

X 線結晶構造解析による ABC 多剤輸送体の
交互アクセスモデルの分子基盤解明

2020

松岡 敬太

目次

| | |
|------------------------------------------------|-----------|
| 略号一覧..... | iii |
| 序章..... | 1 |
| 第一章 QTA 変異導入による内向型・外向型状態の結晶構造の決定..... | 6 |
| 序論..... | 6 |
| 方法..... | 7 |
| 材料..... | 7 |
| 発現・精製..... | 8 |
| 結晶化..... | 9 |
| X線回折実験・構造決定..... | 9 |
| 薬剤耐性試験..... | 9 |
| ATP加水分解活性測定..... | 10 |
| 結果..... | 11 |
| 結晶構造決定..... | 11 |
| TMD構造比較..... | 12 |
| 外向型構造におけるNBDの二量体化メカニズム..... | 16 |
| TMジョイント..... | 18 |
| 考察..... | 20 |
| 第二章 TM1-TM3 ジョイントの改変による外向型状態への平衡移動..... | 22 |
| 序論..... | 22 |
| 方法..... | 23 |
| 材料..... | 23 |
| 発現・精製..... | 23 |
| 結晶化..... | 24 |
| X線回折実験・構造決定..... | 24 |
| ATP加水分解活性測定..... | 25 |
| 結果..... | 26 |
| ATP加水分解活性..... | 26 |
| G132V変異体の結晶構造..... | 27 |

| | |
|------------------------------------------------------|-----------|
| TM1-TM3 ジョイント相互作用変化 | 29 |
| TM3-TM6 水素結合 | 30 |
| 考察 | 31 |
| 第三章 細胞外側の基質排出ゲートの改変が細胞内の ATPase 部位に及ぼす影響..... | 33 |
| 序論 | 33 |
| 方法 | 35 |
| 材料..... | 35 |
| 発現・精製 | 36 |
| 結晶化..... | 37 |
| X 線回折実験・構造決定..... | 37 |
| ATP 加水分解活性測定..... | 37 |
| 薬剤耐性試験 | 38 |
| 結果 | 39 |
| G143W 変異体 ATP 加水分解活性..... | 39 |
| G143W 変異体の内向型構造 | 40 |
| Gly143 と Gly377 の変異体の薬剤輸送活性 | 42 |
| G143W 変異体外向型構造 | 44 |
| 考察 | 45 |
| 結論 | 48 |
| 引用文献..... | 50 |
| 謝辞 | 55 |
| 論文目録..... | 56 |

略号一覧

| | |
|----------------------|-----------------------------------------------|
| ABC | ATP-binding cassette |
| AMP-PNP | adenylyl-imidodiphosphate |
| ATP | adenosine triphosphate |
| β DDM | n-dodecyl- β -D-maltopyranoside |
| β DM | n-decyl- β -D-maltopyranoside |
| EM | electron microscopy |
| IC ₅₀ | half maximal inhibitory concentration |
| IH | intercellular helix |
| IMAC | immobilized metal-ion affinity chromatography |
| MME | monomethyl ether |
| NBD | nucleotide binding domain |
| OD ₆₀₀ | optical density at a wavelength of 600 nm |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PDB | protein data bank |
| PEG | polyethylene glycol |
| RMSD | root mean square deviation |
| rpm | rotations per minute |
| SAD | single-wavelength anomalous diffraction |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| TM | transmembrane helix |
| TMD | transmembrane domain |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| YPD | yeast-peptone-dextrose |

序章

輸送体は膜タンパク質の一種であり、生体膜を貫通した構造を持ち、その役割はイオンや化合物といった輸送基質の膜透過を促進する。輸送を実現するために輸送体分子構造が満たすべき要件として、「交互アクセスモデル」が1966年に Oleg Jardetzky により提唱されている¹ (図 0-1)。このモデルにおいて、輸送体の構造は以下の3点を満たすことが要請される。すなわち、1) 輸送体内部に化合物が入るだけの十分な空洞が存在する、2) 空洞が細胞内を開いた状態（内向型状態）と細胞外を開いた状態（外向型状態）の二状態が存在する、3) 空洞内部に基質結合部位を持ち、基質結合の親和性が二状態間で異なる、の3点である。このことから、輸送体の分子メカニズムの解明には、内向型と外向型、両状態の立体構造を決定することが重要であると言える。神経伝達物質輸送体のホモログ LeuT^{2,3} やグルタミン酸輸送体のホモログ Glt_{ph}^{4,5} など、いくつかの輸送体では内向型と外向型の両状態の立体構造決定が行われ、交互アクセスモデルを発展させた「ロッカースイッチモデル」などが提唱されている⁶。

輸送体が司る基質の輸送は、生体膜を隔てた輸送基質の濃度勾配に従って輸送する受動輸送と、エネルギーを利用して濃度勾配に逆らって輸送する能動輸送の二種類に大別される。能動輸送はさらに、エネルギーを直接利用して化合物を輸送する一次性能動輸送と、一次性能動輸送により生み出された電気化学的勾配を利用して輸送する二次性能動輸送に分けられる。前出の LeuT や Glt_{ph} は、Na⁺イオンや Cl⁻イオンの濃度勾配を利用する二次性能動輸送体に分類される⁷。一方、一次性能動輸送体としては、Ca²⁺イオンを輸送する Ca-ATPase⁸ や ABC

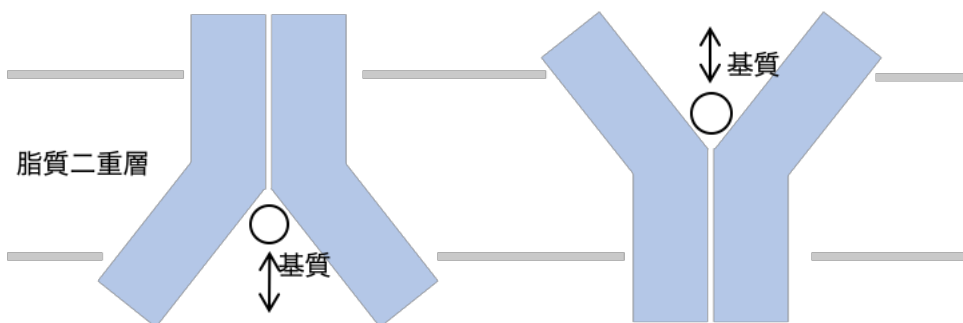


図 0-1. 膜貫通輸送体の交互アクセスモデル図

(ATP-binding cassette) 輸送体⁹があり、ATPの加水分解エネルギーを利用して化合物を能動輸送する。

ABC 輸送体は基質を細胞内に取り込むインポーター型と細胞外に排出するエキスポーター型の二種類に分けられる⁹。インポーター型は原核生物に特異的に存在する一方、エキスポーター型は原核生物にも真核生物にも存在し、特に多剤耐性獲得と関係が深い¹⁰。A-Gの七種類に分類されるヒトのABC輸送体ファミリー¹¹の中でBサブファミリーに属するABCB1は代表的な多剤輸送体である。ABCB1はP糖タンパク質¹²やMDR1^{13,14}とも呼ばれ、小腸、血液脳関門、肝臓、腎臓、生殖器などに発現して異物を体外に排出する役割を持つ¹⁵。すなわち、薬物の体内動態を決定する要因となっており、医薬品においてABCB1の基質になるかどうか、相互作用するかどうかの情報は欠かせないものとなっている。また、ABCB1は、がん細胞で過剰発現することによって多剤耐性獲得につながることから、がんの薬物療法を妨げる要因となっている¹⁶。これらのことから、ABCB1の輸送メカニズムの解明は薬学における重要な課題となっている。

ABCB1に関するX線結晶構造解析では内向型構造のみがマウス由来mABCB1¹⁷⁻²³、線虫由来CeABCB1²⁴、好熱性真核生物である*Cyanidioschyzon merolae*由来CmABCB1²⁵で決定されている。また、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析(CryoEM法)により、ヒトマウスキメラタンパク質hmABCB1^{26, 27}、mABCB1²⁸、ヒト由来hABCB1^{27, 29}の内向型構造が決定されている。共通するABCB1の立体構造の構成は、6本の膜貫通ヘリックス(TM)からなる膜貫通ドメイン(TMD)と細胞内でATP加水分解を担うヌクレオチド結合ドメイン(NBD)をそれぞれ二つ有することである(図0-2)。

CmABCB1内向型構造において、TMDはTM1、2、3、6とTM4、5に別れている(図0-2A)。もう一方のサブユニットのTMDも同様にTM1*、2*、3*、6*とTM4*、5*に分かれており、TM2とTM5*、TM5とTM2*がそれぞれ相互作用をしている(図0-2A, B)。TM4とTM6の間、TM4*とTM6*の間は細胞内側で離れており、TMDが細胞内に開いた構造を取っている。すなわちTM4とTM6が基質取り込みのためのゲートを形成すると示唆される。NBDはTM2とTM3の間の細胞内ヘリックス(IH)1、およびTM4*とTM5*の間にIH2*と相互作用をしTMDと相互作用をしている。同様にNBD*はIH1*とIH2と相互作用し、これにより二つのNBDが解離している。

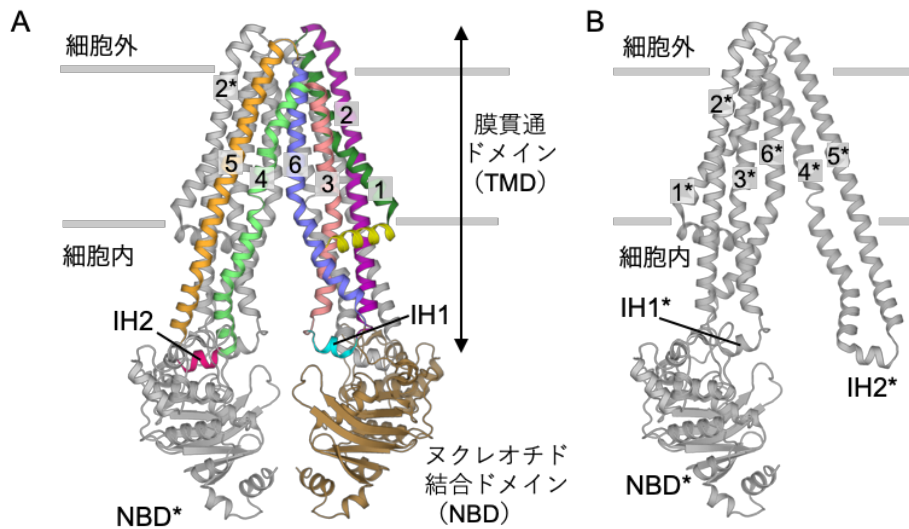


図 0-2. CmABCB1 内向型構造

(A) CmABCB1 野生型内向型構造 (PDB: 3WME) のホモ二量体構造を cartoon 表示で示す。手前側のサブユニットは膜貫通ヘリックス (TM) や細胞内ヘリックス (IH)、ヌクレオチド結合ドメイン (NBD) ごとに色をつけ、奥側のサブユニット (アスタリスクで示す) は灰色で示す。(B) A の手前側のサブユニットを取り除き、奥側のサブユニットを灰色の cartoon 表示で示す。

多くの内向型結晶構造が解かれているのに対し、外向型構造は、真核生物由来 ABCB1 では結晶構造は解明されておらず、原核生物由来 ABCB1 ホモログとされてきた Sav1866^{30, 31} や MsbA³² でのみ解明されている。その外向型構造では細胞内で NBD が二量体を形成し、TMD の細胞外領域では TM1、TM6、TM1*、TM6* の結合は解離している。その結果、TMD の細胞内側が閉まり、細胞外に開いている。このホモログの外向型構造は真核生物の ABCB1 でも同じだろうと考えられ、以下のような交互アクセスモデルが考えられた^{17, 33, 34}。すなわち、内向型状態では、二つの NBD が解離し、二つの TMD で構成される分子内腔が細胞内に開き、そこへ基質が取り込まれる。そして、外向型状態では、NBD が二量体化して TMD が細胞外側に開き、内腔に取り込まれた基質が排出されるというモデルである (図 0-3)。

しかしながら、MsbA の機能は脂質フロッパーゼであり^{35, 36}、また Sav1866 も活性の特徴は ABCB1 より脂質フロッパーゼに近いという報告³⁷があることから、これらの外向型構造が果たして本来の真核生物の多剤排出輸送体外向型状態を示しているのか疑問が残る。特に、これらの外向型構造では、細胞外に開かれた巨大な分子内腔が細胞内にまで達しており、外向型構造においてどのように基質を排出するのか、また、一旦排出した基質が逆戻りすることが起きてしまうのではないかと、いくつかの疑問が解決されずに残っている。その後、

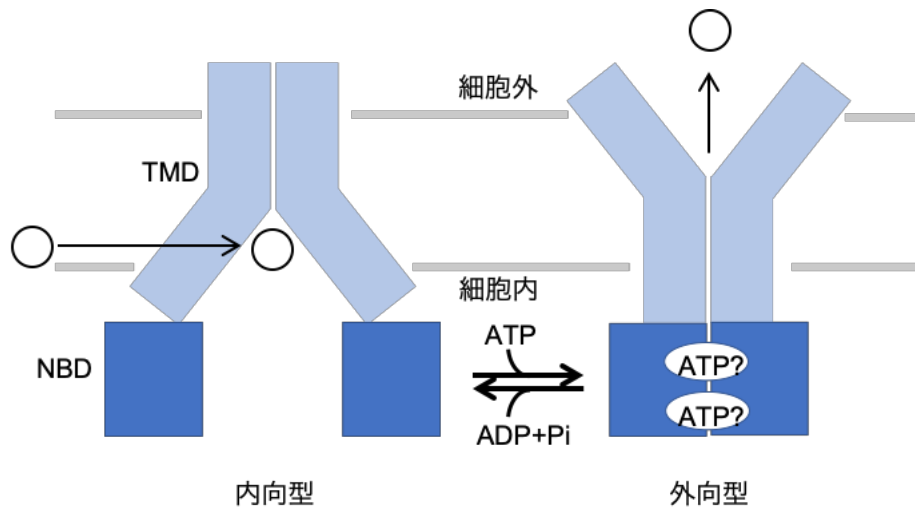


図 0-3. 予想される ABCB1 交互アクセスモデル

2018 年に CryoEM 法を用いた研究によりヒト由来 ABCB1 の外向型構造が決定された³⁸。その構造では細胞外側への開きが小さく、脂質二重層の内葉部位で膜貫通ヘリックスが緊密にパッキングするという、Sav1866 や MsbA の外向型構造とは異なる構造が報告された。この構造の違いから、真核生物の多剤輸送体 ABCB1 と原核生物のホモログでは、内向型と外向型のコンフォメーション変化に違いがある可能性が強く示唆された。しかし、CryoEM 法で決定された立体構造の分解能が低く、特に TMD の領域は不鮮明であり、アミノ酸レベルの構造の詳細は明らかになっていない。したがって、この違いを側鎖レベルの詳細な立体構造の特徴や交互アクセスにおける構造変化の特徴に基づいて議論するには、高分解能の立体構造を取得する必要がある。

前述の CmABCB1 は、高分解能の結晶構造解析を行うため温泉に生息する好熱性真核生物紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* から発見された、高い熱安定性を示すホモ二量体型 ABCB1 ホモログである²⁵。CmABCB1 の機能はヒトやマウス由来の ABCB1 とよく似た多剤排出活性を示す。また、輸送基質の濃度に対する ATP 加水分解 (ATPase) 活性の依存性もよく似ている。すなわち、基底活性が低く、基質濃度に依存して活性が上昇し、ある濃度を超えると阻害が見られるというものである^{25,39-41}。この ATPase 活性プロファイルは薬剤による活性の上昇の比率が高く、MsbA や Sav1866 とは異なっている⁴¹。CmABCB1 の機能がヒトの ABCB1 に近いことから、高分解能での構造解析が期待できる。CmABCB1 の交互アクセスモデル解明はヒト ABCB1 の機能解明につながると期待される。すでに、X 線結晶構造解析により内向型構造 CmABCB1 構造が野生型で分解能 2.75

Å、結晶化に適した変異体で分解能 2.4 Å と、高分解能で決定されている²⁵。しかし、他の真核生物由来 ABCB1 と同様に、ヌクレオチドを加えただけでは外向型の結晶は得られず、外向型構造は未だ解明されていない。

ABCB1 の輸送メカニズムに関しては、未だ多くの疑問が残されており、その解決には、同一のアミノ酸配列を有する分子の内向型と外向型の立体構造を決定することが不可欠である。これら立体構造を明らかにできれば、内向型と外向型のコンフォメーション変化に伴い基質の輸送がどのような装置の働きによって支えられているか、分子構造レベルで明らかにすることが可能となるであろう。能動輸送において ATP 分子のエネルギーがどのように用いられるのかについても疑問が残されている。ATP が加水分解されるためには、NBD の二量体化が不可欠であることはわかっている⁴²。したがって、ATP は内向型・外向型の構造変化と共に加水分解を受けるわけである。しかし、NBD での ATP 結合、加水分解と TMD での基質輸送の共役については、2つのメカニズムが提唱され論争となっている。すなわち、ATP の NBD への結合が外向型への構造変化を引き起こし基質が排出されたのちに、ATP 加水分解が起こり内向型へと戻るという ATP 結合説⁴³ と、ATP が NBD に結合したのち ATPase 反応からのエネルギーによって基質排出がなされるという ATP 分解説⁴⁴ である。これらの解明には、ATP と ABCB1 の複合体の立体構造を精密に理解することが不可欠である。

本研究では高分解能での構造決定が期待できる CmABCB1 に対して X 線結晶構造解析をすることにより、交互アクセスモデルの分子基盤を明らかにした。第一章では、変異体作製により真核生物由来 ABCB1 の外向型結晶構造を初めて取得した。また、同一変異体から内向型結晶構造も取得し、両構造を比較することで交互アクセスモデルを支える構造上の特徴を発見した。第二章では、第一章で細胞内側、外側、両ゲートの開閉を介在すると考えられた特徴的な「ジョイント」部位に対し、その役割を変異体の結晶構造解析により解明した。第三章では、細胞外側での基質排出ゲート開閉と NBD での ATP 結合・加水分解が共役していることを、変異体の結晶構造解析および機能解析により明らかにした。

第一章 QTA 変異導入による内向型・外向型状態の結晶構造の決定

序論

ABC 多剤輸送体の輸送メカニズム解明のためには、内向型と外向型の両方の立体構造を解明し、両者を比較することで交互アクセスモデルの詳細を明らかにする必要がある。序章で述べたようにいくつかの ABCB1 ホモログの立体構造解析が行われてきたが、解明された構造の多くは内向型構造である。真核生物由来 ABCB1 については、外向型構造は結晶構造解析例が無く、クライオ電子顕微鏡構造³⁸が一例報告されているものの、分解能が低いため正確な外向型構造の解明には繋がっていない。そのため、高分解能で外向型構造を解明することが求められている。ABCB1 の外向型構造の取得が困難である原因として、外向型よりも内向型の安定性が高いことが考えられる。真核生物由来 ABCB1 は ATP 存在下であっても内向型構造をとりやすいということが報告されており^{45, 46}、外向型よりも内向型が安定に存在するということが示唆される。よって、外向型構造を取得するためには内向型・外向型の状態平衡を外向型へと偏らせた状態で結晶化を行うことが必要と示唆される。

高分解能での結晶構造解析に適する ABC 多剤輸送体として、好熱性真核生物由来ホモログの CmABCB1 が報告されている²⁵。その内向型構造から、分子内腔の天井で TM1、TM2、TM5、TM6 の疎水性アミノ酸残基がクラスターを形成し、内向型構造を安定化すると考えられた²⁵。さらに、TM1 の Gln147 と TM6 の Asn375 が側鎖同士で水素結合をし、TM6 の Thr381 側鎖が TM1 の Gly143、Ala139 主鎖との間で水素結合をすることで、疎水性アミノ酸残基によるクラスターの形成を支持することから、これら水素結合が内向型構造を安定化すると示唆される (図 1-1)。

