

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689029

研究課題名(和文) ABC輸送体の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of ABC transporters

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・助教

研究者番号：80360543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,000,000円

研究成果の概要(和文)：単細胞真核生物である紅藻の一種が、ヒトの多剤排出トランスポーターP-gpと非常によく似た蛋白質をもつことを見つけ、その蛋白質を結晶構造解析することによって、多剤排出トランスポーターの3次元構造をこれまでに報告された中で世界最高の解像度(2.4 オングストローム)で明らかにすることに成功した。構造を詳細に解析することによって、P-gpがくすりを細胞膜中から蛋白質内に取り込む入口、くすりの認識に関わる可能性のあるアミノ酸残基、P-gpがどのように動いてくすりを細胞外へ排出するのか、構造に基づいて初めて明らかにした(Kodan, A et al. PNAS, 2014)。

研究成果の概要(英文)：In this study, the highest-resolution crystal structures of a eukaryotic P-glycoprotein homolog from the red algae *Cyanidioschyzon merolae*, were determined in two forms: unbound at 2.6-angstrom resolution and bound to a unique allosteric inhibitor at 2.4-angstrom resolution. These structures, along with site-directed mutagenesis and transporter activity measurements, reveal the detailed architecture of the transporter, including a gate that opens to extracellular side and two gates that open to intramembraneous region and the cytosolic side.

研究分野：構造生物学、生化学

キーワード：生体分子 膜タンパク質 癌 多剤耐性 立体構造解析 X線結晶構造解析 ABCタンパク質 P糖タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトのもつ 49 種類の ABC(ATP-Binding Cassette)蛋白質は生理的に重要な役割を担っており、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。P 糖蛋白質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。P 糖蛋白質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。

P 糖蛋白質の立体構造については、米国の研究グループによってマウスの多剤排出ポンプ P-gp の構造<sup>(1)</sup>が報告されていたが、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厳密に議論することはできていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ABC 輸送体の分子機構をその原子レベルの立体構造に基づいて明らかにすることを目的とした。そのため、ヒトの P 糖タンパク質 (MDR1, ABCB1) と良く似た基質特異性を示す好熱性単細胞真核細胞 (紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*) 由来の P-gp ホモログ CmABCB1 を研究対象とし、異なるコンフォメーションの立体構造を X 線結晶構造解析により高分解能で決定する。その立体構造を基に機能に重要と予測されるアミノ酸残基に変異を導入し、それぞれの変異体の薬剤感受性試験を行い、機能に重要なアミノ酸残基を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) タンパク質の大量生産

CmABCB1 の大量発現には、ジャーファーマンター (溶存酸素, pH, 温度を自動制御) を用いたメタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris* SMD1163 株) の高密度培養<sup>(2)</sup>を適用した。発現細胞から膜画分を調製し、界面活性剤 (C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>) で可溶化した後、His-tag カラムとゲルろ過カラムを用いた液体クロマトグラフィーにより精製標品を得た。

### (2) タンパク質の結晶化

上記の精製標品を約 10~15 mg/mL の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。結晶が得られた沈殿剤条件を最適化し、再現性よく良質な結晶が得られる条件を検討した。得られた結晶を用いて母液、抗凍結液の至適化および脱水処理の検討を行った。

### (3) X 線結晶構造解析

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、収集した回折データセットを HKL2000 あるいは XDS を用いて処理した。位相決定は、水銀化合物 (ethyl mercury phosphate) の重原子誘導体結晶を用いた多波長異常分散法 (MAD) により行った。モデル構築、修正および精密化にはプログラム COOT、PHENIX および REFMAC5 を用いた。最終モデルの評価には PROCHECK および MolProbity を用いた。

### (4) 新規環状ペプチドのスクリーニング

従来よりも親和性の高い基質あるいは阻害剤を取得するため、RaPID システム<sup>(3,4)</sup>を用いた環状ペプチドの *In vitro* selection により、合成した 10<sup>12</sup> 種類以上のランダムライブラリーから親和性の高い分子を選抜した。(東京大学の菅裕明教授、Chris J. Hipolito 博士との共同研究)

### (5) 薬剤感受性試験

野生型 CmABCB1 およびその変異体の薬剤輸送能を調べるため、各 CmABCB1 遺伝子を、7 つの内在性 ABC 多剤排出トランスポーターを欠失させた酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* AD1-8u 株)<sup>(5)</sup>に組み込み、様々な薬剤に対する感受性試験を行った。

