

(論文内容の要旨)

序論

P 糖タンパク質は、ATP binding cassette (ABC)トランスポーターに属し、ATP 加水分解のエネルギーを利用して細胞内から多様な化合物を排出する。P 糖タンパク質の癌細胞での高発現は癌における多剤耐性の一因であるため、癌の化学治療における深刻な問題となる。この問題を解決するためには、P 糖タンパク質の基質輸送メカニズムを原子レベルで明らかにする必要がある。しかし、P 糖タンパク質は、単離精製が困難であり、X 線結晶構造解析を行うことが難しい。そこで、P 糖タンパク質ホモログである大腸菌由来 MsbA の X 線結晶構造解析を行うことによって、P 糖タンパク質の構造基盤の解明を目指した。

MsbA は、lipid A を細菌の細胞内膜の細胞質側からペリプラズム側へ輸送するトランスポーターである。一方、P 糖タンパク質の基質であるいくつかの薬剤も MsbA の基質となることが報告されており、一次配列においても、P 糖タンパク質と約 30% の Identity を持つ。したがって MsbA は、P 糖タンパク質の構造解析におけるモデルタンパク質として有用だと考えられる。本研究では、MsbA の立体構造を解明することを目的として、大腸菌由来 MsbA の大量調製法を確立し、結晶化条件の探索を行った。また、タンパク質工学的改変によって結晶の改良を行い、4.0 Å 分解能での構造解析を実施した。

第一章 X 線結晶構造解析に向けた MsbA の大量調製法の確立

X 線結晶構造解析に必要な大量の精製 MsbA を効率的に得るため、ファーメンターを用いた大腸菌の高密度培養を実施した。発現には大腸菌 C41 (DE3) 株を用いた。溶存酸素濃度を 30%に維持するため、攪拌回転数、通気量および通気酸素濃度を自動制御した。発現誘導は、対数増殖期である菌体濃度 $OD_{600} = 15$ において、終濃度 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside を添加した後、2 時間培養することによって行った。その結果、3 L 培養あたり約 180 g の菌体を得られ、約 60 mg の精製 MsbA を調製することが可能となった。1 L 培養あたりの精製 MsbA の収量は、従来のフラスコ培養の約 10 倍上昇した。ファーメンターによる高密度培養を行うことによって、一度に大量かつ均質の精製 MsbA を得ることが可能となり、結晶化スクリーニングの体制を確立した。

第二章 MsbA の輸送基質のスクリーニングと結晶化条件の探索

第一章で効率的に入手可能となった精製 MsbA を用いて、輸送基質との複合体として新規の立体構造を明らかにするため、輸送基質の探索及び共結晶化の条件をスクリーニングした。

MsbA の輸送基質となる化合物の探索を行った。P 糖タンパク質の輸送基質として知られる約 20 種類の化合物を用いて、化合物依存的な MsbA の ATPase 活性の解析を行った。その結果、バリノマイシンによる濃度依存的な活性上昇がみられ、バリノマイシンが MsbA の輸送基質となることが示唆された。

次に、精製 MsbA とバリノマイシンの共結晶化を行ったところ、沈殿剤条件 20%(w/v) polyethylene glycol 3350, 0.2 M Na,K-tartrate, 0.02 M Tris-Cl pH 7.5 で結晶が得られた。この結晶は、空間群 $P1$ 、格子定数 $a = 92.6 \text{ \AA}$, $b = 106.8 \text{ \AA}$, $c = 112.0 \text{ \AA}$, $\alpha = 83.9^\circ$, $\beta = 74.1^\circ$, $\gamma = 82.3^\circ$ であり、分解能は $4.0 \text{ \AA}$ であった。分子置換法による構造解析では妥当な解は得られなかったものの、輸送基質との結合によって膜貫通領域が固定されたことにより、分解能が向上した。

第三章 タンパク質工学的手法による MsbA 結晶の改良と全体構造の決定

大腸菌由来 MsbA は、リガンドなしの状態において低分解能 ($5.5 \text{ \AA}$) で結晶構造が決定されている。この結晶構造は、C 末端の 20 残基で構成される α ヘリックスが、他の分子の同じ領域と相互作用することによって細胞質側に大きく開いた構造であった。この相互作用を除いて結晶のパッキングを変えることによって、新たな結晶構造が得られる可能性があると考えられたため、この α ヘリックスの欠損変異体 ($\Delta C20$) を作製した。精製 $\Delta C20$ は、全長 MsbA と比較して、 $1/4$ の ATPase 活性を保持していた。さらに、2'3'-o-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosin 5'-triphosphate を用いて結合実験を行ったところ、 $\Delta C20$ は全長 MsbA と同等の結合親和性を示した。これらの結果から、 $\Delta C20$ は全長 MsbA と同様の立体構造を保持していることが示唆された。

