

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15031

研究課題名（和文）脂質環境下におけるL型アミノ酸輸送体の構造と機能の解明

研究課題名（英文）Structural and functional elucidation of L-type amino acid transporter under lipid environment

研究代表者

李 勇燦（Lee, Yongchan）

横浜市立大学・生命医科学研究科・助教

研究者番号：00894932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：L型アミノ酸輸送体1（LAT1）は、血液脳関門やがん細胞に多く発現するアミノ酸輸送体であり、細胞内外の必須アミノ酸、ホルモン、抗がん剤、薬物の輸送に関わっている。本研究では、LAT1による基質・薬物結合様式を理解するために、細胞の環境を模した脂質二重膜下で、クライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。種々の基質・阻害剤との複合体を形成し、クライオ電子顕微鏡により高分解能観察することで、LAT1選択的、非選択的な薬物各種に関して、構造決定に成功した。これらの結果から、抗がん剤候補となる化合物がどの様にLAT1に結合し阻害するのか、その構造基盤が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、界面活性剤下あるいは脂質環境下で得られるLAT1の構造、とくに阻害薬の結合の挙動に大きな違いがあることが明らかとなった。これは、ここ数年で報告された膜輸送体構造全般の再解釈を促す重要な発見といえる。本研究で得られた阻害薬の作動機構に関する知見は、LAT1を標的とする薬剤候補の改良に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is a neutral amino acid transporter expressed in the blood-brain barrier and many types of cancer cells and is involved in the transport of hormones and anticancer drugs across the cell membrane. We performed electron cryo-microscopy analyses of LAT1 using the membrane mimetic environment called nanodisc to understand the substrate and drug binding modes. By preparing transporter-ligand complexes with various substrates and inhibitors and performing high-resolution single-particle analyses, we determined the structures of LAT1 in complex with selective and non-selective inhibitors. These results shed light on the structural basis of how anticancer compounds bind to and inhibit LAT1.

研究分野：構造生物学

キーワード：アミノ酸輸送体 クライオ電子顕微鏡 ナノディスク

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヘテロ二量体型アミノ酸輸送体 (HATs) は、軽鎖 (SLC7) と重鎖 (SLC3) という2つのサブユニットからなる輸送体である。軽鎖は12回膜貫通型タンパク質であり、基質を運ぶ本体として働く一方で、重鎖は1回膜貫通型の糖タンパク質であり、軽鎖の局在を制御する。ヒトは8種類のHATサブタイプを持ち、それぞれが異なる生理機能と基質特異性を持つ。例えばLAT1-CD98hcは、ロイシンの輸送を通じて腫瘍細胞の増殖に関わることから、抗がん薬の新規標的として注目されている。申請者は、HATsの分子機構を明らかにするため、LAT1-CD98hcの構造をクライオ電子顕微鏡により決定した[Lee *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2019]。

この構造はアポ型の内向き開口構造であったため、基質結合型を得るためにサンプルを基質と混ぜたが、結合型を得ることはできなかった。興味深いことに、同時期に発表された別グループの論文でも[Yan *et al.*, *Nature*, 2019]、阻害剤JPH203を混ぜたにも関わらずアポ型構造が得られている。いずれの構造も界面活性剤で可溶化されたものであったため、これによって疎水性の高いLAT1阻害剤の結合が妨げられていると考えられた。そこで、より生理的条件に近い、脂質環境下での構造解析に着手した。脂質組成やスキャフォールドタンパク質MSPの比率を検討することで、LAT1を脂質ナノディスクに再構成することに成功しており、予備的なクライオ電子顕微鏡データを取得したところ、分解能7Å程度の三次元再構成像を得ることができた。驚いたことに、ナノディスクに再構成したLAT1は、内向き開口状態とは逆の外向き開口状態をとっていた(図1)。これらの結果から、膜輸送体には脂質環境下でしか捉えられない構造があり、界面活性剤存在下では疎水的な化合物の結合が阻害されてしまい、構造解析ができないのではないかと仮説に至った。そこで、脂質環境中のLAT1の高分解能構造を捉えることで、抗がん薬候補として注目されるLAT1阻害薬の作用機序を明らかにするという研究課題を設定した。

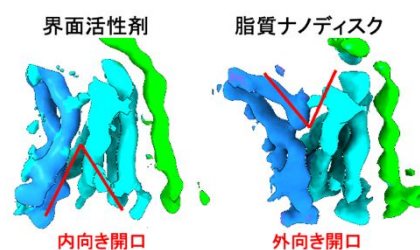


図1 脂質によるLAT1の構造変化

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト膜輸送体の立体構造を限りなく生理的環境に近い条件下で可視化することで、脂質環境が膜輸送体に与える構造的、機能的影響を明らかにすることを旨とする。また、脂質環境中で複数のリガンド複合体の構造解析を行うことで、膜輸送体-薬物の相互作用を原子レベルで解明する。

