

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.....	ii
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
要約.....	22
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.....	23
要約.....	23
結論.....	24
引用文献.....	26
謝辞.....	31
論文目録.....	32

略号一覽

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) 空洞が細胞内に開いた状態（内向型状態）と細胞外に開いた状態（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

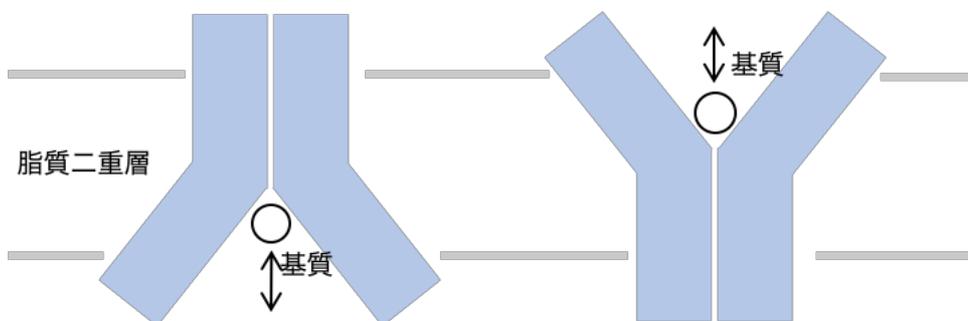


図 0-1. 膜貫通輸送体の交互アクセスモデル図

(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。

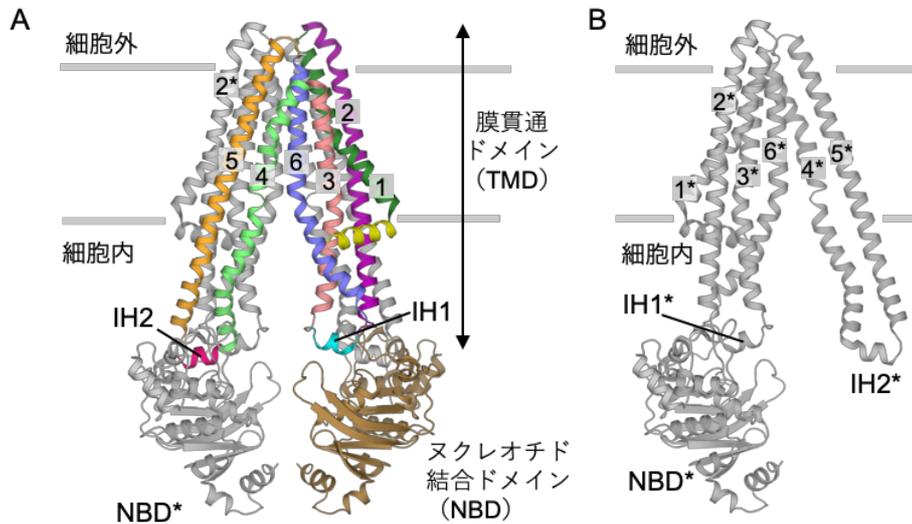


図 0-2. CmABCB1 内向型構造

(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、

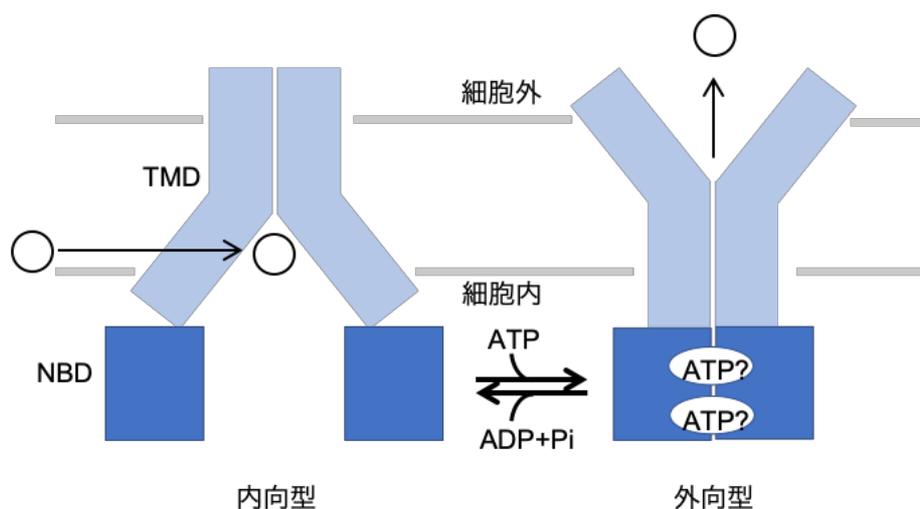


図 0-3. 予想される ABCB1 交互アクセスモデル

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ふ 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)。

