

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07306

研究課題名(和文)ABC輸送体の動作原理の解明と創薬への展開

研究課題名(英文)Structural Basis for drug transport by ABC transporters

研究代表者

小段 篤史(Kodan, Atsushi)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：80360543

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)：代表的なABC輸送体であるP糖蛋白質(別名、MDR1またはABCB1)は、ATPを駆動力として幅広い構造の多種類の脂溶性化合物を細胞や体内から排出するが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。代表者らはP糖蛋白質オーソログの内向型(輸送前)と外向型(輸送後)の立体構造を高分解能で解明し、新たな動作原理の仮説モデルを予測した。立体構造に基づき作成した多数の変異体の機能を調べ、機能-構造相関を解析し、仮説モデルの正当性を証明した。当輸送体が、ATPのエネルギーを利用し、多様な脂溶性化合物を、細胞膜中へ逃さないように、細胞内から細胞外へと徐々に絞り出すように排出する動作原理を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに異なる二状態(内向型と外向型)の結晶構造を同一のP糖蛋白質で明らかにした例はなかった。代表者らは、ヒトP糖蛋白質と基質特性がよく似たP糖蛋白質オーソログを見だし、その両状態の結晶構造を世界に先駆けて高分解能で決定することに成功した。両者の原子レベルでの厳密な比較、および、機能-構造相関解析により、当輸送体の分子メカニズムの理解を飛躍的に向上させることに成功した。本研究で得られた成果は、ABC蛋白質全般の機能を考える上で重要であり、新たな治療方針や創薬アイデアの策定に多大な貢献ができると期待される。

研究成果の概要(英文)：P-glycoprotein, a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family, extrudes a large variety of lipophilic compounds from cells, but the underlying molecular mechanism of how the transporter performs multidrug pumping using ATP as fuel remains unknown. We have solved two structures of a eukaryotic P-glycoprotein ortholog: an outward-open state with bound nucleotide, and an inward-open state. The detailed structural differences between the two conformations of the same molecule allowed us to propose a rational model for the molecular mechanism. To evaluate the validity of the model, we generated more than 100 mutants and test their functions by biochemical analyses. These results supported the validity of the proposed model, indicating that this transporter squeezes various lipophilic compounds to the extracellular space and that the squeeze movement is driven by local conformational changes of nucleotide binding domains upon ATP binding.

研究分野：細胞生化学 分子生物学 蛋白質工学 構造機能生物学

キーワード：ABC輸送体 P糖蛋白質 膜蛋白質 分子メカニズム 機能-構造相関 ATP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ABC 蛋白質は、よく保存された ATP 結合カセットを持つ膜貫通型蛋白質で、ヒトでは 48 種類の ABC 蛋白質分子が確認されている。その遺伝子の欠陥は、疾病と関連しており、ABC 蛋白質は生理学的、医学的に重要な意義を持っている。代表的な ABC 蛋白質である P 糖蛋白質は、ATP を駆動力として、幅広い構造の多種類の脂溶性化合物を、「内向型」と「外向型」のコンフォメーションを相互変換させることで、細胞や体内から排出する。しかし、P 糖蛋白質がどのような仕組みで脂溶性化合物を認識し輸送しているのか、その動作原理の詳細は不明であった。その大きな要因の一つは、同一の P 糖蛋白質分子で「内向型」と「外向型」のコンフォメーションの構造が高解像度で解明されていなかったことにある。代表者らは、最も単純な真核生物として知られるシズン(紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*)に着目し、シズン P 糖蛋白質オーソログがヒト P 糖蛋白質と非常に良く似た基質特異性を示すこと¹、その内向型の結晶構造、および、ATP アナログが結合した外向型の初期構造を得ていた。