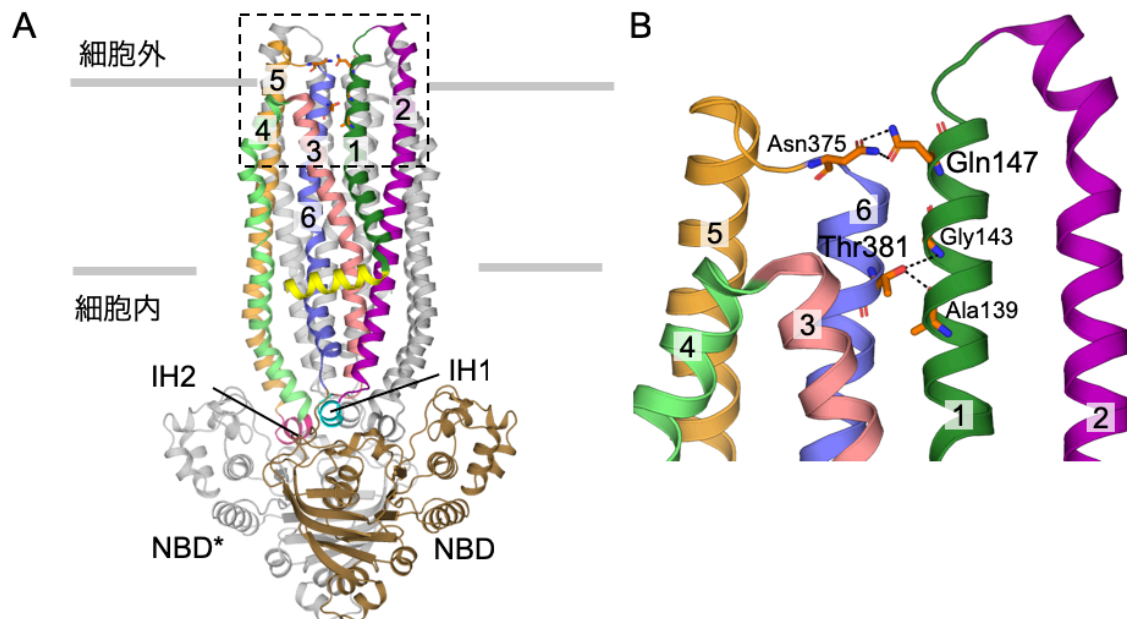


図 1-1. CmABCB1 内向型構造における TM1 と TM6 の間の水素結合

(A) CmABCB1 野生型内向型構造 (PDB: 3WME) のホモ二量体構造を cartoon 表示で示す。手前側のサブユニットは TM や IH、NBD ごとに色をつけ、奥側のサブユニットは灰色で示す。(B) A の点線の枠で囲んだ範囲の内、手前側のサブユニットのみを示す。TM1 と TM6 の間で水素結合を形成するアミノ酸残基をオレンジの stick 表示で示す。

この章では、CmABCB1 の内向型構造を不安定化すると考えられる Gln147 と Thr381 を Ala に変異させた Q147A/T381A (QTA) 変異体を作製し、1.9 Å 分解能で外向型構造を取得した。QTA 変異体により内向型構造も 3.0 Å で得られたことから、高分解能での同一分子由来内向型・外向型の構造比較が初めて可能となった。その結果、詳細な構造比較により、交互アクセスを支える構造上の特徴をアミノ酸側鎖レベルで解明した。

方法

材料

HiLoad 16/60 Superdex 200 pg カラムは GE Healthcare より購入した。Yeast extract、peptone は Becton, Dickinson and Company より購入した。Glucose、塩酸はナカライテスクより購入した。Ni-IMAC レジンは Bio-Rad より購入した。Magnesium nitrate、potassium nitrate、PEG 2000 MME、mercury(II) chloride、クライオグループは Hampton Research より購入した。Sodium chloride、Tris はキシダ化学より購入した。C₁₂E₉、1,4-butanediol、potassium chloride、magnesium chloride、Rhodamine

6G は和光純薬より購入した。Imidazole は関東化学より購入した。トリプシンは sigma-aldrich より購入した。ATP はオリエンタル酵母より購入した。 β DDM、 β DDM は anatrace より購入した。AMP-PNP は Roche より購入した。

発現・精製

CmABCB1 変異体は、pABC3 プラスミドベクターに組み込まれた CmABCB1 遺伝子を PCR 部位特異的変異導入することによって作製した。CmABCB1 は *S. cerevisiae* AD1-8u⁻細胞⁴⁷ を用いて発現させた。*Saccharomyces cerevisiae* 細胞を 20 mL の 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose (YPD 培地) 中で、30 °C、240 rpm の条件下で一晩培養した (Bioshaker BR-23FP, TAITEC)。培養液を 400 mL の YPD 培地に OD₆₀₀ が 0.5 となるように植え継ぎ、OD₆₀₀ が 5 となるまで培養した。8 本の 2.5-L ultra yield flasks (Thomson) 中の 1 L の YPD 培地に OD₆₀₀ が 0.1 となるように植え継ぎ、25 °C、240 rpm 条件下で 24 時間培養した (Innova 4330 incubator shaker, New Brunswick Scientific)。細胞を 3,000 × g、15 分間の遠心により回収した。細胞は -80 °C で凍結保存した。

CmABCB1 の精製は氷上で冷却、もしくは 4 °C 環境下で実施した。細胞を 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM NaCl バッファーで懸濁し、EmulsiFlex-C3 (Avestin) により 25,000 psi で破碎した。破碎残渣を 1,500 × g、15 分間の遠心で除去し、上清をさらに超遠心 (100,000 × g、1 時間) することで膜画分を沈殿させた。膜画分を 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole バッファーで懸濁して機械的に破碎し、1% C₁₂E₉ を含むバッファーで可溶化した。不溶物を超遠心 (100,000 × g、1 時間) により除去し、上清を IMAC レジンと混合させて His タグ精製を実施した。3 時間混合したのち 300 mM imidazole を含むバッファーでレジン吸着物を溶出した。N 末端 92 残基をトリプシン消化により切断し、Superdex200 カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィー精製を実施した。ゲル濾過クロマトグラフィーにおけるバッファーは 20mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM NaCl, 0.2% (w/v) β DDM を用いた。ピークフラクションを 9.9 mg mL⁻¹ に濃縮し結晶化に用いた。ATPase 活性測定に用いるサンプルは、ゲル濾過クロマトグラフィー精製を β DDM のかわりに 0.05% (w/v) β DDM を含むバッファーにより実施した。

結晶化

結晶化は、sitting-drop 蒸気拡散法により 20 °C 環境下で実施した。外向型構造の結晶化では、精製タンパク質を 10 mM AMP-PNP, 20 mM MgCl₂ と 1 時間インキュベーションしたのち、等量のリザーバー19–21% (w/v) PEG 2000 MME, 50 mM KNO₃, 50 mM Mg(NO₃)₂ と混合することで結晶を作製した。水銀誘導体結晶は 1 mM HgCl₂ を含むリザーバーに結晶を 1 日浸した後、非結合有機水銀を取り除くために HgCl₂ を含まないリザーバーに浸し用意した。内向型構造の結晶化では、精製タンパク質を等量のリザーバー14% PEG 2000 MME, 100 mM Mg(NO₃)₂ と混合して作製した。X 線回折実験に供する結晶は、いずれの場合も、抗凍結処理として、結晶母液の PEG 2000 MME 濃度を 30% (w/v) まで引き上げ、さらにそこへ 1,4-ブタンジオールを 5% (w/v) まで加えた。その後、結晶を液体窒素中で急速冷却し保存した。

X 線回折実験・構造決定

X 線回折実験は SPring-8 のビームライン BL41XU で実施した。回折像を MX225HE 検出器もしくは PILATUS 6M 検出器により収集した。水銀誘導体データは HKL2000 により処理し、それ以外は XDS⁴⁸ で処理した。外向型構造の初期位相は単波長異常分散 (SAD) 法により決定し、内向型構造は分子置換により決定した。COOT⁴⁹ によるモデル構築と REFMAC5⁵⁰ と PHENIX⁵¹ による精密化を行った。立体構造の図の作成、構造の重ね合わせは PyMOL⁵² により実施した。

薬剤耐性試験

薬剤輸送活性測定は、CmABC1 を発現させた *S. cerevisiae* AD1-8u⁻ 株の薬剤感受性の変化を利用し、Kodan らの手法²⁵ に従って行った。すなわち、発現が認められた CmABC1 組換え発現株を YPD 培地 1 mL に移して 30 °C, 220 rpm, 16 h 振盪培養を行った。この培養液を OD₆₀₀ が 0.5 となるように YPD 培地 1 mL に移し、OD₆₀₀ が 2–4 となるまで 30 °C, 220 rpm 振盪して前培養を行った。前培養液を OD₆₀₀ が 0.2 となるように YPD 培地で希釈し、希釈液 50 μL を各種濃度で輸送基質 Rhodamine 6G を含む YPD 培地 450 μL に加えて本培養液とした。この時

の Rhodamine 6G は合計 500 μL となった時点での濃度で調製した。本培養は 30 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm, 16 h 振盪により行い、培養後に培養液の 600 nm の吸光度を測定した。Rhodamine 6G を含まない培地における細胞増殖度を 100%として各 Rhodamine 6G 濃度における増殖度を計算し、増殖を 50%阻害する基質濃度 (IC_{50}) を算出した。

ATP 加水分解活性測定

Rhodamine 6G 濃度依存的な ATP 加水分解活性測定は活性測定バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37 $^{\circ}\text{C}$)、150 mM NaCl、0.05% (w/v) DDM、10 mM MgCl_2 、5 mM ATP、0–2 mM Rhodamine 6G) 中で、37 $^{\circ}\text{C}$ インキュベーションにより実施した。反応は等量の 12% (w/v) SDS と混合することで停止した。生成した無機リン酸をリン酸–モリブデン法により定量した。反応の初速度を計算し、Michaelis–Menten 式 (式 1-1) にフィッティングすることで速度論的パラメーターを算出した。

$$v = [e] \left(k_{\text{basal}} + \frac{(k_{\text{sub}} - k_{\text{basal}})[s]}{K_{\text{m}}^{\text{Drug}} + [s]} \right) \left(1 - \frac{[s]}{K_{\text{i}}^{\text{Drug}} + [s]} \right) \quad (\text{式 1-1})$$

ここで、 v は ATP 加水分解反応の初速度、 $[e]$ は CmABCB1 濃度、 $[s]$ は ATP、Rhodamine 6G の濃度、 k_{basal} と k_{sub} は基質非存在下、存在下それぞれの速度定数、 $K_{\text{m}}^{\text{ATP}}$ は ATP に対する見かけ上の Michaelis 定数、 $K_{\text{m}}^{\text{Drug}}$ は見かけの Michaelis 定数、 $K_{\text{i}}^{\text{Drug}}$ は基質による阻害定数を表す。データのフィッティングには GraFit (Erithacus Software) を用いた。

結果

結晶構造決定

TM1 と TM6 の間の水素結合を削除することにより内向型を不安定化すると考えられた QTA 変異体を、 Mg^{2+} および加水分解を受けない ATP アナログである AMP-PNP と混合して結晶を作製した。X 線回折実験により分解能 1.9 Å のデータセットを取得し構造を決定した。データ収集および精密化における統計値は表 1-1 に示した。得られた結晶構造は、二量体化した NBD には Mg^{2+} および AMP-

表 1-1 データ収集および精密化統計値

| | 外向型 | 水銀誘導体 (外向型) | 内向型 |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Data collection | | | |
| Space group | <i>P</i> 4 ₁ 32 | <i>P</i> 4 ₁ 32 | <i>R</i> 32 |
| Cell dimensions | | | |
| a, b, c (Å) | 175.7, 175.7, 175.7 | 176.0, 176.0, 176.0 | 179.7, 179.7, 179.7 |
| α , β , γ (°) | 90, 90, 90 | 90, 90, 90 | 90, 90, 120 |
| Wavelength | 1.0000 | 1.00789 | 1.0000 |
| Resolution (Å) | 43.6–1.89 (2.00–1.89) | 50–2.70 (2.75–2.70) | 47.1–3.02 (3.20–3.02) |
| <i>R</i> _{sym} | 0.152 (1.187) | 0.148 (0.382) | 0.102 (0.629) |
| Total reflections | 1,517,693 | 1,074,412 | 192,073 |
| Unique reflections | 72,007 | 49,994 | 19,238 |
| <i>I</i> / σ <i>I</i> | 13.0 (1.9) | 51.6 (13.1) | 14.3 (2.4) |
| Completeness (%) | 99.2 (95.4) | 100.0 (100.0) | 99.6 (98.5) |
| Redundancy | 21.1 (18.2) | 21.5 (19.7) | 9.98 (10.1) |
| CC _{1/2} (%) | 99.8 (74.0) | (98.3)* | 99.9 (91.8) |
| Processing programs | XDS (ver. Jan. 26, 2018) | HKL2000 (ver. 0.98) | XDS (ver. Nov. 3, 2014) |
| Refinement | | | |
| Resolution (Å) | 43.6–1.90 (1.95–1.90) | | 47.1–3.02 (3.10–3.02) |
| No. reflections | 67,507 | | 18,276 |
| <i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (0.447/0.420) | 0.165/0.208 (0.289/0.293) | | 0.226/0.275 |
| No. atoms | | | |
| Protein | 4537 | | 4476 |
| AMP-PNP | 31 | | 0 |
| Mg^{2+} | 1 | | 0 |
| Detergent | 67 | | 63 |
| Water | 435 | | 13 |
| <i>B</i> -factors (Å ²) | | | |
| Protein | 62.7 | | 91.3 |
| AMP-PNP | 23.5 | | |
| Mg^{2+} | 22.8 | | |
| Detergent | 68.6 | | 120.2 |
| Water | 46.0 | | 76.4 |
| R.m.s. deviations | | | |
| Bond length (Å) | 0.011 | | 0.010 |
| Bond angles (°) | 1.537 | | 1.490 |

括弧内の数値は最外殻の値

*全体の CC1/2 の値を HKL2000 が出力しなかった

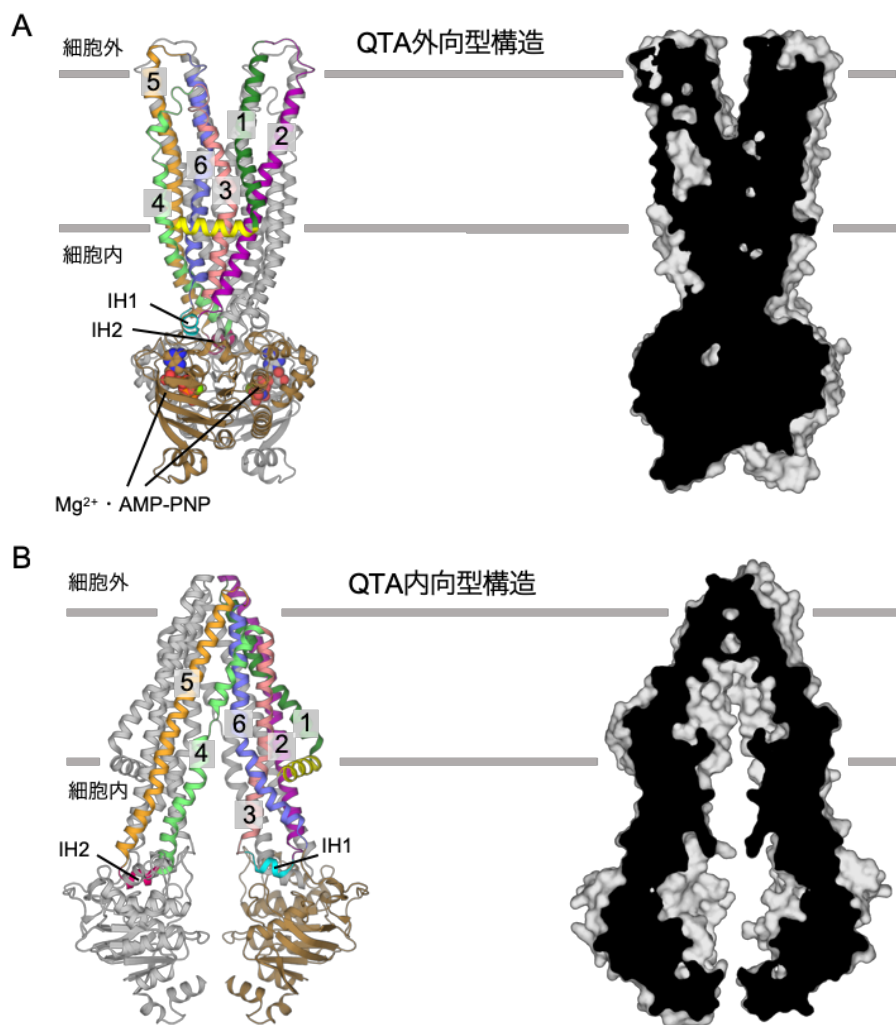


図 1-2. QTA 変異体結晶構造

(A) QTA 変異体外向型構造 (左) と断面図 (右)。タンパク質は cartoon 表示で示し、Mg²⁺ と AMP-PNP は sphere 表示で示す。断面図はタンパク質を灰色の surface 表示で示し、切断面を黒色で示す。(B) QTA 変異体内向型構造 (左) と断面図 (右)。タンパク質は cartoon 表示で示す。断面図はタンパク質を灰色の surface 表示で示し、切断面を黒色で示す。

PNP が結合しており、TMD は細胞内には閉じ、細胞外に開いていた (図 1-2A)。すなわち CmABCB1 の QTA 変異体により ABCB1 の外向型結晶構造が初めて得られた。

また、QTA 変異体から内向型結晶構造を分解能 3.0 Å で決定した (図 1-2B、表 1-1)。これにより同一分子による内向型・外向型両構造の比較が可能となった。

TMD 構造比較

内向型と外向型、両者の分子断面図を比較すると、内向型構造では脂質二重層内葉領域において大きな分子内腔が存在し、細胞内に向けて大きく開かれ、細胞

外側は閉じられている (図 1-2B)。一方、外向型構造では内向型よりも分子内腔が小さく、細胞内側が閉じて細胞外に向けてわずかに開いていた (図 1-2A)。

TMD の細胞外側では、内向型で隣り合っていた TM1 と TM6 が外向型では離れており、TMD が細胞外へ開く原因となっていた (図 1-3A, B)。アミノ酸残基レベルで見ると、内向型構造では TM1 の Phe138 と Phe142、そして TM6 の Phe384 の側鎖がファンデルワールス相互作用する距離にあり、分子中央に集まって分子内腔の天井を形成している (図 1-3A, C)。一方、外向型構造では TM1 と TM6 のヘリックス間が距離を離すように移動することで、これらアミノ酸残基間に空間を生じさせている (図 1-3B, D)。また、Phe384 は側鎖の向きが分子中央から離れるよう水平に回転しており、この回転が空間を広げる一因となっている。

