

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25251006

研究課題名(和文) ABCトランスポーターの多剤認識排出メカニズムの解明と新規阻害剤の開発

研究課題名(英文) Elucidation of Multidrug recognition mechanism of ABC transporter and development of its novel inhibitor

研究代表者

加藤 博章 (Kato, Hiroaki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90204487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：好温性の真核生物シゾン(Cyanidioschyzon merolae)からヒトP糖タンパク質とアミノ酸配列と基質特異性の良く似たABCトランスポーターを発見し、CmABCB1と命名した。そして、その内向型状態構造について最高2.4オングストローム分解能での立体構造決定を達成した。これは、論文発表時点において世界最高分解能で解析されたABCトランスポーターの立体構造である。さらに、特殊ペプチドライブラリーからCmABCB1に対する特異的な阻害剤を創製した。得られた阻害剤aCAPは、ABC多剤排出トランスポーターを分子の外側から錠を打つように阻害する新規なメカニズムのものであった。

研究成果の概要(英文)：We discovered an ATP binding cassette (ABC) multidrug transporter of which amino acid sequence and transporter function are very similar to those of human P-glycoprotein from a thermophilic eukaryote, Cyanidioschyzon merolae, and we named CmABCB1. The crystal structure of CmABCB1 complexed with its specific inhibitor, aCAP at 2.4 Å resolution. This is the structure determination of an ABC transporter at the highest resolution in the year 2014. The inhibitor aCAP has a unique binding mechanism by which it clamps the transmembrane helices from the outside, fixing the CmABCB1 structure in an inward-open conformation. Using structure-based mutagenesis, we defined several important residues that act as a substrate gatekeeper, a transition switch, and a substrate hook associated with the underlying transport mechanism. These studies provide mechanistic insight into substrate recognition and transport by ABCB1 type of multidrug transporters, as well as a blueprint for drug development.

研究分野：構造生物学

キーワード：生体膜 構造機能相関 受容体 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ABC トランスポーターは、ATP の加水分解エネルギーを利用して、生体膜を介した基質の能動輸送を行う膜貫通型の膜タンパク質である。その基本構造は 12 回の膜貫通ドメインと 2 つの ATP 加水分解ドメインから構成される。トランスポート方向の違いから、基質を排出するエキスポーターと基質を取り込むインポーターがあるが、原核生物は主にインポーターを有するのに対して、真核生物はエキスポーターのみを持っている。中でも、多種多様な化学構造の基質に対する多剤排出能を示すヒトの ABC エキスポーター (ABC B1) は、体外から侵入する異物を除去するための重要な役割を担っている。ABC エキスポーターメカニズムは世界中で沢山の研究がなされており、状況証拠から、内向き型構造で基質を捉え、ATP の結合により外向き型に変化すると共に基質を排出し、ATP の加水分解によって、内向き型にもどると予想されている。

膜タンパク質である ABC トランスポーターは結晶化が困難であることなどで、国内で立体構造解析された例はない。海外では 4 例、マウスと線虫 ABC B1 および ABC エキスポーターと良く似た原核生物由来の Sav1866 と MsbA が X 線解析された。しかし、いずれの結晶構造も分解能が低いこと (外向き型 Sav1866, 3.0 Å: Nature 443, 180 (2006); MsbA 内向き型 5.5 Å 外向き型 3.8 Å: PNAS 104, 19005 (2007); マウス ABC B1 内向き型 3.8 Å: Science 323, 1718 (2009) \ 線虫の ABC B1 ホモログ内向き型 3.4 Å: Nature in press) や、マウス ABC B1 以外は、基質特異性が異なり生理的に多剤排出活性を持つかどうかは不明であり (Sav1866 と MsbA はフリッパーゼの可能性が高く、線虫の ABC B1 は多剤排出能がない) \ ABC エキスポーター分子の大体の形までは見えたといえるが、多剤認識と基質排出のメカニズムを論じられる分解能の立体構造は、未解明のままである。