2. 研究の目的

代表者らは、シズン P 糖蛋白質オーソログの内向型と外向型の両構造を原子レベルで厳密に比較することによって、海外研究グループの提案モデルとは異なる新たな動作原理の仮説モデルを提案した。すなわち、「ATP 結合により、ATP 結合ドメインが二量体化すると、膜貫通ドメインのねじれと回転が引き起こされ、膜貫通ドメイン中央に位置する空洞(脂溶性化合物の結合部位)が細胞内側から絞られるように収縮するとともに細胞外ゲートが開くため、脂溶性化合物は細胞外へ排出される」というモデルである。本研究の目的は、上記の仮説モデルの正当性を検証し、P 糖蛋白質分子の動作原理を詳細に解明することである。

3. 研究の方法

シズン P 糖蛋白質オーソログの「内向型」と「外向型」の立体構造を精査・比較し、輸送機能に寄与しうるアミノ酸残基を予測した。それらのアミノ酸残基に変異を導入し、合計 100 種類以上の変異体を作製した。変異体を出芽酵母 *S. cerevisiae* の薬剤感受性株 AD1-8u 株² (内在する 7 つの ABC 基質排出トランスポーター遺伝子を欠損) に形質転換した後、各変異体間で蛋白質の発現量が大きく変わらないことを確認した上で、薬剤感受性試験を実施した。また、形質転換した AD1-8u 株から変異体蛋白質を高純度で精製し、それぞれの基底状態(輸送基質がない)の ATP 加水分解活性、および、輸送基質濃度依存的な ATP 加水分解活性を測定した。薬剤感受性と ATP 加水分解活性の双方の解析結果に基づき、アミノ酸変異による機能への影響を一つ一つ評価した。それらの結果を基に、仮説モデルとの対応を検討しつつ、上記の一連の流れを繰り返し、機能-構造相関を厳密に解析することで仮説モデルの正当性を検証した。さらに、機能に重要と考えられる一部のアミノ酸残基については、ヒト P 糖蛋白質の対応アミノ酸残基に変異を導入し、ヒト培養細胞を用いて上記と同様の実験を実施し、仮説モデルの妥当性を検証した。

4. 研究成果

(1) ABC 蛋白質の中で世界最高分解能の外向き型構造

シズン P 糖蛋白質オーソログの「外向型」(ATP 結合型)の初期構造の精密化を進め、最終的に 1.9 Å 分解能で構造決定し、構造情報は蛋白質構造データバンクに登録した。この外向型構造の解像度は、ATP 結合ドメインと膜貫通ドメインを含む ABC 蛋白質の構造としては、世界最高となった。これまでに同一の P 糖蛋白質で「内向型」と「外向型」の二状態の構造を明らかにした例はなく、今回、代表者らが世界に先駆けて同一 P 糖蛋白質分子の両状態の構造を原子レベルで決

定した。両状態を精密に比較し、変異体の機能解析から得られた機能-構造関連の情報を合わせることで、仮説モデルの正当性を証明するだけでなく、当輸送体が、ATPを利用して駆動する仕組み、さらに、多様な脂溶性化合物を絞り出すように細胞外へ排出する仕組みが以下のように明らかとなった³。