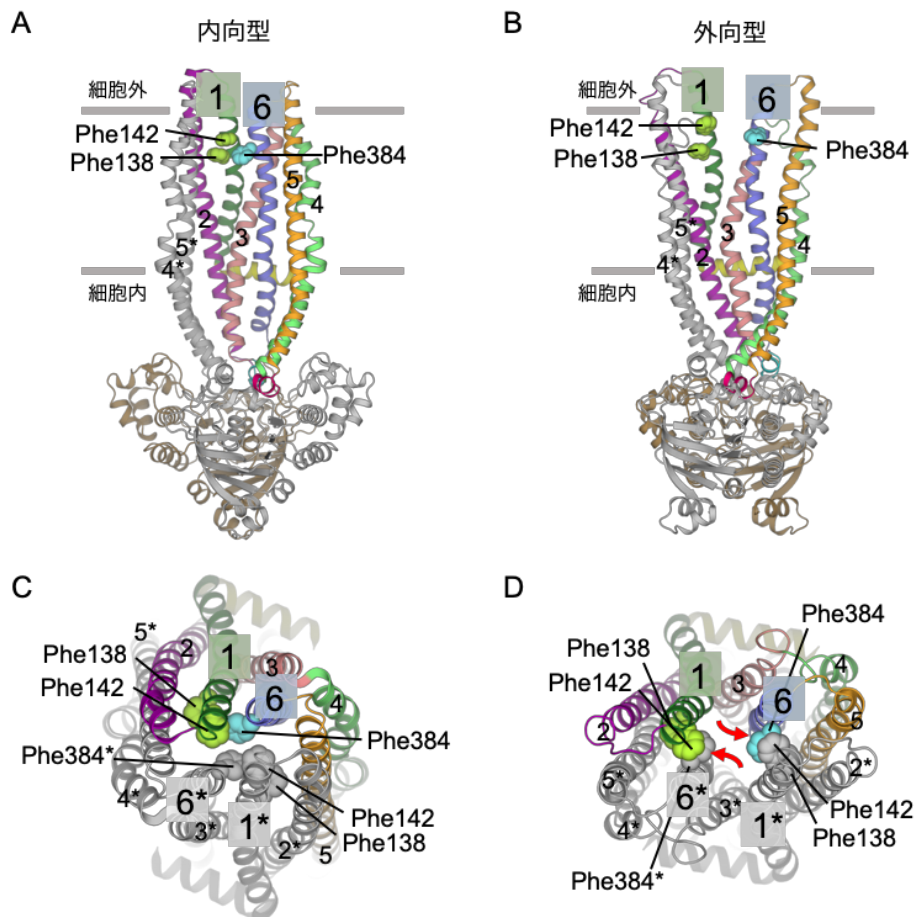


図 1-3. 細胞外側を開く TM1 と TM6

(A) 内向型構造を膜に平行な視点から見た図。見やすさのため、手前側に存在する TM1*、TM2*、TM3*、TM6*は取り除いた。基質輸送路を形成する TM1、TM6 のアミノ酸残基側鎖を sphere 表示で示す。(B) 外向型構造を膜に平行な視点から見た図。見やすさのため、手前側に存在する TM1*、TM2*、TM3*、TM6*は取り除いた。基質輸送路を形成する TM1、TM6 のアミノ酸残基側鎖を sphere 表示で示す。(C) 内向型構造を細胞外から見た図。基質輸送路を形成する TM1、TM6 のアミノ酸残基側鎖を sphere 表示で示す。(D) 外向型構造を細胞外から見た図。基質輸送路を形成する TM1、TM6 のアミノ酸残基側鎖を sphere 表示で示す。赤の矢印は Phe384、Phe384*の内向型から外向型への動きを示す。

TMD の細胞内側では、内向型から外向型への構造変化において、主に TM3、TM6 の構造変化に起因して分子内腔が閉じていた。内向型構造で TM3 の Gln229、Tyr233、Lys237 は TM3* の Gln229*、Tyr233*、Lys237* と離れており、これらのアミノ酸残基の間に空間が存在する (図 1-4A)。また、TM3 の Ala240 と TM6* の Gln398* の間も、距離が離れている。外向型構造では TM3 上の Gln229、Tyr233、Lys237 が TM3* 上の Gln229*、Tyr233*、Lys237* とそれぞれの側鎖同士で接近している (図 1-4B)。また、TM3 上の Ala240 と TM6* 上の Gln398* のペアと Ala240* と Gln398 のペアは、側鎖同士のファンデルワールス相互作用を形成している。この相互作用は、Gln398* と TM5* 上の Phe347* との相互作用、そして Gln398* と TM2 上の Arg181 と TM1 上の Glu131 との水素結合により支えられている (図 1-4C, D)。これらアミノ酸が外向型構造で相互作用を形成した結果、TMD の細胞内側が閉じている。すなわち Gln229、Tyr233、Lys237、Ala240、Gln398 は分子内腔の収縮を制御する役割を持つと考えられることから、これらのアミノ酸残基をチャンバー収縮レギュレーターと名付けた。Tyr233、Lys237、Ala240、Gln398 に対する変異は Rhodamine 6G による薬剤耐性試験の IC₅₀ が低下した (図 1-4E)。すなわち、変異体の薬剤輸送活性が低下したと示唆され、これらアミノ酸残基が基質輸送に重要であると示唆される。また、Ala240 と Gln398 の相互作用から上部にかけて TM6 は、内向型と外向型で主鎖構造に違いが見られ、Gly389、Gly392、Gly394 においてヘリックスの巻き方に変化が観測された (図 1-4C, D)。

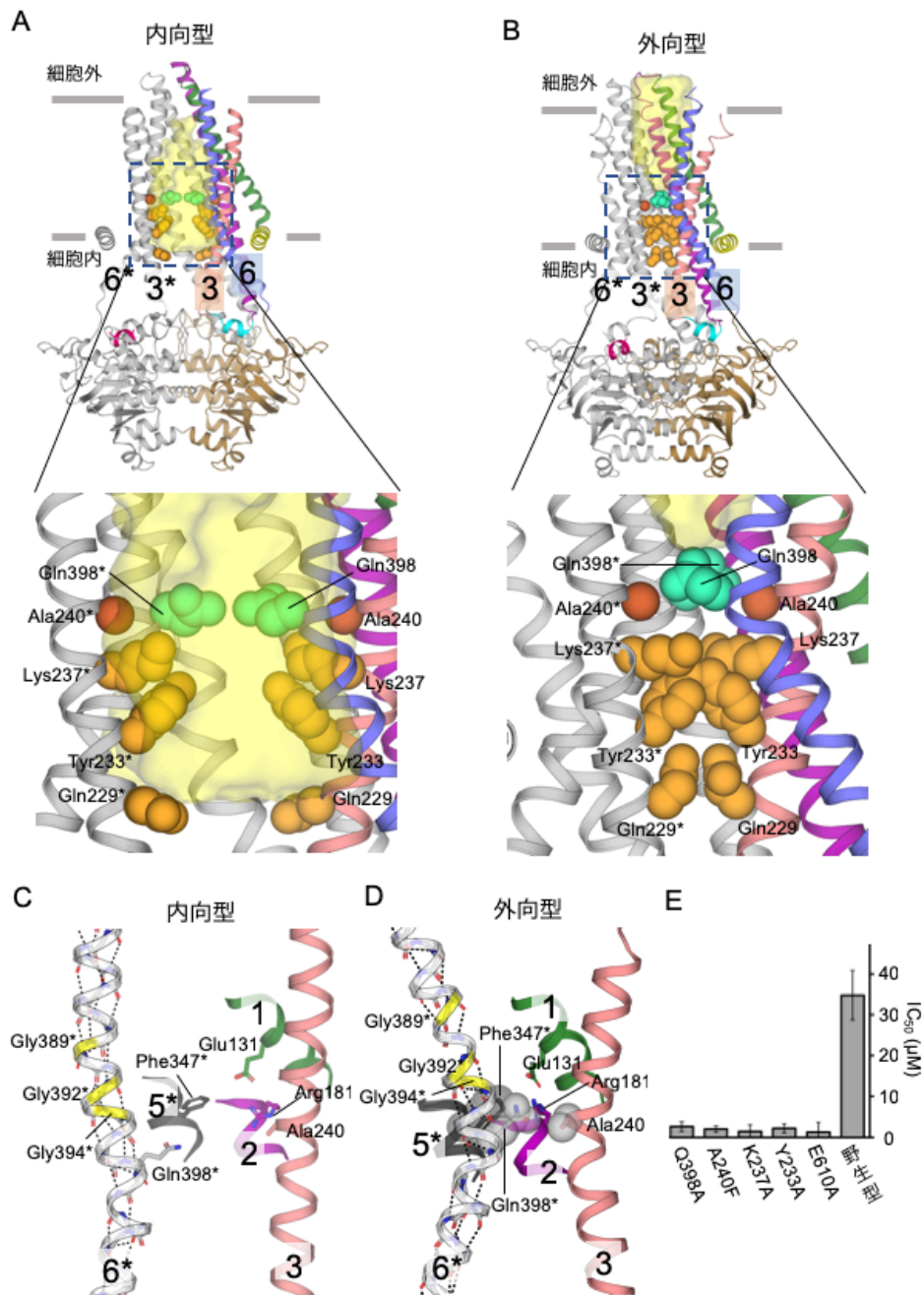


図 1-4. 細胞内側空洞の体積を調節する TM3 と TM6

(A) 内向型構造を cartoon 表示で示す。空洞を見やすくするため、手前側に存在する TM4、TM5、TM1*、TM2*は取り除いた。分子内部の空洞を半透明の黄色で示す。空洞の体積を調節するアミノ酸残基の側鎖を sphere 表示で示す。(B) 外向型構造を cartoon 表示で示す。空洞を見やすくするため、手前側に存在する TM4、TM5、TM1*、TM2*は取り除いた。分子内部の空洞を半透明の黄色で示す。空洞の体積を調節するアミノ酸残基の側鎖を sphere 表示で示す。

(C) TM3 と TM6*の内向型構造を cartoon 表示、主鎖を stick 表示、TM1、TM2、TM5*は一部のみを cartoon 表示する。外向型構造で Ala240 と Gln398*の相互作用に関わるアミノ酸残基側鎖を stick 表示する。外向型構造で TM6 がねじれる位置の Gly を黄色で示す。(D) TM3 と TM6*の外向型構造を cartoon 表示、主鎖を stick 表示、TM1、TM2、TM5*は一部のみを cartoon 表示する。Ala240 と Gln398*の相互作用に関わるアミノ酸残基側鎖を stick 表示と半透明の sphere 表示で示す。TM6 がねじれる位置の Gly を黄色で示す。(E) 薬剤耐性試験による Tyr233、Lys237、Gln398 の Ala 変異体と Ala240 の Phe 変異体の Rhodamine 6G に対する IC_{50} をプロットした。E610A 変異体は Walker B モチーフの加水分解に不可欠な Glu610 を Ala に変異させて輸送体の機能を失わせた変異体²⁵。

外向型構造における NBD の二量体化メカニズム

QTA 変異体外向型構造では、AMP-PNP が二量体化した NBD に挟まれるように結合をしていた (図 1-5A)。AMP-PNP のリン酸基に対して、NBD の $\alpha 1$ ヘリックスの N 末端 (Walker A motif の一部) が α 及び β リン酸基と、もう一方のサブユニットの $\alpha 5$ ヘリックス*の N 末端 (ABC signature motif の一部) が γ リン酸基と相互作用をしていた。これによりヘリックス N 末端側の双極子 δ^+ 同士による反発をリン酸基の負電荷が緩和し、NBD の二量体化を安定化していた (図 1-5B)。AMP-PNP のアデニン環が水分子と結合し、IH1、 $\alpha 1$ ヘリックス、A-loop との隙間を埋め、NBD、IH1、IH2*と強固に相互作用をしていた (図 1-5C)。水素結合ネットワークが水分子の介在により、AMP-PNP、 $\alpha 1$ ヘリックスの Gln489、A-loop の Tyr452、Thr454、RFYD-loop の Tyr495、IH1 の Asp213、IH2*の Arg310* にまたがって形成されていた。この水素結合ネットワークは RFYD-loop の Phe494、Tyr495、IH1 の Val209 によるファンデルワールス相互作用により安定化されると考えられる。

Mg^{2+} は 2.0–2.1 Å の距離でのオクタヘドラル配位を、AMP-PNP の β -、 γ -リン酸の酸素原子 2 つ、P-loop の Ser485 側鎖ヒドロキシ基、Q-loop モチーフ⁵³ の Gln529 側鎖カルボニル基、そして二つの水分子との間で形成していた (図 1-5B)。外向型構造において Gln529 は Q-loop を介して NBD のヘリカルサブドメインとつながっており、そのヘリカルサブドメインと IH1 と IH2*が相互作用をしていた (図 1-5D)。具体的には Q-loop の Val532、Phe534 が IH2*の Thr311*とファンデルワールス相互作用を形成し、 $\alpha 3$ ヘリックスの Tyr544 が Q-loop の Phe534 および IH2*の Phe315*とファンデルワールス相互作用を形成していた。これら相互作用は内向型構造においても形成されており、相互作用を保ったまま内向型から外向型へ構造変化すると示唆された (図 1-5E)。

NBD の底部では、これまで知られていないサブユニット間相互作用が形成されていることを発見した。すなわち、NBD の二量体化により Glu620 と Arg644 がもう一方のサブユニットの Arg644*、Glu620*とそれぞれ塩橋を形成していた (図 1-5F)。そこで、Glu620、Arg644 に対する Ala 変異体、E620A、R644A を作製したところ、いずれの変異体も ATP 加水分解活性の低下を示した (図 1-5G)。この塩橋は外向型での NBD 二量体化を安定化するモチーフであると考えられることから、Arg と Glu の 1 文字表記を元に RE-latch と名付けた。

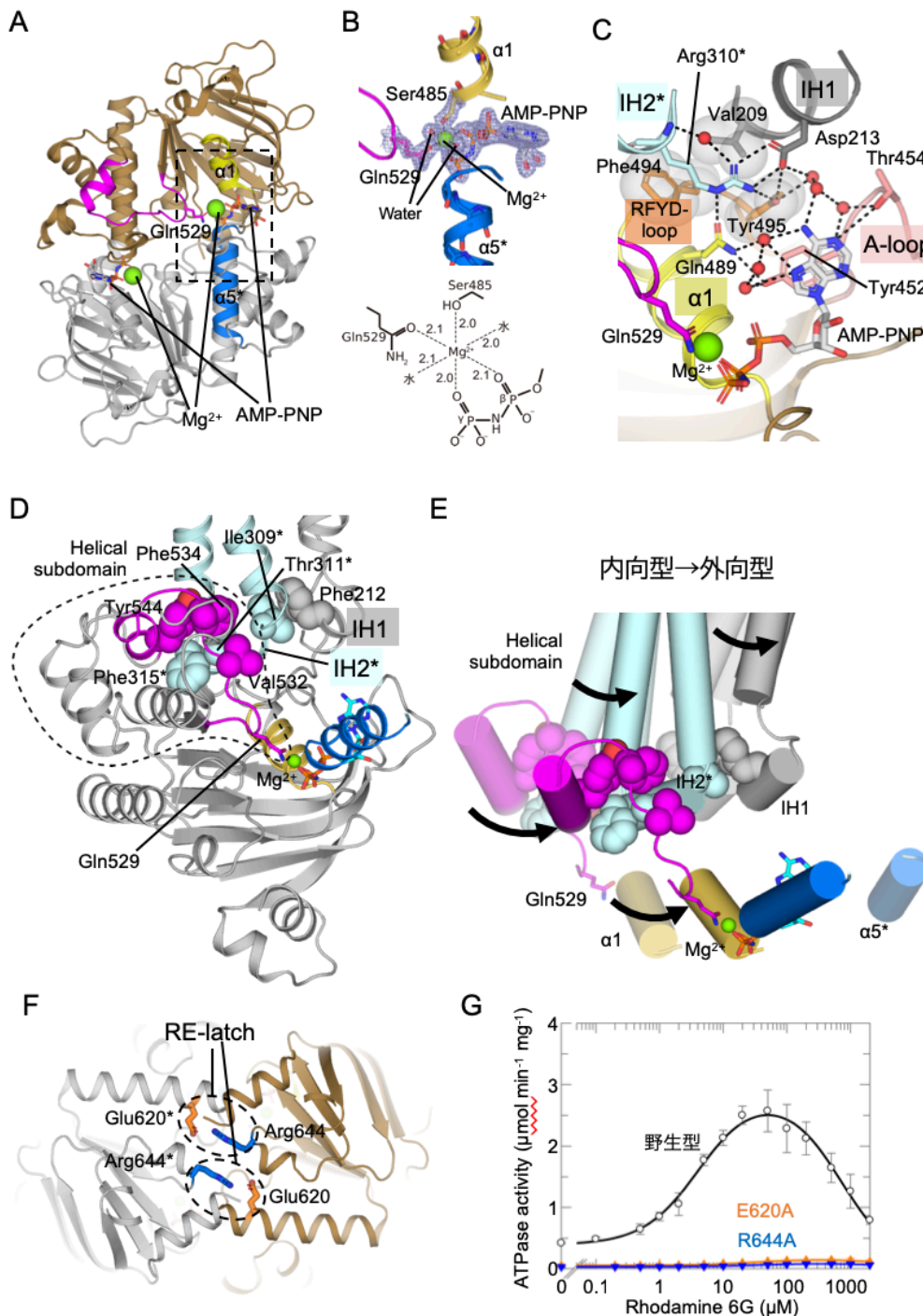


図 1-5. 外向型 NBD 構造

(A) NBD 二量体化構造を TMD から見た図。NBD を cartoon 表示で示す。TMD は表示していない。Mg²⁺ を sphere 表示で、AMP-PNP を stick 表示で、Q-loop の Gln529 を stick 表示で示す。(B) A の点線で囲まれた領域のうち、α1、α5*、Q-loop、AMP-PNP、Mg²⁺ を示した図 (上) と Mg²⁺ オクタヘドラル配位模式図 (下)。メッシュは 2F₀-F₀ map (2.0 sigma level) を示す。(C) AMP-PNP アデノシン環を介する NBD と IH1、IH2* 相互作用。AMP-PNP のアデノシン環と水素結合するアミノ酸残基をそれぞれ stick 表示で、水分子を赤い sphere 表示で示す。IH1 と NBD のファンデルワールス相互作用するアミノ酸残基側鎖を sphere 表示と stick 表示で示す。(D) Q-loop の Gln529 から Helical subdomain を介する NBD と IH1、IH2* 相互作用。Helical subdomain と IH2*、IH2* と IH1 のファンデルワールス相互作用するアミノ酸残基を sphere 表示で示す。(E) 内向型 (半透明) と外向型の NBD、IH1、IH2* 相互作用部位の重ね合わせ。重ね合わせには二量体全体構造を用いた。(F) NBD 二量体化構造を支持する RE-latch を TMD とは反対の側から見た図。サブユニット間で塩橋を形成する Glu620 と Arg644 の側鎖を stick 表示で示す。(G) RE-latch に対する変異体 E620A と R644A の Rhodamine 6G 依存的な ATP 加水分解活性。野生型を黒、E620A をオレンジ、R644A を青で示す。

TM ジョイント

内向型構造と外向型構造の比較から、TMD のコンフォメーション変化における「動きの支点」となる部位を脂質二重層の中央付近で発見した。その部位では、TM1 と TM3 が Gly132^{TM1} と Ala246^{TM3} の間と、Ser128^{TM1} と Gly239^{TM3} の間で密に接しており、また、TM3 と TM6 が Gly251^{TM3} と Ala386^{TM6} および Gly389^{TM6} との間で密に接していた (図 1-6A)。これらの接合が小さな側鎖のアミノ酸残基により構成されているため、内向型と外向型、いずれの構造においてもそれぞれのヘリックス間の距離が短く保たれている。これら接合部位を、TM1-TM3 ジョイント、TM3-TM6 ジョイントとそれぞれ名付けた。

これらジョイントにより外向型構造のサブユニット間距離が短くなっている。すなわち、TM3 と TM6*の間、および、TM3*と TM6 間の距離は、Ala240 と Gln398*、Ala240*と Gln398 の間で 8.9 Å と短くなっていた (図 1-6B)。その結果、Ala240 と Gln398*、および Ala240*と Gln398、それぞれの側鎖の先端部同士でファンデルワールス相互作用が形成されている。これにより、内向型構造で基質が結合できる内腔が外向型構造で収縮し TMD 内部の空間がなくなったと考えられる。

TM1-TM3 ジョイントを構成するアミノ酸残基は真核生物由来 ABCB1 で保存されているのに対し、Sav1866 や MsbA では保存されていない (図 1-6C)。外向型の立体構造の比較からも、ヒトの ABCB1 では CmABCB1 同様に TM1、TM3、TM6 で密な相互作用が形成されている (図 1-6D)。CmABCB1 の Ala240 と Gln398*、Ala240*と Gln398 に相当する TM3 と TM12、TM9 と TM6 の間での距離はそれぞれ 10.1 Å、9.8 Å であった。一方 Sav1866 は、ジョイントに相当する位置で TM1、TM3、TM6 は近接しておらず、TM1 と TM3 は互いに離れていた (図 1-6E)。さらに、TM3-TM6*、TM3*-TM6 間の距離も離れており、CmABCB1 の Ala240 と Gln398*、Ala240*と Gln398 に相当する Asn141 と Ala299*、Asn141* と Ala299 の距離は 17 Å であった。CmABCB1 の Gly132 と Ala246 をそれぞれ Val に変えた G132V 変異体、A246V 変異体は Rhodamine 6G による薬剤耐性試験で IC₅₀ が低下した (図 1-6F)。これら変異体の薬剤輸送活性が低下していると示唆され、保存されている Gly、Ala が ABCB1 の薬剤輸送において重要なアミノ酸残基であると示唆される。

