

令和元年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07320

研究課題名(和文) 排出過程におけるABC輸送体 基質相互作用を捉える

研究課題名(英文) The relationship between substrate-interaction and conformational change in the transport of ABC transporters

研究代表者

山口 知宏 (Yamaguchi, Tomohiro)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80346791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ABC輸送体は内向型・外向型間の構造変化によって基質を輸送する。申請者は、P糖タンパク質ホモログCmABCBを用いて、これら二状態での高分解能結晶構造解析を達成したことから、構造変化と基質輸送との関係に迫ることが可能になった。本研究によって、CmABCBの構造変化途中の結晶構造を決定し、内向型および外向型との比較から基質との相互作用が変化する傾向を観測した。ATP依存的に基質相互作用は減少することが示唆され、その減少に寄与する残基のアミノ酸変異は輸送活性を低下させた。P糖タンパク質は、構造変化で基質結合部位がある空洞を収縮させることで基質との相互作用を弱め細胞外に排出することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からは、P糖タンパク質が多様な基質を排出することができる理由が、基質結合部位がある空洞を収縮して基質との相互作用を弱めて細胞外に運ぶことによることが示唆された。特定の相互作用が寄与しないこの輸送メカニズムからは、ヒトABC1の構造変化に作用することが排出されにくい薬剤の創製に対して新しい視点を与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：ABC transporters transport substrates in association with conformational change between the inward- and outward-facing states. We have determined these two state structures of an ABC multidrug transporter P-glycoprotein homolog, CmABCB1, at high resolution, and thus became to elucidate the relationship between conformational change and substrate transport. In this study, a crystal structure at an intermediate state of CmABCB1 mutant was determined. By comparison with the inward- and outward-structures of CmABCB1, this intermediate structure suggested that the interaction with a substrate was altered in conformational change. The mutation of the amino acid residues contributing the change the substrate interaction disrupted the transport activity. These results suggest that P-glycoprotein transports substrates by weakening the interaction of substrates by contracting the inner cavity involving substrate binding sites.

研究分野：構造生物学

キーワード：ABCトランスポーター P糖タンパク質 立体構造解析 変異体解析 膜タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターは、ATP 加水分解 (ATPase) によって作り出すエネルギーを利用して、脂質膜を介した基質輸送を行う膜タンパク質である。ATPase と基質輸送はそれぞれ、2つのヌクレオチド結合ドメイン (NBD) と2つの膜貫通ドメイン (TMD) が担っている。このトランスポーターは、ATP 結合と加水分解に伴う内向型と外向型の間の構造変化を通じて、基質を輸送すると考えられている。基質は内向型で TMD の膜貫通ヘリックス (TM) で囲まれた空洞に取込まれ、ATP を介して NBD が二量体を形成し外向型へ構造変化することによって排出されると考えられている。

ヒトにおいて最も多くの研究がなされている ABC トランスポーター、ABCB1 (P 糖タンパク質または MDR1 と呼ばれる) は、外界から生体に侵入してくる様々な基質を細胞外に排出する。ヒト ABCB1 は外来異物に対する生体防御の要であるとともに、ガン細胞の多剤耐性化の原因でもあるため、その立体構造に基づいた基質排出メカニズムの解明が希求されている。申請者らは、ヒト ABCB1 と非常に類似した機能を示す新規 ABC トランスポーター CmABCB1 を好熱性真核生物 *Cyanidioschyzon merolae* から見出し、その内向型の結晶構造を高分解能 (2.4 Å) で決定した。さらに、この立体構造に基づいて、内向型構造の安定化に寄与すると考えられるアミノ酸残基に部位特異的変異を導入することによって、外向型での結晶構造解析に成功した。CmABCB1 同一分子での内向型と外向型の高分解能結晶構造を比較することで、どれだけ構造変化することで基質が輸送されるのかが明らかになった。しかし、立体構造変化と基質相互作用との関係とそれによる基質輸送への寄与については不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ABC トランスポーターの基質排出における構造変化が基質相互作用に及ぼす影響を明らかにすることである。まず、CmABCB1 の2つの状態の結晶構造に基づいて、構造変化の途中状態に留めるアミノ酸変異を導入して変異体の結晶構造解析を行った。さらに、得られた途中状態を含めた3つの結晶構造の比較解析を行うとともに、部位特異的変異体を作成して基質相互作用測定と活性測定を行った。これらの構造機能解析結果に基づいて、構造変化と基質相互作用におけるアミノ酸残基の寄与について解析した。

3. 研究の方法

(1) ABC トランスポーターは構造変化の途中状態は不安定であるため結晶化できない。CmABCB1 を構造変化途中に留まりやすくするために、構造変化の主要機構に部位特異的変異を導入した変異体を作成した。この変異体タンパク質を酵母組換え発現系と、ポリヒスチジンタグに対する金属アフィニティー法とゲルろ過法によって精製して結晶を調製し、X線結晶解析によって立体構造を決定した。

