

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22495

研究課題名（和文）多剤エクスポーターと脂質フロッパーゼを区別する立体構造基盤の解明

研究課題名（英文）Structural basis for discrimination between multi-drug exporters and lipid floppases

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体膜を貫通しているトランスポーターには、基質を脂質二重層の内層から外層へ移動させるフロッパーゼ活性と、基質を細胞外へ直接排出するエクスポーター活性が知られている。これらはいずれもATPをエネルギー源として働いており、立体構造もよく似ている。そのため、両者は、はたして同じ分子メカニズムを異なる実験から命名したものなのか、本質的に別の分子なのか、不明の状態が今日まで続いている。そこで、エクスポーターとフロッパーゼの立体構造の違いに着目して、エクスポーターをフロッパーゼ様の構造へと改変し、その活性と立体構造を調べた。その結果、フロッパーゼのような活性と立体構造を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜の脂質のフリップ・フロップ及び膜を介する基質排出は、多様な細胞生物学や分子生物学と関係する現象であり、病理との関係も深い。ただし、エクスポーターとフロッパーゼの違いを見分けるには、生物学的なアプローチでは観察精度に限界があり、両者の捉え方には多様な主張がある。したがって、両者の機能の違いを詳細な結晶構造に基づいて解明した本研究の意義は大きいと言える。

研究成果の概要（英文）：Transporters that multiply across a lipid bilayer membrane possess floppase activity which catalyzes translocation of phospholipids from inner side of a membrane to the outer side or exporter activity which plays efflux of substrate to the out of the membrane. Both activities are powered by ATP as energy source and their molecular structures are very similar. Thus, there is a question that these activities are worked by the same mechanism or there is a distinct molecule that possesses floppase or exporter activity. We plan to alter an exporter structure based on a floppase that has the same protein fold. We determined the crystal structure of the altered transporter and measured the ATP hydrolysis activity. The altered exporter showed floppase-like structure and the activity.

研究分野：構造生物学分野

キーワード：構造生物学 多剤耐性 トランスポーター 膜タンパク質 X結晶学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜を貫通しているトランスポーターには、基質を脂質二重層の内層から外層へ移動させるフロPPERゼ活性と、基質を細胞外へ直接排出するエキスポーター活性が知られている。これらはいずれも ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターに分類され、ATP をエネルギー源として働いており、立体構造もよく似ている。そのため、基質エキスポーターと脂質フロPPERゼは、はたして同じメカニズムの分子を異なる実験から命名したものなのか、本質的に異なる機能を持つ別の分子なのか、不明の状態が今日まで続いている。例えば、癌細胞の獲得多剤耐性の原因となっている多剤エキスポーターP糖タンパク質 ABCB1 と、特定の脂質分子を細菌のフロPPERゼ MsbA は、共に ABCB サブファミリーに属しており立体構造が非常によく似ている。MsbA にも多剤排出活性があるとの報告もある。しかし、両分子は ATP リン酸加水分解酵素 (ATPase) 活性の作用様式が大きく異なるため、別の作用との見方もできるのだ。

申請者は、薬学の基礎として重要な薬物の体内動態の決定要因である一方で、癌化学療法など薬物治療の妨げとなっている ABC 多剤排出トランスポーターの立体構造に取り組んできた。ヒト P-gp は不安定で結晶化には不適当であったことから、ヒトと薬理学的挙動が似ている ABC トランスポーター遺伝子を探索し、温泉に棲む真核生物 *Cyanidioschyzon merolae* から遺伝子配列、多剤輸送スペクトル、そして、分子構造が極めて安定で、薬理学的挙動がヒトと似ている CmABCB1 を発見し、内向型構造の結晶解析に世界最高の精度で成功した (*Pro. Nat. Acad. Sci. USA* (2014) **111**, 4049)。さらに、内向型を安定化している水素結合を切断する変異の導入により外向型構造の結晶化にも ABCB1 として初めて成功した (*Nature Commu.* (2019) **10**, 88)。この構造解析によって、それまで誰もが似ていると信じてきた ABCB1 と MsbA の外向型の立体構造は、実は大きく異なっていることが明らかになった。そして、その原因は、立体構造を構築している「あるパーツ」の違いであることが発見された (*Nat. Commu.*, **10**, 88 (2019))。そして、このパーツを入れ替える変異を導入したところ、ATP 加水分解活性の作用様式は ABCB1 型から MsbA 型に変化することが予備実験により見出されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、このエキスポーターをフロPPERゼ型へと改変した分子と、反対に、フロPPERゼをエキスポーター型へと改変した分子の結晶構造解析を行い、さらに両者のトランスポーター機能およびエキスポーター機能を調べることにより、2つの膜タンパク質が異なる構造に基づく別の作用メカニズムであることを示すことであった。それによって、トランスポート機能の分子装置を構成するパーツごとの機能の役割が解明されると期待された。

