

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590215

研究課題名（和文）ABCトランスポータにおけるNBDエンジンの動作メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of Nucleotide Binding Domain engine in ABC transporters

研究代表者

相馬 義郎（SOHMA YOSHIRO）

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：60268183

研究成果の概要（和文）：

医学生理学的に非常に重要なABCトランスポータを駆動しているNBDエンジンの作動メカニズムについて研究して、その作動サイクル中の遷移状態のうちのひとつにおける4次構造変化を明らかにした。さらにNBDエンジンがATP分解エネルギー以外に、水の熱振動エネルギーを利用して作動している可能性を示した。また、単粒子解析によって水溶液中のCFTR分子の全体像を2nmの解像度で解くことに成功し、NBDエンジンの動作サイクルに伴う4次構造変化の観測の可能性を開いた。

研究成果の概要（英文）：

Physiologically important ABC transporters share Nucleotide Binding Domain (NBD) to make a driving force for displaying their functions. From a series of functional data, we proposed a putative structure of the NBD engine of CFTR in one of the transitional states during its gating cycle. We also suggested a possibility that NBD engine utilized thermal motion energy of water molecules as well as ATP-hydrolysis energy. In addition, we obtained a reconstituted three dimensional structure of CFTR using a single particle analysis, which leads us to an upcoming direct observations of conformational changes of NBD engine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：ABCトランスポータ、CFTR、チャンネル、Nucleotide Binding Domain、ATP加水分解、ゲーティング、アニオン、二量体化

1. 研究開始当初の背景

(1) ABC (ATP Binding Cassette) 蛋白質は、よく保存された2つのATP結合ドメインNBD (Nucleotide Binding Domain)を持つ膜蛋白質の総称で、ヒトにおいては48種のメンバーを内包するスーパーファミリーを形成して、それぞれのメンバーの機能はトランスポータ、チャネルおよびレセプターなど生理学的に重要かつ多岐にわたっている(図1)。

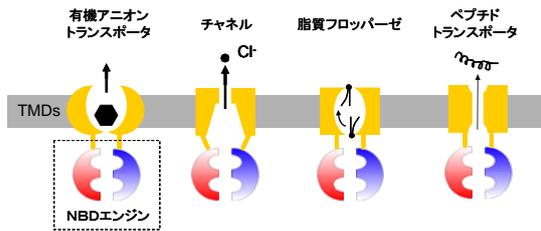


図1 ABCトランスポータ・スーパーファミリー

(2) ABCトランスポータにおいて、NBDはATPの加水分解エネルギーからトランスポータ分子の輸送機能を発揮するための機械的駆動力を供給しており、その動作メカニズムはすべてのABCトランスポータにおいて共通していると推測され、NBDは生体システムにおける重要な“機能ユニット”のひとつであると考えられる(図1、2)。NBDの一次構造については以前より知られていたが、その立体構造は永らく不明なままであったが、近年の構造生物学的研究の進歩により、2つのNBDがATPを1分子ずつATP Binding Pocket (ABP)で挟み込んだ形でNBD2量体を形成することが明らかになってきた(図2)。

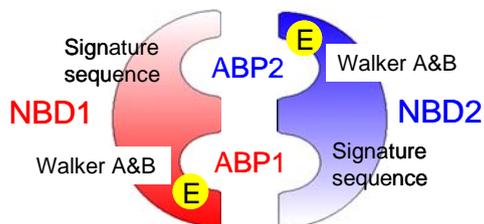


図2 NBD “ATP加水分解”エンジン

これらの構造データは、いわば単なる“スナップショット”であり、それだけではNBDエンジンにおけるATP分子の結合、加水分解、解離のサイクルにとまらぬ連続的かつ動

的な作動メカニズムの解明にはほど遠いものがあるが、その一方、構造情報に基づいたホモロジーモデリングや新しい機能解析を行なうことにより、NBDの動的な作動メカニズムの解明に新たな進展が期待できる好機であった。