(2) 変異体の機能解析では、ATPase 活性については精製タンパク質を用いた ATP 加水分解反応で生じる無機リン酸を測定する実験を実施し、輸送活性については CmABCB1 を発現させた酵母を用いた薬剤耐性実験を実施した。

(3) 基質相互作用の変化を観測するためには、Trp 蛍光変化を利用した。まず、CmABCB1 の内向型立体構造に基づいて、基質結合部位またはその近傍のアミノ酸を Trp に置換した変異体を作成し、その精製タンパク質を用いて基質添加による Trp 蛍光の変化を測定した。バックグラウンドの蛍光強度を下げて測定精度を高めるためには、内在性 Trp 残基を Tyr に置換した変異体を作成して測定に用いた。

4. 研究成果

(1) CmABCB1 の途中状態に留まりやすくした変異体の構造機能解析

① GW 変異体の X線結晶構造解析

CmABCB1 の内向型構造^①の解析から、2つの膜貫通ヘリックス TM1 と TM6 が互いに接近して複数の相互作用を形成しているために、基質輸送の前の状態である内向型構造が安定化されていると考えられた。一方で外向型構造では、TM1 と TM6 とが大きく離れていた。そのため、TM1 と TM2 を適度に引き離して内向型を不安定化することで、外向型との間の途中状態に留まりやすくなると予測した。そこで、TM1 上にある Gly を側鎖が嵩高い Trp に置換した GW 変異体を作成して結晶化を行った。複数の条件で結晶が得られ、X線回折データを収集して結晶解析を行ったところ、変異体の結晶構造を 3.2 Å で決定することができた。この結晶構造を野生型の内向型構造と比較したところ、導入した Trp の側鎖によって TM1 と TM6 とが互いに遠ざかり、外向型構造に近づいた構造であった。基質結合部位を構成するアミノ酸残基の側鎖の位置が変化しており、基質が結合しにくくなっている可能性が示唆された。

② GW 変異体の機能解析

ATPase 活性の輸送基質依存性を測定したところ、酵素反応速度論解析によって基質の K_m 値が野生型より約 4 倍高いことが判明した。このことは GW 変異によって基質が結合しにくくなっているという上記の推定と一致する。また、ATPase 比活性は野生型より高くなっていたが、輸送活性は著しく低下していた。GW 変異導入部位は TMD の細胞外近傍であり NBD からは遠いために、ATP 加水分解反応を妨げることはなく、基質親和性の低下によって輸送活性だけ低下したと考えられる。

(2) CmABC1 の構造変化と基質相互作用との関係の変異体解析

① Trp の蛍光変化を用いて測定する系の構築

構造変化による基質相互作用への影響を調べるため、Trp の蛍光変化を利用して基質との相互作用の強さを観測する系を構築した。これまでに非特異的な蛍光を除くために野生型にある 6 個の Trp のうち、機能に重要な 1 つを除きすべてを Tyr に置換した変異体 (5WY) を作成していたが、5WT 変異体は安定性が低く測定精度を下げるという問題があった。置換した 5 つ Trp のいずれかが安定性に重要な残基であると考えられたため、これらの Trp を 1 つずつ Tyr に置換した変異体タンパク質を調製し、ATPase 活性の熱安定性を測定した。その結果、NBD の内部にある Trp 残基を Tyr に置換した変異体だけ著しく熱安定性が低下したことから、この残基が安定性に関与していることが判明した。この Trp を野生型に戻した変異体 (4WY) を作成したところ、4WY の輸送活性と安定性はいずれも WT と類似していた。

基質との相互作用を評価するために、4WY 変異体をベースとして、立体構造に基づいて基質結合部位を構成する Phe を Trp に置換した変異体 (4WY/FW) を作成した。4WY/FW 変異体の精製タンパク質を用いて、基質または阻害剤による Trp 蛍光変化への影響を測定したところ、添加した基質または阻害剤の濃度に依存して蛍光変化が観測された。この変化量は野生型や 4WY 変異体での蛍光変化より大きかった。野生型や 4WY では基質の結合が引き起こす構造変化による影響を間接的に観測しているのに対して、4WY/FW 変異体では基質との相互作用が観測されていると考えられた。4WY 変異体は新たに導入する Trp と基質との相互作用を観測するために適していることが判明した。

