

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790512

研究課題名（和文）ABC輸送体のX線結晶構造解析

研究課題名（英文）X-ray crystallographic analysis of an ABC transporter

研究代表者

小段 篤史（KODAN ATSUSHI）

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：80360543

研究成果の概要（和文）：本研究では、X線結晶構造解析の手法を用い、真核生物のABC輸送体の3次元構造を高解像度で解明することを目的とした。種々の真核生物由来のABC輸送体について結晶化スクリーニングを行った結果、単細胞性紅藻由来のP糖蛋白質ホモログについて結晶を得ることに成功した。大型放射光施設 SPring-8 のシンクロトン放射光を用いてX線回折実験を実施し、真核生物のABC蛋白質としては、これまでに報告された中で世界最高の解像度を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Understanding the mechanism of action of ABC proteins and developing new therapeutic strategies that target ABC proteins would be considerably accelerated with the three-dimensional structures. Crystal structure of an exporter-type ABC transporter from a unicellular eukaryote was determined by the multiwavelength anomalous dispersion (MAD) method using the X-ray diffraction data measured at SPring-8. The resolution obtained in this study is best among those of eukaryotic ABC proteins ever reported to date.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：生体分子、蛋白質、薬学、癌

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトのもつ 49 種類の ABC 蛋白質は生理的に重要な役割を負っており、それぞれの遺伝子の異常がさまざまな疾病を引き起こす。特に、癌の薬剤耐性、糖尿病、動脈硬化、老人性の失明、アルツハイマー病をはじめ様々な疾患と関連しており、創薬のターゲットとして重要である。代表的な ABC 輸送体である P 糖蛋白質 (ABCB1/MDR1) は、幅広い構造の多種類の薬剤を ATP を駆動力として細胞や体内から排出する。当 ABC 輸送体は多くの薬剤の小腸からの低吸収性や中枢神経系への低移行性と直接結びついており、その立体構造の原子レベルでの解明は中枢神経移行性の高い薬剤をデザインする上で極めて有用である。ABC 輸送体がどのような仕組みで薬剤を認識し輸送しているのか、その詳細な仕組みは不明であり、その解明は ABC 蛋白質全般の機能を考える上で極めて重要である。これまでに、米国の研究グループによってマウスの多剤排出ポンプである *mdr1* の構造が報告されているが (Aller, SG *et al. Science*, 2009)、解像度は低く、その構造をもとにして基質認識機構および輸送機構を議論することはできない。

## 2. 研究の目的

本研究では、X 線結晶構造解析の手法を用い、真核生物の ABC 輸送体の 3 次元構造を高解像度で解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

約 20 種類を目処に、ABC 輸送体遺伝子を単離または入手する。結晶化に向いている ABC 輸送体の効率的な選抜には、まず、ABC 輸送体に GFP を融合したプラスミドを HEK293 細胞に導入し、正常に膜に局在するかどうかを評価する。次いで、界面活性剤を含む溶液において ABC 輸送体の分子分散を GFP 蛍光ゲル

ろ過スクリーニング法で評価することにより結晶化に向けた分子種をさらに選抜する。選抜した ABC 輸送体 (数種類) について結晶化スクリーニングを実施する。結晶が得られ次第、大型放射光施設 SPring-8 のシンクロトロン放射光を用いて X 線回折実験を実施する。結晶化条件の最適化を繰り返し、分解能が 3Å を越えたら、立体構造の決定を開始する。

## 4. 研究成果

これまでに、ほ乳類 (ヒトを含む) 由来のフルサイズ ABC 輸送体について、蛋白質の大量発現および精製を試みたが、それらの発現量、精製蛋白質の安定性や単分散性にまだまだ問題が多く残されており、良質の結晶を得るまでには至っていない。一方で、種々の真核生物由来のハーフサイズ ABC 輸送体について結晶化スクリーニングを行った結果、単細胞性紅藻由来の P 糖蛋白質ホモログについて結晶を得ることに成功した。生化学的解析により当 P 糖蛋白質ホモログが複数の薬剤を輸送する多剤排出ポンプであることを明らかにした。また、当 P 糖蛋白質ホモログのメタノール資化性酵母による大量発現系を確立した。ジャーファーマンタを用いた高密度培養を行うことにより、4 L 培養当たり約 40 mg の精製タンパク質を連続的に安定供給することが可能となった。得られた精製標品を用いて 17,000 以上の結晶化条件をスクリーニングすることにより、良質の結晶を再現性良く得ることに成功した。大型放射光施設 SPring-8 のシンクロトロン放射光を用いて X 線回折実験を実施し構造解析を行った結果、真核生物の ABC 蛋白質としては、これまでに報告された中で世界最高の解像度を得ることに成功した。

## 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 1 件)

- ① Kanako Terakado, Atsushi Kodan, Hiroaki Nakano, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, Toru Nakatsu, and Hiroaki Kato. Deleting two C-terminal  $\alpha$ -helices is effective to crystallize the bacterial ABC transporter *Escherichia coli* MsbA complexed with AMP-PNP. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 査読有、D66, 2010, 319-323  
DOI:10.1107/S0907444909055504

[学会発表] (計 7 件)

- ① Atsushi Kodan, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Keita Sakiyama, Akane Fujioka, Kazumitsu Ueda, and Hiroaki Kato, X-ray crystallographic analysis of an exporter-type ABC transporter. ABC2012, the 4th FEBS Special Meeting “ATP-Binding Cassette Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Disease” Innsbruck, Austria, 2012, February 29 - March 8
- ② Atsushi Kodan, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Keita Sakiyama, Akane Fujioka, Kazumitsu Ueda, and Hiroaki Kato, X-ray crystallographic analysis of an exporter-type ABC transporter. Kakenhi Kiban (S)/iCeMS Joint International Symposium “ABC2011 in Kyoto -ABC

Proteins/Membrane

Meso-domains/ES-iPS cells” Kyoto, Japan, 2011, November 16-17

- ③ 山口 知宏、崎山 慶太、佐藤 友美、小段 篤史、中津 亨、植田 和光、加藤 博章、好熱性紅藻由来の基質排出型 ABC トランスポーターの基質特異性の解析 /Substrate specificity analysis of an exporter type ABC transporter from a thermophilic eukaryote, 第11回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 2011年6月9日
- ④ 山口 知宏、崎山 慶太、地主 遼平、佐藤 友美、小段 篤史、中津 亨、植田 和光、加藤 博章、Characterization of multi-drug exporter activity of an ABC transporter from a thermophilic eukaryote, *Cyanidioschyzon merolae* 日本薬学会第131年会、静岡、2011年3月30日
- ⑤ 山口 知宏、崎山 慶太、池口 圭司、地主 遼平、佐藤 友美、渡辺 文太、小段 篤史、中津 亨、平竹 潤、植田 和光、加藤 博章 好熱性紅藻由来 ABC トランスポーターの多剤排出活性の特徴 第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、富山、2010年11月29日
- ⑥ 崎山 慶太、山口 知宏、小段 篤史、中津 亨、佐藤 友美、植田 和光、加藤 博章、好熱性紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 由来の ABC トランスポーターの発現、精製、及び機能解析 第10回日本蛋白質科学会年会、札幌、2010年6月18日

- ⑦ Tomomi Sato, Atsushi Kodan, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, Toru Nakatsu, and Hiroaki Kato Functional role of the linker region in the mechanism of human multidrug efflux transporter P-glycoprotein, The 5th Seoul-Kyoto-Osaka (SKO) Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, 2010, Osaka, Japan, May 20-21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小段 篤史 (KODAN ATSUSHI)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・  
研究員

研究者番号：80360543

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：