$\Delta C20$ の結晶化スクリーニングを行ったところ、ATP アナログである adenylyl imidodiphosphate 存在下、沈殿剤条件 21.5%(w/v) polyethylene glycol 400, 0.1 M Na-formate, 0.1 M Tris-Cl pH 7.5 において結晶が得られた。結晶学的パラメータは、空間群 $P1$ 、格子定数 $a = 110.3 \text{ \AA}$, $b = 144.8 \text{ \AA}$, $c = 155.9 \text{ \AA}$, $\alpha = 67.0^\circ$, $\beta = 70.6^\circ$, $\gamma = 70.6^\circ$ 、分解能は $4.0 \text{ \AA}$ であった。この測定データを用いて、サルモネラ菌由来 MsbA をスタートモデルとして分子置換法による構造解析を行った。その結果、C 末端の α ヘリックスによる相互作用を無くすことによって細胞質ドメインが閉じ、ペリプラズム側に開いた構造となった。これは、大腸菌由来 MsbA において新規の構造であった。

以上、本研究では、P 糖タンパク質ホモログである MsbA を用いて X 線結晶構造解析を行った。高密度培養によって大量かつ均質の MsbA を調製可能にし、結晶化スクリーニングの体制を確立した。バリノマイシンが輸送基質となることを明らかにし、共結晶化によって結晶の分解能を向上させた。C 末端 α ヘリックス欠損変異体を作製、結晶化し、新しい分子構造を明らかにした。これらの成果は、P 糖タンパク質の機能解明における立体構造基盤と X 線結晶解析実現に向けた基盤技術となる知見である。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、P 糖タンパク質ホモログである大腸菌由来 MsbA (EcMsbA) の X 線結晶構造解析を行うことによって、P 糖タンパク質の基質輸送における立体構造基盤を明らかにしたものである。P 糖タンパク質は、ATP binding cassette (ABC) トランスポーターに属し、ATP 加水分解のエネルギーを利用して細胞内から多様な化合物を排出する。P 糖タンパク質の癌細胞での高発現は癌における多剤耐性の一因であり、化学治療における深刻な問題となる。この問題を解決するためには、立体構造の解明が必要となる。しかし、ヒトの P 糖タンパク質は結晶化が困難であることから、申請者は、P 糖タンパク質と約 30% の同一性を持つ大腸菌由来 MsbA の X 線結晶構造解析を行うことによって、P 糖タンパク質の構造基盤の解明を目指した。MsbA は、lipid A を細菌内膜の細胞質側からペリプラズム側へ輸送するトランスポーターであり、P 糖タンパク質の基質についても輸送することが報告されている。したがって MsbA は、P 糖タンパク質の構造解析におけるモデルタンパク質として有用であるといえる。

申請者はまず、膜タンパク質である EcMsbA の結晶化スクリーニングを効率的に行うため、ジャーファーマンターによる EcMsbA 発現大腸菌の高密度培養法を確立した。すなわち、制御系の各種パラメーターの最適値を見だし、溶存酸素濃度を 30% に保持することにより、培地量あたりの菌体収量を 15 倍、精製タンパク質収量を 10 倍に向上させることに成功し、数 10 ミリグラムの精製 EcMsbA を簡便に調製することを達成した。

次に申請者は、輸送基質との複合体として EcMsbA の立体構造を明らかにするため、輸送基質の探索および分解能の向上を目指した界面活性剤のスクリーニングを行った。その結果、精製に用いる界面活性剤を cymal-6 にし、valinomycin と ATP アナログである AMP-PNP を添加して得られた結晶について X 線解析を行ったところ、4.5 Å 分解能の解析可能な結晶を調製できたことが判明した。

さらに申請者は、低分解能 (5.5 Å) で構造決定された EcMsbA 結晶の結晶格子への分子充填において分子間に形成される相互作用に対する考察から、

EcMsbA の C 末端の約 20 残基で構成される α ヘリックスが、分子充填様式の決定要因であることを見いだした。そして、この相互作用を取り除けば、結晶のパッキングを変えることによって、新たな構造状態の結晶が得られる可能性を基に、この α ヘリックス欠損変異体 Δ C21 を作製した。そして、酵素化学的な解析の結果から、 Δ C21 は、全長 EcMsbA と同様の立体構造を保持していると考えられることをみいだした。そこで、 Δ C21 の結晶化スクリーニングを行い、AMP-PNP との共結晶化に成功した。X 線解析の結果、この結晶は 4 Å 分解能を有しており、分子置換法を用いて立体構造解析を行ったところ、C 末端の α ヘリックスによる相互作用の消失によって細胞質側ドメインが閉じ、ペリプラズム側に開いた新規の立体構造が得られたことが判明した。

以上、本研究は、P 糖タンパク質ホモログである EcMsbA を用いて X 線結晶構造解析を行い、その立体構造を明らかにしたものである。これらの成果は、P 糖タンパク質の機能解明における立体構造基盤を与えるものであるとともに、P 糖タンパク質の X 線結晶構造解析の実現に向けた基盤技術となる知見である。

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