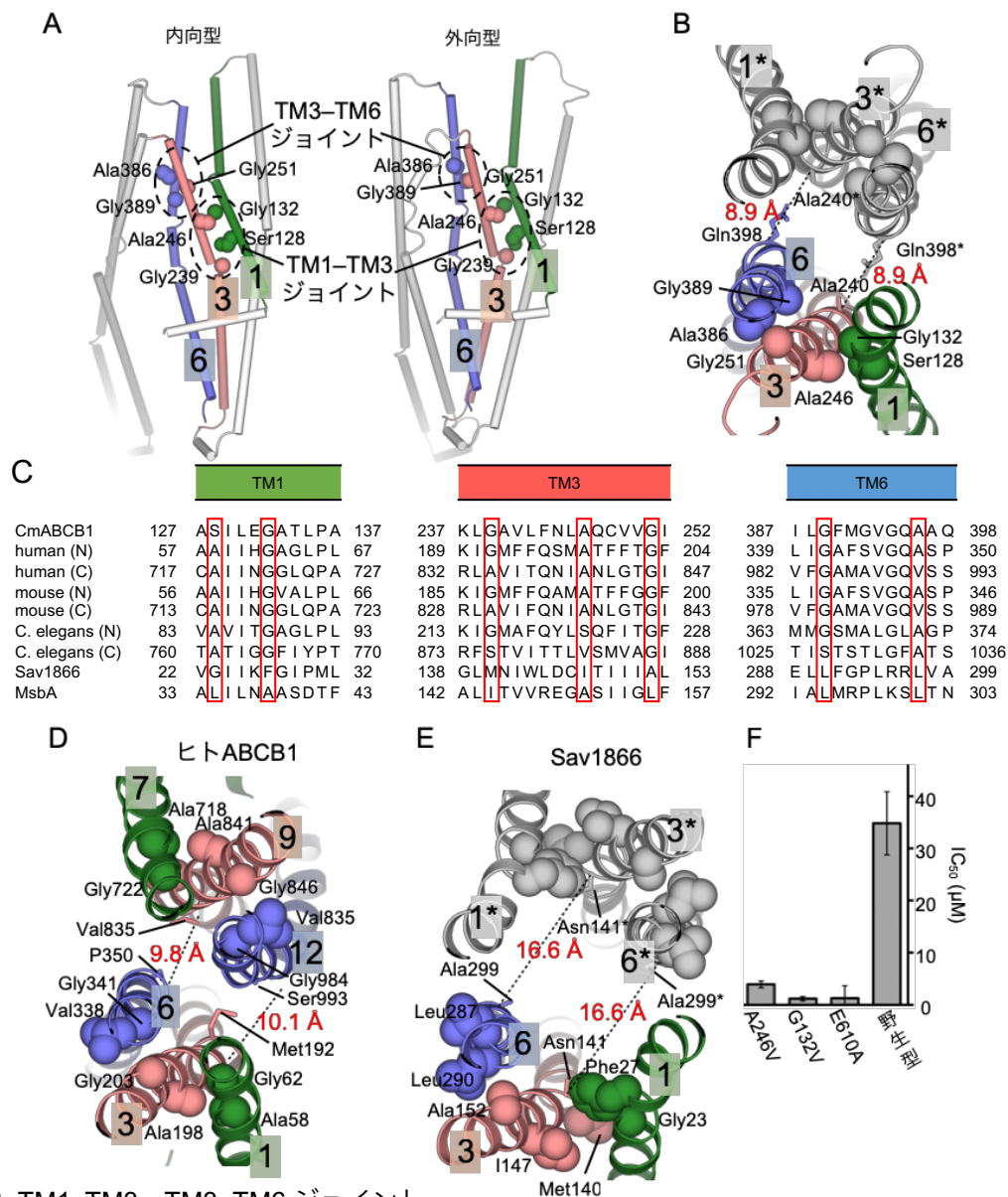


図 1-6. TM1-TM3、TM3-TM6 ジョイント

(A) CmABC1 の QTA 変異体内向型 (左)、外向型 (右) 構造の TMD をシリンダー表示で示す。TM1-TM3、TM3-TM6 ジョイントのアミノ酸残基を sphere 表示で示す。(B) CmABC1 の QTA 変異体外向型構造の TM1、TM3、TM6 のジョイント部位を細胞外側から見た図。ヘリックスを cartoon 表示で示す。TM1-TM3、TM3-TM6 ジョイントのアミノ酸残基を sphere 表示で示す。Ala240-Gln398*、Ala240*-Gln398 相互作用のアミノ酸残基を stick 表示で示す。(C) ABC1 と Sav1866、MsbA の立体構造に基づいたアミノ酸配列のアライメント。TM1、TM3、TM6 のジョイントに関わるアミノ酸残基周辺のみを示す。CmABC1 のジョイントに対応するアミノ酸残基を赤枠囲いで示す。(D) ヒト ABC1 外向型構造 (PDB: 6C0V) の TM1、TM3、TM6、TM7、TM9、TM12 のジョイント部位を細胞外側から見た図。ヘリックスを cartoon 表示で示す。TM1-TM3、TM3-TM6、TM7-TM9、TM9-TM12 ジョイントのアミノ酸残基を sphere 表示で示す。CmABC1 の Ala240、Gln398 に相当するアミノ酸残基を stick 表示で示す。(E) Sav1866 外向型構造 (PDB: 2HYD) で CmABC1 の TM ジョイントに対応する位置の TM1、TM3、TM6 を細胞外側から見た図。ヘリックスを cartoon 表示で示す。CmABC1 の TM1-TM3、TM3-TM6 ジョイントに対応するアミノ酸残基を sphere 表示で示す。CmABC1 の Ala240、Gln398 に相当するアミノ酸残基を stick 表示で示す。(F) それぞれの TM1 (TM7)、TM3 (TM9)、TM6 (TM12) とジョイントを細胞外側から見た図。(F) 薬剤耐性試験による Gly132、Ala246 の Val 変異体の Rhodamine 6G に対する IC₅₀ をプロットした。E610A 変異体は Walker B モチーフの加水分解に不可欠な Glu610 を Ala に変異させて輸送体の機能を失わせた変異体²⁵。

考察

Gln147 と Thr381 を Ala に変異させた QTA 変異体を用いることで、外向型状態構造の結晶化を初めて達成し、真核生物 ABCB1 の外向型立体構造を決定できた。原核生物の ABCB1 ホモログの外向型構造^{30,32}と比較すると、CmABCB1 の外向型構造の分子内腔は小さく、細胞外ゲートを構成している TM1 と TM6 の開き方も低下していた。一方、CryoEM 法で決定されたヒト ABCB1 の外向型構造³⁸とはよく似ていた。CmABCB1 とヒト ABCB1 の外向型構造の共通性から、ABCB1 では、基質を細胞外に排出した後に再び分子内部へ取り込まれないように細胞外への開きを小さくしていることが示唆される。このことは、輸送基質の濃度勾配に逆らった能動輸送を可能にするための仕組みである可能性が予想される。

CmABCB1 の内向型と外向型の構造比較から、基質を輸送するメカニズムは以下のようになっているものと考えられる。内向型状態で基質を取り込む際には、細胞外側では、TM1 と TM6 の疎水性アミノ酸残基、特に Phe138^{TM1}、Phe142^{TM1}、Phe384^{TM6} の相互作用により分子内腔の天井が形成されることにより分子内腔と細胞外とのアクセスが遮断される。その天井に基質が疎水性相互作用によって吸着され、周囲の極性残基との水素結合を形成すると考えられる。外向型に移行すると TM1 と TM6 が互いに離れるように移動し、TMD を細胞外側に開いた状態にする。すなわち、TM1 と TM6 が基質排出ゲートを構成していることが示唆される。また、Phe138、Phe142、Phe384 が分子中央から遠ざかることにより基質の排出されるための通り道、薬剤排出通路を形成すると示唆される。細胞内側では、外向型構造において TM3、TM6、TM3*、TM6*上のチャンバー収縮レギュレーターのアミノ酸残基が互いの側鎖同士でファンデルワールス相互作用を形成することにより、分子内腔の容積が減少し、細胞内とのアクセスが遮断される。チャンバー収縮レギュレーターは、内向型の分子内腔に取り込まれた基質が細胞内に逆戻りするのを防ぎ、細胞外へと絞り出すと考えられる。これは、基質の種類によらない輸送を可能とすることから、多剤排出を可能とするための装置になっていることが示唆される。また、Ala240 と Gln398 の相互作用が TM6 の主鎖構造の一部を巻き戻すように見られた。このヘリックスの巻き戻りは「バ

ネ」のようにひずみを蓄え、基質排出後に外向型から内向型への構造変化を促進させるのではないかと考えられる。

TMD と NBD が接する部位では、NBD の Q-loop と $\alpha 3$ ヘリックスが TMD の IH2* とファンデルワールス相互作用し、IH2* はもう一方の TMD の IH1 と相互作用している。このことから以下のような構造変化メカニズムが示唆される。つまり、ATP が結合して NBD が二量体化して、 Mg^{2+} と Q-loop の配位が形成されると、構造変化がこの相互作用ネットワークを通じて、上述の TMD の構造変化を引き起こす。基質が排出されると、ATP が ADP とリン酸に加水分解される。すると、ADP 部位とリン酸は、別サブユニットの NBD と結合していたため、NBD 二量体の解離が誘起され、外向型構造から内向型構造へと戻ることになる。

内向型と外向型の立体構造変化の方向は、細胞膜と並行に往復しておらず、垂直方向に変化する。すなわち、基質排出ゲートが細胞外側で左右に開閉するのに対して、基質取り込みゲートは細胞内側で前後に開閉する。この動きを切り替えているのが、TMD の中央部位にある 2 つの TM ジョイントであると考えられる。このジョイントの構造の違いが、原核生物型と真核生物型の ABCB1 分子の機能の違いと関わっていることが示唆される。

第二章 TM1-TM3 ジョイントの改変による外向型状態への平衡移動

序論

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のアクセスが交互に行われるためには、細胞内側のゲートと細胞外側のゲートの一方が閉じ、もう一方が開くという正反対の動きが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 での接合は、内向型と外向型で常に TM1 と TM3 の距離を近くに保ち、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関節としての役割が示唆された。すなわち、細胞内側のゲートと細胞外側のゲート、それぞれの正反対の動きが共役するための装置であると期待される。

この章では、上記の可能性を検証するため、CmABCB1 の TM1-TM3 ジョイントを構成する Gly132 を Val に置換した G132V 変異体の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。QTA 変異体の外向型構造と比較することにより、ジョイントへの立体障害導入が TMD の細胞外側を開く様子が明らかとなった。また、ATP 加水分解活性測定の結果から、G132V 変異体は野生型の CmABCB1 と比べて外向型状態に平衡が移動している可能性が示唆された。

方法

材料

HiLoad 16/60 Superdex 200 pg カラムは GE Healthcare より購入した。Yeast extract、peptone は Becton, Dickinson and Company より購入した。Glucose、塩酸はナカライテスクより購入した。Ni-IMAC レジンは Bio-Rad より購入した。Magnesium nitrate、potassium nitrate、PEG 2000 MME、クライオルーブは Hampton Research より購入した。Sodium chloride、Tris はキシダ化学より購入した。C₁₂E₉、1,4-butanediol、potassium chloride、magnesium chloride、Rhodamine 6G は和光純薬より購入した。Imidazole は関東化学より購入した。トリブシンは sigma-aldrich より購入した。ATP はオリエンタル酵母より購入した。βDM、βDDM は anatrace より購入した。AMP-PNP は Roche より購入した。

発現・精製

CmABCB1 の G132V 変異体は *S. cerevisiae* AD1-8u⁻細胞を用いて発現させた。*S. cerevisiae* 細胞を 20 mL の 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose (YPD 培地) 中で、30 °C、220 rpm の条件下で一晩培養した (Bioshaker BR-23FP, TAITEC)。培養液を 200 mL の YPD 培地に OD₆₀₀ が 1 となるように植え継ぎ、OD₆₀₀ が 4 となるまで培養した。8 本の 2.5-L ultra yield flasks (Thomson) 中の 1 L の YPD 培地に OD₆₀₀ が 0.1 となるように植え継ぎ、25 °C、220 rpm 条件下で 24 時間培養した (Innova 4330 incubator shaker, New Brunswick Scientific)。細胞を 3,000 × g、15 分間の遠心により回収した。細胞は -80 °C で凍結保存した。

CmABCB1 の精製は氷上で冷却、もしくは 4 °C 環境下で実施した。細胞を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl バッファーで懸濁し、EmulsiFlex-C3 (Avestin) により 25,000 psi で破碎した。破碎残渣を 1,500 × g、15 分間の遠心で除去し、上清をさらに超遠心 (100,000 × g、1 時間) することで膜面分を沈殿させた。膜面分を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole バッファーで懸濁して機械的に破碎し、1% C₁₂E₉ を含むバッファーで可溶化した。不溶物を超遠心 (100,000 × g、30 分) により除去し、上清を IMAC レジンと混合させて His

タグ精製を実施した。3 時間混合したのち、オープンカラムにレジンを移した。20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole、0.05% (w/v) C₁₂E₉ をカラムボリュームの 20 倍量を流し、レジンを洗浄した。300 mM imidazole を含むバッファーでレジン吸着物を溶出した。N 末端 92 残基をトリプシン消化により切断し、Superdex200 カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィー精製を実施した。ゲル濾過クロマトグラフィーにおけるバッファーは 20mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM NaCl, 0.2% (w/v) β DM を用いた。ピークフラクションを 10 mg mL⁻¹ に濃縮し結晶化に用いた。ATPase 活性測定に用いるサンプルは、ゲル濾過クロマトグラフィー精製を β DM のかわりに 0.05% (w/v) β DDM を含むバッファーにより実施した。

結晶化

結晶化は sitting-drop 蒸気拡散法により 20 °C 環境下で実施した。精製タンパク質を 12.5 mM AMP-PNP、12.5 mM MgCl₂ と 20 °C で 16 時間インキュベーションしたのち、1 μ L のタンパク質サンプルと 1 μ L のリザーバー19% (w/v) PEG 2000 MME、100 mM Mg(NO₃)₂、100 mM KCl と混合することで結晶を作製した。抗凍結処理として、結晶母液の PEG 2000 MME 濃度を 30% (w/v) に引き上げ、さらにそこへ 1,4-ブタンジオールを 5% (w/v) まで加えた。結晶を液体窒素中で急速冷却し、X 線回折実験に用いた。

X 線回折実験・構造決定

X 線回折実験は SPring-8 のビームライン BL41XU で実施した。波長 1.0000 Å の X 線を用い、PILATUS 6M 検出器 (Dectris) で回折像を収集した。得られたデータは XDS で処理をした。初期位相の決定は QTA 変異体の外向型構造を用いた rigid-body refinement により行った。モデル構築と精密化はそれぞれ COOT⁴⁹ と PHENIX⁵¹ を用いた。モデル評価は MolProbity⁵⁴ を用いた。立体構造の図の作成、構造の重ね合わせ、RMSD の計算は PyMOL⁵² により実施した。

ATP 加水分解活性測定

ATP 濃度依存的な ATPase 活性の測定は、活性測定バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37 °C)、150 mM NaCl、0.05% (w/v) DDM、10 mM MgCl₂、0–5 mM ATP) 中で、37 °C インキュベーションにより実施した。反応は等量の 12% (w/v) SDS と混合することで停止した。生成した無機リン酸をリン酸–モリブデン法により定量した。Rhodamine 6G 濃度依存的な ATPase 活性の測定には、5 mM ATP、および各種濃度の Rhodamine 6G を含む活性測定バッファーを用いた。反応の初速度を計算し、Michaelis–Menten 式にフィッティングすることで速度論的パラメーターを算出した。ATP 濃度依存的な曲線のフィッティングに式 2-1、Rhodamine 6G 濃度依存的な曲線のフィッティングは野生型には式 2-2 を、G132V 変異体には式 2-3 を用いた。

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[e][s]}{K_{\text{m}}^{\text{ATP}} + [s]} \quad (\text{式 2-1})$$

$$v = [e] \left(k_{\text{basal}} + \frac{(k_{\text{sub}} - k_{\text{basal}})[s]}{K_{\text{m}}^{\text{Drug}} + [s]} \right) \left(1 - \frac{[s]}{K_{\text{i}}^{\text{Drug}} + [s]} \right) \quad (\text{式 2-2})$$

$$v = [e] \left(\frac{(k_{\text{basal}} - k_{\text{sub}})}{1 + \frac{[s]}{K_{\text{i}}^{\text{Drug}}}} + k_{\text{sub}} \right) \quad (\text{式 2-3})$$

ここで、 v は ATP 加水分解反応の初速度、 $[e]$ は CmABCB1 濃度、 $[s]$ は ATP、Rhodamine 6G の濃度、 k_{cat} は速度定数、 k_{basal} と k_{sub} は基質非存在下、存在下それぞれの速度定数、 $K_{\text{m}}^{\text{ATP}}$ は ATP に対する見かけ上の Michaelis 定数、 $K_{\text{m}}^{\text{Drug}}$ は見かけの Michaelis 定数、 $K_{\text{i}}^{\text{Drug}}$ は基質による阻害定数を表す。データのフィッティングには GraFit (Erithacus Software) を用いた。

結果

ATP 加水分解活性

G132V 変異体の ATP 加水分解活性測定の結果を図 2-1 に、速度論的パラメーターを表 2-1 に示した。ATP 濃度依存的な加水分解活性では、G132V 変異体は、図 2-1A に見られるように G132V 変異体では野生型よりも ATP 濃度増加に伴う活性の増大が大きく、野生型に対して k_{cat} が 21 倍程度増大した (表 2-1)。また、ATP に対する K_m は 0.14 mM であり、野生型の 0.50 mM よりも小さくなっていた (表 2-1)。すなわち G132V 変異により ATP への親和性が増大していた。また、G132V 変異体の薬剤非存在下での活性である基底活性 (k_{basal}) は 23 s^{-1} であり、野生型より 23 倍高い値であった (表 2-1、図 2-1B)。以上のことから G132V 変異体は、ATP が結合した NBD 二量体構造をとりやすくなり、NBD 二量体化状態と解離状態の間での遷移が起こりやすくなっていると示唆された。さらに、

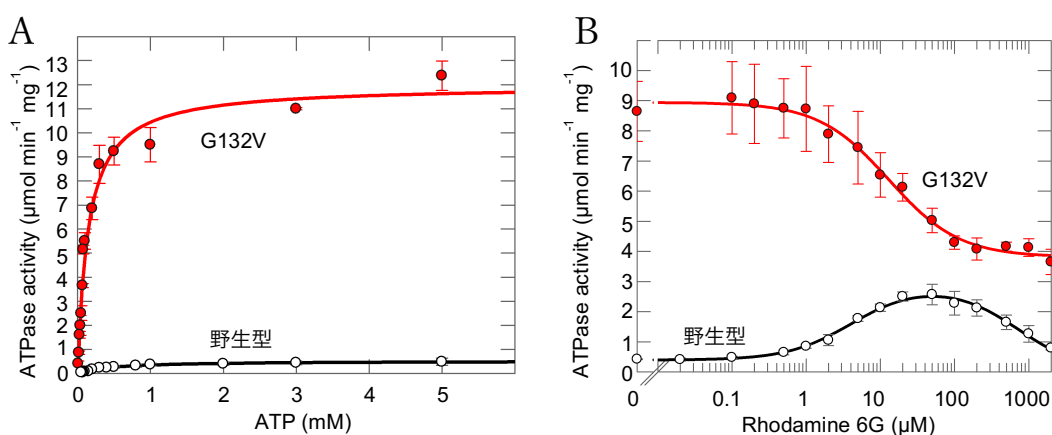


図 2-1. G132V 変異体 ATP 加水分解活性

(A) G132V 変異体 (赤) と野生型 (黒) の ATP 濃度依存的な ATP 加水分解活性のプロット。(B) G132V 変異体 (赤) と野生型 (黒) の Rhodamine 6G 濃度依存的な ATP 加水分解活性のプロット。

