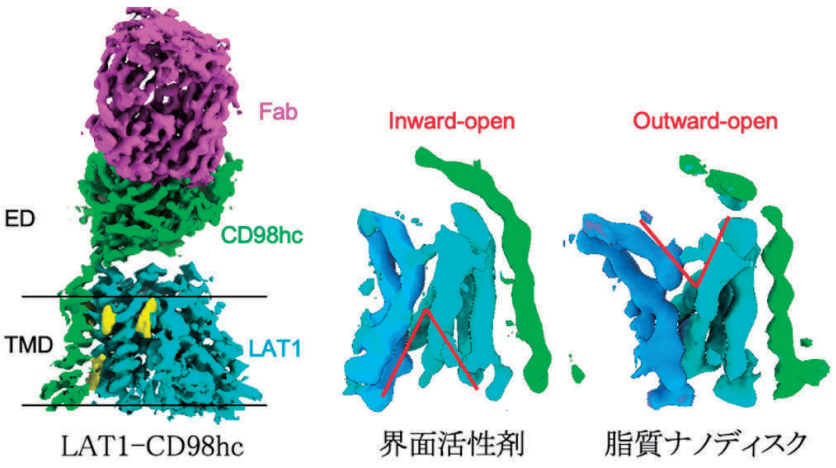
157　L型アミノ酸輸送体に対する薬剤作用の構造基盤の解明	李　勇燦

【目的】ヘテロ二量体型アミノ酸輸送体（HATs）は、ジスルフィド結合によってつながった軽鎖（SLC7）と重鎖（SLC3）という 2 つのサブユニットからなる輸送体である。ヒトは 8 種類の HAT サブタイプを持ち、それぞれが異なる生理機能と基質特異性を持つ。例えば、L 型アミノ酸輸送体として知られる LAT1 - CD98hc はロイシンの輸送を通じてがん細胞の増殖に関わることから、抗がん剤の新規標的として注目されている。また腎臓尿細管の微絨毛に局在する b0,+AT-rBAT は、シスチン尿症と呼ばれる遺伝疾患の原因タンパク質である。筆者らは、HATs の分子機構を明らかにするため、LAT1 - CD98hc の構造をクライオ電子顕微鏡により初めて決定した［Lee et al., Nat Struct Mol Biol, 2019］。本研究では、これまでの研究結果に基づき、LAT1 - CD98hc の立体構造を限りなく生理的環境に近い脂質条件下で可視化することで、その薬物認識機構を解明することを目指す。そのために、1. LAT1 - CD98hc を脂質ナノディスクやリポソームに再構成し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行う。また、2. この状態で種々の阻害剤を添加することで、阻害剤結合型の構造を決定し、認識機構を解明する。

【方法】構造解析に供するタンパク質試料を得るため、HEK293 浮遊細胞に改変型バキュロウイルスを共感染し、LAT1 - CD98hc 複合体を細胞内で発現させた。膜画分を界面活性剤によって可溶化し、それぞれのサブユニットに融合したアフィニティタグを用いてタンデム精製を行い、タンパク質試料を得た。これを、リン脂質とスキャフォールドタンパク質からなる脂質二重膜微小環境であるナノディスクに再構成し、Vitrobot によって瞬間冷却することで、クライオグリッドを作製した。300 kV の最新型電子顕微鏡 Titan Krios G4 を用いて高分解能データを撮像し、これを RELION および cryoSPARC のソフトウェアを用いて解析することで三次元再構成像を得た。