(3) Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)チャネルは、スーパーファミリーの中で唯一イオンチャネルの機能を有し、パッチクランプ法によってシングルチャネル電流を測定することによって、リアルタイムでNBDの動態の観察が可能である(図3)。このCFTRをモデルとした機能解析を行なうことは、ABCトランスポータ・スーパーファミリーに共通したNBDエンジンの動作メカニズムの解明のために、非常に有望なアプローチであると考えられた。

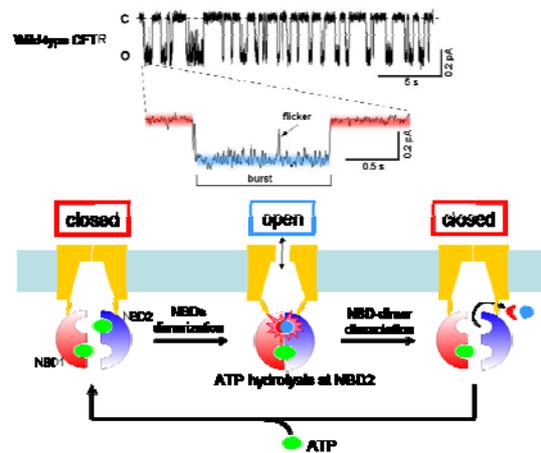


図3 CFTRチャネルゲーティングモデル

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、直接的にはABCトランスポータ・スーパーファミリーに共通したNBDエンジンの動作メカニズムを解明することである。

(2) さらに、後述のようなABCトランスポータの機能不全を原因であると思われる疾患が数多く存在しており、NBDエンジンの動作メカニズムについての理解は、それらのABCトランスポータ機能不全を原因とする疾患の病態の理解および治療法の開発

に役立つと考えられる。例えば、CFTR (ABCC7)は、呼吸上皮や膵管上皮に発現して陰イオンチャンネルとして機能しており、その機能不全は慢性気管支炎や慢性膵炎、さらにその発現不全は致命的な嚢胞繊維症を引き起こす。P-gp(ABCB1)やMRP1(ABCC1)は、薬物耐性に中心的な役割を果たしている。ABCB4、ABCA1等は、脂質を脂質二重層内で内層から外層へ移動させるフロッパーゼとしての機能を持ち、ABCA1はコレステロールトランスポータとして機能している。ペプチドトランスポータTAPは、HMC抗原提示に重要な役割を果たしており、自己免疫疾患との関連性が示唆されている。

3. 研究の方法

(1) CFTRのシングルチャンネル電流測定およびコンピュータモデリング:CFTRをABCトランスポータのモデルとして、パッチクランプ法を適用することによって、CFTRのNBDエンジン(図4)の動作サイクルをリアルタイムで観察し、それに対するNBDへの点変異導入、ATPアナログおよび様々な薬剤の影響を調べる。本研究では、いわゆる“Computer-aided structure-based functional study”の手法をとっており、得られた結果はゲーティングのモンテカルロシミュレーションさらにホモロジーモデルの分子動力学シミュレーションを用いて詳細に解析・検討する。

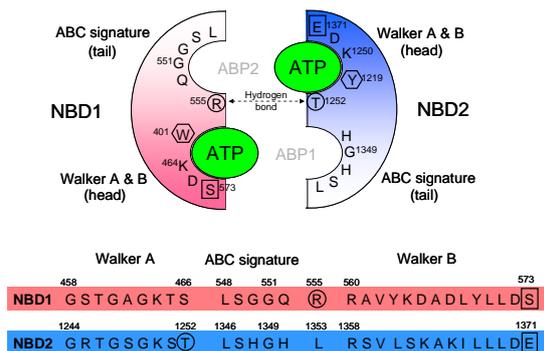


図4 CFTR-NBDエンジンのABP付近のアミノ酸配位

(2) CFTR分子の単粒子解析 (Single Particle Analysis): 電子顕微鏡で撮影された精製CFTR蛋白の数千から数万におよぶ様々な方向を向いている単粒子投影像を分類し、各グループごとに加算平均処理による鮮明化を行