表 2-1. G132V 変異体 ATP 加水分解活性の速度論的パラメーター

| | ATP | | Rhodamine 6G | | | | |
|-------|----------------------------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | k_{cat} (s^{-1}) | K_m^{ATP} (mM) | k_{basal} (s^{-1}) | k_{sub} (s^{-1}) | k_{sub}/k_{basal} (-fold) | K_m^{Drug} (μM) | K_i (μM) |
| WT | 1.4 ± 0.3 | 0.50 ± 0.16 | 1.0 ± 0.2 | 7.5 ± 0.7 | 7.4 ± 0.7 | 4.5 ± 1.1 | 680 ± 110 |
| G132V | 30 ± 1 | 0.14 ± 0.04 | 23 ± 3 | 10 ± 1 | 0.44 ± 0.04 | | 14 ± 5 |

Rhodamine 6Gを添加することにより活性が阻害され、野生型における Rhodamine 6G の添加により活性が亢進するという性質とは異なっていた（図 2-1B）。

G132V 変異体の結晶構造

G132V 変異体は Mg^{2+} および AMP-PNP とあらかじめ複合体を形成させたのち、結晶化を行った。X 線結晶構造解析により分解能 2.15 Å で構造を決定した（図 2-2A）。データ収集および精密化における統計値は表 2-2 に示す。得られた構造では、NBD が二量体化して間に Mg^{2+} と AMP-PNP が結合しており、TMD は細胞内へは閉じ、細胞外に開いていた。すなわち、G132V 変異体から外向型結晶構造が得られた。G132V 変異体外向型構造と QTA 変異体外向型構造について全アミノ酸残基の $C\alpha$ 原子に対する RMSD を計算すると 0.18 Å であり、両者の構造はほぼ同じであった。

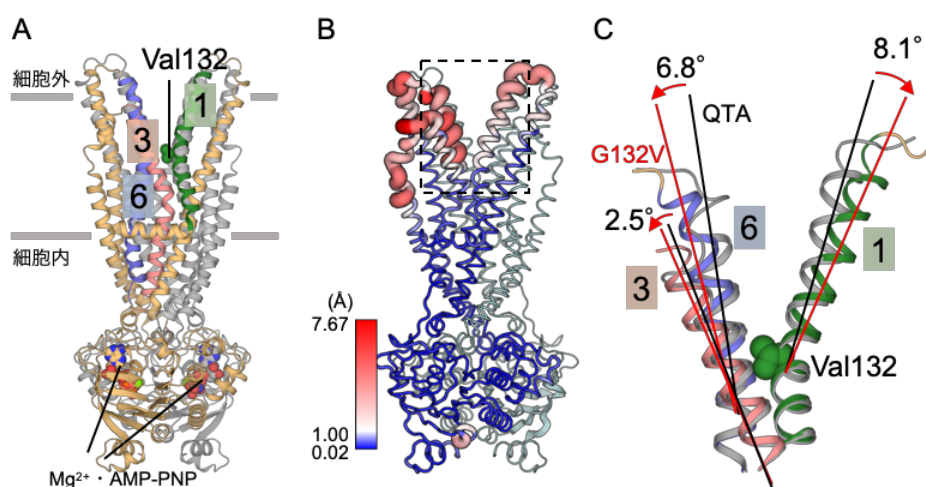


図 2-2. G132V 変異体外向型結晶構造

(A) G132V 外向型結晶構造を cartoon 表示で示す。一方のサブユニット（オレンジ）の内、TM1 を緑、TM3 をピンク、TM6 を青で示す。もう一方のサブユニットは灰色で示す。変異導入した Val132 の側鎖と AMP-PNP、 Mg^{2+} を sphere 表示で示す。(B) G132V 変異体と QTA 変異体の外向型構造を比較する。QTA 変異体外向型構造と比較して $C\alpha$ 原子の動きが大きいアミノ酸残基を赤色かつ太いチューブで、動きが小さい残基を青色かつ細いチューブで示す。 $C\alpha$ 原子の動いた距離と色の対応はカラーバーで示す。(C) B の点線で囲んだ領域について、G132V 変異体外向型構造の TM1（緑）、TM3（ピンク）、TM6（青）を QTA 変異体外向型構造（灰色）のものと重ね合わせた図。重ね合わせには二量体全体構造を用いた。赤の矢印は G132V 変異体 TM1、3、6 の、QTA 変異体外向型構造に対しての動きを示す。

表 2-2 データ収集および精密化統計値

| | |
|-----------------------------------|---------------------------|
| Data collection | |
| Space group | P4 ₁ 32 |
| Cell dimensions | |
| a, b, c (Å) | 175.7, 175.7, 175.7 |
| α , β , γ (°) | 90, 90, 90 |
| Wavelength | 1.0000 |
| Resolution (Å) | 48.7–2.15 (2.28–2.15) |
| R_{merge} | 0.070 (0.766) |
| R_{meas} | 0.072 (0.816) |
| Total reflections | 1,686,152 (128,754) |
| Unique reflections | 95,087 (15,216) |
| $I/\sigma I$ | 27.38 (2.25) |
| Completeness (%) | 99.7 (98.4) |
| Redundancy | 17.7 (8.46) |
| CC _{1/2} (%) | 100.0 (78.9) |
| Refinement | |
| Resolution (Å) | 48.7–2.15 (2.17–2.15) |
| No. reflections | 95,079 |
| $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ | 0.185/0.210 (0.294/0.348) |
| No. atoms | |
| Protein | 4,497 |
| AMP-PNP | 31 |
| Mg ²⁺ | 1 |
| Detergent | 66 |
| NO ₃ ⁻ | 4 |
| Water | 354 |
| B -factors (Å ²) | |
| Protein | 76.5 |
| AMP-PNP | 32.5 |
| Mg ²⁺ | 32.1 |
| Detergent | 73.3 |
| NO ₃ ⁻ | 38.7 |
| Water | 50.9 |
| R.m.s. deviations | |
| Bond length (Å) | 0.007 |
| Bond angles (°) | 0.838 |
| Ramachandran plot (%) | |
| Favored region | 96.76 |
| Allowed region | 3.07 |
| Outlier region | 0.17 |

括弧内の数値は最外殻の値

G132V 変異体外向型構造と QTA 変異体外向型構造について、立体構造の重ね合わせを行い、比較を行った。アミノ酸残基ごとの Ca 原子距離を見ると、TMD の細胞内側や NBD と比較して TMD の細胞外側が動いていた (図 2-2B)。変異を導入した部位は TMD の細胞外側と細胞内側の間あたりに位置しており (図 2-2 A)、細胞内領域側に対する細胞外領域側のヘリックスの角度に違いが見られた (図 2-2 C)。G132V 変異体外向型構造では QTA 変異体外向型構造に対して、TM1 の細胞外側が TM6 から遠ざかる方向、すなわち細胞外側ゲートが広がる方向に 8.1°傾いていた。また TM3 および TM6 の細胞外側においても同様に TM1 から遠ざかる方向にそれぞれ 2.5°、6.8°傾いていた。よって、TM1 と TM6 および TM1*と TM6*からなる基質排出ゲートは、QTA 変異体外向型構

造よりもさらに開いていた。変異導入した部位から細胞外領域側の TMD の RMSD を計算すると 2.4 Å であった。

G132V 外向型構造の Val132 の位置より細胞内領域側の TMD について QTA 外向型構造との RMSD を計算すると 0.16 Å、NBD についての RMSD は 0.14 Å であり、変異導入した部位より細胞内側はほとんど同じ構造であった。

TM1-TM3 ジョイント相互作用変化

G132V 変異体外向型構造における TM1-TM3 ジョイントは、QTA 変異体外向型構造で見られたコンフォメーションとは異なるものであった。TM1 と TM3 のヘリックス間において、G132V 構造では Val132 の側鎖が Ala246、Gln247 の側鎖とそれぞれファンデルワールス相互作用をしており、Val132 と Ala246 との間、Val132 と Gln247 との間で C α 原子間の距離がそれぞれ 6.6 Å、5.6 Å であった (図 2-3A)。これに対し、QTA 外向型構造では Gly132 主鎖の C α 原子が Ala246、Gln247 と直接相互作用をしており、Gly132 と Ala246 との間、Gly132 と Gln247 との間で C α 原子間の距離がそれぞれ 5.0 Å、4.6 Å であった (図 2-3B)。すなわち、G132V 変異体外向型構造では、導入された Val の側鎖が TM3 の方向を向き、TM1 と TM3 のヘリックスの距離が離れていた。

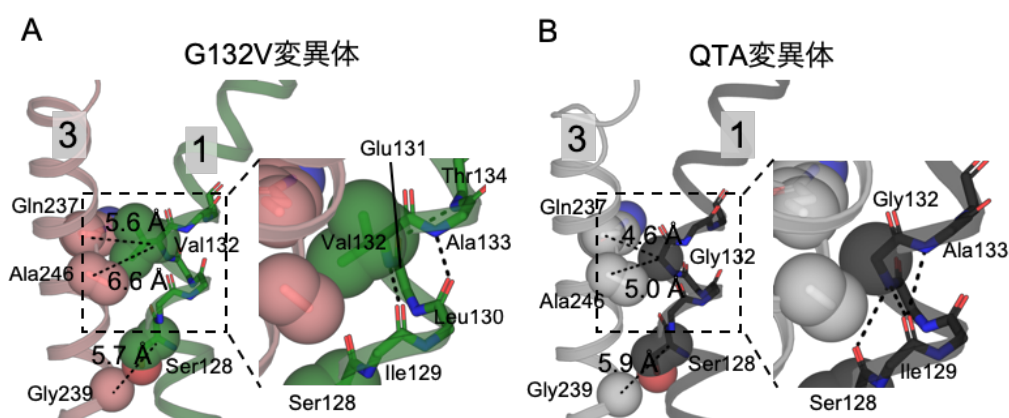


図 2-3. TM1-TM3 ジョイント相互作用変化

(A) G132V 変異体外向型構造の Val132 周辺の TM1-TM3 ファンデルワールス相互作用 (左) と TM1 主鎖拡大図 (右)。ヘリックスを cartoon 表示で示し、ヘリックス間相互作用に関わるアミノ酸残基を stick 表示と半透明の sphere 表示で示す。TM1 の主鎖を stick 表示で示す。(B) QTA 変異体外向型構造の Gly132 周辺の TM1-TM3 ファンデルワールス相互作用 (左) と TM1 主鎖拡大図 (右)。ヘリックスを cartoon 表示で示し、ヘリックス間相互作用に関わるアミノ酸残基を stick 表示と半透明の sphere 表示で示す。TM1 の主鎖を stick 表示で示す。

TM1-TM3 ジョイントを構成するもう一組の側鎖の小さいアミノ酸ペアである Ser128 と Gly239 において、Ca 原子間の距離は G132V 構造で 5.7 Å、QTA 構造で 5.9 Å であり、変異による差は小さいものであった。(図 2-3)。

G132V 変異体外向型構造では、TM1 の細胞内領域に対する細胞外領域が QTA 外向型構造に比べて広がっており、この立体構造を保つために TM1 主鎖の水素結合ネットワークの状態が変化していた。G132V 変異体外向型構造では Val132 のアミド NH と Ile129 のカルボニル基との間、Leu130 のカルボニル基と Ala133 のアミド NH との間、Glu131 のカルボニル基と Thr134 のアミド NH との間でそれぞれ水素結合を形成していた(図 2-3A)。また、Ser128 のカルボニル基と Val132 のアミド NH との距離、Ile129 のカルボニル基と Ala133 のアミド NH との距離はともに 3.9 Å であり、水素結合を形成していなかった。これに対し、QTA 構造では Gly132 のアミド NH は Ile129 のカルボニル基および Ser128 のカルボニル基と水素結合を形成していた。さらに、Ile129 のカルボニル基は Ala133 のアミド NH と水素結合を形成していた(図 2-3B)。

TM3-TM6 水素結合

TM3 と TM6 の間の細胞外側ヘリックスにおいて、QTA 変異体外向型構造では観測されていない水素結合、すなわち Thr381 側鎖ヒドロキシ基が Phe258 および Asn378 の主鎖カルボニル基間、Ser385 側鎖ヒドロキシ基と Gly251 主鎖カルボニル基間で水素結合が観測された(図 2-4A)。QTA 変異体では Thr381 が Ala に置換されているため水素結合ができない構造であり、Ser358 側鎖ヒドロキシ基と Gly251 主鎖カルボニル間において水素結合できる距離ではなかった。(図 2-4B)。すなわち TM3-TM6 間の距離は QTA 変異体外向型構造より G132V 変異体外向型構造の方が近づいており、ヘリックスもきちんとフォールディングされていた。

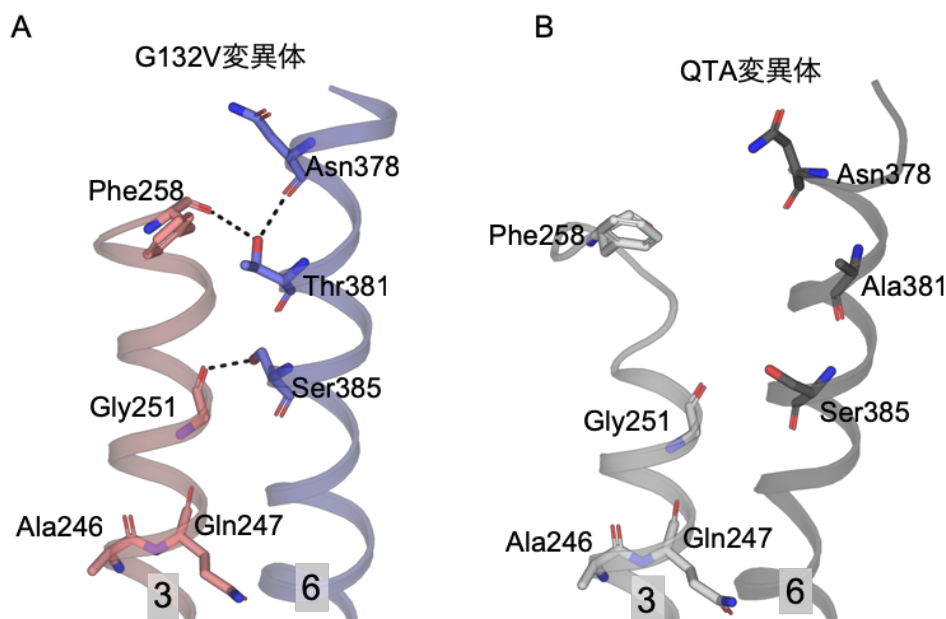


図 2-4. TM3 と TM6 の相互作用

(A) G132V 変異体外向型構造の TM3 と TM6 を cartoon 表示で示す。TM3 と TM6 で水素結合を形成しているアミノ酸残基を stick 表示で示す。Val132 と相互作用する Ala246、Gln247 を stick 表示で示す。(B) QTA 変異体外向型構造の TM3 と TM6 を cartoon 表示で示す。G132V 外向型構造で TM3 と TM6 で水素結合を形成するアミノ酸残基を stick 表示で示す。Gly132 と相互作用する Ala246、Gln247 を stick 表示で示す。

考察

これまでに CmABCB1 で外向型構造決定が達成されたのは QTA 変異体であり、これは内向型構造において水素結合形成に寄与する Gln147 と Thr381 の側鎖を欠失させ内向型を不安定化したためと考えられている。本研究では QTA 変異を含まない TM1-TM3 ジョイント部分の G132V 変異体によっても外向型結晶構造を決定することができた。G132V の変異によりジョイントの部分に Val 側鎖であるイソプロピル基が導入されることにより、内向型構造を安定化すると考えられる TM1 と TM6 がより広がった構造となったことから、外向型へ状態平衡を偏らせることができる構造となっていると考えられる。導入されたイソプロピル基は TM1 上にあり、TM3 と相互作用していた。これにより TM1 と TM3 がより広がる構造となると考えられる。TM3 は TM6 と Phe258 と Thr381 の間、Gly251 と Ser385 の間で水素結合しており、TM6 は TM3 とともに動くこ

とが推察された。すなわち TM6 は TM1 との直接的な相互作用はないものの、TM3 の動きと連動して、TM1 から遠ざかる、すなわち細胞外ゲートを開く方向に移動すると推測された。G132V 変異体外向型構造ではヘリックス構造が保たれているが、QTA 変異体では TM6 上の Thr381 が Ala に変異していることが要因で細胞外側領域のヘリックスがほどけていることが推察できる。野生型の内向型構造ではこの部分のヘリックス構造は保たれていることを考慮すると、TM3 および TM6 はヘリックス構造を保ったまま構造変化をしていると考えられる。

TM1-TM3 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の TM1 と 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た。G132V 変異体では ATP への親和性がよくなり、ATPase 活性があがっている。また G132V 変異は外向型構造において TM1-TM3, TM6 間の距離を広げ、基質排出ゲートを広げるような役割を担っている。このようなことから、変異体の構造は外向型になりやすく、内向型と外向型の構造変化をしやすくなっている。以上から、TM1-TM3 ジョイントは構造変化に重要な構造であることが示唆される結果となった。

しかし第一章で示したように G132V 変異体は薬物の輸送活性がほとんど観測されていない。野生型では Rhodamine 6G 濃度依存的に ATPase 活性が上昇するものの、G132V 変異体では逆に活性が阻害されている。すなわち G132V 変異体は薬物を認識してもうまく排出できるような動きをとることができず、構造変化を起こしやすいことと基質排出とは直接関係がないと考えられる。

第三章 細胞外側の基質排出ゲートの改変が細胞内の ATPase 部位に及ぼす影響

序論

第一章では、QTA 変異体の内向型と外向型の結晶構造の比較から、二分子の ATP・Mg²⁺が結合することによる NBD の会合が Q-loop、ヘリカルサブドメイン、そして IH を経て TMD に伝わり、最終的に基質排出ゲートが開く一連の構造変化が明らかとなった。TMD の動きに着目すると、TM ジョイントが細胞内側の閉じる動きを細胞外側に伝達して基質排出ゲートを開かせるための鍵となる構造だと示唆された。第二章では、TM ジョイントの重要性を調べるために、TM1-TM3 ジョイントを形成する Gly132 を Val に置換した G132V 変異体の結晶構造を解明し、G132V 変異によるジョイント部位の嵩増しによって、QTA 変異体の外向型構造よりも基質排出ゲートが開いた外向型構造となることを確かめた。精製した G132V 変異体は、ATPase 活性の大幅な上昇が見られたため、また、基質排出ゲートが開きやすい構造となったことから、NBD が二量体化しやすくなったことが示唆された。すなわち、NBD から 80 Å 程度離れた基質排出ゲートの動きが、ATP 結合を介した NBD の二量体化と密接に共役していることが示された。TM ジョイントと NBD の二量体化の共役が CmABCB1 の内在的に備わっている機構であることは、QTA 変異体や G132V 変異体の結晶構造から明らかとなったが、基質排出ゲートの開き度合いが直接 NBD にまで伝わるかは、G132V 変異体の実験からは完全に証明されていない。そこで、第三章では、基質排出ゲートを意図的に開かせる変異を導入し、NBD の動きに与える影響を調べることを目的とした。

CmABCB1 の基質排出ゲートには、特徴的な Gly ペアが存在する。TM1 上の Gly143 と TM3 上の Gly377 の間で C α 原子が相互作用し、内向型構造において

基質排出ゲートをしっかり閉じる役割を担うことが示唆される。この Gly143 と Gly377 ペアは他の ABC 輸送体でも保存されている (図 3-1)。ヒト、マウス、線虫由来 ABCB1 において同様に TM1 と TM6 上の対応する Gly ペアが存在し、ヒトでは Gly73 と Gly329、マウスでは Gly72 と Gly325、線虫では Gly99 と Gly353 のペアが主鎖 Ca 原子間で相互作用している。また、ヒト ABC 輸送体 B サブファミリーの他のメンバーの内方向型構造⁵⁵でも保存されており、ABCB2 では Gly209 と Gly442、ABCB3 では Gly174 と Gly407 のペアが存在する。ABCB2 と ABCB3 は transporter associated with antigen processing (TAP)1 と TAP2 としても知られており、ペプチドをサイトゾルから小胞体に運ぶ輸送体である⁵⁶。多くの

