

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19333

研究課題名（和文）多剤トランスポーターに対するリン脂質組成の影響解明の構造生物学

研究課題名（英文）Structural biology studies on the effect of phospholipid contents for multi-drug transporters

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：2種類の多剤排出トランスポーターABC1とABC2のホモログを標的として様々な細胞膜組成のリン脂質とともにナノディスクに再構成する系を確立した。そして、ナノディスク中におけるATP加水分解活性を測定した。その結果、輸送基質存在下と非存在下における比活性の違いを詳しく計測することができた。さらに、それらナノディスクを用いて極低温電子顕微鏡を用いた単粒子（CryoEM）解析を行ったところ、高分解能での構造決定が可能な電顕像を観測することができた。そこで、その立体構造解析を行った結果、分子構造モデルを作成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでCryoEMで立体構造解析されることがない、2種類のABC多剤排出トランスポーターの立体構造を解析することに初めて成功した。好熱性真核生物Cyanidioschyzon merolae由来のABC多剤排出トランスポーターCmABC1については、界面活性剤ミセル中に溶解した状態についてX線結晶構造が、すでに我々によって決定されていたことから、界面活性剤中とリン脂質膜中のCmABC1の立体構造比較が可能となり、今後、両状態での立体構造の違いが明らかになれば、リン脂質と膜タンパク質の相互作用について新たな知見が得られるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We have established a system that reconstitutes nanodiscs with phospholipids of various cell membrane compositions by targeting two types of multidrug efflux transporters, ABC1 and ABC2. Then, the ATP hydrolysis activity in the Nanodisc was measured. As a result, we were able to measure in detail the difference in specific activity between the presence and absence of the transport substrate. Furthermore, when we performed single-particle (CryoEM) analysis using cryogenic electron microscopy using these nanodiscs, we observed electron microscopic images that enable structure determination at 4Å resolution. Therefore, as a result of conducting a three-dimensional structure analysis, we succeeded in constructing a molecular structure model.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 構造薬理学 膜タンパク質 リン脂質膜 トランスポーター 多剤耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2013 年末に低温電子顕微鏡による単粒子解析 (CryoEM 解析) の分解能が 3 オングストローム程度まで向上し、X 線結晶構造解析に匹敵するようになった (Nature (2013) 504, 107-112)。以来、その分解能の向上は目覚ましい進歩を遂げており、結晶化の難しい膜タンパク質の立体構造決定では、CryoEM 解析が第一の手段となっている。研究代表者は、独自に発見した ATP Binding Cassette (ABC) 多剤排出トランスポーター CmABC1 の X 線結晶解析により、基質取り込み前と排出後の 2 状態の立体構造を最高 1.9 オングストローム分解能で決定することに世界で初めて成功していた (Nature Communication (2019) 10(1), 88)。予備的に、この分子を Cryo-EM 解析用にリン脂質と共にナノディスクへ再構成したところ、想定外の現象を発見した。驚いたことに、大豆、酵母、大腸菌由来のそれぞれの膜脂質を用いたところ、ある同じ輸送基質に対する容量反応曲線が、アゴニスト型、逆アゴニスト型、そして、アンタゴニスト型のような挙動を示したのである。それぞれの脂質を用いてリポソームへ再構成した場合にはこのような挙動は観測されておらず、ナノディスク中の脂質構造の違いによる側方圧の影響が、あるいは、特定の脂質成分が立体構造へ影響していることが予想された。このことから、ナノディスク中に挿入した CmABC1 の立体構造を決定して、すでに界面活性剤中で決定した高分解能の X 線結晶構造と比較すれば、周囲の膜脂質環境が膜タンパク質の立体構造と機能に及ぼす影響を明らかにすることができるものと期待された。

### 2. 研究の目的

溶液中と脂質膜中では物理化学的環境が大きく異なることから、膜に埋め込まれている膜タンパク質は、界面活性剤中の X 線結晶構造が生体膜中でも同じ立体構造かどうか？は、膜タンパク質の立体構造決定が初めて達成された 1980 年代から果てしなく論争が続いてきた。この疑問に答えることが容易ではないのには 2 つの理由がある。1 つは結晶解析と同等の精度で膜タンパク質の立体構造を解析できる方法がなかったからである。この問題は、最近、極低温電子顕微鏡による単粒子解析 (Cryo-EM) が革命的な解像度の向上を遂げ、高分解能を示すような試料の調製ができればリン脂質膜中の立体構造を解析可能にしたことで道が拓けた。しかしながら、生体膜中のタンパク質分子構造を解析するための試料調製が困難なこと、そして、脂質膜中と界面活性剤中での分子の挙動が異なることを示す実験指標がないことから具体的な分子による究明が阻まれていた。申請者は、すでに高分解能での X 線結晶構造を決定している ABC トランスポーターをナノディスク中に再構成した試料を調製していたところ、同じ輸送基質に対するトランスポーターの挙動がナノディスク中の脂質の違いによって著しく変化することを発見した。本研究は、脂質組成の異なるナノディスク中のトランスポーター試料の機能解析と立体構造解析を同時に実施し、界面活性剤中で結晶化した場合の立体構造との違いを機能と関連付けて明らかにしようとするものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) リン脂質組成の違いが膜トランスポーターの分子構造に与える影響の解析

