

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03222

研究課題名（和文）膜脂質中のABC多剤排出ポンプの交互アクセス機構の立体構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis for alternating access mechanism of ABC multi-drug pump in lipid membrane

研究代表者

加藤 博章（Kato, Hiroaki）

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：90204487

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、生体防御の最終バリアーであると同時に癌の獲得多剤耐性の原因であるATP結合カセットトランスポーター-ABC B1が、1）非常に多種多様な化学構造の分子を排出できる能力、2）極めて効率的な基質輸送と動力獲得の化学反応を共役させて能動輸送を実現する能力の構造基盤を解明するために、それら機能の鍵となるマシーナリーの構造解析、反応に伴う構造変化を捉えるための単寿命X線結晶構造解析法の確立、さらに、部位特異的に導入したトリプトファン蛍光を利用して基質結合を特異的に検出する方法の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜トランスポーターは、生体膜に挿入されている重要なタンパク質であり、細胞内へ栄養素を吸入したり、細胞外へ代謝廃物や毒性化合物を排出している。これまで多くの膜トランスポーターの立体構造が明らかにされてきたが、未だ未解明の謎として以下の疑問が残されている。すなわち、どのようなメカニズムで膜トランスポーターは、輸送に必要な動力となるエネルギーを細胞から得ているのかである。ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターは、ATPを動力源として膜を介する能動輸送をしており、その障害は重篤な病気を引き起こすことが知られていることから、その謎の解明は健康長寿社会の発展にも有益である。

研究成果の概要（英文）：The ATP-binding cassette transporter ABCB1 is the final barrier in host defense and the cause of acquired multidrug resistance in cancer. We focus on the ability of ABCB1 to flow out molecules of very diverse chemical structures and to achieve highly efficient active transport coupled with ATP hydrolase chemistry and studied the following subjects. Structural analysis of the key apparatus of transporter function, establishment of a short-lifetime X-ray crystallography method to capture structural changes accompanying the transporter actions, and the construction of the specific detection method of the substrate binding using site-specifically introduced tryptophan fluorescence at the substrate binding site proposed by the crystal structure.

研究分野：構造生物学

キーワード：トランスポーター ATP 膜タンパク質 立体構造解析 多剤認識

1. 研究開始当初の背景

1966年にJardetzkyは、膜トランスポーターには内向型と外向型のコンフォメーションがあり、膜を挟んだ基質輸送のためにその両型間を往復運動する仮説「交互アクセスモデル」を提唱し、以来、その2状態の分子構造を求めることが膜トランスポーター研究の目標となってきた(Jardetzky O (1966) *Nature*, 211 (5052):969-970)。しかし研究が進むにつれて、トランスポーターの構造変化は輸送される基質によって触媒されていることをKlingenbergが指摘し(Klingenberg M (2007) *Biochimie* 89, 1042-1048) 基質が強く結合するのはタンパク質の構造変化の真最中の最も不安定な構造状態であるため、従来からの構造解析法で捉えるには不向きであり、その不安定状態をどのようにしたら解析することができるのか、挑戦が続いている。膜トランスポーターの能動輸送のエネルギーは直接に、またはイオン濃度勾配として間接的にATPから供給されるため、ATPのエネルギーがどのように基質輸送とトランスポーターの周期的構造変化に用いられるのかを明らかにする必要がある。ATP結合カセット(ABC)トランスポーターは、分子の一部にATP結合と分解を担うABCドメインを有しており、それをエンジンとして動力を供給し膜を挟んだ基質の濃度勾配に逆らって一方向へ輸送を行う。中でも、本研究で取り上げるABCB1は、細胞膜へと侵入する分子量100から3000程度の多様な化合物を細胞外へと排出することで真核生物の生体防御の要となっている。しかし、薬も異物であることからABCB1によって排出されるため、薬剤の開発においては、相互作用の程度が薬の効果(体内動態)に及ぼす影響を調べることが必須となっている。さらには、再発した癌が多剤耐性を獲得するのは、ABCB1を始めABCC1, ABCG2などABC多剤排出トランスポーターを高発現する能力を獲得することが原因であり、ABCB1のメカニズムの理解は抗がん剤治療の根本的な課題となっている(Amawi H, et al. (2019) *Adv Exp Med Biol* 1141:549-580)。

これまで、膜タンパク質の立体構造解析は、主に界面活性剤で可溶化して精製した試料を結晶化し、X線結晶解析することで明らかにされてきた。しかし、2013年以来、低温電子顕微鏡(CryoEM)を用いた単粒子解析の解像度が飛躍的に向上し、結晶が不要のため、準安定な複数の分子種の立体構造の観測が試みられてきた(Ognjenovic J, et al. (2019) *Annu Rev Biomed Eng*. 21: 395-415)。一方、X線結晶解析では、X線自由電子レーザー(XFEL)が開発され、連続フェムト秒X線結晶解析(SFX)によって、微小結晶を用い室温で短寿命の中間体を高精度で解析することが可能になってきた。膜タンパク質は、脂質キュービック相(LCP)を用いて脂質膜に挿入された状態を擬似的に調整することでSFXが可能になってきており(Standfuss J (2019) *Curr Opin Struct Biol* 57:63-71)、もし、CryoEMとSFXを組み合わせることができれば、両者の欠点を補い、革新的な動的構造の情報が得られるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、我々が世界に先駆けて解明したABCトランスポーターの同一分子における内向型と外向型の結晶構造(Kodan, A et al. (2019) *Nat. Commun.*, 10(1), 88)を基盤として以下の3点の解明を目的とした。