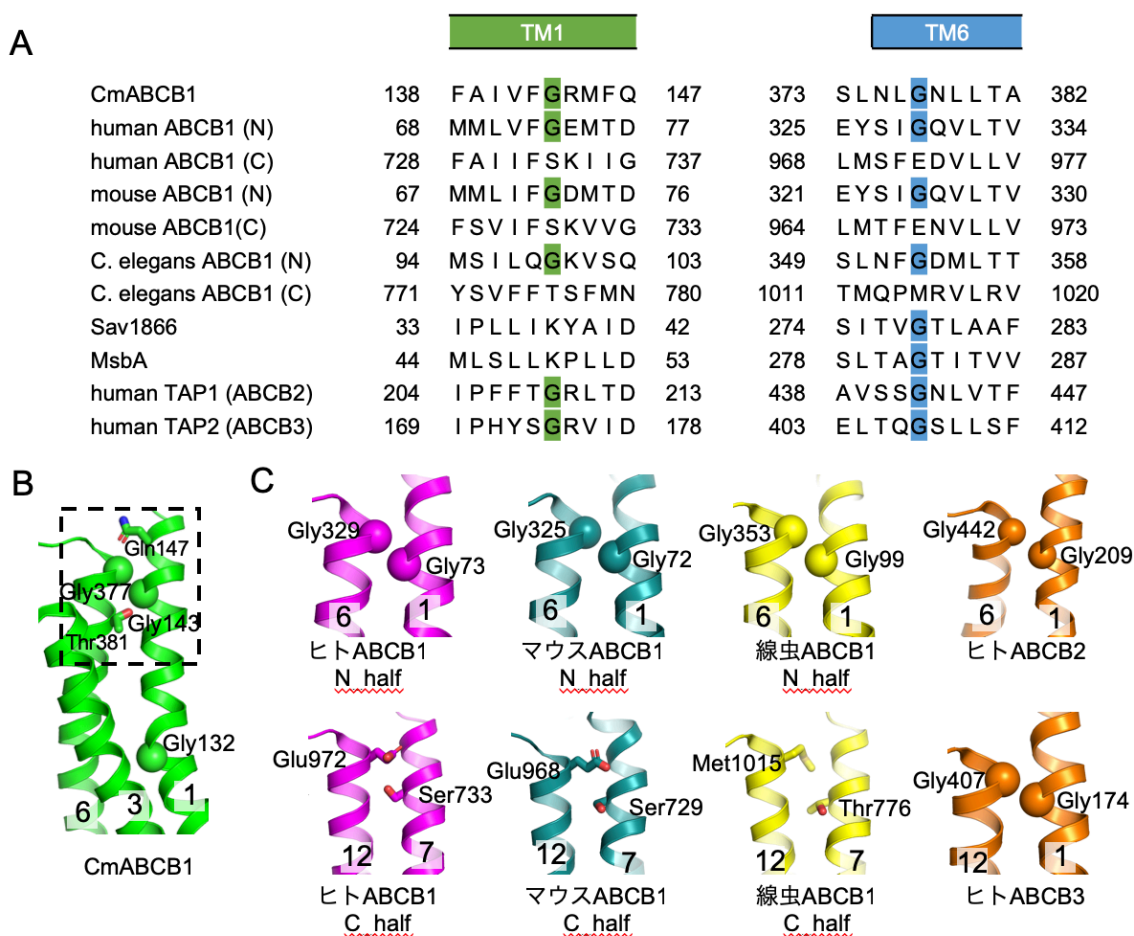


図 3-1. Gly143、Gly377 保存性

(A) ABCB1 と Sav1866、MsbA、ヒトの TAP1/2 (ABCB2/3) の、立体構造に基づいたアミノ酸配列のアライメント。CmABCB1 の Gly143 と Gly377 周辺のみ表示する。(B) CmABCB1 (PDB ID: 3WME) の TM1 と TM6 の間で近接する Gly143 と Gly377 を sphere 表示で示す。第一章で変異させた Gln147、Thr381 の側鎖を stick 表示で、第二章で変異を入れた Gly132 を sphere 表示で示す。(C) ヒト ABCB1 (6QEX)、マウス ABCB1 (4M1M)、線虫 ABCB1 (4F4C)、ヒト ABCB2/3 (5U1D) について、B の点線で囲んだ枠に相当する部位の TM1 と TM6 もしくは TM7 と TM12 を cartoon 表示で示す。CmABCB1 の Gly143、Gly377 に相当するアミノ酸を、Gly は sphere 表示で、それ以外は stick 表示で示す。

ABCB サブファミリーの ABC 輸送体に共通してこの Gly ペアが存在することから、基質排出ゲート上の Gly 同士の相互作用は多剤輸送体に特徴的な構造であることが示唆され、Gly ペアに嵩高いアミノ酸を導入することで、基質排出ゲートの閉まりを意図的に改変することができるかもしれない。

この章では Gly143 に Trp を導入した G143W 変異体を作製し、その内向型の結晶構造を解明し、導入した Trp によって内向型構造で基質排出ゲートがすこし開いたコンフォメーションとなることを示した。この G143W 変異は G132V 変異体と同じように ATP の親和性、加水分解活性の上昇を示し、NBD の二量体化を促進した。すなわち、基質排出ゲートへの変異が約 80 Å 離れた NBD のコンフォメーション変化を引き起こすことを確認することができた。酵母を用いた薬剤耐性実験では、G143W 変異による CmABCB1 の薬剤輸送活性の低下が見られた。G143W 変異体の外向型結晶構造を解明し、その構造から G143W 変異が基質の排出通路を塞ぐことが薬剤輸送活性の低下を引き起こすことが明らかとなった。

方法

材料

HiLoad 16/60 Superdex 200 pg カラムは GE Healthcare より購入した。Yeast extract、peptone は Becton, Dickinson and Company より購入した。Glucose、塩酸はナカライテスクより購入した。Ni-IMAC レジンは Bio-Rad より購入した。Magnesium nitrate、potassium nitrate、PEG 2000 MME、クライオグループは Hampton Research より購入した。Sodium chloride、Tris はキシダ化学より購入した。C₁₂E₉、1,4-butanediol、potassium chloride、magnesium chloride、Rhodamine 6G、clotrimazole は和光純薬より購入した。Imidazole は関東化学より購入した。トリプシンは sigma-aldrich より購入した。ATP はオリエンタル酵母より購入した。βDM、βDDM は anatrace より購入した。AMP-PNP は Roche より購入した。Monensin は Alexis より購入した。

発現・精製

CmABCB1 変異体は、pABC3 プラスミドベクターに組み込まれた CmABCB1 遺伝子を PCR 部位特異的変異導入によって作製した。CmABCB1 は *S. cerevisiae* AD1-8u⁻細胞を用いて発現させた。*S. cerevisiae* 細胞を 20 mL の 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose (YPD 培地) 中で、30 °C、220 rpm 条件下で一晩培養した (Bioshaker BR-23FP, TAITEC)。培養液を 200 mL の YPD 培地に OD₆₀₀ が 1 となるように植え継ぎ、OD₆₀₀ が 4 となるまで培養した。8 本の 2.5-L ultra yield flasks (Thomson) 中の 1 L の YPD 培地に OD₆₀₀ が 0.1 となるように植え継ぎ、25 °C、220 rpm 条件下で 24 時間培養した (Innova 4330 incubator shaker, New Brunswick Scientific)。細胞を 3,000 × g、15 分間の遠心により回収した。細胞は -80 °C で凍結保存した。

CmABCB1 の精製は氷上で冷却、もしくは 4 °C 環境下で実施した。細胞を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl バッファーで懸濁し、EmulsiFlex-C3 (Avestin) により 25,000 psi で破碎した。破碎残渣を 1,500 g、15 分間の遠心で除去し、上清をさらに超遠心 (100,000 × g、1 時間) することで膜画分を沈殿させた。膜画分を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole バッファーで懸濁して機械的に破碎し、1% C₁₂E₉ を含むバッファーで可溶化した。不溶物を超遠心 (100,000 × g、30 分) により除去し、上清を IMAC レジンと混合させて His タグ精製を実施した。3 時間混合したのち、オープンカラムにレジンを移した。20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole、0.05% (w/v) C₁₂E₉ をカラムボリュームの 20 倍量を流し、レジンを洗浄した。300 mM imidazole を含むバッファーでレジン吸着物を溶出した。N 末端 92 残基をトリプシン消化により切断し、Superdex200 カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィー精製を実施した。ゲル濾過クロマトグラフィーにおけるバッファーは 20mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM NaCl, 0.2% (w/v) βDM を用いた。ピークフラクションを 10 mg mL⁻¹ に濃縮し結晶化に用いた。ATPase 活性測定に用いるサンプルは、ゲル濾過クロマトグラフィー精製を βDM のかわりに 0.05% (w/v) βDDM を含むバッファーにより実施した。

結晶化

結晶化は sitting-drop 蒸気拡散法により 20 °C 環境下で実施した。内向型構造の結晶化では、精製タンパク質を 5 mM AMP-PNP、5 mM MgCl₂、1 mM clotrimazole と混合し 20 °C で 16 時間インキュベーションしたのち、1 μL のタンパク質サンプルと 1 μL のリザーバー 18% (w/v) PEG 2000 MME、100 mM Mg(NO₃)₂ と混合することで結晶を作製した。外向型構造の結晶化では、1 mM clotrimazole の代わりに 0.5 mM monensin を加えてのインキュベーションを行ったのち、リザーバーと混合することで結晶化を行った。20 °C でインキュベーションした。いずれの結晶も、抗凍結処理として、結晶母液の PEG 2000 MME 濃度を 30% (w/v) に引き上げ、さらにそこへ 1,4-ブタンジオールを 5% (w/v) まで加えた。その後、結晶を液体窒素中で急速冷却し、X 線回折実験に用いた。

X 線回折実験・構造決定

X 線回折実験は SPring-8 のビームライン BL41XU で実施した。波長 1.0000 Å の X 線を用い、PILATUS 6M 検出器 (Dectris) で回折像を収集した。得られたデータは XDS で処理をした。初期位相の決定は QTA 変異体の外向型構造を用いた rigid-body refinement により行った。モデル構築と精密化はそれぞれ COOT⁴⁹ と PHENIX⁵¹ を用いた。モデル評価は MolProbity⁵⁴ を用いた。立体構造の図の作成、構造の重ね合わせ、RMSD の計算は PyMOL⁵² により実施した。

ATP 加水分解活性測定

ATP 濃度依存的な ATPase 活性の測定は、活性測定バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37 °C)、150 mM NaCl、0.05% (w/v) DDM、10 mM MgCl₂、0–5 mM ATP) 中で、37 °C インキュベーションにより実施した。反応は等量の 12% (w/v) SDS と混合することで停止した。生成した無機リン酸をリン酸–モリブデン法により定量した。Rhodamine 6G 濃度依存的な ATPase 活性の測定には、5 mM ATP、および各種濃度の Rhodamine 6G を含む活性測定バッファーを用いた。反応の初速度を計算し、Michaelis–Menten 式にフィッティングすることで速度論的

パラメーターを算出した。ATP 濃度依存的な曲線のフィッティングに式 3-1、Rhodamine 6G 濃度依存的な曲線のフィッティングは式 3-2 を用いた。

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[e][s]}{K_m^{\text{ATP}} + [s]} \quad (\text{式 3-1})$$

$$v = [e] \left(k_{\text{basal}} + \frac{(k_{\text{sub}} - k_{\text{basal}})[s]}{K_m^{\text{Drug}} + [s]} \right) \left(1 - \frac{[s]}{K_i^{\text{Drug}} + [s]} \right) \quad (\text{式 3-2})$$

ここで、 v は ATP 加水分解反応の初速度、 $[e]$ は CmABCB1 濃度、 $[s]$ は ATP、Rhodamine 6G の濃度、 k_{cat} は速度定数、 k_{basal} と k_{sub} は基質非存在下、存在下それぞれの速度定数、 K_m^{ATP} は ATP に対する見かけ上の Michaelis 定数、 K_m^{Drug} は見かけの Michaelis 定数、 K_i^{Drug} は基質による阻害定数を表す。データのフィッティングには GraFit (Erithacus Software) を用いた。

薬剤耐性試験

薬剤輸送活性測定は、CmABCB1 を発現させた *S. cerevisiae* AD1-8u⁻ 株の薬剤感受性の変化を利用し、Kodan らの手法²⁵ に従って行った。すなわち、発現が認められた CmABCB1 組換え発現株を YPD 培地 1 mL に移して 30 °C, 220 rpm, 16 h 振盪培養を行った。この培養液を OD₆₀₀ が 0.5 となるように YPD 培地 1 mL に移し、OD₆₀₀ が 2-4 となるまで 30 °C, 220 rpm 振盪して前培養を行った。前培養液を OD₆₀₀ が 0.2 となるように YPD 培地で希釈し、希釈液 50 μL を各種濃度で輸送基質 Rhodamine 6G を含む YPD 培地 450 μL に加えて本培養液とした。この時の Rhodamine 6G は合計 500 μL となった時点での濃度で調製した。本培養は 30 °C, 220 rpm, 16 h 振盪により行い、培養後に培養液の 600 nm の吸光度を測定した。Rhodamine 6G を含まない培地における細胞増殖度を 100% として各 Rhodamine 6G 濃度における増殖度を計算し、増殖を 50% 阻害する基質濃度 (IC₅₀) を算出した。

結果

G143W 変異体 ATP 加水分解活性

TM1 と TM6 の Gly ペアのうち Gly143 を Trp に置換した G143W 変異体を作製し、精製標品の ATP 加水分解活性を測定したところ、ATP 加水分解活性の著しい上昇が見られた (図 3-2、表 3-1)。ATP 濃度依存的な加水分解活性では、G143W 変異体は野生型に対して最大活性を示す速度定数 k_{cat} が 6 倍程度増大しており、加水分解の頻度が高くなっていることが明らかとなった (図 3-2A、表 3-1)。また、G143W 変異体の ATP に対する K_m が 0.057 mM で野生型の 0.50 mM よりも小さくなっており、ATP の親和性が大きく増大していた。この ATP に対する親和性の増加と最大活性の増加は第二章の G132V 変異体にも見られた現象である。輸送基質である Rhodamine 6G 濃度に依存的な ATP 加水分解活性については、G143W 変異体と野生型の活性測定プロファイルと比較すると、薬剤非

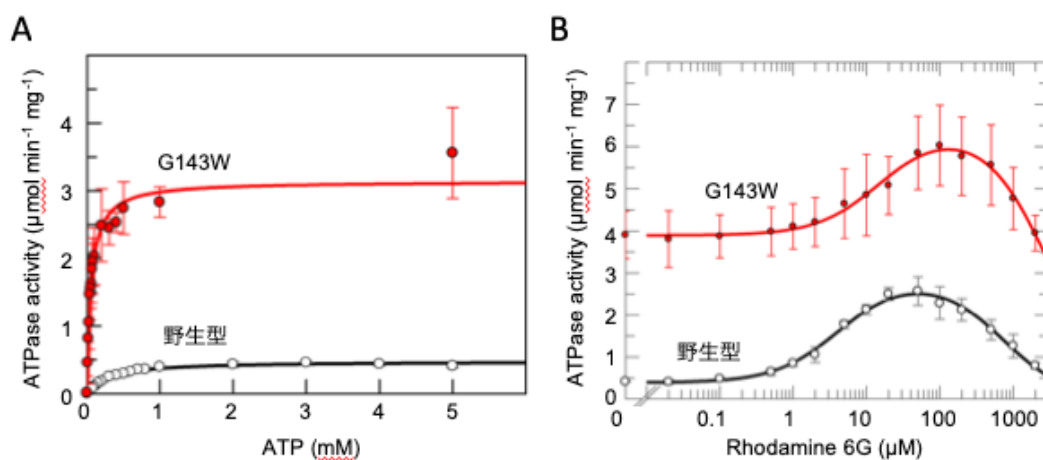


図 3-2. G143W 変異体 ATP 加水分解活性

(A) G143W 変異体 (赤) と野生型 (黒) の ATP 濃度依存的な ATP 加水分解活性のプロット。(B) G143W 変異体 (赤) と野生型 (黒) の Rhodamine 6G 濃度依存的な ATP 加水分解活性のプロット。

表 3-1. G143W 変異体 ATP 加水分解活性の速度論的パラメーター

| | ATP | | Rhodamine 6G | | | | |
|-------|---------------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------|
| | k_{cat} (s ⁻¹) | K_m^{ATP} (mM) | k_{basal} (s ⁻¹) | k_{sub} (s ⁻¹) | k_{sub}/k_{basal} (-fold) | K_m^{Drug} (μM) | K_i (μM) |
| WT | 1.4 ± 0.3 | 0.50 ± 0.16 | 1.0 ± 0.2 | 7.5 ± 0.7 | 7.4 ± 0.7 | 4.5 ± 1.1 | 680 ± 110 |
| G143W | 8.1 ± 0.7 | 0.057 ± 0.02 | 10 ± 1 | 17 ± 3 | 1.7 ± 0.20 | 16 ± 4 | 3200 ± 400 |

存在下での G143W 変異体の ATP 加水分解活性 (基底活性) を示す速度定数 k_{basal} が 10 s^{-1} であり、野生型の 1.0 s^{-1} の 10 倍高い値であった (図 3-2B、表 3-1)。G143W 変異体の ATP 加水分解活性は Rhodamine 6G 添加に従って亢進し、基底活性とピーク活性の比率 $k_{\text{sub}}/k_{\text{basal}}$ は 1.7 であり、野生型の 7.4 と比べると低い値であったが、基底活性から Rhodamine 6G 添加時のピーク活性の増加幅は同じくらいであった。

G143W 変異体の内向型構造

G143W 変異体の結晶構造解析に取り組んだところ、clotrimazole を加えた結晶化条件で析出した結晶から、分解能 3.3 \AA で内向型構造を解明することができた (図 3-3A)。データ収集および精密化における統計値は表 3-2 の通りであった。結晶形成には AMP-PNP や clotrimazole を加える必要があったが、それらの化合物の電子密度は同定することができなかつた。野生型と G143W 変異体の構造を比較すると、全体的に同じ構造をしていたが、基質排出ゲートに顕著な違いが見られ、G143W 変異体の基質排出ゲートが開く方向に、TM1 が 7.8° 、TM6 が 4.7° 傾いていた (図 3-3B)。この構造変化で基質排出ゲートが外向型構造のように大きく開くことはなかったが、TM1 と TM6 の間の疎水性相互作用が変化していた。野生型では TM1 上の疎水性残基 (Leu135、Phe138、Phe142、Phe146、Thr150) が TM6 上の疎水性残基 (Leu388、Phe384、Leu380、Leu376) とジッパーのように密にファンデルワールス相互作用をしていた (図 3-3C)。G143W 変異体では Gly143 が Trp に変化したため、立体障害となり、Phe146、Phe142 と Leu380 のコンタクトが分断され、Trp143 の上下に空白が生じていた。Phe142、Phe138 と Phe384 との相互作用が失われ、Phe384 は Trp143 とのみ相互作用をしていた (図 3-3D)。また、Leu380 と Phe146 との相互作用、Thr150 と Leu376 との相互作用も失われていた。このようにして、G143W 変異体は、内向型構造を取るときに、TM1 と TM6 によって形成される基質排出ゲートは完全には閉じない構造であった。

G143W 変異体内向型構造の Trp143 側鎖は、分子中央に位置していた（図 3-3B）。この部位は、第一章の QTA 変異体構造解析から外向型で薬剤排出通路が形成されると予想される場所であったことから、Trp143 は内向型構造で薬剤の細胞外への排出を妨げていると示唆される。