予備実験で確立した方法を用いて、多剤排出トランスポーター ABC1 の好熱性真核生物 *Cyanidioschyzon merolae* ホモログである CmABC1、並びに ABC2 のホモログである酵母の *Cdr1* をリン脂質とともにナノディスクに再構成する。大腸菌、酵母、大豆由来のリン脂質を用いて、それらの各種リン脂質やステロールなどの化合物組成の違いが、ABC トランスポーターの ATP 加水分解酵素 (ATPase) 活性や基質輸送の挙動の違いに及ぼす影響を明らかにする。特に、哺乳類の膜脂質成分であるコレステロールや真菌の場合のエルゴステロールなどリン脂質膜の物性や動的構造の変化をもたらす脂質の影響についても解析を行い、トランスポーター作用に及ぼすリン脂質膜組成の決定要因を明らかにする。我々は、界面活性剤ミセル中の CmABC1 の立体構造を X 線結晶解析で決定できているため、界面活性剤ミセル中の薬理的な挙動を比較対象にすることで、分子構造と作用メカニズムを結びつけることができると期待された。

#### (2) リン脂質組成の異なるナノディスク中の膜タンパク質の立体構造解析

ナノディスクに再構成した CmABC1 と *Cdr1* の立体構造を明らかにして、分子構造とその動きが作用メカニズムに与える影響の解明を試みた。ナノディスク中の CmABC1 の立体構造は、低温電子顕微鏡を用いた単粒子 (CryoEM) 解析により決定する。いずれのトランスポーターについても、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*) を用いて発現し、数 mg の精製標品を用いてナノディスクへ再構成した。得られたナノディスクは、SDS-PAGE とゲルろ過クロマトグラフィーを用いて純度を確認した。得られたナノディスク試料を濃縮した後、Vitrobot を用いて、CryoEM 用のサンプルグリッドに添加し、液体エタンにより急速凍結した。それらを用いて電子顕微鏡像を観測し、単粒子解析を実施した。比較のため、界面活性剤中で可溶化した試料についても CryoEM 解析を行い、ナノディスク中の構造との比較を試みた。基質である ATP やその誘導體 AMP-PNP、あるいは、輸送基質となる薬物との複合体についても CryoEM 解析を行い、それぞれの結合様式や結合に伴う構造変化の観測を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) ナノディスクに再構成した CmABC1 および Cdr1 の ATPase 反応の基質濃度依存性  
いずれの ABC トランスポーターについても、ナノディスクに再構成することにより、輸送基質非存在下での ATPase 比活性が界面活性剤に可溶化したときと比較して顕著に上昇した。ABC1 は、Michaelis-Menten 型酵素反応のように輸送基質の濃度の上昇とともに ATPase 活性が上昇し飽和に達する。しかし、それ以上の基質を添加すると基質阻害を起こし、ATPase 活性の低下が観測される。一方、ABC2 は、基質非存在下で高い ATPase 活性を示すにもかかわらず、基質の添加に応じて活性が減少し、基質阻害だけが観測されることが知られている。そこで、ナノディスク再構成試料に対する基質濃度の影響を調べた。その結果、CmABC1 の場合は、界面活性剤中での ATPase の挙動は変わらず、基質濃度の上昇とともに ABC1 型の挙動を示した。ただし、比活性は 10 倍上昇しており、ナノディスク中の方がトランスポーター作用が高いことが示された。一方、Cdr1 についても、界面活性剤中よりもナノディスク中の方が ATPase 活性は上昇していた。しかも基質に対する挙動は、界面活性剤中とナノディスク中では同じように作用していることが判明した。次に、CmABC1 について、ナノディスクに再構成したときの脂質組成の違いの影響を調べた。その結果、ホスファチジルコリンの多い大豆レシチンを用いた場合は、界面活性剤中と同様の挙動を示した。ところが、パン酵母から抽出した脂質を用いて作成したナノディスクでは、ABC2 型の基質阻害が観測された。すなわち、基質濃度の上昇により、ATPase 活性は低下した。さらに、大腸菌から抽出した脂質を用いた場合は、基質添加による ATPase 活性の上昇はわずかとなった。これら実験では同一の輸送基質を用いていたことから、ナノディスクを作成する際のリン脂質組成の違いが CmABC1 の構造変化に影響を与えることが示唆された。一方、同じ条件で作成した Cdr1 ではこのような挙動は観測されなかった。Cdr1 の精製標品は CmABC1 に比較して不安定であり、精製中には失活することを防ぐために ATP を添加することが必要だった。このことを考えると、ナノディスクへ再構成した後の試料も不安定であることが予想され、脂質組成の違いを検討することは困難だと考えられた。