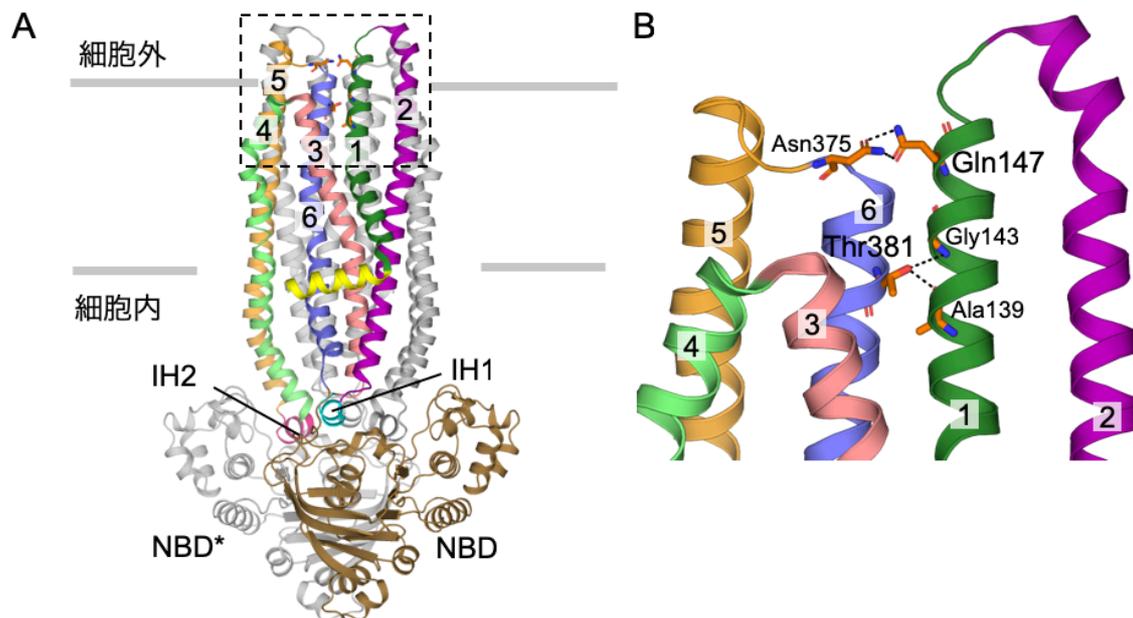


図 1-1. CmABCB1 内向型構造における TM1 と TM6 の間の水素結合

(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、クライオロープは 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>P4₁32</i>	<i>P4₁32</i>	<i>R32</i>
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)
R_{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
$I/\sigma I$	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
R_{work}/R_{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

