

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659018

研究課題名(和文) P糖タンパク質の生体内分子イメージング剤の立体構造に基づいた最適化

研究課題名(英文) Structural basis for optimization of molecular probe using P-glycoprotein in vivo imaging

研究代表者

加藤 博章 (Kato, Hiroaki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90204487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：P糖タンパク質のin vivoイメージングに適したプローブを開発するために、プローブ候補化合物とP糖タンパク質の複合体のX線結晶構造解析を実施して、両者の相互作用の立体構造基盤を解明した。その結果、P糖タンパク質ホモログの電子密度は明瞭で、その分子構造が判明した。しかし、プローブ候補化合物は、電子密度が得られなかった。一方、分光学的な測定では、分子プローブが結晶中に取り込まれていることが示唆された。これらの結果は、本研究に用いた分子プローブとP糖タンパク質との相互作用が弱く、分子プローブが一定のコンフォメーションをとっていないことを示すものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to develop specific molecular probes for in vivo imaging of P-glycoprotein, an X-ray crystallographic analysis of a P-glycoprotein homolog in complex with some candidate molecules for the probe was performed and the structural basis of their interactions was elucidated. From the X-ray diffraction analysis clear electron density of the P-glycoprotein homolog was observed whereas the unclear density of the probe molecules was detected. A photometric assay of the complex crystals indicated that the probes were included in the crystals. These findings indicated that the probe candidates are weakly bound in the inner cavity of the P-glycoprotein homolog and their conformations are unfixed even in the crystalline state.

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分子イメージング ABCトランスポーター X線結晶解析 P糖タンパク質 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

P糖タンパク質など多剤排出型のABCトランスポーターは、*in vitro* ではがん細胞の多剤耐性の原因であることが実証されている。ところが、その阻害剤や調節化合物を抗がん剤と併用する療法の臨床試験では、第二相試験での頓挫が繰り返されており、多剤排出型ABCトランスポーターを標的とする創薬は成功していない。このことから、*in vitro* におけるABCトランスポーターの局在化と多剤排出活性を精度良く求める方法の開発が求められており、陽電子放射断層撮影(PET)などの分子イメージング法に期待が集まっている。ところが、ABCトランスポーターは、広い特異性を有しており、しかもP糖タンパク質(ABCB1)、MRP1(ABCC1)、BCRP(ABCG2)など複数のトランスポーターが似た挙動を示すこと、さらには、親和性の高い阻害剤がないことから、現状のPET像の分解能では期待する効果が得られていない。

2. 研究の目的

そこで、分子プローブの候補化合物とABCトランスポーターとのX線結晶構造解析を行い、分子プローブのそれぞれのトランスポーターに対する特異性と親和性を向上させるための立体構造基盤を解明することを目指した。申請者は、すでにP糖タンパク質のホモログ分子の結晶化とX線解析に成功しており、研究期間内に、PET分子プローブの候補化合物との複合体のX線結晶解析を終えることは可能であると思われた。また、すでに分子プローブの候補となる数十種類の化合物の合成にも成功しており(京都大学化学研究所平竹教授のグループとの共同研究、特願2010-262291)、複数の候補化合物複合体の結晶解析の準備は完了していた。

ABCトランスポーターの高解像度PET像が得られるようになれば、ABCトランスポーターが*in vivo* でガンの多剤耐性に果たす役割が初めて明らかになる。また、これまでのところ、PET分子プローブ合成化学研究は、入手可能な化合物のアイソトープラベル化反応の開発がほとんどであり、分子プローブの機能を向上させるための分子設計指針を得るための研究はほとんどなされていない。したがって、立体構造に基づいた分子設計により、特異性と親和性を兼ね備えた分子プローブの創成が期待されるとともに、高度医療への応用が期待された。

3. 研究の方法

研究方法の概要は以下の通りである。すなわち、骨格構造の異なる5種類の分子プローブ候補化合物とABCトランスポーターのP糖タンパク質ホモログとの複合体について、X線結晶解析を実施する。そして、得られた立体構造から、標的ABCトランスポーターに対する高い基質特異性と親和性を付与す