2. 研究の目的

我々は、好温性の真核生物 *Cyanidioschyzon merolae* から多剤排出 ABC エキスポーター (CmABC B1) を発見してメタノール資化性酵母を用いて発現させ、得られたタンパク質を高度に精製して結晶化し、予備的な研究により 2.7 Å 分解能での立体構造解析が可能であることを見いだした。この内向き型構造に続き、現在、複数の基質や阻害剤との複合体結晶を調製して基質結合部位の同定を試みている。また、変異導入により、ATP を結合した外向き型構造の確実な作製方法を、大腸菌 MsbA を用いて新たに開発した (Terakado, K., et al., Acta Cryst., D66, 319-323 (2010)) \ その方法を応用し外向き型構造の CmABC B1 の結晶化も実施中である。すでに申請者は、ヒト ABC B1 の大量発現系の構築と精製 (Kodan, A., et al., Protein Expr.

Purif., 66, 7-14 (2009)) \ 精製標品を用いた ATPase 測定による機能解析 (Sato, T., et al., H., FEBS J., 276, 3504-3516 (2009)) を実施して ABC トランスポーターの構造と機能を分子構造レベルで精密に解析するための実験手法を確立している。また、*in vivo* での機能解析に向け、細胞膜上の 7 つすべての ABC トランスポーターを欠失させた酵母を用いて、標的 ABC トランスポーターの基質排出活性測定の実験系も確立した。さらに、研究分担者の渡辺は、ABC B1 の代表的な基質であるベラパミルを骨格として合成展開し、強力な阻害剤を合成した。

本研究の達成目標は、以下の 3 点である。

(1) ABC トランスポーターが多様な化学構造の化合物を認識できる仕組みの解明

(2) ABC トランスポーターが生体膜内にて疎水性の高い基質を捕捉し、それを細胞外の親水性環境へと排出する輸送の仕組みの解明

(3) 明らかになった構造を基に、新たなメカニズムの阻害剤を開発する。

上記 3 つの課題解明を、CmABC B1 を対象として X 線結晶構造学、タンパク質工学、有機合成化学を組み合わせ取り進むことにより達成する。また、判明した多剤認識排出輸送メカニズムをヒト由来のホモログ P 糖タンパク質と比較することにより、共通点と相違点を明らかにして、新たな抗がん剤や、神経変性疾患薬を設計するための指針を明らかにする。

3. 研究の方法

研究代表者加藤 (京大院薬) と研究分担者中津 (京大院薬) の構造解析チーム、分担研究者渡辺 (京大化研) の有機合成チーム、代表者加藤と連携研究者山口 (京大院薬) の機能解析チームによる協力体制で 3 つの課題解決の研究を展開する。それぞれが、数名の大学院生とともに、それぞれの役割分担で協奏的に実施する体制とする。この研究体制は、互いの進捗状況に依存するので、緊密に会合を開いて情報と試料の交換をしながら相互に協力して計画を進める。中核となる X 線結晶構造解析には熟練のポスドクを採用し、期間内に完了できる体制を構築する。

研究分担者中津は、困難なタンパク質の結晶解析に多くの実績を持つ X 線結晶解析のエキスパートである。同渡辺は、企業と大学において、酵素の阻害剤を設計合成した豊富な経験を有する。連携研究者山口は、膜タンパク質の取り扱いに豊富な経験をもち、細胞生物学やタンパク質工学による機能解析と電子顕微鏡による構造解析を得意とする。

この体制により、X 線解析可能な結晶が準備された状態で研究を開始し、進展とともに、それぞれの課題達成により解析標的が準備されて、その結晶が順次用意可能になっている。また、立体構造からの仮説は、変異導入

解析と合成化学的アプローチにより実証される計画である。

4. 研究成果

(1) ABC トランスポーターの多剤認識メカニズムの解明

好温性の真核生物 *Cyanidioschyzon merolae* 由来の ABC 多剤排出トランスポーター CmABC B1 の「内向型状態」構造について最高 2.4 オングストローム分解能での立体構造決定ができた。これは、論文発表時点で世界最高分解能で解析された ABC トランスポーターの立体構造である(発表論文)。その際、ABC トランスポーターの代表的基質ペラパミルを基本骨格として合成した特異的阻害剤は、結晶化の再現性向上に対して有効であることが判明した。

