   (14301)	結晶解析
研究分担者	宮ノ入 洋平  (Miyanoiri Yohei)  (80547521)	大阪大学・蛋白質研究所・准教授   (14401)	NMR解析
研究分担者	山口 知宏  (Yamaguchi Tomohiro)  (80346791)	京都大学・薬学研究科・助教   (14301)	機能解析