- 1) 基質結合及び内向型から外向型へ構造変化するための連結装置の作動機構を解明すること。
- 2) 周期運動するトランスポーターの動作途中状態構造を明らかにする実験系を確立すること。
- 3) 多様な化学構造の輸送基質の結合を特異的に測定するための実験法を確立すること。

3. 研究の方法

(1) 交互アクセスモデルの基点となる内向型と外向型の結晶構造から、12本の膜貫通ヘリックスを途中で束ね、内向きと外向きに変換する起点となる連結装置が見つかった。そこで、その装置のカギとなるアミノ酸残基に変異を導入して動作に及ぼす影響を解析することで、この装置の動作メカニズムの解明を目指した。

(2) トランスポート反応に伴う立体構造の時間変化を捕捉する実験系の獲得を目指し、フェムト秒程度でX線回折データを測定できる可能性がある自由電子レーザーX線(XFEL)を用いた連続フェムト秒X線結晶解析(FSX)を実施するための結晶の取得と実際の解析実験設備と手法の確立をABCトランスポーターについて実施した。また、CmABCB1をナノディスクに挿入して、CryoEMを用いた解析を検討した。

(3) 多様な化学構造の輸送基質の結合を特異的に測定するための実験法として、X線解析によって判明した立体構造を基にトリプトファン残基を基質結合予想部位に導入し、基質結合に伴う蛍光の消光利用して解離定数を計測する系を確立した。

4. 研究成果

(1) 基質結合及び内向型から外向型へ構造変化するための連結装置の作動機構

交互アクセスモデルにおいて、基質結合部位が細胞内側と細胞外側それぞれに対してアクセスするためには、細胞内側のゲートと細胞外側のゲートは一方が閉じ、もう一方は開くという正反対の動きの共役をする必要がある。CmABCB1のQTA変異体の内向型・外向型構造において、TM1-

TM3 ジョイントと名付けた TM1 と TM3 での接合部位には、内向型と外向型で常に TM1 と TM3 の距離を近く保ち、ジョイントを挟んで細胞内側と細胞外側でのヘリックスの移動を逆方向にする蝶番としての役割が示唆された。すなわち、細胞内側ゲートと細胞外側ゲートそれぞれの開閉がアロステリックに共役するための装置であると期待されたのである。その可能性を検証するため、TM1-TM3 ジョイントを構成する Gly132 を Val に置換した G132V の X 線結晶構造解析を行い、外向型構造を 2.15 Å 分解能で決定した。すでに解析済みの外向型構造と比較したところ、ジョイントへの立体障害導入が細胞外側ゲートをより大きく開く様子が明らかとなった。また、ATP 加水分解活性の変化から、G132V 変異体が外向型状態に平衡が移動している可能性が示唆された。これらのことから TM1-T3 ジョイントにおけるコンパクトな接合は、内向型構造で基質排出ゲート TM1-TM6 を強固に閉じるために必要な構造モチーフであると考えられ、交互アクセスモデルに従う輸送活性を制御する基本装置である可能性が示唆された。

(2) 周期運動するトランスポーターの準安定な動作途中状態構造を捕捉する実験系の確立

XFEL-FSX 実験には、サブマイクロメートルサイズの微結晶が必要であるが、その結晶には、極小サイズでも十分な X 線回折能が得られるように、分子が密に詰まった形状が必要となる。その条件に適した結晶化法に、脂質キュービク相 (LCP) を利用するタンパク質結晶化法がある。しかし LCP 法は、生体膜に深く埋め込まれた膜タンパク質の結晶化に優れた方法であっても適用範囲が GPCR などに限られており、ABC トランスポーターのように膜外に大きくはみ出している領域の大きな立体構造の膜タンパク質では、結晶が得られた例はほとんどなかった。そこで、LCP の調製方法を工夫し、通常の LCP 法に用いる脂質である 9.9MAG (モノオレイン) ではなく、7.7MAG というアシル鎖が短い脂質を使用したときに、より良好な微結晶 (長辺 10 マイクロメートル程度) が得られることを発見した。この LCP 微結晶を用いて、XFEL 施設 SACLA の数フェムト秒パルスレーザー X 線を用いて、FSX 実験を行ったところ、分解能 2.2 オングストロームでの結晶構造解析を行うことに成功した。得られた構造は、ATP アナログを結合した外向型状態の立体構造であり、これまでに解析済みの構造と一致したことから、LCP 結晶の有用性が確認された。今後、この LCP 結晶を用いることで、ATPase 反応に伴い、立体構造が変化する様子をフェムト秒単位で連続的に追跡することができるものと期待される。また、CmABCB1 を脂質ナノディスクへ再構成した試料を用いて、CryoEM 単粒子解析することができた。今後はさらに分解能を上げて基質結合状態の構造解析を目指す。