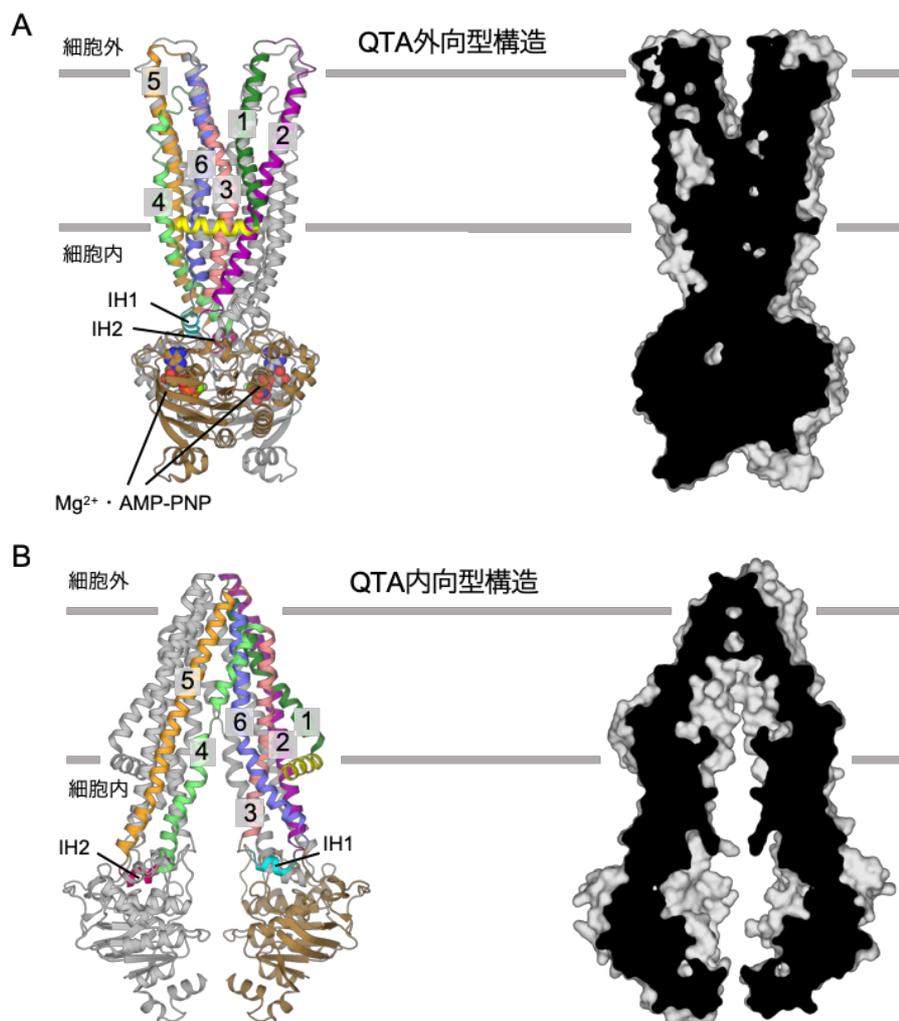


図 1-2. QTA 変異体結晶構造

(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。

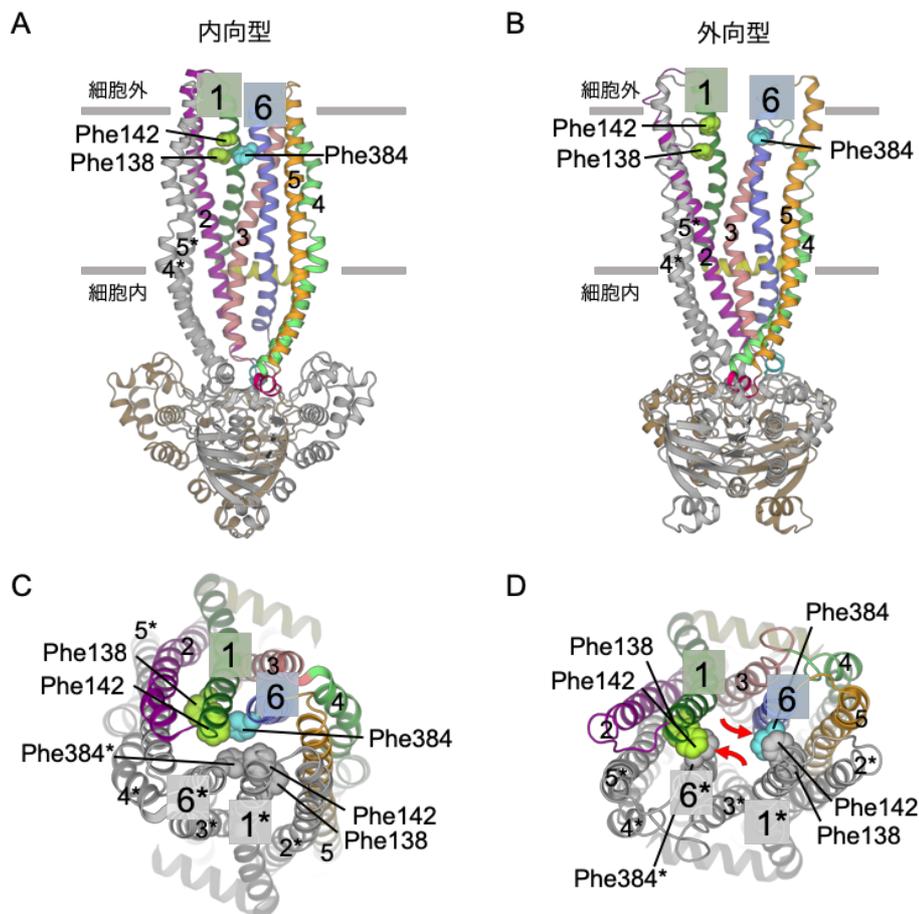


図 1-3. 細胞外側を開く TM1 と TM6

