

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19176

研究課題名（和文）多剤輸送体が脂質輸送体から分岐した可能性の検証

研究課題名（英文）Evolutionary possibility of drug transporters from lipid transporters

研究代表者

木村 泰久（Kimura, Yasuhisa）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10415143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：ABCタンパク質はATP依存的な能動輸送体で、様々な脂溶性化合物を輸送するトランスポーター群である。ABCタンパク質にはよく似た構造を持ちながら、脂質輸送体と多剤輸送体に機能分化している近縁の輸送体が存在する。本研究ではこれらの輸送体の機能分化機構を明らかにすることを目的とし、輸送基質の取り込み経路と予想された領域に着目し解析を行った。この結果、脂質輸送体と多剤輸送体は基質の取り込み経路が異なり、この部分が機能分化に重要であることが示唆された。また、コレステロールが多剤輸送体の活性を調節する機構についても解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABCタンパク質がどのように機能分化を達成してきたかを明らかにすることは、タンパク質進化を考えるうえで重要である。本研究では脂質と薬物の輸送体として機能分化した近縁輸送体の機能分化機構に着目し、機能分化に部分的に関与する領域を同定することに成功した。ヒトには多くの膜輸送タンパク質が存在し、基本的な生命活動を多く担っている。また、これらの機能的な重要性から薬物の開発対象としても注目されている。本研究の成果はABCタンパク質だけでなく、様々な輸送体がどのように進化してきたかをときあかす端緒になると期待できる。

研究成果の概要（英文）：ABC (ATP Binding Cassette) transporters transport various hydrophobic compound by energy of ATP binding and hydrolysis. Despite the highly homologous amino acid sequence and structural backbone, several transporters function as lipid and multidrug transporter. The aim of this study is to clarify the molecular mechanisms of functional differentiations of these transporters. In this study, we found that substrate translocation pathway is different between lipid and multidrug transporter. By using chimeric protein of these transporters, it was suggested that substrate translocation pathway is important for the functional differentiation.

研究分野：生化学

キーワード：ABCタンパク質 多剤輸送体 脂質輸送体 機能変換

1. 研究開始当初の背景

ABC タンパク質は ATP 依存的な能動輸送体で、ATP の結合・加水分解のエネルギーを利用して様々な化合物の輸送を行う。ヒトでは 48 種類のタンパク質が同定されており、その機能不全は様々な疾患の原因となることが知られている。特に脂質の輸送体として生体の脂質恒常性の維持に関与するタンパク質が多く、善玉コレステロールとして知られる高密度リポタンパク質(HDL)の生産や、呼吸に必要な肺サーファクタントの分泌、皮膚バリア形成に必要な脂質分泌など重要な生理反応が、脂質輸送型の ABC タンパク質によって、達成されている。

多剤輸送体は構造に関連のない様々な脂溶性化合物を輸送できるのが特徴で、有害な化合物を腎臓から排出し、小腸からの取り込みを抑制することで、生体を自然環境中の有害な化合物から保護している。また、脳や精巣などの重要な臓器の境界領域に存在し、これらの臓器の化学的保護を担う。多剤輸送体は様々な化合物を体外へと排出することから、投与薬物の体内動態にも強く影響する。多剤輸送体に認識される化合物は、速やかに体外へと排出されるため、薬効が著しく減弱する。また、がん細胞に発現した場合は様々な抗がん剤に対して耐性を付与するため、がんの化学療法の大きな障壁となっている。

脂質輸送型 ABC タンパク質と多剤輸送型の ABC タンパク質には、きわめて高い配列上、および構造上の相同性を有するタンパク質が存在するが、これらの輸送体が、機能分化する分子基盤はいまだ解明されていない。ヒトには 3 種類の多剤輸送体が存在することから、ヒトは進化の過程で少なくとも 3 回にわたって多剤輸送体を獲得してきたと考えられるが、どのような過程で多剤輸送体を獲得してきたかについても全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は脂質輸送型 ABC タンパク質と多剤輸送多型の ABC タンパク質の機能分化機構を明らかにすることであった。この目的達成のため高い相同性を持つヒトの脂質輸送体(ABCB4)と多剤輸送体(ABCB1、MDR1)に着目し、解析を行った。ABCB4 と ABCB1 は 86%という高い配列相同性を示すことから、比較研究の対象として最適であると考えられた。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト由来の脂質輸送体、多剤輸送体をヒト培養細胞に発現させ、精製標品を取得して解析を行った。精製タンパク質の機能解析は、人工脂質 2 重膜(リポソーム)に再構成した輸送体の ATP 加水分解を指標に実施した。また、高密度リポタンパク質形成に関与する脂質輸送体の標識手法の開発や、多剤輸送体の構造変化を生細胞中で観察する技術開発を実施した。