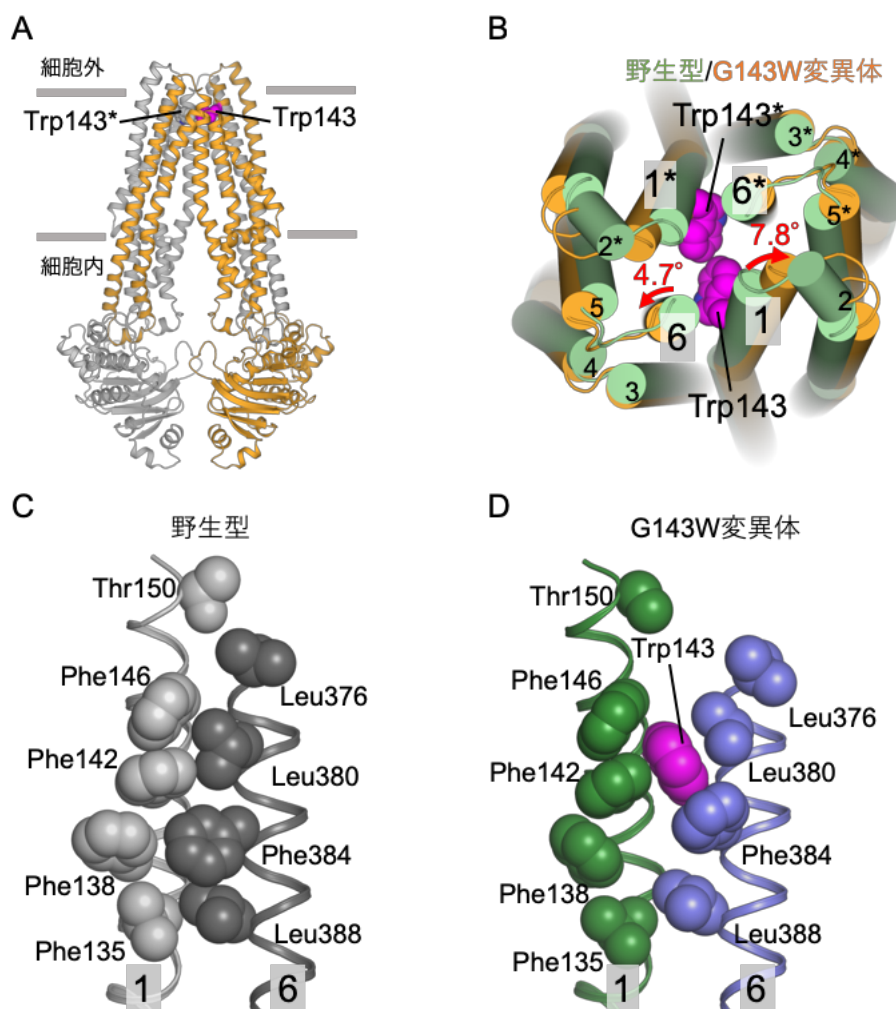


図 3-3. G143W 変異体内向型構造

(A) G143W 変異体内向型構造を一方のサブユニットをオレンジ、もう一方を灰色の cartoon で示す。変異導入した Trp143 の側鎖を sphere で示す。(B) G143W 変異体（オレンジ）と野生型（緑）の内向型構造の重ね合わせを、細胞外から見た図。重ね合わせには二量体全体構造を用いた。赤の矢印は G143W 変異体内向型構造の TM1 と TM6 の、野生型に対しての動きを示す。(C) 野生型内向型構造の TM1 と TM6 を分子内部から見た図。TM1 と TM6 を cartoon 表示で示す。TM1-TM6 ヘリックス間のファンデルワールス相互作用に関わるアミノ酸残基の側鎖を sphere で示す。(D) G143W 変異体内向型構造の TM1 と TM6 を分子内部から見た図。TM1 と TM6 を cartoon 表示で示す。TM1-TM6 ヘリックス間のファンデルワールス相互作用に関わるアミノ酸残基の側鎖を sphere で示す。

表 3-2 データ収集および精密化統計値

| | 内向型 | 外向型 |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Data collection | | |
| Space group | <i>R</i> 32 | <i>P</i> 4 ₁ 32 |
| Cell dimensions | | |
| a, b, c (Å) | 178.7, 178.7, 155.9 | 174.9, 174.9, 174.9 |
| α, β, γ (°) | 90, 90, 120 | 90, 90, 90 |
| Wavelength | 1.0000 | 1.0000 |
| Resolution (Å) | 46.8–3.30 (3.49–3.30) | 48.5–2.00 (2.12–2.00) |
| R_{sym} | 0.067 (0.856) | 0.089 (1.140) |
| Total reflections | 147,625 | 2,395,397 |
| Unique reflections | 14,652 | 62,079 |
| $I/\sigma I$ | 21.2 (2.37) | 33.9 (3.54) |
| Completeness (%) | 99.6 (98.9) | 100.0 (100.0) |
| Redundancy | 10.1 (9.80) | 38.6 (38.0) |
| $CC_{1/2}$ (%) | 100.0 (84.7) | 100.0 (89.5) |
| Refinement | | |
| Resolution (Å) | 46.8–3.29 (3.54–3.29) | 47.3–2.00 (2.03–2.00) |
| No. reflections | 14,643 | 62,070 |
| $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ | 0.248/0.294 (0.353/0.425) | 0.183–0.204 (0.220–0.235) |
| No. atoms | | |
| Protein | 4,492 | 4,533 |
| AMP-PNP | 0 | 31 |
| Mg ²⁺ | 0 | 1 |
| Detergent | 23 | 82 |
| Water | 0 | 407 |
| <i>B</i> -factors (Å ²) | | |
| Protein | 118.6 | 62.2 |
| AMP-PNP | | 27.4 |
| Mg ²⁺ | | 27.0 |
| Detergent | 134.0 | 78.1 |
| Water | | 46.1 |
| R.m.s. deviations | | |
| Bond length (Å) | 0.009 | 0.009 |
| Bond angles (°) | 1.249 | 0.929 |
| Ramachandran plot (%) | | |
| Favored region | 97.09 | 96.59 |
| Allowed region | 2.56 | 2.90 |
| Outlier region | 0.34 | 0.51 |

括弧内の数値は最外殻の値

Gly143 と Gly377 の変異体の薬剤輸送活性

G143W 変異体の薬剤輸送活性を Rhodamine 6G に対する薬剤耐性試験により評価した。Rhodamine 6G 濃度依存的な酵母細胞の生存率のプロットを図 3-4 に示す。G143W 変異体の IC₅₀ は 2.8 μ M であり、野生型の 37 μ M よりも低下し、非発現株の 0.77 μ M より少し高い値であった (図 3-4A)。よって G143W 変異体は薬剤輸送活性が低下したと考えられる。一方、内向型の基質排出ゲートで Gly143 と Gly ペアを形成する Gly377 に対する変異体、G377W 変異体では IC₅₀ が 67 μ M であり、輸送活性を保持していた (図 3-4B)。G377W による変異は薬剤輸送活性に大きな影響を与えないと考えられる。

CmABCB1 の Gly143 のアミノ酸残基は他の ABCB1 の C 末側や脂質フロッパーゼでは異なるアミノ酸残基になっている (図 3-1)。そこで CmABCB1 の Gly143

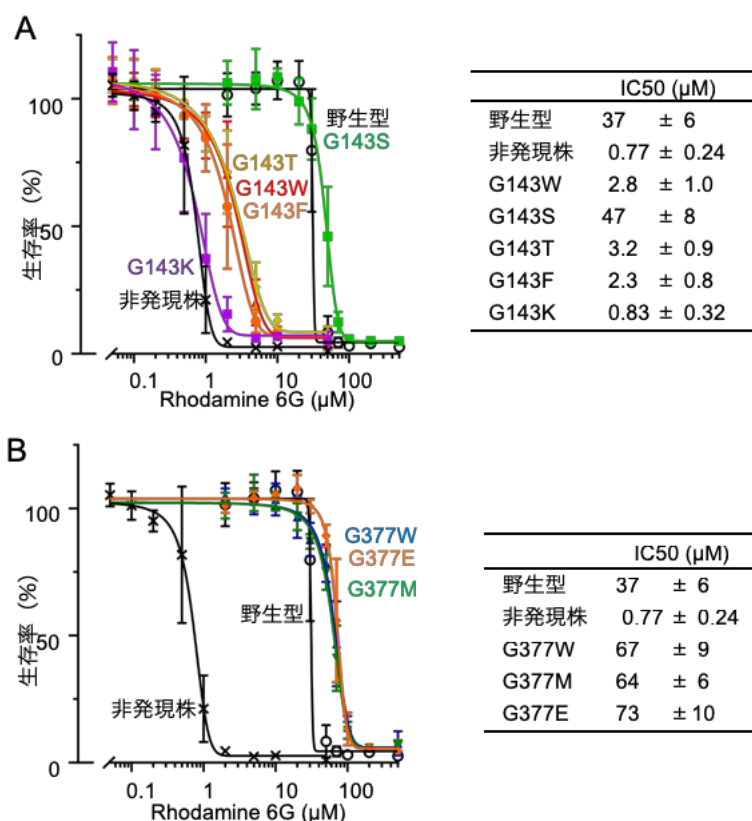


図 3-4. Gly143、Gly377 への変異と薬剤輸送活性

(A) Gly143 に対する変異体 (G143S、G143T、G143W、G143F、G143K) と野生型、CmABCB1 非発現株の Rhodamine 6G を用いた薬剤耐性試験の結果と変異体ごとの IC₅₀ 値を示す。(B) Gly377 に対する変異体 (G377W、G377E、G377M) と野生型、非発現株の Rhodamine 6G による薬剤耐性試験の結果と変異体ごとの IC₅₀ 値を示す。

をヒトやマウスの C 末側に対応する G143S 変異体、線虫の C 末側に対応する G143T 変異体、Sav1866 や MsbA の Lys に対応する G143K 変異体を作製し、Rhodamine 6G に対する薬剤輸送活性を測定した。また、Trp よりも側鎖の小さい Phe に置換した G143F 変異体に対しても薬剤輸送活性を測定した。G143S 変異体は IC₅₀ が 47 μM であり野生型と同程度の薬剤輸送活性を示した(図 3-4A)。G143T 変異体、G143F 変異体は IC₅₀ が 3.2 μM、2.3 μM であり G143W 変異体と同程度まで低下していた。G143K 変異体は IC₅₀ が 0.83 μM であり非発現株と同程度まで低下していた。

CmABCB1 の Gly377 はヒトとマウスの ABCB1 では C 末端側が Glu であり、線虫の ABCB1 では Met である(図 3-1)。CmABCB1 の Gly377 を Glu に変えた G377E 変異体、Met に変えた G377M 変異体は IC₅₀ がそれぞれ 64 μM、73 μM であり、G377W 変異体と同様に輸送活性を保持していた(図 3-4B)。

G143W 変異体外向型構造

G143W 変異体の内向型構造から、Trp143 残基が薬剤排出通路を妨害していることが示唆された。G143W 変異体の結晶化を続けたところ、monensin を加えた結晶化条件で得られた結晶が、clotrimazole を加えたときにできた結晶と異なる空間群を示し、X 線回折データを収集し、解析したところ、G143W 変異体の外向型構造を分解能 2.0 Å で解明することができた (図 3-5A)。データ収集および精密化における統計値は表 3-1 に示した。内向型結晶構造の時と同様に、結晶形成のために加える必要があった monensin の電子密度は同定することができなかった。G143W 変異体の外向型構造は QTA 変異体外向型構造に対して RMSD が 0.13 Å とほぼ同じ構造であったが、基質排出ゲートに着目すると、導入した Trp143 が側鎖を分子中央に向き、TM1、TM6、TM1*、TM6* に囲まれた空間を

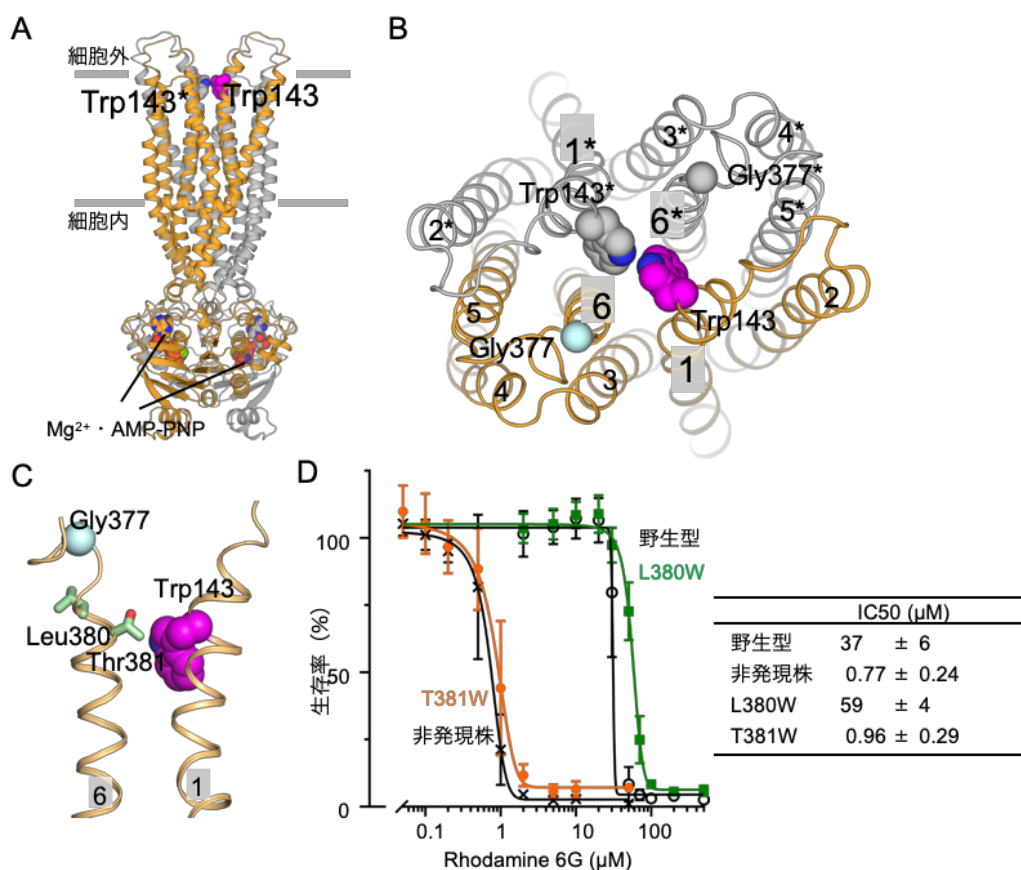


図 3-5. G143W 変異体外向型構造

(A) G143W 変異体外向型構造を一方のサブユニットをオレンジ、もう一方を灰色の cartoon 表示で示す。変異導入した Trp143 の側鎖と AMP-PNP、Mg²⁺ を sphere 表示で示す (左)。(B) 細胞外から見た図。Trp143 の側鎖と Gly377 の Ca を sphere 表示で示す。

(C) TM1 と TM6 の細胞外側領域を膜に平行な視点から見た図。Trp143 と Gly377 を sphere 表示で示す。Trp143 と同じ高さにある TM6 の Leu380 と Thr381 の側鎖を stick 表示で示す。(D) L380W 変異体、T381W 変異体と野生型、非発現株の Rhodamine 6G を用いた薬剤耐性試験の結果と変異体ごとの IC₅₀ 値を示す。

塞いでいた (図 3-5B)。この部位は第一章の QTA 変異体結晶構造解析から薬剤排出通路であると予想されていた。G143W の外向型構造でも、Trp143 が薬剤排出通路の障害となることが明らかとなった。一方で、Gly ペアの Gly377 は、G143W 変異体の外向き型構造では、薬剤排出通路の中心から離れた位置に移動し、もう片方のサブユニットの Gly377 から遠い位置にあった。

G143W 変異体の結晶構造解析をもとに薬剤耐性実験の結果を解釈すると、G143W 変異体の Trp143 は外向型構造で分子中央を塞ぎ、薬剤輸送活性を低下させたが、G377W 変異体の Trp377 は外向型構造において分子中央から離れ細胞外領域に位置し、薬剤輸送活性に影響を及ぼさないということが考えられる (図 3-5B, C)。そこで、Gly377 がある TM6 上の別のアミノ酸残基で、Trp に置換したときに、外向型の CmABCB1 分子中央の通路を塞ぐと予想されるアミノ酸残基を探索した。外向型構造において Gly143 と同じ高さにある TM6 上の Leu380 と Thr381 が妥当であると考え、L380W 変異体と T381W 変異体を作製した。Rhodamine 6G を用いた薬剤耐性試験を実施して、これらの変異体の薬剤輸送活性を評価した。L380W は IC_{50} が $59 \mu\text{M}$ であり、薬剤輸送活性が保持されていたが、T381W は IC_{50} が $0.96 \mu\text{M}$ と非常に低下しており、薬剤輸送活性が非発現株と同程度まで低下した (図 3-5D)。G143W 変異体の外向型構造では、Thr381 の側鎖は CmABCB1 分子中央の通路に突き出すように配置していた。このため、T381W 変異体は G143W 変異体と同じように薬剤輸送通路を塞ぐことができたと推測される。

考察

第三章では、基質排出ゲートが完全には閉じない変異の導入が、NBD の二量体化・ATP 加水分解活性に与える影響について調べた。ABCB1 ホモログや ABCB サブファミリーの輸送体に多く見られる基質排出ゲートの特徴である Gly ペアに着目し、Gly143 と Gly377 の位置にアミノ酸置換変異を導入し、ATP 加水分解活性と薬剤輸送活性を測定したところ、当初の基質排出ゲートと NBD の分子内共役を理解する目的を達成できただけでなく、基質排出ゲートの構成機構についても新たな知見を得ることができた。

まず、Gly ペアの TM 1 上の Gly143 を嵩高い Trp に置換した G143W 変異体の ATP 加水分解活性を調べたところ、ATP の加水分解活性が亢進し、ATP の親和性が大きく増大していた。この特徴は第二章で記述した G132V 変異体にも見られた。これらの変異体の結果を関連づけて考えると、G143W 変異体も ATP が結合し、NBD が解離した状態から二量体化した状態へ変化しやすくなったことが示唆された。TM ジョイントに変異を導入した G132V 変異体では、基質である Rhodamine 6G による ATP 加水分解活性の亢進がみられなかったが、G143W 変異体では、Rhodamine 6G を添加すると ATP 加水分解活性の亢進が見られた。このことから、G132V 変異体では基質が CmABCB1 内腔に入りづらくなり、G143W 変異体では基質が内腔に進入できることが示唆された。この結果はとても理にかなっている。なぜなら、G132V 変異は脂質二重層の中央付近の位置に導入した変異で、内腔の入り口や内部の形状に影響を与える可能性が高い一方、G143W 変異は基質排出ゲートへの変異であるため、内腔の形成に影響を及ぼしづらいつと考えられるからである。また、G132V 変異体では ATP 加水分解活性の基底活性が G143W 変異体と比べて約 3.5 倍高い値を示した。このため、G132V 変異体は G143W 変異体と比べて、より外向型構造になりやすく、基質が進入する内向型構造を取りづらくなっていることが考えられる。G143W 変異体は NBD からより離れたところに変異を導入したため、ATP 加水分解活性への影響は G132V 変異体と比べて穏やかなものだったと解釈することができる。

G143W 変異体の内向型結晶構造では、変異残基の Trp143 の側鎖が野生型の TM 1 と TM 6 に見られた疎水性残基側鎖のジッパー状の噛み合わせを乱し、基質排出ゲートの閉口を不完全にしていた。Trp143 の側鎖は CmABCB1 分子中央の薬剤排出通路上にあり、基質の通過を妨害すると示唆された。この Trp143 側鎖による妨害は、G143W 変異体の外向型結晶構造を解明したことで、より明らかとなった。つまり、G143W 変異体では内向型構造から外向型構造に変化しても、Trp143 側鎖は CmABCB1 分子中央の薬剤排出通路上に留まり、結果、QTA 変異体の外向型構造で見られた薬剤排出通路が完全に塞がれていた。

