

(論文内容の要旨)

序論

P 糖タンパク質(P-gp)は ATP の加水分解エネルギーとの共役によって構造の異なる種々の薬物を細胞外へと排出する **ABC(ATP-binding cassette)**トランスポーターである。**P-gp** の作動機構の詳細は未だに解明されておらず、基質輸送と ATP 加水分解の共役様式や、幅広い基質特異性を示す仕組みの解明が待たれている。**P-gp** はアミノ酸配列に基づいた二次構造予測により、6 回膜貫通領域と細胞内のヌクレオチド結合領域から構成される基本構造単位が、76 残基にわたるリンカーで繋がった構造であると推定されている。ところが、細菌などの **ABC** トランスポーターは基本構造単位の二量体構造をしており、リンカーを欠いている。従って、このリンカーは **P-gp** に特徴的な部位であり、作動機構における役割に興味を持たれている。また、**P-gp** の作動機構の解明には、詳細な立体構造情報が不可欠である。しかし、これまでに **P-gp** は無論のこと、そのホモログについても X 線結晶解析された例はほとんどない。これは、**P-gp** が膜タンパク質であるため、X 線結晶構造解析に適した結晶が得られ難いことに起因する。

そこで、本研究では高度に精製した **P-gp** を用いて、**P-gp** の作動機構におけるリンカーの役割を解明した。さらに、**P-gp** の立体構造基盤解明を目指し、立体構造の安定な好熱菌由来の **P-gp** ホモログをスクリーニングし、結晶化に適したものを見いだすとともに、その結晶を得ることに成功した。

第一章 P 糖タンパク質の作動機構におけるリンカー領域の役割の解明

P-gp のリンカー領域 (**Glu⁶³³ - Tyr⁷⁰⁹**) の役割を調べるため、このリンカーのみが切断された **P-gp** の調製を試みた。すなわち、精製した **P-gp** を数種類のプロテアーゼにより限定加水分解を行い、N 末端配列解析により切断部位を同定した。その結果、**P-gp** はリンカー領域のみが切断を受けることが明らかになった。このことから、リンカー領域は **P-gp** の構造中で最もフレキシブルな領域であることが示唆された。

次に、リンカーを切断した **P-gp** と未切断の **P-gp** の性質を比較することにより、リンカーの役割について調べた。リンカーを切断した **P-gp** は、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて未切断の **P-gp** と同じ溶出位置に溶出され、熱安定性についても未切断の **P-gp** と同等であり、さらに **P-gp** の特徴である基質輸送に伴う ATP 加水分解 (**ATPase**)活性も有していた。従って、**P-gp** のリンカーを切断しても、立体構造の保持や機能発現そのものには影響しないことが示された。さらに、基質輸送に伴う **ATPase** 活性の詳しい速度論的解析を行った。その結果、リンカーの切断により k_{cat} 値は輸送基質の有無に関わらず上昇し、特に輸送基質がない時、すなわち基質輸送と共役しない **ATPase** 活性がより大きく上昇することが示された。一方、輸送基質の特異性はリンカーの切断によって変化することも判明した。従って、リンカーは基質特異性と **ATPase** 活性を制御することによって、ATP 加水分解のエネルギーを効率的に基質輸送に用いることができるようにしていると考えられた。このことは、**P-gp** の細菌由来ホモログである **MsbA** の立体構造にリンカーが付加された立体構造モデルに基づいた考察からも支持された。

第二章 結晶化に適した P 糖タンパク質ホモログの迅速かつ効率的なスクリーニング

高温環境下で生息する好熱菌のタンパク質は、熱に対する安定性が高いことから立体構造が強固にできており、結晶化に適すると考えられている。そこで、8 種類の好熱菌(始原菌と原生細菌を含む)に由来する 23 種類の P-gp ホモログの中から結晶化に適したものをスクリーニングした。迅速化と効率化のため、クローニングにはハイスループットクローニング法の 1 つである positional hetero-stagger PCR 法を用い、多サンプルを同時に処理するようにした。また、発現精製は P-gp ホモログのスクリーニングに適していると思われる一条件に固定して、擬陽性を排除してできるだけ結晶化能の高いものを選抜できるようにした。