(2) ATPをどのように利用して駆動しているのか

これまでにバクテリア由来ABC蛋白質のATP結合ドメインのみの結晶構造から、 Mg^{2+} -ATP結合がもたらすATP結合ドメインの局所的な構造変化 (α ヘリカルサブドメインが recA likeサブドメインに引きつけられる動き) はすでに明らかとなっていた⁴。しかし、この局所的な動きが膜貫通ドメインにどのようにして伝わるのかは不明であった。シゾンP糖蛋白質オーソログの外向型構造のATP結合部位を精査したところ、ATPのアデニン環が、細胞内のATP結合ドメインと膜貫通ドメインの間の空間に、水を介した水素結合ネットワークを形成している様子を鮮明に捉えることができた (図1A)。このアデニン環から派生する水素結合ネットワークは、膜貫通ドメインとATP結合ドメインの境界領域を安定化しており、ATP結合ドメインが膜貫通ドメインに効率的に力を伝えるのに役立っていると考えられた。この知見は、1.9Åという高分解能により、水の配置まで精密に決定できたことで、初めて明らかとなった。また、ATP結合ドメインの α ヘリカルサブドメインのQ-loopが Mg^{2+} に引き寄せられることにより、recA likeサブドメインに結合しているATPの β リン酸と γ リン酸の近傍に八面体型六配位構造の Mg^{2+} 結合部位が形成されることが判明した。その結果、 α ヘリカルサブドメインには斜下向きの旋回の動きが生まれる。 α ヘリカルサブドメインはQ-loopを介して膜貫通ドメインの細胞内ヘリックス (IH) と疎水性相互作用で強固に結合しているため、 α ヘリカルサブドメインの旋回は細胞内ヘリックスを介して膜貫通ドメインへと伝播する (図1B)。その結果、膜貫通ドメイン全体がねじれ (回転と傾き) を伴って構造変化し、外向型へと移行する。

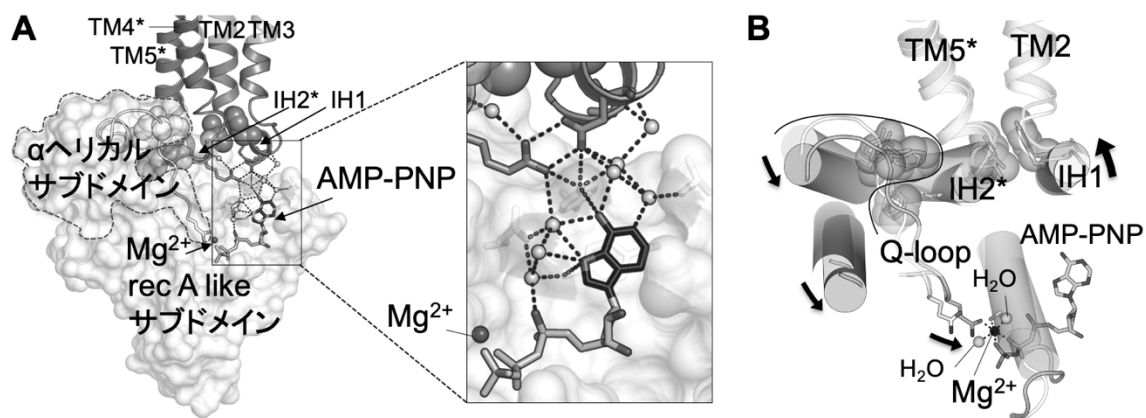


図1. ATP結合によるATP結合ドメインの構造変化 (A) アデニン環から派生する水を介した水素結合ネットワーク。点線は水素結合を示す。疎水性相互作用で強固に結合している α ヘリカルサブドメインとIHヘリックス上のアミノ酸側鎖を球で示した。ホモダイマーのうち他方のサブユニットをアスタリスクで示した。(B) α ヘリカルサブドメインからIHヘリックスへの構造変化の伝播。矢印は Mg^{2+} 結合部位形成に伴う内向型から外向型への構造変化を示している。 α ヘリカルドメインとIHヘリックスの境界を線で示した。点線は水素結合を示す。

さらに、ATP結合ドメイン二量体の境界では、ATP結合部の下にイオン結合が形成されていた。変異体の機能解析の結果とあわせると、このイオン結合は、脂溶性化合物を細胞外に排出するまで外向型をしばらく安定して保持する役割を担っていると推察された。同様のイオン結

合は、ヒトP糖蛋白質にも保存されていたため、ヒトP糖蛋白質変異体を作製し、その機能を調べたところ、ヒトP糖蛋白質においてもこのイオン結合の重要性が明らかとなった。