るための構造要因を解明する。また、分子プローブの化学構造中でトランスポーターとの結合や分子認識に関与していない部位を明らかにすることで、分子プローブ候補化合物の細胞毒性の低下を実施するための方法を明らかにする。さらに、標的ABCトランスポーター：プローブ候補複合体結晶中の分子プローブ占有率を化学量論的1:1にするため、および、X線結晶解析の分解能を向上させるために、リン脂質誘導体を用いたLipidic Cubic Phase法とBicelle法による結晶化法をABCトランスポーターへ利用可能なように改良して、現状の3.0オングストロームレベルの分解能から2.0オングストロームレベルへと構造解析の精度を向上させる。の4項目である。

(1) 標的ABCトランスポーターと分子プローブ候補化合物との複合体の結晶化

マウス由来のP糖タンパク質(P-GP)の立体構造は3.8オングストローム分解能で決定されているが、分解能が低い立体構造を基盤とした研究は進んでいない。そこで、好熱性の真核生物 *Cyanidioschyzon merolae* から、ヒトのP-GPと遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列が良く似た分子を探したところ、1つの遺伝子を単離することに成功した。そこで、ABCトランスポーターを欠失させることにより薬剤感受性となっている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* AD1-8に、その遺伝子を導入して発現させたところ、薬剤耐性が上昇することを見いだした。そこで、その遺伝子産物である膜タンパク質を単離精製し、薬理学的な性質を調べたところ、ヒトP-GPと良く似ているABCトランスポーターであることが判明した。そして、その遺伝子をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に導入し、結晶化に必要な大量のP糖タンパク質ホモログ(CmP-GP)を調製した。結晶化を実施したところ、3.0オングストロームを超える分解能の結晶を得ることができた。

そこで、このCmP-GPを用いて、各種分子プローブとの複合体を結晶化した。結晶化では、予め分子プローブ候補化合物と混合した後、沈殿剤を加えた条件と、結晶化した後、プローブ候補化合物を加えた結晶母液に結晶を浸漬した場合の2つの方法にて行った。その結果、いずれの場合でも、もとの単独にて結晶化した場合と同様に3.0オングストローム分解能以上のX線回折像を与えるX線結晶解析に適した結晶が得られた。

(2) 同複合体のX線結晶解析

得られた結晶を用いて、結晶構造解析を実施した。まず、実験室のX線装置で結晶の選抜を行い、分解能の高い結晶については、SPring-8の放射光X線を用いてX線回折データの収集を行った。そして、すでに構造解析したCmP-GP単独の分子モデルを初期構造モデルとする分子置換法を用いてフリー工解

析に必要な位相情報を得た。結晶構造解析の結果、CmP-GPの立体構造に関する精密な分子モデル(2.7Å分解能)を構築することができた。しかし、加えた分子プローブについては、電子密度が不鮮明で分子モデルを構築することができなかった。一方、ローダミン誘導体のような可視光を吸収する分子では、分子が結晶中に取り込まれていることを確認することができたことから、結晶中で電子密度は与えなくともCmP-GPに取り込まれていることが示唆された。このことから、いずれの分子プローブも結晶中に取り込まれたものの、結晶中でコンフォメーションが限定されるような強い結合をしていないため、分子構造が多様性を示し、結果として明瞭な電子密度を与えなかったと考えられた。

電子密度を与えなかった理由としては、CmP-GPが二量体であるため、非対称な分子である分子プローブの結合が二量体当たり1分子である場合には少なくとも2つの可能性が生じ、電子密度の半減が起きたことが推定された。そこで、分子内部に2回軸を有する分子プローブ候補(図1)を用いてその問題を回避することを試みた。しかし、結果は同様であり、明瞭な電子密度は得られなかった。

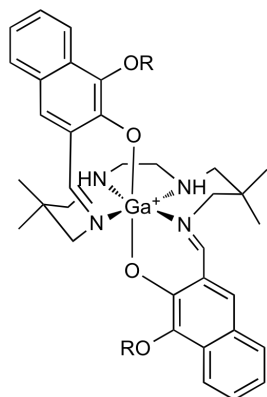


図1. 分子内に2回対称をもつプローブ候補分子

(3) 立体構造に基づいた分子プローブ構造設計指針の解明

CmP-GPに結合した分子プローブの構造が判明しなかったことから、分子プローブが基質のように排出されている可能性について、調べた。ABCトランスポーターは、ATPの加水分解酵素(ATPase)活性を有しており、その反応速度は輸送される基質濃度の上昇とともに、ミカエリスメンテン(双曲線)型の曲線を描くことが判明している。そこで、この測定系を用いてプローブ候補化合物を測定した。その結果、輸送される基質と同等のKm値を示すことが明らかとなった。すなわち、通常の輸送基質と同等の結合を示すものと考えられた。さらに、CmP-GPの結晶構造が判明したことから、その構造中において基質結合部位であると考えられる部位を調べたところ、膜貫通領域に相当する分子の内部に大きな空洞が見つかった。そこで、プログラム