なって得られたCFTR単粒子の2次元像からもとの3次元構造を再構築する。結晶サンプルを必要とせず、水溶液中でのCFTRの分子像を得ることができる。

4. 研究成果

(1) NBDエンジンの機能解析については、pyrophosphate (PPi)を用いてNBD二量体の解離プロセスにおいて、ある中間体Ciが存在し、その4次構造としてはABP1にATPが結合してその部分では2つのNBDが結合しているが、ABP2は空の状態での部分ではNBDは解離しているpartial dimer構造をとっていることが示唆された(図5)。さらにこのpartial dimer中間体のABP2にpyrophosphateが結合するとNBDが完全に二量体化してCFTRチャンネルが開口固定されることを明らかにした(図5)[文献①]。このことはNBDの二量体化にはATPのリン酸基が持つnegative chargeが重要であることを示唆している。

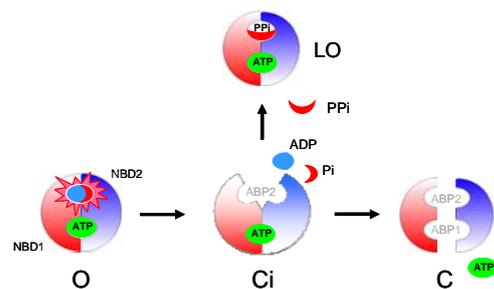


図5 CFTR-NBDの解離過程における中間体CiとPPiの効果

(2) 高濃度(15 mM)のMgPPiによって、飽和濃度(2 mM)ATPの1/3程度ではあるが、CFTRが活性化されることが確認できた(図6)[文献①]。

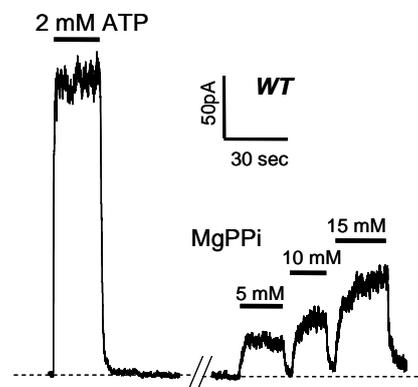


図6 MgPPiによるCFTRの活性化

この MgPPi によるゲーティングは、ATP 加水分解が不能な変異体 E1371S-CFTR でも観測された。このことは、NBD エンジンが ATP 分解エネルギー以外に、水の熱振動エネルギーを利用している可能性を示唆している。他の ABC トランスポーターメンバーの多くが、この NBD エンジンを使って能動輸送を行なっていることを考えると、これは従来の ATP 加水分解エネルギーを中心とした生体エネルギー観に一石を投じる重要な発見であると言える。

(3) CFTRは、細菌を用いた発現系が使えないために、大量のCFTRを得ることが出来ず、その高解像度の結晶構造は未だ得られてない。今回、我々は精製したCFTR分子の電子顕微鏡写真から単粒子解析を行なって、野性型CFTRの立体構造を2 nmの解像度で解くことに成功し、リン酸化（活性化）されていないCFTRが、膜貫通部位直下に横穴を持つ卵型の二量体構造をとっていることを、世界で初めて明らかにした（図7）[文献②]。

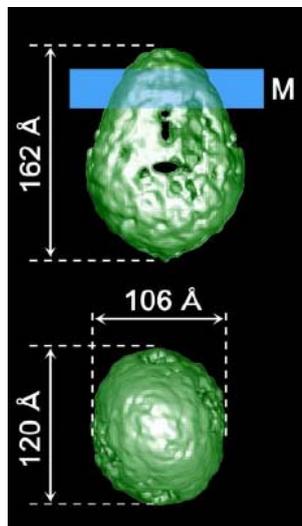


図7 CFTRの3次元構造

この論文はNBDエンジン部分を含めたCFTR分子の全体像を水溶液中で捉えることに成功した画期的な業績である。これによりNBDエンジンの動作サイクルに伴う4次構造変化の観測の可能性が開かれた。