(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)。

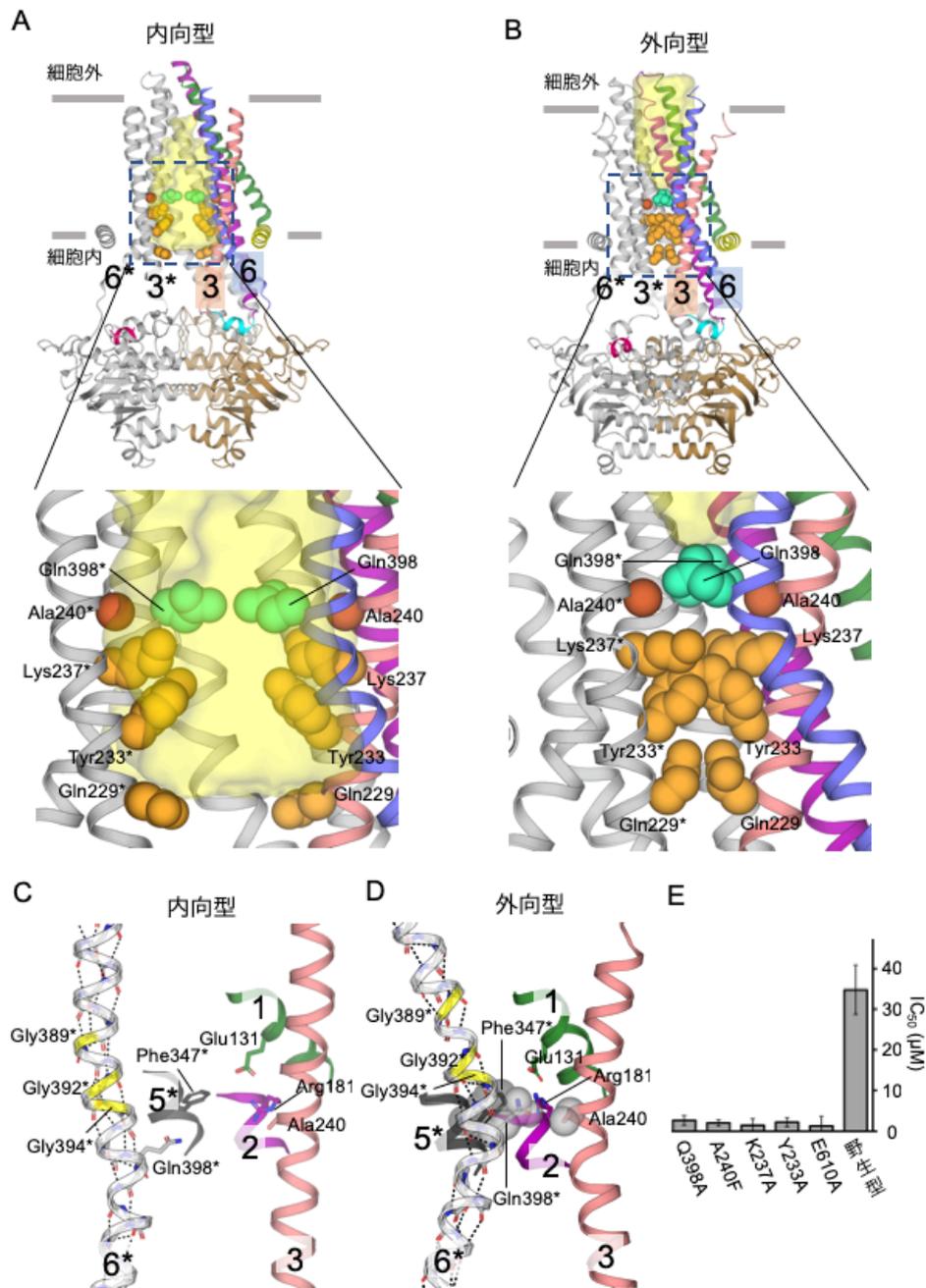


図 1-4. 細胞内側空洞の体積を調節する TM3 と TM6

(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。

