

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670014

研究課題名(和文) P糖タンパク質の薬剤排出効力の制御メカニズムの構造薬理学

研究課題名(英文) Structural physiology of regulation mechanism of transport efficiency by P-glycoprotein

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、自ら発見した新規な真核生物のP糖タンパク質euP-gpの基質輸送経路にあるGln残基をAlaに変換すると、ATP加水分解活性が恒常的に活性化されるものの、薬物排出能が大きく低下することを発見し、そのGln残基が、ATP加水分解と能動輸送を共役させるための役割を果たしているものと予想した。そこで、X線結晶構造解析を実施したところ、問題のGln残基は、対面するサブユニットのヘリックスのAla残基とファンデルワールス相互作用を行い、内向型から外向型への構造変化によって膜貫通ドメインのヘリックスにトルクを蓄積し、それをエネルギー源として復路の構造変化を行っている可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：We discovered that a replacement of a Gln residue with Ala in a eukaryotic P-glycoprotein, euP-gp induced an increase of the basal ATP hydrolysis enzyme activity independent with a transport substrate, suggesting the Gln residue plays an important role in the coupling between ATP hydrolysis and active transport. To reveal this proposition, we determined the crystal structure of euP-gp and observed that the Gln residue connects an Ala residue in an alpha-helix of the other subunit by van der Waals force. This interaction may restrict the structural exchange between inward-open and outward-open states of the transporter, allowing to accumulate a torque that drives the reverse structural exchange of the transporter.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 受容体・膜輸送 薬理学 X線結晶学

1. 研究開始当初の背景

P 糖タンパク質など ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターは、SLC トランスポーターと異なり、自ら ATP を加水分解することにより、基質の能動輸送に必要なエネルギーを獲得している。P 糖タンパク質は、普段の ATP 加水分解活性を抑制し、基質濃度の上昇とともにその活性が亢進されるというエネルギー効率の良い輸送メカニズムを備えている。最近いくつかの 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、P 糖タンパク質ホモログでは 3.8 オングストロームと分解能が低いため (*Science* 323, 1718, 2009; *Nature* 490, 566, 2012; *PNAS* 110, 13386, 2013)、ATP 加水分解と輸送の共役メカニズムは不明のままである。我々は、好熱性の真核生物から P 糖タンパク質ホモログ euP-gp を取得し、2.4 オングストローム分解能での結晶解析に成功し論文を投稿中であった。その構造を基に、基質輸送経路と考えられる部位にある多数のアミノ酸残基に部位特異的 Ala 変異を導入したところ、ある Gln から Ala への変異体の ATP 加水分解活性が、輸送基質を加えなくても恒常的に活性化されることを最近発見した。そして、その Gln 残基の役割から薬剤排出効力の制御すなわち、ATP 加水分解活性と基質輸送との共役メカニズムを明らかにすることができるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

問題の Gln 残基の役割としては、基質がないときには互いに衝突して ATP 加水分解に必要なドメイン NBD の二量体化を抑制し、基質の結合に伴い、この衝突回避により活性抑制が外れるスイッチとなる可能性が示唆される。そこで、基質との複合体を結晶解析することにより、基質と Gln 残基との相互作用を解析する。同時に、Gln を Ala 以外のアミノ酸残基に改変して輸送活性と ATP 加水分解活性を調べ、Gln の役割を明らかにすることにした。

P 糖タンパク質特有のメカニズムの分子構造基盤が明らかになれば、MRP1(ABCCs)やBCRP(ABCG2)など他の ABC 多剤排出トランスポーターとの分子機能の違いを明確に区別することが可能となる。また、本研究により、P 糖タンパク質固有のメカニズムを基盤とした機能調節分子の設計という薬物設計指針を新たに提供できるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) ABC トランスポーター euP-gp と輸送基質との複合体の結晶化

輸送基質と euP-gp 複合体の X 線結晶解析を実現するため、基質結合部位に Cys 残基を導入し、SH 基と反応性の高い官能基を導入した基質アナログを用いて共有結合させるこ

とを考案した。基質アナログ(親和性修飾分子プローブ)候補分子としては、euP-gp の基質特異性探索から見いだされた Rhodamine 誘導体を利用した。これらは、蛍光を示すことから、euP-gp の SH 基との反応生成物を SDS-PAGE のバンドの蛍光で確認できる利点を有する。また、水銀を分子中に有する化合物の利用を検討する、すなわち、水銀由来の高い電子密度を利用して、実験室での低分解能の X 線結晶解析で、結晶中の結合状態を予備測定することにより、シンクロトロンでの実験の効率化をめざす。Cys 変異の導入位置は、ドッキングシミュレーションにより、各化合物が結合したときに適切な距離となる候補を選択済である。

結晶化に必要な大量の euP-gp は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて調製し、His-tag を利用した 2 段階の操作で精製する。結晶化は、PEG3000 を用いた蒸気拡散法にて行う。得られた結晶を用いて、実験室の X 線装置を用いて結晶の選抜を行い、解析に適した結晶は、SPring-8 の高輝度 X 線を用いて解析を実施する。膜タンパク質の結晶は、X 線による損傷を受けやすいなどから特殊な対策が必要であるが、それらは解決済みであり、構造解析の実施を阻む問題はない。位相問題は、すでに解析済の構造を基に分子置換法を用いて解く。また、水銀化合物は、異常分散効果を示すため、MAD 法による位相決定を行うことも可能であり、位相が決定できなかった際の備えとしても有効である。