(4) NBD エンジンの動作においては、ふたつの NBD 間の水素結合 R555-T1246 が重要な働きをしていることが予想されたので、R555K 変異を導入した水素結合欠落変異体を作成して、その性質を調べた。R555K 変異体は、MgATP によってでも非常に低い開口速度しか示さず、残念ながらゲーティング解析は不可能であったが、ATP 加水分解能欠落との二重変異体 R555K/E1371S では、ゲーティングが観察可能で、NBD 間水素結合の欠落によって開口速度の減少および閉口速度の増加が認められた (data not shown)。このことは NBD 間水素結合は、NBD 二量体の形成および安定化の両方に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(5) ATP は結合できるが NBD の二量体化ができないために ATP 依存性開口ができない G551D 変異体に、ATP 依存性ゲーティングを復活させる薬剤である genistein および curcumin の作用機序についての実験を行った。その結果、驚くべきことに、ATP 加水分解能欠落によって開口固定されている E1371S 変異体は、genistein /curcumin の同時投与によって閉口された (data not shown)。このことは、ABC トランスポーター共通の NBD エンジンの活性制御に基づく薬剤開発に直結した非常に重要な知見である。

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6件)

- ① Tsai MF, Shimizu H, Sohma Y, Li M, Hwang TC (2009) State-dependent modulation of CFTR gating by pyrophosphate. *J. Gen. Physiol.* 133: 405-419 査読有
- ② Mio K, Ogura T, Mio M, Shimizu H, Hwang TC, Sato C, Sohma Y. (2008) Three-dimensional reconstruction of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel revealed an ellipsoidal structure with orifices beneath the putative transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 283: 30300 - 30310 査読有
- ③ Wu X, Yang Y, Gui P, Sohma Y, Meininger GA, Davis GE, Braun AP, Davis MJ (2008) Potentiation of BK channels by $\alpha 5\beta 1$ integrin activation in arteriolar smooth muscle. *J Physiol.* 586(6): 1699 -1713 査読有

[学会発表] (計10件)

- ① Sohma Y. Molecular mechanism of a multi-functional Cl⁻ channel CFTR. Symposium “Regulation of various physiological functions by chloride-transporting proteins”, 87th Annual Meeting, The Physiological Society of Japan, May 19 - 21, 2010; Morioka, Japan
- ② Sohma Y., Nakamura Y, Yu YC, Furukawa T, Matsuzaki Y, Abe Y, Yasui M. Functional Probing of an ABC Transporter, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Channel by Small Aromatic Carboxylic Acids. 83rd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. March 16 - 18, 2010, Osaka, Japan.
- ③ Sohma Y., Mio K, Ogura T, Mio M, Shimizu H, Hwang TC, Sato C. 3D STRUCTURE OF HUMAN CFTR CHLORIDE CHANNEL REVEALED AN ELLIPSOIDAL FORM WITH ORIFICES BENEATH THE PUTATIVE TRANSMEMBRANE DOMAIN. XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) Function of Life: Elements and Integration. July 27 - August 1, 2009; Kyoto, Japan
- ④ Mio K, Ogura T, Mio M, Shimizu H, Hwang TC, Sato C, Sohma Y. Three dimensional reconstruction of CFTR chloride channel using single particle analysis. 53th Biophysical Society Annual Meeting. February 28 - March 4, 2009; Boston, Massachusetts, USA
- ⑤ Tsai MF, Shimizu H, Sohma Y., Li M, Hwang TC. Two distinct gating cycles of CFTR chloride channels. 53th Biophysical Society Annual Meeting. February 28 - March 4, 2009; Boston, Massachusetts, USA
- ⑥ Sohma Y. Mechanism of ATP hydrolysis-driven NBD gating engine in CFTR channel. Symposium “Dynamic Picture of Ion Channel upon Gating”, 46th Annual Meeting, The Biophysical Society of Japan, December 3 - 5, 2008; Fukuoka, Japan

[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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
相馬 義郎 (SOHMA YOSHIRO)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：60268183

(2) 研究分担者
窪田 隆裕 (KUBOTA TAKAHIRO)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：10084906
(H20→H21:連携研究者)

宗宮 浩一 (SOHMIYA KOICHI)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：20319544
(H20→H21:連携研究者)

山本 大助 (YAMAMOTO DAISUKE)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50240106
(H20→H21:連携研究者)

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者
T.-C. Hwang (T.-C. Hwang)
米ミズーリ大学・医学部・教授