立体構造を決定できた CmABC B1 の「内向型状態」構造をもとに基質のドッキングシミュレーションを行い、基質結合部位を探索した。その結果、CmABC B1 分子内部の巨大な空洞の天井付近に結合する位置を見いだした。その周囲には、これまでに基質結合に関与することが生化学的実験から示唆されたアミノ酸残基が存在していた。

ドッキングシミュレーションを用いることにより、「内向型」から「外向型」への立体構造変化の経路を探索した。また、その構造変化に伴う基質の結合部位と輸送経路を探索した。その結果、内向型構造のトランスポーターに侵入した基質は分子中央の基質結合部位へと至り、トランスポーターの内向型状態から外向型状態への構造変化に伴い、基質結合部位の上部に開いた細胞外側への出口から外へ排出されようとするが見いだされた。このシミュレーションの結果は、部位特異的変異導入により Ala へ置換した場合に機能が著しく低下するアミノ酸残基を調べた結果とほぼ一致していた。

(2) ABC トランスポーターの基質排出輸送の仕組みの解明

CmABC B1 の立体構造から基質結合部位と予想されるアミノ酸残基を推定し部位特異的変異を導入した。そして、得られた変異体の活性を回生することにより、それぞれのアミノ酸残基の基質排出との相関を明らかにした。その結果、基質結合に関わる疎水性でかさ高いアミノ酸残基を同定することができた。また、水素結合を形成することにより、膜貫通ヘリックス(TM)の TM1 と TM6 の相互作用が細胞膜と細胞外領域の境界付近で強化されていることを見いだした。

「外向型状態」を形成しやすいように改変した ABC トランスポーターを調製することができた。また、基質の取り込み口と基質の排出口と思われる部位を構成する特徴的なアミノ酸残基に変異を導入し、得られた変異体の活性を解析したところ、基質取り込み口のドアの開閉を司っていると考えられる残基を同定することができた。それらの変異型

CmABC B1 と ATP アナログである AMP-PNP との複合体の結晶化を行った結果、新たな形状の結晶が得られた。

新たに得られた結晶を用いて X 線結晶構造解析を実施した。その結果、期待通り外向型状態の結晶構造の決定に成功した。また、同じ変異型を用いて内向型状態の結晶化にも成功し、その結晶構造も決定できた。これは、同一分子の基質排出型 ABC トランスポーターにおいて内向型と外向型両状態の結晶構造を解析した世界初の例である。

(3) ABC トランスポーターのメカニズムに基づいた新規阻害剤の設計と合成

CmABC B1 に分子の外側から結合する新規阻害剤 aCAP との複合体の結晶構造決定に成功した。その結果、ユニークな新規阻害剤の結合様式が判明した。また、速度論的な実験から、阻害剤は、基質結合をアロステリックに抑制していることが明らかとなった。

CmABC B1 に分子の外側から CmABC B1 結合する新規阻害剤 aCAP を見いだしたことを基に、その阻害剤と CmABC B1 の阻害様式を調べた。その結果、aCAP は輸送基質ローダミンと拮抗的に阻害を示すことが判明した。また、同様の阻害を示す類似化合物についても CmABC B1 との複合体の結晶を作成し、結晶構造解析を実施した。その結果、同じように分子の外側から CmABC B1 に結合していることが示唆された。この阻害剤は、「外向型状態」を形成しやすい変異型 CmABC B1 とは結合しないことから、「内向型状態」に特異的に結合するものと示唆された。

野生型 CmABC B1 に分子の外側から特異的に結合する新規阻害剤が、外向型状態を取りやすい変異型にも結合するかどうかを検討した。その結果、その変異型への結合力は大きく低下しており、その阻害剤は、内向型状態の構造が安定に存在していることで強力に結合するメカニズムであることが判明した。一方、基質であるローダミンの誘導体を合成し構造活性相関を実施した。その結果、当該トランスポーターによって輸送されなくなった化合物が得られた。今後、その化合物がアンタゴニストかどうかを検討することにより、多剤排出メカニズムの一端が明らかになると期待される。

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 10 件)

Atsushi Kodan, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Keita Sakiyama, Chris J. Hipolito, Akane Fujioka, Ryo Hirokane, Keiji Ikeguchi, Bunta Watanabe, Jun Hiratake, Yasuhisa Kimura, Hiroaki Suga, Kazumitsu Ueda, Hiroaki Kato, Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein、Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States, 査読有、111, 2014, 4049-4054、10.1073/pnas.1321562