#### (2) ナノディスクに再構成した CmABC1 および Cdr1 の立体構造解析

ナノディスクに再構成した CmABC1 および Cdr1 の CryoEM 単粒子解析を行った。その結果、それぞれの電子顕微鏡密度図は 4 オングストロームを超える分解能で得ることができた。そして、それぞれのマップについて、既知のアミノ酸配列を当てはめて分子構造モデルを作成することができた。

CmABC1 について X 線結晶構造と比較したところ、全体の構造は同じであるものの、サブユニット間の相互作用の程度が異なる様子や基質結合に伴う立体構造変化が観測された。すなわち、膜貫通ドメインは N 末端に肘型の短い ヘリックスを持ち、続いて 6 本の ヘリックスが生体膜を交互に貫通して 6 番目のヘリックスのドメイン (TMD) の C 末端側にヌクレオチド結合ドメイン (NBD) がサイトゾルに突き出した形状をしていた。以前に我々が解析した結晶構造では、結晶格子に充填された際の分子間相互作用により異なる二量体分子の NBD が van der Waals 接触しており、二量体分子内のサブユニット間の空間 (基質結合部位であると予想されている領域) の体積が一定に保たれていた。しかし、CryoEM の場合は、ナノディスク中に 1 分子の二量体が挿入された状態の試料を観測していることから、タンパク質分子間の相互作用は、二量体内部に限られており、二量体分子間の接触がないことから、結晶中よりも動きやすい状態であることが判明した。次に、輸送基質を加えて複合体を作らせた状態でナノディスク中に再構成した試料について CryoEM 解析を行ったところ、分子内部に存在する巨大内腔に輸送基質を抱き抱えると共に、基質のサイズに応じて内腔が構造変化し、いわゆる induced-fit が起きていることが観測された。ただし、CryoEM で観測された二量体分子の形状は、単一ではなく、サブユニット間の相互作用の程度が異なる多様な立体構造の分子種が含まれていることが示された。この構造変化は、結晶中では前述した分子間相互作用によって阻害されることが予想される。なぜなら結晶中では、最も安定な分子構造のみが結晶を構成すると考えられるからである。一方、CryoEM の場合は、試料中に多様な立体構造の分子が含まれていても、それらを区別して構造解析することが可能であることから、準安定な立体構造の分子種を捕捉することが可能であることが示された。

Cdr1 については、他の酵母由来のホモログとよく似た立体構造であることが確認された。すなわち、N 末端から NBD を構成し、その C 末端側に 6 回膜貫通 ヘリックスが続き、リンカー部分を経て、2 番目の NBD と TMD が繋がる構造をしていた。すなわち、1 本のペプチド鎖中に ABC1 とは逆転する順番で 2 つの NBD と 2 つの TMD を持つ構造をしていた。Cdr1 では、2 箇所の ATP 結合部位のうち片方は、ATP を結合できるものの ATPase 作用は失われている。2 つの ATP 結合部位のうち、片方の結合部位にのみ ATP 結合が観測されたことから、2 つの ATP 結合部位は、ATPase 活性の有無だけでなく、ATP 結合の強さも異なっていることが立体構造からも示唆された。輸送基質結合部位には、阻害剤として知られる化合物が観測されていた。しかし、その結合様式は、他の酵母由来の ABC トランスポーターで観測された様式とは異なっており、基質の構造に応じて結合様式が異なることが示唆された。今回の CryoEM 解析の分解能では、ナノディスク再構成に用いたリン脂質の分子構造を観測することはできなかった。そのため、リン脂質組成の違いに伴う構造変化を観測するためには、さらに分解能を向上させることが必要であることが判明した。今後は、ナノディスクへの再構成条件の最適化や、CryoEM 試料の調製法を改良することにより、分解能の向上を検討する。

ナノディスク中のリン脂質の立体構造を決定することはできなかったが、一方で、CryoEM 試

料中に ATP を添加した際の基質を捉える際の内向型状態と ATP と結合して基質を排出した後の外向型状態の分子種の含まれる割合に脂質組成に依存した違いが観測された。ことから、リン脂質組成の違いが内向型と外向型コンフォメーションの平衡状態に影響を与えている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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CmABCB1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

〔図書〕 計0件

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

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
---------	---------