4. 研究成果

・ヒト脂質輸送体と多剤輸送体の機能変換

ABCB1 と ABCB4 は高い配列相同性(86%)を示すことから、基本的な構造及び基質の輸送機構は共通していると推測される。研究開始時点で多剤輸送体の立体構造はすでに報告されており、輸送基質の結合部位も同定されていたことから、多剤輸送体(ABCB1)と脂質輸送体(ABCB4)が異なる化合物を認識するのは基質結合部位の違いによるものであると予想されていた。一方で研究代表者らは好熱性紅藻由来の多剤輸送体の構造解析から、多剤輸送体には膜貫通領域に一部緩んだ領域が存在し、基質の通過経路を形成することを示唆する結果を得ていた。そこでヒト ABCB1 にも同様の基質取り込み経路が存在するのではないかと仮定し、変異体解析を行ったところ、ヒト ABCB1 には基質取り込み経路が 2 か所存在することが明らかとなった。ヒト ABCB4 に対して同様の解析を行ったところ、ABCB1 で見られた二つの基質取り込み経路のうち、一つが機能していないことが示唆された。また ABCB1 の基質取り込み経路を形成する膜貫通ヘリックスを ABCB4 に導入したところ、脂質輸送能が消失した(小川 農芸化学学会大会 2019)。一方で、薬物の輸送活性は獲得できなかったことから、複数の機構が連動している可能性が示唆された。

・コレステロールがヒト多剤輸送体の活性を調節する機構の解析

ABCB4 はホスファチジルコリンとコレステロールを輸送する。一方、ABCB1 はコレステロールを輸送しないが、コレステロールと直接結合し、様々な化合物に対する輸送活性がコレステロールによって調節されることを研究代表者は明らかにしていた。共通して相互作用するコレステロールを足掛かりに機能の分化機構に迫れるのではないかと着想し、研究を開始した。まず、コレステロールが MDR1 の活性を調節する機構の詳細を明らかにするため、精製標品を用いて様々な構造の化合物を輸送する際にコレステロールが与える影響の解析を行った。その結果、コレステロールによる活性調節は基質となる化合物によって異なり、コレステロールによって輸送速度が亢進する輸送基質ではエントロピーなどの物理化学的パラメーターが変動していることが明らかとなった(岩村 トランスポータ研究会 2019、農芸化学会関西支部例会 2019)。

・高密度リポタンパク質形成に關与する脂質輸送体の機能解析

ヒトには様々な脂質輸送体が存在する。このうち、善玉コレステロール(HDL)形成に關与する ABCA1 は ABCB4 と輸送基質が共通する。本研究項目ではヒト ABCA1 の機能解析を行った。ABCA1 は HDL 形成の最初期反応を担う輸送体で、血中のアポリポタンパク質 A-I(apoA-I)にリン脂質とコレステロールを輸送して、新生 HDL を形成する。ABCA1 は HDL 形成時に apoA-I と直接相互作用すると考えられていたが、具体的な相互作用部位は不明であった。そこで apoA-I に光反応によって近傍タンパク質をビオチン化できるクロスリンカーを導入し、細胞膜上で ABCA1 と相互作用させ、ABCA1 上の apoA-I 結合部位をビオチン化した。次いでビオチン化された ABCA1 を精製し、消化酵素による断片化、抗体による結合部位の絞り込みによって、ABCA1 の第一細胞外領域に apoA-I 相互作用部位が存在することを明らかにした(Kawanobe、Biosci Biotechnol Biochem 2019)

・多剤輸送体の生細胞上での構造変化解析

ABC タンパク質は ATP の結合・加水分解に共役して構造変化し、基質を輸送するがその詳細は明らかにされていなかった。研究代表者は生細胞上でヒト ABCB1 の構造変化を解析する研究にも参画し、ATP の結合が構造変化に重要であることを明らかにした(Futamata、J Biol Chem 2020)。

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 0件）

1. 著者名 Takaaki Kawanobe, Naoko Shiranaga, Noriyuki Kioka, Yasuhisa Kimura & Kazumitsu Ueda	4. 巻 83
2. 論文標題 Apolipoprotein A-I directly interacts with extracellular domain 1 of human ABCA1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 490-497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1547106	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 Ryota Futamata, Fumihiko Ogasawara, Takafumi Ichikawa, Atsushi Kodan, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka, 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 Journal of Biological Chemistry	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7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光
2. 発表標題 ヒト由来浮遊培養細胞への遺伝子導入手法の検討
3. 学会等名 2018年度日本農芸化学会関西支部大会(第505回講演会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川峻、末永健人、木岡紀幸、植田和光、木村泰久
2. 発表標題 リン脂質輸送体ABCB4の第4膜貫通ヘリックスに存在するプロリンの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二股良太、小笠原史彦、市川尚文、木村泰久、木岡紀幸、植田和光
2. 発表標題 生細胞膜上におけるヒト多剤輸送体P-glycoproteinの構造変化とATP結合・加水分解の共役機構の解明
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩村紗花、木岡紀幸、植田和光、木村泰久
2. 発表標題 コレステロールによるヒト多剤輸送体MDR1の活性調節機構の解析
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二股良太、小笠原史彦、市川尚文、木村泰久、木岡紀幸、植田和光
2. 発表標題 多剤輸送体P-glycoprotein (ABCB1)による薬剤輸送には 2分子のATP結合・加水分解 が共役する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村泰久、川野邊峻哲、植田和光
2. 発表標題 生化学的手法を基軸としたヒトABCタンパク質の機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩村紗花、木岡紀幸、植田和光、木村泰久
2. 発表標題 ヒト多剤輸送体P-糖タンパク質の酵素活性にコレステロールが与える影響の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中部支部 2019年度合同神戸大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木村泰久、小段篤史、植田和光	4. 発行年 2020年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 538
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック(多剤輸送体 MDR1 (ABCB1))	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----