

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840048

研究課題名(和文) ABC輸送体のATP加水分解と基質輸送共役効率化のカギとなる残基の同定

研究課題名(英文) Identification of key residues for control of the coupling between ATP hydrolysis and substrate transport of an ABC transporter

研究代表者

山口 知宏 (Yamaguchi, Tomohiro)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80346791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのABCトランスポーターには、基質輸送活性とこれを駆動するATP加水分解活性との間に高度な調節メカニズムが存在すると考えられる。そこで、ヒトのABCトランスポーターと機能がよく似たCmABCB1の結晶構造に基づいて、CmABCB1のアミノ酸残基を置換した変異体を作成し、構造機能解析を実施した。その結果、膜貫通ドメインの基質輸送経路上にあるグルタミン残基とアラニン残基が、ATP加水分解による基質輸送を調節していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Human ABC transporters are predicted to have a characteristic mechanism to control the substrate transport driven by hydrolysis of ATP. In this study, structural and functional analyses were performed using CmABCB1 mutant designed based on the crystal structures of CmABCB1, the function of which is similar to that of human ABC transporter. The analyses revealed that glutamine and alanine residues localized on the substrate transport pathway in the transmembrane domain of CmABCB1 act as an important role in the control mechanism.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜タンパク質 ABCトランスポーター X線結晶構造解析 基質輸送 ATP

1. 研究開始当初の背景

ABC トランスポーターは、ATP 加水分解 (ATPase) 反応によって基質を能動輸送する。ヒトの ABC トランスポーターの特徴は、基質がないときには、低い ATPase 活性 (基底活性) を示し、輸送基質の添加に伴いその活性が亢進されることである。申請者は、ヒトの ABC トランスポーターには、基質がないときには ATPase を抑制し、基質結合によって活性化するスイッチ構造があると予想した (図 1)。また申請者はこれまでに、ヒトの ABC トランスポーターと同じ共役機構を示す *Cyanidioschyzon merolae* 由来 ABC トランスポーター CmABC1 を用いて、高分解能 (2.4 Å) での結晶構造解析に成功した (Kodan, A., *et al.*, *PNAS*, 111, 4049 (2014))。この結晶構造を基に予備的な実験を行い、部位特異的変異導入を行ったところ、基質輸送を担う膜貫通ドメイン (TMD) にある Gln 残基を Ala に置換した変異体では、ATPase と基質輸送の共役が消失していることを初めて発見した。

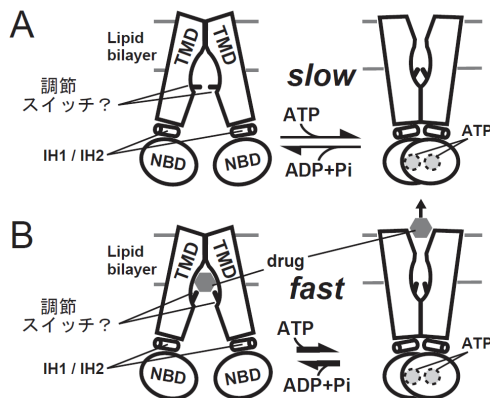


図 1 ABC トランスポーターの推定作動機構模式図。A. 輸送基質非存在下での基底活性発現時。B. 基質輸送と共役している時。

2. 研究の目的

そこで、この変異体を足がかりとして、ヒト型 ABC トランスポーターにおける ATPase 基質輸送共役の調節を担うスイッチの役割 (スイッチ仮説) の解明を目指した。すなわち、当該 Gln 残基や、その相互作用相手となる周囲の残基を様々なアミノ酸に置き換えた変異体を作成して機能を調べるとともに、機能が変化した変異体や基質アナログ複合体の X 線結晶構造解析によって、ATPase と基質輸送の共役機構を形成している複数のアミノ酸残基を同定し、これらの役割を明らかにすることを目指した。

ATPase と基質輸送の共役メカニズムの研究はほとんど進んでおらず、本研究はヒト型 ABC トランスポーターに特徴的なメカニズムの核心に迫る新たな試みであり、学術的に高い意味を持つと考えた。また申請者は、ヒトと同じ性質のホモログを好熱性の真核生物である *C. merolae* から見だし、その結晶