エキスポーターCmABCB1 とフロPPERゼ MsbA の違いとは、6本ずつ存在する膜貫通ヘリックスのうち1番目 (TM1) と3番目 (TM3) の接合部位 (TM-joint) の造りにある。そのため、CmABCB1 では、TM1 と TM3 の動きが連動し、細胞外側が閉じている。一方、MsbA では、TM1 と TM3 が離れており、個別に動くため、細胞外側が大きく開口する。この違いによって、基質を細胞膜外まで絞り出すエキスポーターとなるか、脂質二重層の外層部に横方向へと移動するフロPPERゼとなるかの違いを生み出していると予想される。そこで、CmABCB1 の TM1 と TM3 の接合部を MsbA 型へ、反対に MsbA の TM1 と TM3 を CmABCB1 型へと改変して、それぞれの改変分子の結晶解析とエキスポーター、フロPPERゼの機能解析を実施することを計画した。

3. 研究の方法

CmABCB1 の TM3 にある Gly132 を Val に改変することで、TM1 と TM3 の密接な相互作用に楔を入れられると予想した。そして、CmABCB1 遺伝子にその変異を入れた遺伝子 G132V を作成し、酵母 *S. cerevisiae* AD1-8u-株により遺伝子由来のタンパク質を調製した。そして、結晶化に必要な数ミリグラム単位の G132V を精製することができた。その結晶化は、沈殿剤 PEG2000MME を用いていわゆる蒸気拡散法により実施した。結晶化試料には、ATP の誘導体である AMP-PNP を添加した。20 °C で静置することにより結晶を作成した。得られた結晶は液体窒素中で急速冷却し、X線回折実験に供した。X線回折実験は SPring-8 のビームライン BL41XU で実施した。波長 1.0000 Å の X線を用い、PILATUS 6M 検出器 (Dectris) で回折像を収集した。得られたデータは XDS で処理をした。初期位相の決定にはすでに構造解析した QTA の外向型構造 (PDB code: 6A6M) を用いた。モデル構築と精密化はそれぞれ COOT と PHENIX を用いた。モデル評価には MolProbity を利用した。ATPase 活性は、反応により生成した無機リン酸をリン酸 - モリブデン法により定量し、その濃度の時間変化から求めた。

フロPPERゼからエキスポーター型への改変には、*Staphylococcus aureus* 由来の Sav1866 を用いた。この Sav1866 の外向型構造は、X線結晶構造解析により 3.0 Å の立体構造が明らかになっている (Dawson, R. J. (2006) *Nature*, **443**(7108), 180)。そこで、その結晶構造に基づいて、Sav1866 では TM1 と TM3 の接近を阻んでいるアミノ酸残基 Phe や Met を Gly へと改編した。得られた変異体遺伝子は大腸菌にて発現させ、対応する変異体タンパク質を取得した。そして、ATPase 活性の測定や結晶化に用いた。

4. 研究成果

(1) G132V 変異体の ATP 加水分解活性

図1に示すように、野生型 CmABC B1 から G132V への変異によって ATP 加水分解活性は k_{cat} が 30 倍程度上昇していた。また、ATP に対する K_m は約 40 %低下していた。一方、輸送基質に対する活性の促進は観測されず、阻害だけが観測された。このことから、G132V 変異によって外向型構造が優先的に得られやすくなっていることが示唆された。このような結果から、G132V は、Sav1866 や MabA の示す ATP 加水分解活性の挙動へ近づいた可能性が示唆された。

図 1 A

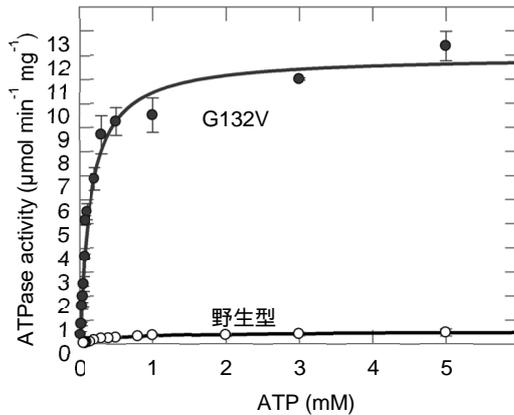
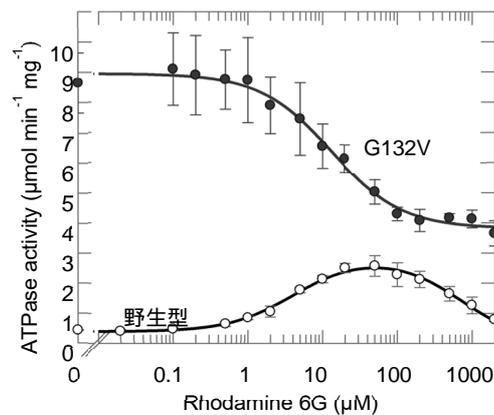