(2) 部位特異的変異導入による機能解析

QA 変異体について、Ala 以外のアミノ酸残基への改変を行い、基質輸送活性と ATPase 活性への影響を調べ、Gln の位置のアミノ酸側鎖が担う役割を解明する。結晶構造からは、Gln 側鎖同士の水分子を介した相互作用の可能性と、側鎖のカルボキシ基が 4 残基隣り、すなわち、ヘリックス 1 巻き分離れた Pro の主鎖と相互作用するという 2 つの可能性が考えられることから、Gly、Leu、Phe、Glu、Lys などに改変したときの影響を調べることでより洞察する。ATPase 活性の測定は、生成物の無機リン酸の定量あるいは、ピルビン酸キナーゼと乳酸脱水素酵素を共役させた方法で ADP を定量することにより実施する。基質輸送活性は、euP-gp を発現させた酵母が、rhodamine による生育阻害に対して耐性を獲得することから定量する。

4. 研究成果

多剤排出輸送体 P 糖タンパク質にエネルギーを供給する ATP 加水分解活性は、輸送基質(アゴニスト)によって十数倍上昇するという特有の分子挙動を示す。申請者は、新たに立体構造を解明した真核生物の P 糖タンパク質 euP-gp の基質輸送経路にある Gln 残基を Ala に変換すると、ATP 加水分解活性が恒常的に活性化されるものの、薬物排出能が大きく低下することを発見し、その Gln 残基が、

ATP 加水分解と能動輸送を共役させるための重要な役割を果たしているものと予想した。そこで、euP-gp と基質との複合体の立体構造を明らかにすることにより、問題の Gln 残基と基質結合あるいは基質輸送との関係を明らかにすることを試みた。また、Gln を Ala 以外の多様なアミノ酸残基に改変して Gln の役割を機能解析からも明らかにすることを実施した。

単に基質などのリガンドを加えただけでは、基質複合体の結晶を調製することができなかった。そこで、問題の Gln の近傍に Cys 残基を導入し、Cys 残基と共有結合を形成するように改変したローダミン誘導体を用いて euP-gp との化学量論的な複合体の調製を行い、結晶化した。そして、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU にて X 線結晶構造解析を実施したところ、3Å 程度の X 線回折強度データを収集することができた。そこで、すでに得られている基質なしの構造モデルを基にフーリエ変換を行い、電子密度図を描いた。すると、形状がローダミンに相当すると考えられる電子密度の塊を見いだすことができた。結合が見られた場所は、基質が結合すると予想される分子中央内部の巨大空洞の中であり、基質結合部位であると考えられた。ただし、その位置は問題の Gln 残基とは直接相互作用できない部位であった。このことは、この Gln 側鎖は、基質と直接相互作用して輸送を制御しているのではなく、輸送に必要な立体構造変化を制御している可能性が示唆された。

次いで、ヌクレオチドと結合した外向型構造を結晶解析することにより、問題の Gln の役割を調べることにした。常法に従い ATP の加水分解耐性のアナログである AMP-PNP を添加することにより、ATP 結合型を固定して外向型状態の構造の結晶化を試みた。しかし、結晶は得られなかった。そこで、内向型から外向型への構造変化を抑制していると考えられるアミノ酸残基を探して改変することにした。その結果、膜貫通ヘリックス間に水素結合を形成している Asn 残基と Thr 残基を Ala 残基に改変することにした。その変異型を *Pichia pastoris* を用いて大量調製することにより、結晶化に必要なタンパク質を取得して結晶化を行った。この改変により、AMP-PNP を加えたときには、これまでの内向型構造の結晶とは形状の異なる結晶を調製することに成功した。そしてその立体構造解析を実施したところ、外向型構造であることが確認された。問題の Gln 残基の位置を確認したところ、Gln は対面する相手のサブユニットの Ala 残基との間でファンデルワールス相互作用をしていることを見いだした。そして、その相互作用により分子内部の巨大な空洞が縮んでいることを見いだした。このことは、問題の Gln

が基質結合部位の容積変化の調節に関わっていることを示唆している。

さらに、ヌクレオチドと結合した外向型状態の euP-gp の立体構造解析を実施することにより、Gln が対面する二量体の相手方サブユニットの Ala 残基とファンデルワールス相互作用することを見いだした。そこで、Gln を Ala 以外のアミノ酸残基に改変した変異型を用いて機能解析を実施したところ、Gln 残基の位置で側鎖が短くなると基質を加えなくとも ATPase が上昇し、長くなるとその上昇は見られなかった。また、いずれの場合も変異型の薬物輸送能は低下した。このことから、Gln の役割は、輸送装置の動きを抑制することでスプリング状のバネのようなヘリックスにトルクを蓄積し、そのエネルギーを薬物排出に用いることではないかと考えられた。すなわち、euP-gp が内向型から外向型へと構造変化する際の動きに伴い、ヘリックスに加わる回転の動きを Gln と Ala の側鎖間のファンデルワールス力で規制して両者の根元のヘリックスに「ねじれ」を生じさせることでトルクを蓄積する。そして、そのトルクを利用して、外向型から内向型への復路の動力を得ているものと推測した。よって、このファンデルワールス相互作用がなくなるような変異が導入されると動きの抑制が外れて ATP 加水分解が促進されるものの基質輸送は行われなくなってしまうものと考えられた。

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 4 件)

Furuta, T., Yamaguchi, T., Kato, H., Sakurai M, 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/bi500255j

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、2014、224-229、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、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

〔学会発表〕(計 8 件)

Kato, Hiroaki, 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)

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)

潘東青、中津亨、山口知宏、小段篤史、小川和浩、松嶋一樹、山下恵太郎、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、X 線自由電子レーザーを用いたタンパク質 X 線結晶構造解、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 (神戸市)

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立、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〕
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：90204487

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者