【結果】ナノディスクに再構成した LAT1 は、Inward-open 構造とは逆の Outward-open 構造をとっていた（図）。この結果は、膜輸送体には生理的条件に近い脂質二重膜下でしか捉えられない構造があることを強く示唆した。そこで、試料条件をさらに最適化し、各種阻害剤、基質との構造解析を進めた。無収差イメージシフト法（AF-IS）を利用した高速データ収集によって、それぞれ 5,000～20,000 程度のデータを撮像した。これまでに、4.0 Å を切る分解能で、LAT1 に関しては 8 つの構造を決定することに成功している。構造解析と並行して、LAT1 に特異的に結合するバインダーの取得とスクリーニングを進めた。LAT1 の構造解析の成功を受けて、LAT1 とパラログである LAT2 に関しても構造解析を進めた。結果、アポ型、阻害剤結合型、および基質結合型の構造を決定した。これにより、L 型アミノ酸輸送体を阻害する様々な阻害剤の結合様式が明らかとなった。

LAT1 の全体構造と脂質環境における構造変化



157. L 型アミノ酸輸送体に対する薬剤作用の構造基盤の解明

李　勇燦

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科

Key words：アミノ酸輸送体，構造，抗がん剤，クライオ電子顕微鏡，ナノディスク

緒　言

ヘテロ二量体型アミノ酸輸送体（HATs）は、ジスルフィド結合によってつながった軽鎖（SLC7）と重鎖（SLC3）という 2 つのサブユニットからなる輸送体である。ヒトは 8 種類の HAT サブタイプを持ち、それぞれが異なる生理機能と基質特異性を持つ。例えば、L 型アミノ酸輸送体として知られる LAT1 - CD98hc はロイシンの輸送を通じてがん細胞の増殖に関わることから、抗がん剤の新規標的として注目されている。筆者らは、HATs の分子機構を明らかにするため、LAT1 - CD98hc の構造をクライオ電子顕微鏡により初めて決定した［1］。しかしながら、界面活性剤によって可溶化したタンパク質には、解析対象である阻害剤が結合しないことが示唆された。

そこで本研究では、これまでの研究結果に基づき、LAT1 - CD98hc の立体構造を限りなく生理的環境に近い脂質条件下で可視化することで、その薬物認識機構を解明することを目指した。そのために、LAT1 - CD98hc を脂質ナノディスクやリポソームに再構成し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行った。また、この状態で種々の阻害剤を添加することで、阻害剤結合型の構造を決定し、認識機構を解明することを目指した。また、LAT1 とパラログである LAT2 に関しても構造解析を進めることで、L 型アミノ酸輸送体を阻害する様々な阻害剤の結合様式を明らかにし、より特異性の高い薬剤開発にむけた構造基盤を提供することを目指した。

方　法

1. HAT の大量発現系の構築と精製

HATs は、SLC3 と SLC7 に属するサイズの異なるタンパク質のヘテロ複合体であるため、その発現においては、各サブユニットを適切な強度比で発現誘導する必要があった。そこで、過去の手法［2］にならい、濃縮 BacMam ウイルスを用いた小スケールでの条件検討によって、最適な量比で両サブユニットを発現させた。この方法によって、LAT1 - CD98hc 複合体および LAT2 - CD98hc 複合体を高収量で発現させることに成功した。GFP タグ - 抗 GFP ナノボディを用いたアフィティー精製およびゲルろ過により、1 リットルあたり 3 mg 以上の高収量にて目的タンパク質を精製した。この試料を、MSP2N2 および POPC／POPG／Cholesterol 混合脂質とインキュベートし、界面活性剤を除くことでナノディスク再構成タンパク質を調製した。ここに、CD98hc を認識するモノクローナル抗体を結合させることで、観察試料とした。

2. クライオ電子顕微鏡試料の作製、データ測定、解析、および構造決定

初期の検討によって、ナノディスク再構成タンパク質はグリッド作製時にいわゆる「気液界面における変性」［3］によって構造が壊れることがわかったため、少量の Surfactant を加えることで問題を回避した。各種基質および阻害剤の結合型の解析においては、精製タンパク質に化合物を加え、氷上あるいは 37℃でインキュベートすることで複合体を調製した。各種試料に対して、最適なグリッドをスクリーニングした後、300 kV 加速電圧の Titan Krios 電子顕微鏡を用いて、5,000～15,000 枚程度のクライオ電子顕微鏡像を撮影した。これまで、解析には主にオープンソースソフトウェアである RELION を用いてきたが、近年開発の進む cryoSPARC を用いると、