### 3. 研究の方法

ヒト由来LAT1-CD98hcの調製：昆虫細胞Sf9を用いて、各サブユニットをコードするバキュロウイルスを作製し、HEK293浮遊細胞にそれらを共感染させることによって、LAT1-CD98hc複合体を細胞内で形成させた。界面活性剤によって膜画分を可溶化し、アフィニティタグを用いて精製を行った。高純度な試料を得たあとは、脂質環境中への再構成実験を行った。まずは、低分解能の構造が既に得られているナノディスクの系を試した。高分解能構造を得るために、ナノディスクのサイズを一定に保ち、粒子の凝集を最小限に抑える条件を探す必要があったため、スキャフォールドタンパク質の種類(MSP1、MSP2N2など)や脂質の組成(POPC、POPG、POPE、コレステロールなど)、再構成温度や反応時間を細かく検討した。各条件に対して、ゲルろ過および負染色電子顕微鏡法を用いてタンパク質粒子の形状を観察することで品質を評価し、最適な条件を見出した。

クライオ電子顕微鏡観察のためには、タンパク質試料を薄い非晶質氷に急速冷却する必要があるが、これまでの実験から、ナノディスクに再構成したLAT1-CD98hcはこの時に変性を受けやすいことが分かっている。そこで、高親和性のバインダーとして、FabおよびNanobodyを用いる方法、および、少量の添加剤により界面を保護する方法を検討した。それぞれの条件に対して、200 kVの電子顕微鏡Tecnai Arcticaを用いて粒子の分散性や均一性を評価し、最適化した。

データ収集に適していると思われる条件に関しては、300 kVの電子顕微鏡Titan Kriosを用いて大規模データを撮像した。界面活性剤下での試料に比べて、高分解能を得るために必要な枚数が多いことが判明したため、一条件あたり数千から一万枚程度の画像を取得した。

得られたデータを、RELIONを用いて解析することで三次元再構成像を得た。モデル構築が可能な高分解能のマップを得るため、複数段に及び画像クラス分けと、多体精密化を用いた。基質結合型に関しては、LAT1への親和性が最も高いL-Pheを添加した状態で撮像した。阻害剤に関しては、抗がん薬として臨床試験が進められているJPH203を優先的に試し、BCH等他の化合物に関しても同様に撮像した。

### 4. 研究成果

ナノディスクに再構成したLAT1-CD98hc複合体を精製し、抗CD98hc抗体のFabフラグメント

と混合することで、観察試料を得た。これを高濃度に濃縮したのち、Fluorinated Fos-Choline-8 を添加することにより、クライオ電子顕微鏡観察に最適な試料を作製することができた。予備検討の後、条件あたり 6,000 枚から 20,000 枚程度の大規模クライオ電子顕微鏡像を撮影した。ドメイン間のフレキシビリティにより、通常の画像解析では局所分解能が制限され、リガンドが不鮮明となったため、多体精密化を適用することで、本研究で着目するリガンド結合部位に関して最良で 3.5 オングストローム分解能で 3 次元再構成を行った。これにより、LAT1 の基質である Phe 結合型、Melphalan 結合型、選択的阻害薬 JPH203 結合型、非選択的阻害薬 BCH 結合型と、アポ型外向き開口状態、およびアポ型内向き開口状態に関して、構造決定に成功した[Lee *et al.*, *bioRxiv*, 2023]。

Phe 結合型の構造では、LAT1 の TM1、TM6 の細胞外側が傾き、ポケットが細胞外に開いた外向き開口状態をとっていた。タンパク質の中心部では、部分的に主鎖がほどけた 1,6 番目の膜貫通ヘリックス (TM1, TM6) により、基質のカルボキシ基、アミノ基がそれぞれ認識されていた。一方で、基質の側鎖は、ほどけた TM6 上にあるグリシン残基、およびフタをするような位置に存在するフェニルアラニン残基と相互作用することで認識されていた。阻害薬である JPH203 結合型の構造を見ると、リガンドは同じポケットに結合していた一方で、より長い疎水性置換基が TM3 に並行に向き、側鎖と広範な相互作用をしていた(図 2)。また、TM10 に対する立体障害によってポケットの構造変化を抑える仕組みが見受けられた。Melphalan は遅い基質であり、阻害作用を持つことが知られているが、これも JPH203 と同様の立体障害を有することが示唆された。

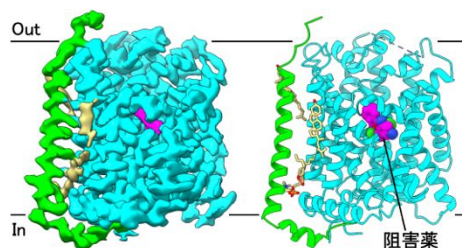


図2 LAT1と阻害剤の複合体構造

驚くべきことに、非選択的阻害薬である BCH は、上記の構造とは全く異なる閉塞状態をとっていた。BCH の結合により、TM1 と TM6 の細胞外側は大きく内側に倒れ込み、基質を覆うように位置していた。この状態は、輸送体が内向きと外向きを行き来する際に見られる中間状態であると考えられ、BCH がむしろ構造変化を促進する仕組みが想定された。対抗輸送実験により、BCH が対抗基質として働くことが確認された。