AutoDockを用いて、輸送基質や分子プローブ候補化合物がどこに結合する可能性があるのか、ドッキングシミュレーションを用いて探索した。その結果、分子内空洞の表面の凹凸に従い、分子が結合する様子が観測された。しかし、酵素などと異なり、リガンド分子の立体構造とトランスポーターの分子表面は、必ずしも空間的な相補性が保持されておらず、輸送基質、分子プローブ候補化合物、いずれの場合も、多様性のある結合様式がみとられ、それらのエネルギー的違いはそれほど大きくは変わらなかった。このことは、多剤排出トランスポーターの機能から考えると妥当な性質であると考えられるが、PETなどの分子プローブに必要となる性質としては、特異性の低下する原因となっていることが示された。

(4) Lipidic Mesophase法とBicelle法による高分解能結晶の調製への挑戦

モノオレインを用いて調製したLipidic cubic phaseとLipidic sponge phaseを用いて結晶化を行ったところ、いずれにおいてもCmP-GPの結晶化が見られた。しかし、Bicelle法を用いた場合は、結晶化は観測できなかった。ただし、得られた結晶が不安定なため、これまでに得られている結晶よりも分解能が向上しているかどうかは、確認できなかった。

4. 研究成果

薬物の体内動態特性の決定因子であるP糖タンパク質の構造と薬理学的挙動が似ているホモログ分子の立体構造を高分解能で決定した。分子プローブの候補化合物はいずれもP糖タンパク質と弱い相互作用で認識されていることが判明した。そして、それらは、多様なコンフォメーションをしているため、原子レベルでの結合様式を決定することはできなかった。

今回、P糖タンパク質ホモログの高分解能の立体構造が得られたことから、この立体構造を用いた分子動力学(MD)シミュレーションにより、P-GPと特異的に結合する分子プローブ候補化合物候補を分子構造と結合様式に基づいて選抜するための計算実験系を構築することができたことになる。今後は、分子プローブ候補化合物の分子構造を大量に入手して、CmP-GPとの結合様式をMDシミュレーションで調べることが可能であり、臨床応用可能な化合物の探索に役立つものと期待される。

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1件)

Atsushi Kodan, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Keita Sakiyama, Christopher

Hipolito, Akane Fujioka, Ryo Hirokane, Keiji Ikeguchi, Bunta Watanabe, Jun Hiratake, Yasuhisa Kimura, Hiroaki Suga, Kazumitsu Ueda, Hiroaki Kato, Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読有 (2014) 111, 4049-4054, DOI : 10.1073/pnas.1321562111

〔学会発表〕(計 6 件)

山口知宏、小段篤史、中津亨、植田和光、加藤博章、「ABC 多剤排出トランスポーターにおける基質取込の立体構造基盤」、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27～30 日、熊本大学(熊本市)

益子祥、山口知宏、中津亨、加藤博章、「ABC トランスポーターの ATP 加水分解基礎活性の調節部位の探索」、第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2013 年 11 月 21～22 日、東京大学大学院薬学研究科(東京都文京区)

廣兼諒、小段篤史、中津亨、山口知宏、植田和光、加藤博章、「好熱性真核生物の ABC 多剤排出トランスポーターの X 線結晶構造解析」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12～14 日、とりぎん文化会館(鳥取市)

加藤博章、「ABC トランスポーターにおける ATP 駆動メカニズムの立体構造基盤」、第 38 回生体エネルギー研究会(招待講演)、2012 年 12 月 22～24 日、岡山大学薬学部大講義室(岡山市)

加藤博章、「X-Ray Crystallography of a Multidrug Exporter-type ABC Transporter」、第 35 回日本分子生物学会年会(招待講演)、2012 年 12 月 11～14 日、福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡市)

加藤博章、「結晶構造を基に多剤排出型 ABC トランスポーターのメカニズムを探る」、第 59 回生化学会近畿支部例会(招待講演)、2012 年 5 月 19 日、京都大学宇治キャンパス黄檗ホール(宇治市)

〔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
加藤 博章 (KATO, Hiroaki)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：90204487