構造決定を 2.4 Å という高い分解能で達成しており、その機能解析に必要な実験系も構築済みであった (Kodan, A., *et al.*, *PNAS*, 111, 4049 (2014))。したがって、これまでに誰も到達できていなかった立体構造基盤を手掛かりとすることで、新たなメカニズムの解明というブレークスルーを産み出せるものと期待された。

3. 研究の方法

(1) タンパク質精製標品の調製

機能構造解析に用いた CmABC1 タンパク質の精製標品は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の変異株 AD1-8u に CmABC1 タンパク質を組換え発現させて膜画分を取得し、界面活性剤 (C₁₂E₉) による可溶化後、His タグアフィニティーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによって調製した。

(2) CmABC1 変異体の機能解析

CmABC1 変異体の機能解析では ATPase 活性と基質輸送活性を測定した。ATPase については、界面活性剤 DDM ミセル中の精製タンパク質を様々な濃度の基質と 10 mM MgCl₂ 存在下で、37 °C にて 5 mM ATP と反応させ、加水分解反応によって生じた無機リン酸をリン酸モリブデン法で定量した。この無機リン酸濃度の経時変化から反応初速度を計算し、酵素反応速度論解析法によって解析した。基質輸送については、酵母 AD1-8u の薬剤感受性を利用した活性測定系を用いた。この株は、7 つの主要な ABC トランスポーター遺伝子が欠失されているため、導入したトランスポーターの毒物排出活性の測定に適している (Nakamura, K., *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 3366 (2001))。CmABC1 タンパク質を組換え発現させた酵母を様々な濃度の基質を含む培地中で培養し、各化合物濃度における増殖量から増殖を 50% 阻害する基質濃度 (IC₅₀) を調べた。

(3) CmABC1 変異体および CmABC1-基質アナログ複合体の結晶化

CmABC1 変異体結晶の調製

CmABC1 変異体の結晶化は、精製標品を 10-15 mg/mL のタンパク質濃度まで濃縮し、シッティングドロップ蒸気拡散法により 20 °C にて行った。

CmABC1-基質アナログ複合体の結晶化

CmABC1-基質アナログ複合体を共有結合で調製するために、基質アナログには tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMRM5) を用い、これと共有結合する Cys 残基を基質輸送経路上に導入した変異体を作成した。Cys 導入変異体の精製標品と TMRM5 を反応させた後、ゲルろ過クロマトグラフィーによって未反応の化合物を除去した。得られた標品を 8 mg/mL のタンパク質濃度まで濃縮した後、シッティングドロップ蒸気拡散法により 20 °C にて結晶化を行った。

(4) X 線結晶構造解析

上記(3)により得られた結晶を用いて X 線結

晶構造解析を実施した。実験室の X 線装置を用いて多数の結晶から分解能の高いものを選抜し、SPring-8 シンクロトロン放射光を用いて X 線回折データを収集した。位相決定には、すでに決定している内向型の結晶構造を用いて、分子置換法を用いて行った。

4. 研究成果

申請者の仮説では、基質がないときには当該 Gln 残基が関与する相互作用によって、ATPase を伴う構造変化が阻害されると考えられた。そこで、この相互作用に必要な側鎖の大きさと形状、その相互作用は van der Waals 相互作用か水素結合か、を明らかにするために、当該 Gln 残基を Ala 以外のアミノ酸残基に置換した変異体を作成し、これらの変異体の基質 rhodamine 6G の濃度依存的な ATPase 活性を測定した。Gln よりも側鎖の長さが 2 原子分以上短い Ala、Val に置換した変異体では基底活性が野生型から大きく上昇し、ATPase 活性の上昇も消失していた。また、炭素鎖が 1 原子分だけ短い Leu、Asn に置換した変異体では活性挙動は野生型と似ていたが、基底活性は 2-3 倍程度上昇していた。さらに、1 原子分長い Lys に置換したところ基底活性が低下していた。これらの結果から、基底活性の抑制には、当該 Gln 残基の側鎖の適切な長さが重要であることが示唆された。

当該 Gln 残基による ATPase 基質輸送の共役調節が基質輸送において重要かを調べるため、上記の変異体を発現させた酵母を用いて rhodamine 6G に対する薬剤耐性試験を行った。その結果、ATPase 基底活性が上昇した変異体（当該 Gln 残基を Ala、Val、Leu、Asn に置換した変異体）では IC_{50} が野生型に比べ低下した。特に、ATPase 基底活性が大きく上昇した Ala、Val 変異体では IC_{50} の低下が顕著であった。また、ATPase 基底活性が野生型より低い Lys 変異体もまた IC_{50} が大きく低下していた。これらの結果から、当該 Gln 残基の側鎖は基質輸送に寄与していることが示唆された。