## 4. 研究成果

これまでに研究代表者の小段は、ヒト P-gp の結晶化に 10 年近く挑戦し続けてきたが、その熱安定性の低さのため<sup>(6)</sup>、これまでのところ成功には至っていない。そこで、全ゲノム配列が解読されており<sup>(7)</sup>、熱安定性が高く結晶化に適していると予想された好熱性 (42 °C, pH2.5 が至適) 単細胞真核生物である紅藻 (*Cyanidioschyzon merolae*) の P-gp ホモログ CmABCB1 に着目した。CmABCB1 はハーフサイズの ABC トランスポーターであり、ヒト P-gp (フルサイズ) の N 末端側と 41 %、C 末端側と 37 % の相同性を有していた。様々な薬剤に対する感受性試験の結果、CmABCB1 はヒト P-gp と非常に良く似た基質特異性を有していることが判明した。CmABCB1 は熱安定性が非常に高く、界面活性剤ミセル中において 48 °C で 16 時間インキュベートした後でも 91 ± 5 % の ATPase 活性が残存していた。このことから、この P-gp ホモログは高分解能での結晶構造解析に適していると考えられた。

結晶化スクリーニングの結果、CmABCB1 の結晶 (空間群 R 32) が再現性よく得られた。SPring-8 の BL41XU ビームライン を利用して X 線回折実験を行い、3.1 Å 分解能にて野生型 CmABCB1 の初期位相を決定した。決定した結晶構造を観察したところ、野生型 CmABCB1 は内向型構造をとっており、特に、膜貫通 (Transmembrane, TM) ヘリックス TM4 の一部の電子密度が非常に低く、この領域が非常にフレキシブルであることが判明した。そこで、そのフレキシビリティを抑えると予想

される変異体(G277V/A278V/A279V、以降、VVV変異体と呼ぶ)の結晶を作製し構造解析を行った。その結果、TM4全体に明確な電子密度が観測され、分解能が2.6 Åまで向上した。VVV変異体の薬剤感受性試験を行ったところ、野生型とは異なり、薬剤輸送能が消失していた。このことから、この部位が、P-gpが薬剤を細胞膜中から蛋白質内に取り込む入口であると推察された。

また、CmABCB1のTMドメインの構造を詳細に観察したところ、脂質二重膜の中央から細胞外にかけて芳香族または比較的大きな疎水性アミノ酸残基(Phe, Leu, Ile, Tyrなど)が集まった4層構造から成る領域が認められた。この部位は空洞と細胞外を隔てているため、ここが細胞外へ通じるゲートと考えられた。そこで、この4層構造を構成するアミノ酸残基をAlaに置換した変異体を作製してそれらの薬剤感受性試験を行った結果、Tyr358, Ile387, Leu388, Phe384, Phe138が薬剤輸送に重要な役割を果たしていることが判明した。

一方で、野生型およびVVV変異体を用いてさまざまな薬剤との共結晶化を試みたが、TMドメイン内の空洞にはっきりとした薬剤の電子密度を捉えることができなかった。これは、CmABCB1と輸送基質の相互作用が非常に弱いためと考えられた。そこで、既知のリガンドより親和性の高い基質あるいは阻害剤を取得するため、RaPIDシステムを用いた*In vitro* selectionを実施した結果、最もよく結合する基質 rhodamine 6G よりも約100倍親和性の高い分子 aCAP (anti-CmABCB1 peptide) を新たに見出した。aCAPは18アミノ酸残基で構成される環状ペプチド(分子量:2123)であり、CmABCB1のATP加水分解活性を強力に阻害( $K_i = 65 \text{ nM}$ )した。そこで、aCAPとCmABCB1との複合体結晶を作製したところ、複合体構造を2.4 Å分解能で決定することができた(図1)。