本研究の遂行中に、別の研究グループから、新規 LAT1 阻害薬である JX 化合物群と、LAT1 との複合体構造が複数報告された[Yan *et al.*, *Cell Discov*, 2021]。JX 化合物群に結合した LAT1 は、外向き閉塞状態を取っており、構造比較から、JPH203 結合型はより大きくポケットが開いた状態で固定されていることが示唆された。JX 化合物群は二つの環構造を持つバイサイクリック骨格を有している一方で、JPH203 は Tyr を骨格とするなど主鎖構造に違いがあることから、側鎖のバリエーション以外に、主鎖のバリエーションによっても LAT1 に対する構造的効果が異なることが分かった。

これらの結果から、各種化合物がどのように LAT1 に結合し阻害するのか、その構造基盤が明らかになった。他の研究グループからの構造報告と合わせ、多数の LAT1-リガンド複合体構造が明らかになったことにより、より高い親和性、選択性を付与した新規な阻害化合物の設計のための指針が得られたと言える[Lee *et al.*, *bioRxiv*, 2023]。

#### <引用文献>

- (1) Lee, Y., Wiriyasermkul, P., Jin, C., Quan, L., Ohgaki, R., Okuda, S., Kusakizako, T., Nishizawa, T., Oda, K., Ishitani, R., Yokoyama, T., Nakane, T., Shirouzu, M., Endou, H., Nagamori, S., Kanai, Y., & Nureki, O. Cryo-EM structure of the human L-type amino acid transporter 1 in complex with glycoprotein CD98hc. *Nature Structural & Molecular Biology* 26, 510-517, 2019.
- (2) Yan, R., Zhao, X., Lei, J., & Zhou, Q.. Structure of the human LAT1-4F2hc heteromeric amino acid transporter complex. *Nature* 568, 127-130, 2019.
- (3) Lee, Y., Jin, C., Ohgaki, R., Xu, M., Ogasawara, S., Warshamanage, R., Yamashita, K., Murshudov, G., Nureki, O., Murata, T., Kanai, Y. Structural basis of anticancer drug recognition and amino acid transport by LAT1. *bioRxiv*, 2023.12.03.567112; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.12.03.567112>.
- (4) Yan, R., Li, Y., Müller, J., Zhang, Y., Singer, S., Xia, L., Zhong, X., Gertsch, J., Altmann, K. H., & Zhou, Q. (2021). Mechanism of substrate transport and inhibition of the human LAT1-4F2hc amino acid transporter. *Cell discovery*, 7, 16, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lee Yongchan, Wiriyasermkul Pattama, Moriyama Satomi, Mills Deryck J., Kuehlbrandt Werner, Nagamori Shushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Ca <sup>2+</sup> -mediated higher-order assembly of b <sub>0</sub> ,+AT-rBAT is a key step for system b <sub>0</sub> ,+ biogenesis and cystinuria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.05.06.443019	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Lee Yongchan, Wiriyasermkul Pattama, Kongpracha Pornparn, Moriyama Satomi, Mills Deryck J., Kuehlbrandt Werner, Nagamori Shushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Ca <sup>2+</sup> -mediated higher-order assembly of heterodimers in amino acid transport system b <sub>0</sub> ,+ biogenesis and cystinuria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30293-9	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 該当する

1. 著者名 Lee Yongchan, Jin Chunhuan, Ohgaki Ryuichi, Xu Minhui, Ogasawara Satoshi, Warshamanage Rangana, Yamashita Keitaro, Murshudov Garib, Nureki Osamu, Murata Takeshi, Kanai Yoshikatsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural basis of anticancer drug recognition and amino acid transport by LAT1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.12.03.567112	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yongchan Lee
2. 発表標題 Structural Studies of Membrane Transporters Relevant to Health and Diseases
3. 学会等名 2022 China-Japan-Korea Youth Forum（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Saki Takahashi, Yongchan Lee, Satoshi Ogasawara, Takeshi Murata, Yoshikatsu Kanai, Tomohiro Nishizawa
2. 発表標題 Cryo-EM Structure of L-type Amino Acid Transporter 2 (LAT2)
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yongchan Lee
2. 発表標題 Structural mechanisms of heteromeric amino acid transporters revealed by cryo-EM and insights into cystinuria
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 勇燦
2. 発表標題 脂質二重膜に埋め込まれた膜タンパク質のCryo-EM構造解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 勇燦
2. 発表標題 哺乳類が持つヘテロ複合体型アミノ酸輸送体の構造解析
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yongchan Lee
2. 発表標題 Structural studies of SLC amino acid transporters relevant to health and diseases
3. 学会等名 International Conference on Biological Physics (ICBP2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 李 勇燦
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるアミノ酸輸送体の構造薬学的研究
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第66回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関