(3) 膜貫通ドメイン内部空洞の収縮と弛緩

シゾン P 糖蛋白質オーソログ分子には、脂溶性化合物を細胞外へ一方向に排出するための実に巧妙な仕組みが、その膜貫通ドメインに備わっていることが明らかとなった。内向型では脂溶性化合物を結合する大きな空洞があったが、外向型ではこの空洞は収縮し脂溶性化合物が結合できるスペースは残されていなかった。上記の ATP 結合ドメインの旋回の動きが膜貫通ドメインに伝播した結果、膜貫通ドメインは全体としてねじれるように構造変化し、空洞はちょうど膜中央付近で最も絞られるようになっていた。また、膜貫通ヘリックス 3 と 6 上のアミノ酸残基が弁のような役割を果たすことで、脂溶性化合物が細胞内に逆流しないように調節しており、細胞外への一方向性の排出を可能にしていた。

(4) ヒト P 糖蛋白質を用いた検証

ヒト P 糖蛋白質を対象とした *in vivo* FRET の結果、ヒト P 糖蛋白質の内向型から外向型へのコンフォメーション変化を促進するためには、ATP と輸送基質の両方が必要であることが明らかになった。この結果は、P 糖蛋白質オーソログ内向型が、膜貫通ドメインの空洞天井部の疎水性クラスターと水素結合によって安定化しているという結果とよく一致する。すなわち、空洞天井部に結合した脂溶性輸送基質は、ATP 結合ドメインが二量体化する過程で、楔を打つように疎水性クラスターを不安定化することで細胞外ゲートを開き、外向型へのコンフォメーション変化を促進することが強く示唆された。

(5) 多様な脂溶性化合物を細胞外へ絞り出すように排出する仕組み

本研究により明らかとなった P 糖蛋白質の分子メカニズムを、簡単なイラスト (図 2) とともにまとめると、以下のようになる。P 糖蛋白質分子は、内向型で取り込んだ脂溶性化合物を大きな空洞内に曖昧に結合させる (図 2 左)。Mg²⁺-ATP 結合によって引き起こされる ATP 結合ドメインの構造変化が膜貫通ドメインに伝播する (図 2 左から中央にかけて)。脂溶性化合物が、疎水性の高い空洞天井部に結合し、楔を打つようにして疎水性クラスターを不安定化し外向型へのコンフォメーション変化を促進する (図 2 中央)。ATP 結合ドメインが二量体化する過程で、膜貫通ドメインは全体としてねじれるように構造変化し、細胞内側から細胞外側へと脂溶性化合物を絞り出すようにして排出する (図 2 中央から右にかけて)。その後、ATP が加水分解されると、二量体化した ATP 結合ドメインが解離し、再び内向型に戻る。P 糖蛋白質分子は、この一連のサイクルを繰り返すことで、その機能を発揮していることが明らかとなった。