(3) 部位特異的トリプトファン残基導入による基質結合計測系の確立

ABCB1 と基質との相互作用については内在性トリプトファン (Trp) 残基の蛍光変化による解析が行われているが、蛍光変化が基質と Trp 側鎖の相互作用に直接由来するのか、間接的な構造変化に由来するものなのか不明である。そこで、結晶構造を決定した CmABCB1 の分子構造情報を利用して、内在性 Trp 残基の位置と蛍光スペクトルとの関係を明らかにするとともに、結晶構造から予想した基質結合部位のアミノ酸残基を新たに Trp へと改変し、その Trp 蛍光の変化が基質濃度に依存するのかを調べた。すなわち、CmABCB1 の立体構造から基質結合部位へ側鎖を突き出しているアミノ酸残基として 391 番目のメチオニン (Met391) を候補に選定、部位特異的変異法により Trp に変換した M391W を作成した。さらに M391W に対して、非特異的な内在性 Trp の影響を除くため、4 つの Trp 残基をチロシン (Tyr) に置換する変異を加えた。この変異体を用いて、代表的な 5 種類の輸送基質を加えて Trp 由来の蛍光強度を測定したところ、野生型と比較して顕著な消光が観測された。この結果は、従来の内在性の Trp 蛍光を利用する方法と比較して、高感度で特異的であることが示唆された。そこで、その現象を利用して基質の解離定数を測定したところ、ATPase に対する輸送基質濃度の影響から算出した K_m と比較すると、基質の結合はもっと強力であることが示唆される結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Pan Dongqing, Oyama Ryo, Sato Tomomi, Nakane Takanori, Mizunuma Ryo, Matsuoka Keita, Joti Yasumasa, Tono Kensuke, Nango Eriko, Iwata So, Nakatsu Toru, Kato Hiroaki | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Crystal structure of CmABCB1 multi-drug exporter in lipidic mesophase revealed by LCP-SFX | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 IUCrJ | 6. 最初と最後の頁 134 ~ 145 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2052252521011611 | 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 Matsuoka Keita, Nakatsu Toru, Kato Hiroaki | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 The crystal structure of the CmABCB1 G132V mutant, which favors the outward facing state, reveals the mechanism of the pivotal joint between TM1 and TM3 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Protein Science | 6. 最初と最後の頁 1064 ~ 1071 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.4058 | 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 Thomas C., Aller S. G., Beis K., Carpenter E. P., Chang G., Chen L., Dassa E., Dean M., Duong V. H. F., Ekiert D., Ford R., Gaudet R., Gong X., Holland I. B., Huang Y., Kahne D. K., Kato Hiroaki, & Tampe R. | 4. 巻 594 |
| 2. 論文標題 Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Letters | 6. 最初と最後の頁 3767 ~ 3775 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13935 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 水沼 諒、小田島 圭、三和 空知、潘 東青、瀧川 紘、中津 亨、高須 清誠、加藤 博章 |
| 2. 発表標題 ABC多剤排出トランスポーター薬物複合体のX線結晶構造解析 |
| 3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂口 俊平、水沼 諒、小川 治夫、加藤 博章 |
| 2. 発表標題 ABC多剤排出トランスポーターのCryo-EMによる構造解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水沼 諒、潘 東青、小川 治夫、加藤 博章 |
| 2. 発表標題 立体構造に基づいたABC多剤排出トランスポーターCmABC1の基質輸送に関わる残基の役割 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 潘 東青、筒井 隼一、宮田 知子、牧野 文信、難波 啓一、小川 治夫、加藤 博章 |
| 2. 発表標題 Candida albicansの多剤排出ABCトランスポーターCdr1pのクライオ電顕による単粒子解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小田島 圭、潘 東青、三和 空知、水沼 諒、瀧川 紘、高須 清誠、加藤 博章 |
| 2. 発表標題 親和性標識によるP糖タンパク質CmABC1の基質結合様式の同定 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 水沼 諒、小田島 圭、三和 空知、潘 東青、瀧川 紘、中津 亨、高須 清誠、加藤 博章 |
| 2. 発表標題 多剤排出トランスポーターCmABCB1と基質アナログの結晶構造解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 陳月、潘 東青、加藤 博章 |
| 2. 発表標題 ナノディスクに挿入したP糖タンパク質CmABCB1のATPase活性に対する脂質成分の影響 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>がんの多剤排出の原因ABCトランスポーターの立体構造をSACLAのX線自由電子レーザーで決定 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-12-23</p> |
|--|

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 | 潘 東青 (Pan Dongqing) (50710787) | 京都大学・薬学研究科・助教 (14301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|