当該 Gln 残基の改変による立体構造への影響を明らかにするために、Ala 変異体の結晶化を試みた。結晶化に適した条件を探索し、得られた結晶を用いて SPring-8 の放射光 X 線を用いて X 線回折データの収集を行った。得られたデータを解析したが、構造決定に至らなかった。そこで、ATP の非加水分解性アナログを用いて X 線結晶解析により決定した外向型構造に基づいて、当該 Gln 残基と相互作用する残基を探索した。その結果、この残基は基質輸送経路をはさんで反対側にある Ala 残基とファンデルワールス相互作用を形成することを見出した。この Ala 残基を Phe に置換した変異体を作成したところ、この変異体の ATPase 基底活性は著しく増強していた。以上の結果から、当該 Gln 残基の Ala 変異体では、側鎖が短いためにこの相互作用が適切に形成されなくなり、ATPase 基質輸送

の共役が崩れた立体構造をとるようになったのではないかと考えられた。

ヒト型 ABC トランスポーターの ATPase は基質によって 10 倍以上に増強される。そこで、当該 Gln 残基が基質と相互作用するかを明らかにするために、CmABC B1 基質複合体の X 線結晶構造解析を行った。これまでヒト型 ABC トランスポーターは、基質が結合した状態で構造決定された例がなく、基質複合体結晶の調製には困難が予測された。そのため、基質複合体を共有結合で調製することを検討した。すなわち、Cys 残基と共有結合を形成するマレイミド基を付加したローダミンアナログ TMRM5 を用いて、安定な共有結合を形成する Cys 導入部位を探索したところ、当該 Gln 残基と同じ膜貫通ヘリックス上にあり、基質輸送経路の奥側に位置する Met を Cys に置換した変異体で共有結合の形成を確認した。そこで、この共有結合複合体試料を用いて結晶化条件を探索したところ結晶化に成功したため、SPring-8 の放射光 X 線を用いて X 線回折データを収集し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、3.8 Å 分解能で結晶構造を構築し、基質アナログと推定される新たな電子密度を観測することができた。立体構造におけるこの電子密度の位置から、基質は当該 Gln 残基と相互作用していないと考えられた。

本研究によって、ヒト型の ABC トランスポーターに特徴的な ATPase 基質輸送の共役調節において中心的な役割を果たす残基がはじめて明らかになった。しかし、基質がどのようにこの調節機構に影響するかについてはその解明に至らなかった。今後、構造変化途中状態の X 線結晶解析や NMR 動的構造解析によって基質輸送経路の中で基質が当該 Gln 残基に近い位置にいる状態を捉えることで、基質がどのように ATPase 基質輸送共役を活性化するか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 3 件)

- (1) 山口知宏、ABC 多剤排出トランスポーターの構造と機能から ADME を探る、薬学雑誌、**136**(2), 197-202 (2016). (査読有)
DOI:10.1248/yakushi.15-00229-5
- (2) 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、**56**(4), 224-229 (2014). (査読有)
DOI:10.5940/jcrsj.56.224
- (3) 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*, **53**, 4261-4272 (2014).
(査読有)
DOI:10.1021/bi500255j

[学会発表](計 8 件)

- (1) 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, March 5 - 11, 2016, Innsbruck (Austria)
- (2) 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, March 5 - 11, 2016, Innsbruck (Austria)
- (3) 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, December 15 - 20, 2015, Honolulu (USA)
- (4) 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、ポスター発表、日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年 10 月 17 日、大阪大谷大学 (大阪府・富田林市)
- (5) 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 3 月 25 日~28 日、神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
- (6) 山口知宏、ABC 多剤排出トランスポーターの構造と機能から ADME を探る、日本薬学会第 135 年会 (招待講演) 2015 年 3 月 25 日~28 日、神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
- (7) 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の立体構造の特徴、第 87 回日本生化学会大会 (招待講演) 2014 年 10 月 15 日~18 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- (8) 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、2014/10/11、京都薬科大学 (京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：80346791