まず、種々の好熱菌のゲノム DNA から目的遺伝子を PCR にて増幅し、大腸菌発現用のベクターに直接クローニングした。この際、精製を容易にするため His-tag を融合した。目的遺伝子の発現には、大腸菌 C41 株を用い 0.5 mM IPTG により目的遺伝子の発現を誘導した。抗 His-tag 抗体による Western blotting により発現を確認した結果、16 種類のホモログについて発現が確認されたので、これらについて精製を行った。目的タンパク質精製溶媒界面活性剤として n-dodecyl- β -D-maltopyranoside を用い、His-tag アフィニティによる 1 段階精製の後、結晶化能の有力な指標となる単分散性をゲル濾過クロマトグラフィーにて評価した。その結果から 7 種類の P-gp ホモログを選抜して結晶化条件の初期スクリーニングを行ったところ、*Pyrococcus horikoshii* 由来の 1 種類のホモログについて結晶が得られた。このホモログについてさらに結晶化条件を検討し、得られた結晶の X 線回折実験を行った。結晶の空間群は $P4_12_12$ (又は $P4_32_12$) と $P2_12_12$ の 2 種類が観測され、それぞれの最高分解能は 8.0 Å と 8.5 Å であった。結晶化に適した P-gp ホモログを選抜するまでにかかった期間は、遺伝子のクローニング開始から僅か 3 ヶ月であり、最初の結晶化スクリーニングにより結晶が得られた。この結果は、P-gp ホモログの結晶解析に新たな道を開いただけでなく、本研究によって開発された方法を適用することによって、これまで数年にわたる時間が必要であった膜タンパク質の結晶化を大幅に短縮できることを示している。

以上、本研究では P-gp の基質輸送と ATPase 活性の共役、および P-gp の持つ幅広い基質特異性の発揮には、リンカー領域が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、P-gp の詳細な作動機構の解明には立体構造解析が必須であるが、好熱菌のタンパク質の安定性に着目して短期間に P-gp ホモログの結晶化に成功した。これらの成果は P-gp の作動機構の一端を解明するとともに、詳細な構造機能解明への基盤を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、多剤排出トランスポーターP糖タンパク質(P-gp)の構造と作動機構の解明を行ったものである。P-gpは、ATPの加水分解エネルギーとの共役によって構造の異なる種々の薬物を細胞外へと排出するABC(ATP-binding cassette)トランスポーターである。P-gpの作動機構については不明の点が多く残されており、特に、基質輸送とATP加水分解の共役の仕組みや、幅広い基質特異性を制御する仕組みの解明が待たれている。

第一章においては、P-gp分子中に存在する2つの繰り返し構造単位をつなぐリンカー領域(Glu⁶³³—Tyr⁷⁰⁹)に着目してP-gpの作動機構を解明するための研究を行った。まず、プロテアーゼを用いた限定加水分解とN末端配列解析の結果から、このリンカー領域が分解を受けやすいフレキシブルな領域であることを示した。次に、リンカーを切断しても立体構造の保持や機能発現そのものには影響しないことを、ゲル濾過分析、熱安定性、そして、P-gpの特徴である基質輸送に伴うATP加水分解(ATPase)活性の挙動から明らかにした。さらに、基質輸送に伴うATPase活性の詳しい速度論的解析を行った結果、リンカーの切断により分子活性 k_{cat} 値は輸送基質の有無に関わらず上昇し、特に輸送基質がない時、すなわち基質輸送と共役しないATPase活性がより大きく上昇することを見いだした。一方、輸送基質の特異性はリンカーの切断によって変化することも判明した。すなわち、P-gpのリンカーは、基質特異性とATPase活性を制御することによって、ATP加水分解のエネルギーを効率的に基質輸送に用いることができるように機能していると考えられた。このことは、P-gpの細菌由来ホモログであるMsbAの立体構造にリンカーが付加された立体構造モデルに基づいた考察からも支持された。

第2章においては、P-gpの立体構造基盤解明を目指し、8種類の好熱菌(始原菌と原生細菌を含む)に由来する23種類のP-gpホモログの中から結晶化に適したものをスクリーニングにより発見した。そのスクリーニ

ングは、迅速かつ効率よく行うため、以下の点を工夫して行われた。まず、遺伝子クローニングは positional hetero-stagger PCR 法によりハイスループットに行った。また、発現には膜タンパク質の発現に適しているとされる大腸菌 C41 株を用い、発現精製は汎用性の高い一条件に固定して効率化した。さらに、結晶化能の有力な指標となる分子の単分散性をゲル濾過分析にて評価することにより、確率を高めてから結晶化を行った。結晶化条件の初期スクリーニングの結果、*Pyrococcus horikoshii* 由来の 1 種類のホモログについて結晶を得ることに成功した。X 線解析の結果、得られた結晶は最高で 8.0 Å 分解能を与えたことから、このホモログは、結晶性の改良によって構造決定に至ることができるものと期待される。また、本研究によって開発された方法は、これまで数年にわたる時間が必要であった膜タンパク質の結晶化を大幅に短縮できるものであることが示された。

以上本研究は、P-gp の基質輸送における ATP 駆動力の共役機構、および幅広い基質特異性の制御には、リンカー領域が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、P-gp の作動機構の解明には必須となる立体構造解析に向けて、好熱菌由来 P-gp ホモログの結晶を提供することができた。これらの成果は薬物動態の中核となる P-gp の作動機構の一端を解明するとともに、詳細な構造機能解明への基盤を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 21 年 2 月 23 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公開可能日： 平成 22 年 4 月 1 日以降