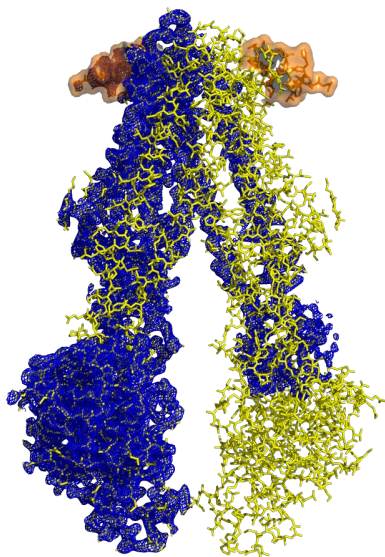


図1. aCAP/CmABCB1の複合体結晶構造

aCAPは結晶のパッキングには関与していなかったことから、aCAP複合体の分解能が2.4 Åに向上した要因は、aCAPの結合自体がCmABCB1の「内向型構造」を安定化したためであると推察された。ただし、予想に反してaCAPは、分子の外部から「かすがい」を打つようにTM2とTM6に結合しており、輸送基質が結合するであろう分子内部には結合していなかった。つまり、aCAPが結合した状態ではTM2と連動するTM1はTM6から離れることができないと考えられた。上述のように、aCAPはCmABCB1のATP加水分解活性を強力に阻害することからも、TM1とTM6が離れることは輸送活性に必須であると考えられた。

CmABCB1とバクテリアホモログであるSav1866<sup>(8)</sup>の構造は、それぞれ内向型と外向型で、これまでに決定された最も高分解能の立体構造であるため、両者を比較することで、内向型から外向型への構造変化がどのように起こっているのか、その動作原理についてはじめて原子レベルで厳密に議論することができるようになった<sup>(9)</sup>。しかしながら、この動作原理における重要アミノ酸残基の役割を明らかにするためには、やはりどうしてもCmABCB1の外向型構造情報が必要である。最近、立体構造に基づいた部位特異的変異導入などの工夫によって、CmABCB1の外向型結晶を得ることに成功した。この結晶から2.0 Åより高い分解能の回折データを収集できおり、現在、外向型構造モデルの精密化を進めているところである。今後、CmABCB1の外向型構造と内向型構造と比較し、機能に重要なアミノ酸残基を同定することで、さらに詳細な分子メカニズムを解明できるものと期待している。

#### <引用文献>

- S. G. Aller, et al.: Science 323, 1718 (2009)  
H. Kato and S. Iwata, Ed.: Structural Biology of Membrane Proteins, p.80, Kagakudojin (2013)  
C. J. Hipolito and H. Suga: Curr. Opin. Chem. Biol. 16, 196 (2012).  
Y. Yamagishi, et al.: Chem. Biol. 18, 1562 (2011).  
K. Nakamura, et al.: Antimicrob. Agents Chemother. 45, 3366 (2001)  
A. Kodan, et al.: Protein Expr. Purif. 66, 7 (2009)  
M. Matsuzaki, et al.: Nature 428, 653 (2004)  
R. J. Dawson and K. P. Locher: Nature 443, 180 (2006)  
A. Kodan, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 4049 (2014)

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) 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, and Hiroaki Kato, "Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, 111, 4049-4054 (2014)  
DOI: 10.1073/pnas.1321562111

[学会発表](計 8件)

- 1) 山口知宏、小段篤史、中津亨、藤岡あかね、植田和光、加藤博章、トランスポーターにおけるATP駆動力共役メカニズムの立体構造基盤、公開シンポジウム「ゆらぎと水 生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」、2012年09月14日~2012年9月15日、大阪ガーデンパレス(大阪府大阪市)
- 2) 藤岡あかね、山口知宏、小段篤史、中津亨、植田和光、加藤博章、結晶構造に基づく多剤排出型ABCトランスポーターメカニズムの解明、第11回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム、2012年09月16日、九州大学病院キャンパス コラボ (福岡県福岡市)
- 3) 山口知宏、木村泰久、小段篤史、池口圭司、渡辺文太、平竹潤、中津亨、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輸送基質特異性の検討、第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012年11月16日、京都大学薬学部(京都府京都市)
- 4) 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)
- 5) 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, the 5th FEBS Special Meeting "ATP-Binding Cassette Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Disease"* (招待講演)2014年03月08日~2014年03月14日、インスブルック(オーストリア)

- 6) 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, CmABC1 from a thermophilic eukaryote, *ABC2014, the 5th FEBS Special Meeting "ATP-Binding Cassette Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Disease"*, 2014年03月08日~2014年03月14日、インスブルック(オーストリア)
- 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における基質取込の立体構造基盤、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)
- 8) 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~2014年10月18日、国立京都国際会館(京都府京都市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

京都大学ホームページ

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 -体内動態や脳内移  
行に優れたくすりの開発にも期待-

[http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news\\_data/h/h1/news6/2013\\_1/140220\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2013_1/140220_1.htm)

## 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・助  
教

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：