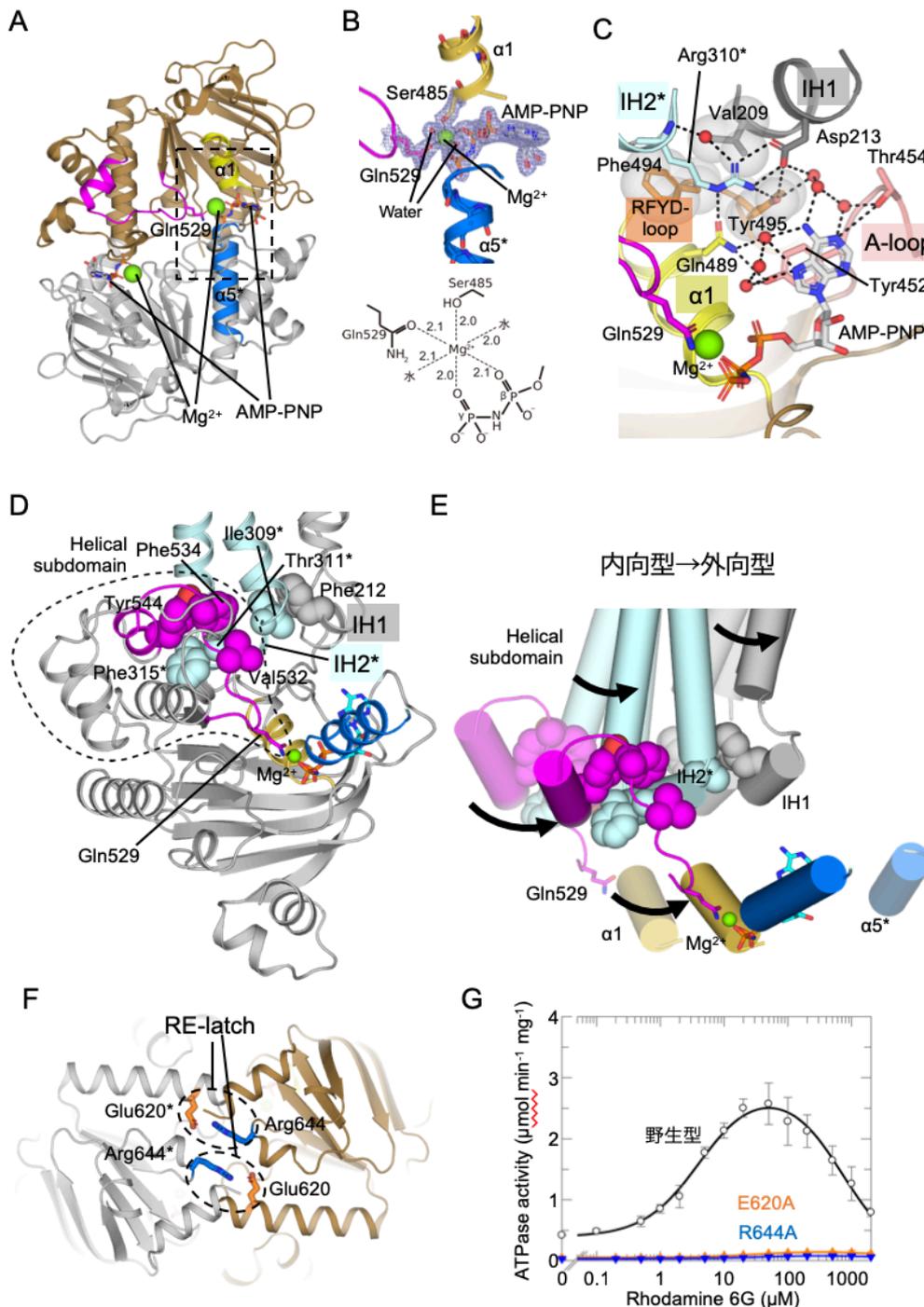


図 1-5. 外向型 NBD 構造

(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 2F_o-F_c 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。