Furuta, T., Yamaguchi, T., Kato, H., Sakura, Analysis of the structural and functional roles of coupling helices in the ATP-binding cassette transporter MsbA through enzyme assays and molecular dynamics simulations, *Biochemistry*, 査読有、53, 2014, 4261-4272, 10.1021/bi5002j

小段篤史、山口知宏、中津亨、加藤博章、真核生物由来 ABC 多剤排出トランスポーターの構造と分子メカニズム、*日本結晶学会誌*、査読有、56 巻、2014、315-319、doi: 10.5940/jcrsj.56.224.

加藤博章、ヒト ABC 多剤排出トランスポーター類似タンパク質の立体構造決定と新規阻害剤の創製、*ファルマシア*、査読有、151 巻、2015、315-319、

清水敏之、加藤博章、受容体とトランスポーターの構造薬理学、*薬学雑誌*、査読有、136 巻、2016、171-172、10.1248/yakushi.15-00229-F

Moritsugu Kei, Koike Ryotaro, Yamada Kouki, Kato Hiroaki, Kidera Akinori, Motion Tree Delineates Hierarchical Structure of Protein Dynamics Observed in Molecular Dynamics Simulation, *PLoS One*、査読有、10, 2015, e0131583, 10.1371/journal.pone.0131583

Watanabe, B., Structure-Activity Relationship Studies of Insect and Plant Steroid Hormones, *J. Pestic. Sci.*, 査読無、40, 2015, 146-151, 10.1584/jpestics. J15-04

Watanabe, B.; Minami, S.; Ishida, H.; Yoshioka, R.; Nakagawa, Y.; Morita, T.; Hayashi, K., Stereospecific Inhibitory Effects of CCG-1423 on the Cellular Events Mediated by Myocardin-Related Transcription Factor A, *PLoS One*, 査読有、10, 2015, e0136242, 10.1371/journal.pone.0136242

Watanabe, B.; Ichiyangi, A.; Hirokawa, K.; Gomi, K.; Nakatsu, T.; Kato, H.; Kajiyama, N., Synthesis and Inhibitory Activity of Substrate-Analog Fructosyl Peptide Oxidase Inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、25, 2015, 3910-3913, 10.1016/j.bmcl.2015.07.045

渡辺文太; 平竹潤、グルタチオン代謝と

チオールケミストリー、*化学と生物*、査読無、53 巻、2015、354-361、

〔学会発表〕(計 15 件)

廣兼諒、小段篤史、中津亨、山口知宏、植田和光、加藤博章、好熱性真核生物の ABC 多剤排出トランスポーターの X 線結晶構造解析、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 06 月 12 日 ~ 2013 年 06 月 14 日、とりぎん文化会館 (鳥取県鳥取市)

Tomohiro Yamaguchi, Ryohei Jinushi, Sho Masuko, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato, Roles of two coupling helices between transmembrane and cytosolic domains in ABC transporter, 第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月 28 日 ~ 2013 年 10 月 30 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

益子祥、山口知宏、中津亨、加藤博章、ABC トランスポーターの ATP 加水分解基礎活性の調節部位の探索、第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2013 年 11 月 21 日 ~ 2013 年 11 月 22 日、東京大学大学院薬学系研究科 (東京都文京区)

Atsushi Kodan, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Keita Sakiyama, Christopher J. Hipolito, Akane Fujioka, Ryo Hirokane, Yasuhisa Kimura, Hiroaki Suga, Kazumitsu Ueda, Hiroaki Kato, High-resolution crystal structure of an ABC multidrug exporter from *Cyanidioschyzon merolae*, a thermophilic unicellular eukaryote, ABC2014, 5th FEBS Special Meeting, ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases (招待講演) 2014 年 03 月 08 日 ~ 2014 年 03 月 14 日、Hotel Grauer Bar, (Innsbruck, Austria)