解析の速度向上によるスループットが 5 倍以上であることがわかったため、初期の解析は cryoSPARC を主に用い、RELION そのほかのソフトに特有の機能を利用する際は、データ変換の上さらに解析を進めた。

結果および考察

1. LAT1 - CD98hc と基質・阻害剤複合型の構造解析

LAT1 - CD98hc と基質である Phe、Melphalan との構造を、分解能 3.5 A 前後で決定した（図 1）。初期の低分解能構造から示唆されたように、ナノディスク下で基質を結合した LAT1 は、基質結合ポケットが外側に開いた Outward-open 構造を取っていた。Phe の結合様式を見ると、原核生物の SLC7 ホモログである AdiC や ApcT と同様に、膜貫通ヘリックス 1、6（Transmembrane helices : TM1, 6）のほどけた部位の主鎖原子によって認識されていた。

さらに、LAT1 に特異的な阻害剤および非特異的な阻害剤との結合型構造を決定した（図 1）。種々の構造を比べると、LAT1 のポケットは Outward-open から Occluded 構造にいたる様々な開き具合を示していることが分かった。特に、クラシカルな非特異的阻害剤である BCH との結合型においては、ポケットが完全に閉塞されており、他の阻害剤の作用様式とは異なることが示唆された。

過去の研究において解決されていない疑問として、重鎖である CD98hc が LAT1 の構造変化にどれだけの影響を与えるかが上げられる。LAT1 - CD98hc の解析においては、CD98hc の細胞外ドメインと LAT1 を別々にアラインメントすることで分解能向上が見られた。このことは、LAT1 と CD98hc 細胞外ドメインが比較的独立して動くことを示している。一方で、既に報告されている Inward-open 構造[1]と今回の Outward-open、Occluded 構造を比べると、CD98hc の細胞外ドメインの位置にも違いが見られた。したがって、細胞外ドメインは LAT1 の構造変化と連動していることが示唆された。

2. LAT2 - CD98hc の構造解析

LAT2 - CD98hc に関しても、同様の解析を行い、分解能 3.5 A 程度で構造決定を行った。LAT2 は、リガンドの非存在下では LAT1 と同様に Inward-open 構造を取っていた一方で、阻害剤を加えたものについては、Outward-occluded 構造および Occluded 構造を取っていた。LAT1 との構造比較を行ったところ、大きな構造の違いは見られなかったものの、ポケットの内側を向くアミノ酸残基に複数の違いがあることがわかった。これらの違いによって、LAT1 と LAT2 の基質選択性の違いが生み出されていることが示唆された。

3. 今後の展望

ヒトが持つアミノ酸輸送体は 70 種類以上が知られているが、そのアミノ酸認識機構や阻害機構の詳細が明らかにされた例はいまだ少ない。本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって、L 型アミノ酸輸送体に対するリガンド結合機構の詳細を明らかにすることに成功した。2019 年時点での試料調製法では、界面活性剤による影響を取り除ききれないという問題があったが、本研究にて目指したナノディスクによる試料調製法の確立は、より生体に近い状態で輸送体の構造を捉えるうえでのブレークスルーであったといえる。今後は、構造から得られた知見をもとに、阻害剤の構造展開および検証を行う。また、本研究で培った技術知識を用いて、ヒトが持つ様々な輸送体の構造薬理学研究を推進する。