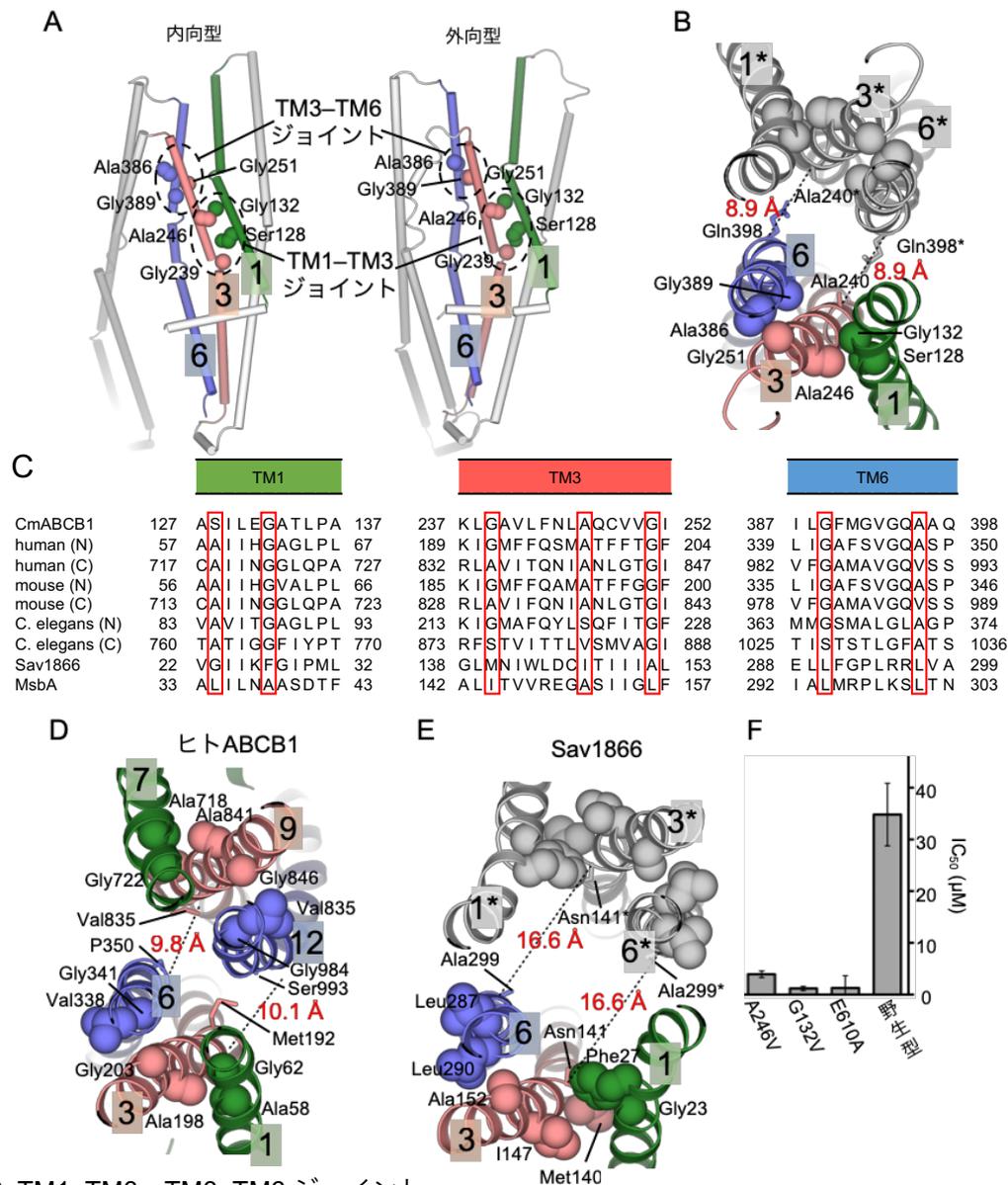


図 1-6. TM1-TM3、TM3-TM6 ジョイント

(A) CmABCB1 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) CmABCB1 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) ABCB1 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。CmABCB1 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 ABCB1 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。CmABCB1 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 CmABCB1 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。CmABCB1 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。CmABCB1 の Ala240、Gln398 に相当するアミノ酸残基を stick 表示で示す。(E)、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