QTA 変異体と異なるアイデアで作製した G143W 変異体が QTA 変異体と同様な外向型構造を取ることから、基質排出ゲートと NBD の二量体化との共役について確かめられたのみならず、G143W 変異による薬剤排出通路の阻害作用が示唆されたため、薬剤耐性実験を行って、示唆された仮説を確かめた。基質排出ゲートの Gly ペアのうち Gly143 の Trp 置換は薬剤輸送活性を大きく低下させた

が、Gly377 の Trp 置換はむしろ薬剤輸送活性を少し向上させた。この違いは驚くべきものであったが、G143W 変異体の外向型構造を見ると、Gly377 は外向型構造では薬剤排出通路から離れた位置に移っていることが明らかとなり、外向型構造における側鎖の位置が重要であることが示唆された。外向型構造で分子中央方向に向く残基である Thr381 に Trp 置換を導入すると、薬剤輸送活性が G143W 変異体と同等に低下したことから、この仮説が正しいことが確かめられた。

さらに ABCB1 ホモログや ABCB サブファミリーメンバーの輸送体の CmABCB1 の Gly143 と Gly377 に相当するアミノ酸残基の配列比較を、3 次元構造をもとに行うと、ヒトやマウスなどの ABCB1 ホモログでは Gly143 の位置には Gly が存在するか、Ser のように比較的小さい側鎖を持つアミノ酸があることがわかった。G143S 変異体では薬剤輸送活性が野生型と同等であるように、小さい側鎖を持つアミノ酸に置換されても、CmABCB1 は機能を失わないことが確かめられた。一方で、脂質フロPPERゼである MsbA のようなタンパク質では Gly の代わりに Lys であり、G143K 変異体が全く薬剤輸送活性を持たなくなったことから、フロPPERゼの機能には Gly である必要はないことが示唆された。Gly377 の位置のアミノ酸残基はより多様性に富んでおり、ABCB1 ホモログでも Met や Glu のような全く異なる性質のアミノ酸が代わりに存在することができる。CmABCB1 の G377M や G377E 変異体が野生型より少し高い薬剤輸送活性を持つことから Gly377 の位置のアミノ酸残基は薬剤輸送機能には重要ではないことが示唆された。

CmABCB1 の基質排出ゲートは、NBD の二量体化に合わせて開き、NBD の解離に合わせて閉じるという重要な役割を担うが、その作りはそれほど単純なものではないことが明らかとなった。内向型の状態で基質排出ゲートは TM1 と TM6 の疎水性残基のジッパー構造によってしっかり密閉される必要があり、Gly ペアによる TM1 と TM6 の密接な相互作用が可能とする。CmABCB1 が外向型の状態になったときには、基質排出ゲートは薬剤排出通路を塞がないように、通路を形成するアミノ酸残基は比較的小さいものがふさわしい。このような規則に従わない作りの基質排出ゲートを持つ ABC 輸送体はおそらく薬剤輸送機能を持たないことが推測される。

結論

本研究では、ABC_{B1} の交互アクセスモデルにおける輸送メカニズムを分子構造レベルで解明することを目的とした。まず、高分解能の外向型構造が得られていない現状を解決するため、CmABC_{B1} の内向型構造を不安定化する QTA 変異により、高分解能で外向型の結晶構造を解明することを達成した。QTA 変異体の内向型構造も解明することにより、同一分子由来の内向型・外向型構造比較を初めて可能とした。内向型・外向型構造比較から、ATP 結合が NBD の二量体化を引き起こし、TMD が外向型へと構造変化するメカニズムが示唆された。また、多剤輸送を可能とする装置を見出した。

QTA 変異体構造から示唆された交互アクセスモデルを支える装置の役割を、別の変異体の結晶構造解析、生化学的活性測定により明らかにした。TM1-TM3 ジョイントに立体障害を加えた G132V 変異体は、その外向型結晶構造、ATP 加水分解活性測定から、第一章で予想したように TM1-TM3 ジョイントが TMD の細胞内側の動きと細胞外側の動きを伝達していると示された。基質排出ゲートへの G143W 変異は、G143W 変異体内向型構造と ATP 加水分解活性測定の結果から、CmABC_{B1} の基質排出ゲートと NBD が共役していることを示した。また、G143W 変異体の外向型構造と薬剤耐性試験の結果から、第一章で薬剤排出通路と予想された部位を薬剤が通っていることが示唆された。

予想される CmABC_{B1} の輸送メカニズムを提唱する (図 4-1)。内向型から外向型への構造変化は NBD への ATP・Mg²⁺ 結合により引き起こされ、Q-loop-Mg²⁺ の相互作用からヘリカルサブドメイン、IH の側鎖のファンデルワールス相互作用によって NBD の動きが TMD に伝達される。TMD の細胞内側ではチャンバー収縮レギュレーターを介した TM3-TM3*、TM3-TM6*、TM3*-TM6 の相互作用によって細胞内側が閉じられる。細胞内側の動きは TM ジョイントによって TMD の細胞外側へと伝達される。細胞外側で TM1 と TM6 が離れて疎水性アミノ酸残基によるファンデルワールス相互作用クラスターが破壊される。特に Phe138、Phe142、Phe384 が分子中央から離れることで薬剤排出通路を形成する。この構造変化において、内向型で分子内腔に取り込まれていた基質はチャンバー収縮レギュレーターによって細胞内への逆戻りが防がれて輸送体内に閉じ込められ、細胞外側に存在する空洞に押し上げられて排出される。NBD の RE-latch

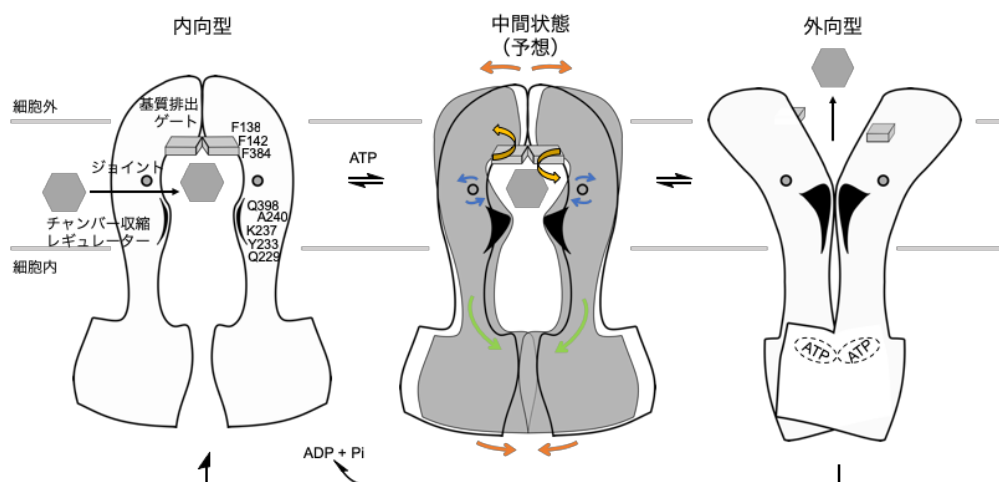


図 4-1. CmABCB1 交互アクセスモデル

がNBD二量体化を安定化することで、基質が排出されるまで外向型状態を保つ。ATP加水分解後は、TM3、TM3*、TM6、TM6*にヘリックスのひずみという形で蓄えられたエネルギーを利用して外向型から内向型へと構造変化をする。

CmABCB1はヒトABCB1と機能が近いことから、本研究で明らかになった輸送メカニズムはヒトABCB1にも適用できると考えられ、ヒトABCB1の多剤輸送メカニズムの理解を助けるものである。

引用文献

1. Jardetzky, O., Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* **1966**, *211* (5052), 969-70.
2. Yamashita, A.; Singh, S. K.; Kawate, T.; Jin, Y.; Gouaux, E., Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* **2005**, *437* (7056), 215-223.
3. Krishnamurthy, H.; Gouaux, E., X-ray structures of LeuT in substrate-free outward-open and apo inward-open states. *Nature* **2012**, *481* (7382), 469-474.
4. Yernool, D.; Boudker, O.; Jin, Y.; Gouaux, E., Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* **2004**, *431* (7010), 811-8.
5. Verdon, G.; Oh, S.; Serio, R. N.; Boudker, O., Coupled ion binding and structural transitions along the transport cycle of glutamate transporters. *Elife* **2014**, *3*, e02283.
6. Drew, D.; Boudker, O., Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annual Review of Biochemistry* **2016**, *85* (1), 543-572.
7. Shi, Y., Common Folds and Transport Mechanisms of Secondary Active Transporters. *Annual Review of Biophysics* **2013**, *42* (1), 51-72.
8. Dyla, M.; Kjærgaard, M.; Poulsen, H.; Nissen, P., Structure and Mechanism of P-Type ATPase Ion Pumps. *Annual Review of Biochemistry* **2020**, *89* (1), 583-603.
9. Dassa, E.; Bouige, P., The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology* **2001**, *152* (3), 211-229.
10. Rees, D. C.; Johnson, E.; Lewinson, O., ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2009**, *10* (3), 218-227.
11. Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **2001**, *11* (7), 1156-66.
12. Juliano, R. L.; Ling, V., A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **1976**, *455* (1), 152-62.
13. Chen, C. J.; Chin, J. E.; Ueda, K.; Clark, D. P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Roninson, I. B., Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **1986**, *47* (3), 381-9.
14. Ueda, K.; Cardarelli, C.; Gottesman, M. M.; Pastan, I., Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad*

Sci U S A **1987**, *84* (9), 3004-8.

15. Szakács, G.; Váradi, A.; Ozvegy-Laczka, C.; Sarkadi, B., The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* **2008**, *13* (9-10), 379-93.
16. Szakacs, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M., Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (3), 219-34.
17. Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G., Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **2009**, *323* (5922), 1718-22.
18. Ward, A. B.; Szewczyk, P.; Grimard, V.; Lee, C. W.; Martinez, L.; Doshi, R.; Caya, A.; Villaluz, M.; Pardon, E.; Cregger, C.; Swartz, D. J.; Falson, P. G.; Urbatsch, I. L.; Govaerts, C.; Steyaert, J.; Chang, G., Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (33), 13386-91.
19. Li, J.; Jaimes, K. F.; Aller, S. G., Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci* **2014**, *23* (1), 34-46.
20. Szewczyk, P.; Tao, H.; McGrath, A. P.; Villaluz, M.; Rees, S. D.; Lee, S. C.; Doshi, R.; Urbatsch, I. L.; Zhang, Q.; Chang, G., Snapshots of ligand entry, malleable binding and induced helical movement in P-glycoprotein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2015**, *71* (Pt 3), 732-41.
21. Nicklisch, S. C.; Rees, S. D.; McGrath, A. P.; Gokirmak, T.; Bonito, L. T.; Vermeer, L. M.; Cregger, C.; Loewen, G.; Sandin, S.; Chang, G.; Hamdoun, A., Global marine pollutants inhibit P-glycoprotein: Environmental levels, inhibitory effects, and cocrystal structure. *Sci Adv* **2016**, *2* (4), e1600001.
22. Esser, L.; Zhou, F.; Pluchino, K. M.; Shiloach, J.; Ma, J.; Tang, W. K.; Gutierrez, C.; Zhang, A.; Shukla, S.; Madigan, J. P.; Zhou, T.; Kwong, P. D.; Ambudkar, S. V.; Gottesman, M. M.; Xia, D., Structures of the Multidrug Transporter P-glycoprotein Reveal Asymmetric ATP Binding and the Mechanism of Polyspecificity. *J Biol Chem* **2017**, *292* (2), 446-461.
23. Le, C. A.; Harvey, D. S.; Aller, S. G., Structural definition of polyspecific compensatory ligand recognition by P-glycoprotein. *IUCrJ* **2020**, *7* (4), 663-672.
24. Jin, M. S.; Oldham, M. L.; Zhang, Q.; Chen, J., Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2012**, *490* (7421), 566-9.
25. Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nakatsu, T.; Sakiyama, K.; Hipolito, C. J.; Fujioka, A.; Hirokane, R.; Ikeguchi, K.; Watanabe, B.; Hiratake, J.; Kimura, Y.; Suga, H.; Ueda, K.; Kato, H., Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proc Natl Acad Sci U*

S A **2014**, *111* (11), 4049-54.

26. Alam, A.; Kung, R.; Kowal, J.; McLeod, R. A.; Tremp, N.; Broude, E. V.; Roninson, I. B.; Stahlberg, H.; Locher, K. P., Structure of a zosuquidar and UIC2-bound human-mouse chimeric ABCB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115* (9), E1973-E1982.
27. Alam, A.; Kowal, J.; Broude, E.; Roninson, I.; Locher, K. P., Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein. *Science* **2019**, *363* (6428), 753+.
28. Thonghin, N.; Collins, R. F.; Barbieri, A.; Shafi, T.; Siebert, A.; Ford, R. C., Novel features in the structure of P-glycoprotein (ABCB1) in the post-hydrolytic state as determined at 7.9 Å resolution. *BMC Structural Biology* **2018**, *18* (1), 17.
29. Nosol, K.; Romane, K.; Irobalieva, R. N.; Alam, A.; Kowal, J.; Fujita, N.; Locher, K. P., Cryo-EM structures reveal distinct mechanisms of inhibition of the human multidrug transporter ABCB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117* (42), 26245-26253.
30. Dawson, R. J.; Locher, K. P., Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **2006**, *443* (7108), 180-5.
31. Dawson, R. J.; Locher, K. P., Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett* **2007**, *581* (5), 935-8.
32. Ward, A.; Reyes, C. L.; Yu, J.; Roth, C. B.; Chang, G., Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (48), 19005-10.
33. Kerr, I. D.; Jones, P. M.; George, A. M., Multidrug efflux pumps: The structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. *The FEBS Journal* **2010**, *277* (3), 550-563.
34. Gutmann, D. A. P.; Ward, A.; Urbatsch, I. L.; Chang, G.; van Veen, H. W., Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1. *Trends in Biochemical Sciences* **2010**, *35* (1), 36-42.
35. Polissi, A.; Georgopoulos, C., Mutational analysis and properties of the msbA gene of *Escherichia coli*, coding for an essential ABC family transporter. *Mol Microbiol* **1996**, *20* (6), 1221-33.
36. Zhou, Z.; White, K. A.; Polissi, A.; Georgopoulos, C.; Raetz, C. R., Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *J Biol Chem* **1998**, *273* (20), 12466-75.
37. Beck, A.; Aänismaa, P.; Li-Blatter, X.; Dawson, R.; Locher, K.; Seelig, A., Sav1866 from *Staphylococcus aureus* and P-glycoprotein: similarities and differences in ATPase activity assessed with detergents as allocrites. *Biochemistry* **2013**, *52* (19), 3297-309.
38. Kim, Y.; Chen, J., Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-

facing conformation. *Science* **2018**, 359 (6378), 915-919.

39. Ambudkar, S. V.; Lelong, I. H.; Zhang, J.; Cardarelli, C. O.; Gottesman, M. M.; Pastan, I., Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, 89 (18), 8472-6.
40. Sharom, F. J.; Yu, X.; Chu, J. W.; Doige, C. A., Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochem J* **1995**, 308 (Pt 2), 381-90.
41. Sato, T.; Kodan, A.; Kimura, Y.; Ueda, K.; Nakatsu, T.; Kato, H., Functional role of the linker region in purified human P-glycoprotein. *FEBS j* **2009**, 276 (13), 3504-16.
42. Senior, A. E.; Al-Shawi, M. K.; Urbatsch, I. L., The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Letters* **1995**, 377 (3), 285-289.
43. Rosenberg, M. F.; Velarde, G.; Ford, R. C.; Martin, C.; Berridge, G.; Kerr, I. D.; Callaghan, R.; Schmidlin, A.; Wooding, C.; Linton, K. J.; Higgins, C. F., Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *Embo j* **2001**, 20 (20), 5615-25.
44. Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V., Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97 (6), 2515-20.
45. Moeller, A.; Lee, S. C.; Tao, H.; Speir, J. A.; Chang, G.; Urbatsch, I. L.; Potter, C. S.; Carragher, B.; Zhang, Q., Distinct conformational spectrum of homologous multidrug ABC transporters. *Structure* **2015**, 23 (3), 450-460.
46. Verhalen, B.; Dastvan, R.; Thangapandian, S.; Peskova, Y.; Koteiche, H. A.; Nakamoto, R. K.; Tajkhorshid, E.; McHaourab, H. S., Energy transduction and alternating access of the mammalian ABC transporter P-glycoprotein. *Nature* **2017**, 543 (7647), 738-741.
47. Nakamura, K.; Niimi, M.; Niimi, K.; Holmes, A. R.; Yates, J. E.; Decottignies, A.; Monk, B. C.; Goffeau, A.; Cannon, R. D., Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, 45 (12), 3366-74.
48. Kabsch, W., XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, 66 (Pt 2), 125-32.
49. Emsley, P.; Cowtan, K., Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, 60 (Pt 12 Pt 1), 2126-32.
50. Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J., Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1997**, 53 (Pt 3), 240-55.
51. Adams, P. D.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Hung, L. W.; Ioerger, T. R.; McCoy, A. J.;

Moriarty, N. W.; Read, R. J.; Sacchettini, J. C.; Sauter, N. K.; Terwilliger, T. C., PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2002**, 58 (Pt 11), 1948-54.

52. Schrödinger, L. L. C., The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. **2015**.

53. Sauna, Z. E.; Kim, I. W.; Ambudkar, S. V., Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1). *J Bioenerg Biomembr* **2007**, 39 (5-6), 481-7.

54. Williams, C. J.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Prisant, M. G.; Videau, L. L.; Deis, L. N.; Verma, V.; Keedy, D. A.; Hintze, B. J.; Chen, V. B.; Jain, S.; Lewis, S. M.; Arendall, W. B., 3rd; Snoeyink, J.; Adams, P. D.; Lovell, S. C.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C., MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci* **2018**, 27 (1), 293-315.

55. Oldham, M. L.; Grigorieff, N.; Chen, J., Structure of the transporter associated with antigen processing trapped by herpes simplex virus. *Elife* **2016**, 5.

56. Abele, R.; Tampé, R., The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)* **2004**, 19, 216-24.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科、加藤博章教授に深甚の謝意を表します。X線回折実験や構造解析のご指導、ご助言賜りました、中津亨准教授に厚く御礼申し上げます。本研究に多大な貢献を賜り、著者の実験指導も賜りました、山口知宏助教（現 株式会社 FuturedMe）、小段篤史博士に深く感謝申し上げます。本論文完成にお力添えを賜りました、潘東青助教に謝意を表します。

第一章の内容に関してご指導、ご助言賜りました京都大学大学院農学研究科、植田和光教授、木村泰久助教（現 同准教授）に深く感謝いたします。

折に触れて有益なご討論、ご助言を賜りました横浜市立大学大学院生命医科学研究科、木寺詔紀教授、並びに京都大学大学院薬学研究科、高須清誠教授に厚く感謝申し上げます。

著者の実験にご協力いただきました、水沼諒学士をはじめとする京都大学大学院薬学研究科構造生物薬学分野諸氏に御礼申し上げます。

最後に、著者が研究活動に専念できるようご支援いただきました両親に深謝いたします。

論文目録

第一章 QTA 変異導入による内向型・外向型状態の結晶構造の決定

本章の内容は次の学術論文により公表

Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABCB1

(ホモ二量体型 P 糖タンパク質 CmABCB1 の内向型と外向型の X 線結晶構造)

Atsushi Kodan, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Keita Matsuoka, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda & Hiroaki Kato

Nature Communications (2019) Volume 10, Article number: 88 に掲載

第二章 TM1-TM3 ジョイントの改変による外向型状態への平衡移動

本章の内容は次の題目の学術論文により公表予定

Crystal structure of CmABCB1 G132V mutant favoring the outward-facing state reveals mechanism of the pivotal joint between TM1 and TM3

(G132V 変異体 CmABCB1 結晶構造解析による TM1-TM3 ジョイントメカニズム解明)

未発表

第三章 細胞外側の基質排出ゲートの改変が細胞内の ATPase 部位に及ぼす影響

本章の内容は次の題目の学術論文により公表予定

Structural requirements of the efflux gate in the transport mechanism of CmABCB1 multidrug transporter

(CmABCB1 基質輸送メカニズムにおける基質排出ゲートの分子基盤)

未発表