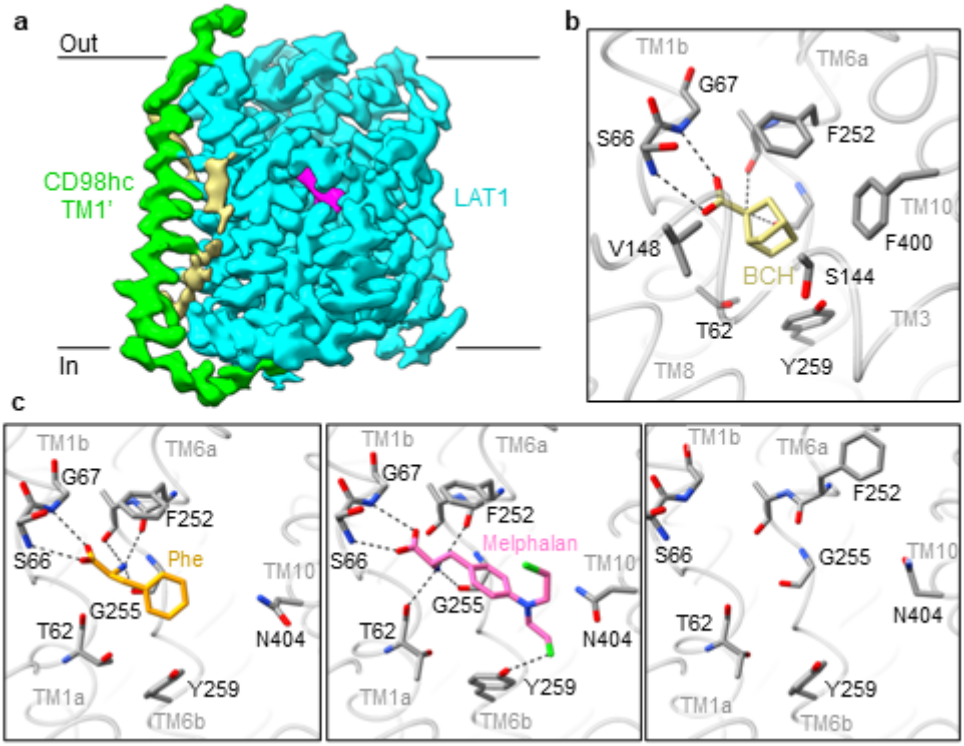


図 1. ナノディスクに再構成した LAT1 - CD98hc のクライオ電子顕微鏡構造

a) クライオ電子顕微鏡マップ。LAT1 をシアンで、CD98hc を緑で、阻害剤をマゼンタで、脂質分子を黄色で示している。

b) BCH 結合型の LAT1 の拡大図。

c) 各種基質結合型およびアポ型の LAT1 の比較。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学の金井好克教授である。本研究の一部は、研究室所属の学生である髙橋咲紀さんが進めたものである。データ測定は、主に理化学研究所のクライオ電子顕微鏡施設を用いた。本研究の遂行において、研究室主宰者である西澤知宏教授に多大なるご協力をいただいた。研究にご協力いただいた方々ならびに貴重な研究助成を賜りました上原記念生命科学記念財団様にこの場を借りて感謝申し上げます。

文　献

1) Lee Y, Wiriyasermkul P, Jin C, Quan L, Ohgaki R, Okuda S, Kusakizako T, Nishizawa T, Oda K, Ishitani R, Yokoyama T, Nakane T, Shirouzu M, Endou H, Nagamori S, Kanai Y, Nureki O. Cryo-EM structure of the human L-type amino acid transporter 1 in complex with glycoprotein CD98hc. Nat Struct Mol Biol. 2019;26(6):510–517. PMID: 31160781 DOI: 10.1038/s41594-019-0237-7

2) Morales-Perez CL, Noviello CM, Hibbs RE. Manipulation of Subunit Stoichiometry in Heteromeric Membrane Proteins. Structure. 2016;24(5):797–805. PMCID: PMC4856541 DOI: 10.1016/j.str.2016.03.004

3) D'Imprima E, Floris D, Joppe M, Sánchez R, Grininger M, Kühlbrandt W. Protein denaturation at the air-water interface and how to prevent it. eLife. 2019;8:e42747. PMID: 30932812 DOI: 10.7554/elife.42747