要約

TM1-TM3 ジョイントが立体構造変化の平衡状態に及ぼす影響を解明するため、ジョイントを構成する Gly132 を側鎖の大きい Val に変える G132V 変異体を作成し、結晶構造を決定した。その構造は外向型であり、内向型状態の結晶は得られなかった。立体構造の観測から Val 側鎖の立体障害によって、細胞膜に対して垂直に並んだ TM1 と TM3 は細胞外側が開くように構造変化していることがわかった。G132V 変異によって外向型状態を取りやすくなったことが示唆されたため、第一章で予想した通り TM1-TM3 ジョイントが TMD の細胞内側、細胞外側それぞれの動きを伝達すると示された。

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

要約

これまでの構造解析から交互アクセスモデルでは、細胞外側に位置する基質排出ゲートの開閉と細胞内に位置する ATPase ドメイン (NBD) の活性との共役が存在する、と予想される。すなわち、内向型状態では、基質排出ゲートは閉じて、NBD 二量体は単量体に解離する。一方、外向型状態では、NBD は ATP と結合して会合し二量体となり、基質排出ゲートは開く。そして、ATP が加水分解されることで外向型から内向型へと戻る。この一連の構造変化における基質輸送と ATPase 反応の共役を調べるため、細胞外ゲートに立体障害が加わるような変異体を作製した。基質排出ゲートを構成する TM1 と TM6 が密接している部位の Gly-Gly ペアに着目し、一方の Gly を Trp に変えた変異体を作製した。変異体の内向型結晶構造を解析した結果、導入した Trp が基質排出ゲートを押し広げる様子が観測された。つまり、変異が基質排出ゲートを開きやすくしていることが示唆された。そして ATPase 活性を測定した結果、分子活性と ATP に対する親和性が増大していた。基質排出ゲートの開きやすさが NBD の ATPase 活性に影響を与えることが明らかになり、基質排出ゲートの開閉と ATPase が共役していることが示唆された。

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。

第二章、第三章では第一章で見出された装置が実際に機能していることを、別の変異体を作製し、結晶構造解析、生化学的な機能解析の結果から示した。

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、TM142、TM384 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

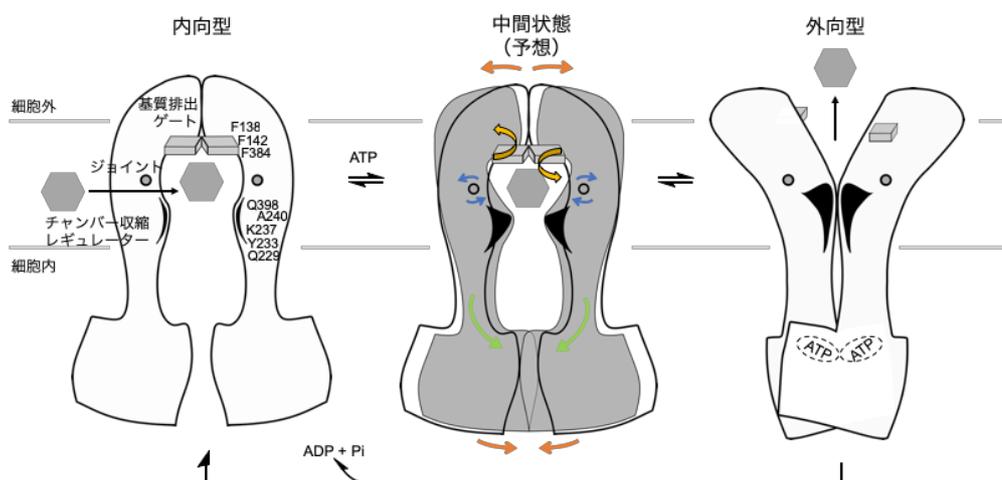


図 4-1. CmABCB1 交互アクセスモデル

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 crystallographica. Section D, Biological crystallography* **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. *The FEBS journal* **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 crystallographica. Section D, Biological crystallography* **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 crystallographica. Section D, Biological crystallography* **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.

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