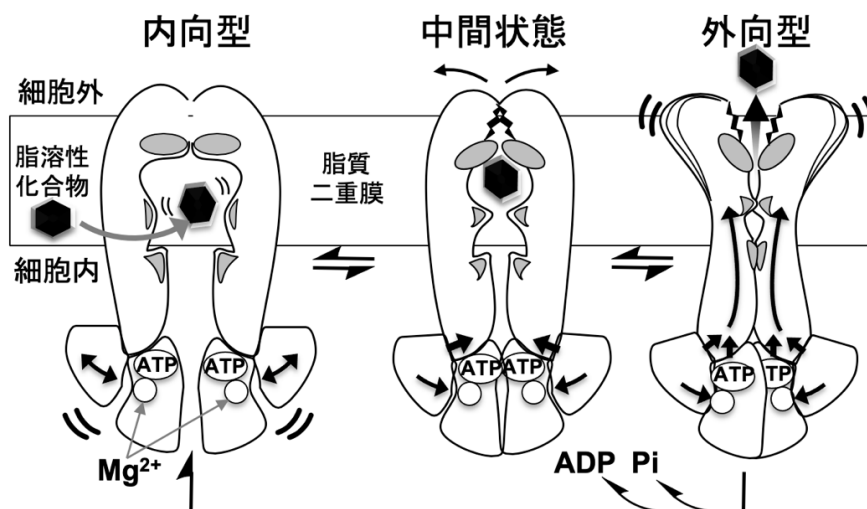


図 2. 本研究で明らかとなった P 糖蛋白質の分子メカニズム

(6) 今後の展望

本研究では、当初の予想をはるかに上回る詳細な P 糖蛋白質の分子メカニズムを明らかにすることができた。また、代表者が本研究を通じて培った、細胞膜から機能状態に近い P 糖蛋白質分子を抽出・調製するためのノウハウを、生理学的に重要な役割を果たす他のヒト ABC 蛋白質へ適用し条件の最適化を試みた結果、機能-構造解析に適すると考えられる 2 種類の ABC 蛋白質メンバーを見いだすことができた。今後、これらの ABC 蛋白質メンバーの分子メカニズムを明らかにし、本研究で明らかとなった P 糖蛋白質の分子メカニズムと比較することで、ABC 蛋白質の機能分化、さらには、分子メカニズムに基づいた創薬アイデアに関する新たな知見の創出が期待できる。

<引用文献>

- (1) Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nakatsu, T.; Sakiyama, K.; Hipolito, C. J.; Fujioka, A.; Hirokane, R.; Ikeguchi, K.; Watanabe, B.; Hiratake, J.; Kimura, Y.; Suga, H.; Ueda, K.; Kato, H. Structural Basis for Gating Mechanisms of a Eukaryotic P-Glycoprotein Homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111* (11), 4049-4054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321562111>.
- (2) Nakamura, K.; Niimi, M.; Niimi, K.; Holmes, A. R.; Yates, J. E.; Decottignies, A.; Monk, B. C.; Goffeau, A.; Cannon, R. D. Functional Expression of Candida Albicans Drug Efflux Pump Cdr1p in a Saccharomyces Cerevisiae Strain Deficient in Membrane Transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (12), 3366-3374. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3366-3374.2001>.
- (3) Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nakatsu, T.; Matsuoka, K.; Kimura, Y.; Ueda, K.; Kato, H. Inward- and Outward-Facing X-Ray Crystal Structures of Homodimeric P-Glycoprotein CmABCB1. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 88. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08007-x>.
- (4) Orelle, C.; Alvarez, F. J. D.; Oldham, M. L.; Orelle, A.; Wiley, T. E.; Chen, J.; Davidson, A. L. Dynamics of α -Helical Subdomain Rotation in the Intact Maltose ATP-Binding Cassette Transporter. *6*.
- (5) Futamata, R.; Ogasawara, F.; Ichikawa, T.; Kodan, A.; Kimura, Y.; Kioka, N.; Ueda, K. *In Vivo* FRET Analyses Reveal a Role of ATP Hydrolysis-Associated Conformational Changes in Human P-Glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295* (15), 5002-5011. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012042>.

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Atsushi Kodan、Tomohiro Yamaguchi、Toru Nakatsu、Keita Matsuoka、Yasuhisa Kimura、Kazumitsu Ueda、Hiroaki Kato	4. 巻 10
2. 論文標題 Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABC1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1, 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-08007-x	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 -

1. 著者名 Ryota Futamata, Fumihiko Ogasawara, Takafumi Ichikawa, Atsushi Kodan, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka and Kazumitsu Ueda	4. 巻 295
2. 論文標題 In vivo FRET analyses reveal a role of ATP hydrolysis-associated conformational changes in human P-glycoprotein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 5002, 5011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.012042	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学ホームページ http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/190108_2.html SPring-8大型放射光施設ホームページ http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2019/190108/ 日本経済新聞 https://www.nikkei.com/article/DGXLRSP499732_Q9A110C1000000/
--

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
研究分担者	HIPOLITO CHRIS (Hipolito Chris) (20759914)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	