図 1 B



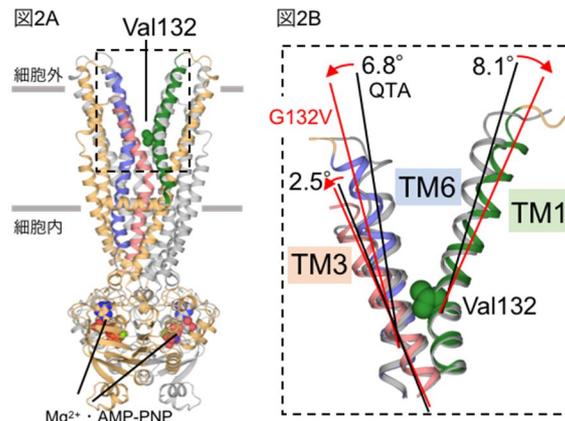
(2) G132V の結晶構造

G132V 変異体の結晶化を Mg^{2+} 及び ATP の誘導体 AMP-PNP (adenosine 5'-(β,γ -imido)triphosphate) 存在下で実施した。X線結晶構造解析により分解能 2.15 Å で構造を決定できた (図2)。得られた構造は外向型構造であった。G132V 構造と構造既知の CmABC B1 外向型構造 (PDB code: 6AGM) との比較から、主に膜貫通ドメイン (TMD) の細胞外側領域に違いが見られた。G132V 構造では TM1 の細胞外側が TM6 と反対の方向に 8.1° 傾いていた。TM3 および TM6 はそれら細胞外側が TM1 と反対の方向にそれぞれ 2.5°、6.8° 傾いていた。これにより、G132V 構造の TM1 の細胞外側末端は 3.1 Å、TM6 の細胞外側末端は 3.2 Å、移動した位置にあった。よって、TM1 と TM6 および TM1* と TM6* (*は二量体を形成する相手側のサブユニットを示す) からなる細胞外側ゲートは、元の構造よりもさらに細胞外側に開いていた。

一方、TMD の細胞内側領域ではあまり違いが見られず、特に ATP 結合ドメイン (NBD) における RMSD (root-mean-square-deviation) は 0.14 Å であり、ほとんど同じ構造であった。 Mg^{2+} 結合や ATP 結合に関わるアミノ酸残基や、加水分解活性に関わるアミノ酸残基の構造は両者でよく重なりあっていた。

G132V 変異導入箇所では Val の立体障害により TM1 と TM3 の距離が増大していた。Gly132 への変異は TM3-TM6 相互作用を介して細胞外側ゲート周辺の TM6 構造へも影響を及ぼした。TM6 のねじれは基質輸送に重要なアミノ酸残基、特に Phe383、Phe384、Ile387、Leu388 の構造変化を引き起こした。TM1-T3 間のコンパクトな接合は、内向型構造で基質排出ゲート TM1-TM6 を強固に閉じるために必要な構造モチーフであると考えられ、輸送活性を制御する可能性が示唆された。

野生型の基質排出ゲートは Gln147、Thr381 を介する水素結合により安定化されており、ATPase 活性を抑制する。ゲートの閉まりは TM1-TM3 間の強固な接合により支持されると考えられる。G132V 変異は TM1-TM3 間の距離を広げ、また、TM3 と協調的な TM6 の動きにより、ゲートの開きを引き起こし、内向型構造を不安定化すると予想される。そして、これにより構造状態の平衡を内向型から外向型に偏らせ、その結果、G132V 変異体の ATP 加水分解活性が亢進したものと考えられた。



(3) Sav1866 の CmABC B1 型への改変

フロッパーゼ Sav1866 をエクスポーターへと改変するために、TM1 と TM3 との距離を近づける変異を導入した。しかし、ATP 加水分解活性の変化は見られず、結晶化もできなかった。このことから、TM1 と TM3 以外のアミノ酸残基の影響も考慮した設計の必要が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuoka Keita, Nakatsu Toru, Kato Hiroaki	4. 巻 30
2. 論文標題 The crystal structure of the CmABCB1 G132V mutant, which favors the outward facing state, reveals the mechanism of the pivotal joint between TM1 and TM3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1064 ~ 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Thomas C., Aller S. G., Beis K., Carpenter E. P., Chang G., Chen L., Dassa E., Dean M., Duong V. H. F., Ekiert D., Ford R., Gaudet R., Gong X., Holland I. B., Huang Y., Kahne D. K., Kato Hiroaki, & Tampe R.	4. 巻 594
2. 論文標題 Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3767 ~ 3775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13935	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 陳月、潘 東青、加藤 博章
2. 発表標題 ナノディスクに挿入したP糖タンパク質CmABCB1のATPase活性に対する脂質成分の影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水沼諒、山口知宏、加藤博章
2. 発表標題 P糖タンパク質CmABCB1の基質取込口開閉の制御に関わる残基の探索
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のためのファジカル・ファーマフォーラム
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CmABCB1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 Keita Matsuoka, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato
2. 発表標題 Mechanism of coupling between extracellular gate opening and ATP hydrolysis in P-glycoprotein, CmABCB1
3. 学会等名 Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020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
---------	---------