② 構造変化の状態と基質相互作用との関係の解析

Trp 置換による基質相互作用への影響を小さくするために、CmABC1 の基質結合部位ではなくその周辺のアミノ酸残基に対して 4WY をベースに Trp に置換した変異体を作成した。Trp 蛍光測定を行ったところ、TM6 の Met を Trp に置換した変異体 (4WY/MW) は、基質の添加によって濃度依存的に Trp 蛍光が大きく変化した。さらに、4WY/MW 変異体は ATP の添加によって基質濃度依存的な蛍光変化の最大変化量が減少した。ATP は NBD に結合して二量体を形成させて外向型への構造変化を引き起こすことから、この最大蛍光変化量の減少は基質と相互作用する内向型の割合が減少したことによるものと考えられる。

4WY/MW 変異体で観測された ATP 存在下での基質相互作用の減少の要因を調べるために、CmABC1 の内向型と外向型の 2 つの立体構造を用いたモーフィング解析を行った。基質結合部位のある空洞は、外向型になるときに細胞内側から収縮する動きが見られた。この動きが基質との相互作用を減少させると推定された。この推定に基づいて 2 つの結晶構造を調べたところ、この収縮に TM1 の Gly と TM3 の Ala による van der Waals 相互作用が寄与する可能性を見出した。これらの残基を Val に置換して相互作用を壊した変異体の活性を測定したところ、ATPase 活性は野生型より高く、輸送活性が著しく低下していた。Val 置換はこれらの TM1 と TM3 による空洞の収縮とそれとともに基質相互作用の変化を妨げたことで、ATPase 活性は乱さずに輸送活性を低下させたと考えられる。TM3 は TM6 と束を形成していることから、構造変化で TM6 と TM1 が形成する排出ゲートが開くとともに空洞の収縮が引き起こされて、基質は相互作用が減少して排出される考えられた。

(3) 結論

本研究によって、CmABC1 の構造変化途中の結晶構造が明らかになり、内向型および外向型との比較と構造解析に用いた変体の機能解析から、基質輸送すなわち構造変化の途中では基質との相互作用が減少する傾向が観測された。Trp 蛍光変化を利用した解析からも構造変化を引き起こす ATP の存在によって基質の相互作用の減少が観測され、基質結合部位の変化に寄与すると考えられるアミノ酸残基の変異体解析では基質輸送活性の低下が認められた。P 糖タンパク質は、構造変化によって基質結合部位がある空洞を収縮させて基質との相互作用を弱め基質を細胞外に排出することが示唆された。

<引用文献>

- ① Atsushi Kodan, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Keita Sakiyama, C. J. Hipolito, Akane Fujioka, Ryo Hirokane, Keiji Ikeguchi, Bunta Watanabe, Jun Hiratake, Yasuhisa Kimura, Hiroaki Suga, Kazumitsu Ueda, Hiroaki Kato, Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 4049-4054 (2014)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Atsushi Kodan, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Keita Matsuoka, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, Hiroaki Kato, Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABCB1, *Nature Communications*, **10**, Article Number: 88 (2019), 査読有
<https://www.nature.com/articles/s41467-018-08007-x>

[学会発表] (計7件)

- ① 宇都宮裕人、山口知宏、宮ノ入洋平、小田健人、中津亨、甲斐荘正恒、加藤博章、メタノール資化性酵母発現系を用いて ^{15}N 安定同位体標識した ABC トランスポーターの NMR 解析、第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7日~9日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ② 小田健人、山口知宏、宮ノ入洋平、宇都宮裕人、中津 亨、甲斐荘正恒、加藤博章、[epsilon- ^{13}C]メチオニン標識した ABC トランスポーター MsbA の調製と NMR 解析、第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7日~9日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ③ 山口知宏、P 糖タンパク質の多剤能動輸送メカニズムから考える創薬・薬理学、日本薬学会第137年会、2017年3月24日~27日、仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ④ 松岡敬太、山口知宏、中津亨、加藤博章、P 糖タンパク質の基質排出ゲート開閉の構造基盤、第17回日本蛋白質科学会年会、2017年6月20日~22日、仙台国際センター (宮城県)
- ⑤ 大山諒、潘東青、中津亨、佐藤友美、山口知宏、小段篤史、植田和光、岩田想、加藤博章、X 線自由電子レーザーを用いた P 糖タンパク質ホモログの連続フェムト秒 X 線結晶構造解析、第14回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2017年8月27日~28日、ロッジ舞洲 (大阪府大阪市)
- ⑥ 大城悠暉、山口知宏、松岡敬太、宇都宮裕人、中津亨、加藤博章、トリプトファンの蛍光を利用した ABC 多剤排出トランスポーターとリガンドとの相互作用解析、第67回日本薬学会近畿支部総会・大会、2017年10月17日、兵庫医療大学 (兵庫県)
- ⑦ 井上善貴、山口知宏、大城悠暉、松岡敬太、加藤博章、Trp 蛍光を利用した P 糖タンパク質分子内の基質結合部位の解析、日本薬学会第139年会、2019年3月20日~23日、幕張メッセ (千葉県)

[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) 研究分担者

(2) 研究協力者

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。