Tomohiro Yamaguchi, Atsushi Kodan, Toru Nakatsu, Keita Sakiyama, Christopher J. Hipolito, Akane Fujioka, Ryo Hirokane, Yasuhisa Kimura, Hiroaki Suga, Kazumitsu Ueda, Hiroaki Kato, Structure-based functional aspects of the ABC multidrug transporter, CmABCB1 from a thermophilic eukaryote, ABC2014, 5th FEBS Special Meeting, ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, 2014 年 03 月 08 日 ~ 2014 年 03 月 14 日、Hotel Grauer Bar, (Innsbruck, Austria)

山口知宏、小段篤史、中津亨、植田和光、加藤博章、ABC 多剤排出トランスポーターにおける基質取込の立体構造、*日本薬学会第*

134 回年会、2014 年 03 月 27 日～2014 年 03 月 30 日、熊本大学（熊本県熊本市）

潘東青、中津亨、山口知宏、小段篤史、小川和浩、松高一樹、城地保昌、登野健介、矢橋牧名、鈴木守、南後恵理子、岩田想、加藤博章、SACLA による ABC トランスポーターおよびホタル・ルシフェラーゼの X 線結晶解析、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 06 月 25 日～2014 年 06 月 27 日、ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア（神奈川県横浜市）

宇都宮裕人、山口知宏、宮ノ入洋平、武田光広、中津亨、甲斐荘正恒、加藤博章、Lys の 13C-ジメチル化による ABC 多剤排出トランスポーターの NMR 解析、第 64 回日本薬学会近畿支部総会大会、2014 年 10 月 11 日～2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学（京都府京都市）

Kato, H. Structural basis for allosteric inhibition of P-glycoprotein homologue CmABCB1, The 3rd international symposium on chemical biology of natural products（招待講演）2014 年 10 月 28 日～2014 年 10 月 29 日、Life Science Center (Osaka, Osaka)

加藤博章、ATP Binding Cassette トランスポーターの構造薬理学、平成 26 年度日本結晶学会年会（招待講演）2014 年 11 月 01 日～2014 年 11 月 03 日、東京大学農学部（東京都文京区）

大塚哲央、山口知宏、中津亨、加藤博章、Trp 変異導入による ABC 多剤排出トランスポーターと基質の相互作用解析、日本薬学会第 135 年会、2015 年 03 月 25 日～2015 年 03 月 28 日、神戸学院大学（兵庫県神戸市）

小田健人、山口知宏、宮ノ入洋平、中津亨、甲斐荘正恒、加藤博章、NMR 解析を目指した ABC トランスポーターの大腸菌高密度培養による安定同位体標識系の確率、日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年 10 月 17 日～2015 年 10 月 17 日、大阪大谷大学（大阪府富田林市）

Ka Lu, Yamaguchi Tomohiro, Nakatsu Toru, Kato Hiroaki, Altering stability of a transmembrane protein, MsbA by structural comparison with its thermophilic homolog, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015（国際学会）2015 年 12 月 15 日～2015 年 12 月 20 日、Honolulu, Hawaii (USA)

Oyama Ryo, Pan Dongqing, Nakatsu Toru, Sato Tomomi, Yamaguchi Tomohiro, Kodan Atsushi, Ueda Kazumitsu, Iwata So, Kato hiroaki, Serial Femtosecond

Crystallography of ABC Transporter, 6th Special Meeting, ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases（国際学会）2016 年 03 月 05 日～2016 年 03 月 11 日、Innsbruck (Austria)

Matsuoka Keita, Hirokane Ryo, Kodan Atsushi, Yamaguchi Tomohiro, Nakatsu Toru, Ueda Kazumitsu, Kato Hiroaki, Crystallographic study of the ABC transporter CmABCB1 covalently bound to substrate derivatives, 6th Special Meeting, ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases（国際学会）2016 年 03 月 05 日～2016 年 03 月 11 日、Innsbruck (Austria)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

がん化学療法の障害となる多剤排出トランスポーターの結晶構造
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2013_1/140220_1.htm 研究成果について、報道機関へのプレスリリースを行った

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

渡辺 文太 (WATANABE, Bunta)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号：1 0 5 4 4 6 3 7

中津 亨 (NAKATSU, Toru)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：5 0 2 9 3 9 4 9

(3) 連携研究者

山口 知宏 (YAMAGUCHI Tomohiro)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：8 0 3 4 6 7 9 1