

22PO-am117S

Trp 蛍光を利用した P 糖タンパク質分子内の基質結合部位の解析

○井上 善貴¹, 山口 知宏¹, 大城 悠暉¹, 松岡 敬太¹, 加藤 博章¹ (京大院薬)

【目的】P 糖タンパク質(P-gp)は多種多様な化学構造の基質を細胞外へと排出する多剤排出トランスポーターであり、ADME の要である。P-gp と多剤との相互作用については内在性 Trp 残基の蛍光変化による解析が行われているが、蛍光変化が基質と Trp の相互作用に由来するのか、間接的な構造変化に由来するものなのか調べられていない。そのため、蛍光変化が基質結合に対応しているか不明である。そこで、我々が結晶構造を決定した P 糖タンパク質 CmABCB1 の立体構造 1)を利用して、内在性 Trp 残基の位置と蛍光スペクトルとの関係と、結晶構造から予想した基質結合部位のアミノ酸残基を Trp に改変し、その Trp 蛍光の変化が基質濃度に依存するのかを調べた。

【方法】CmABCB1 の立体構造から基質結合部位の残基として Met391 を候補に選んだ。そして部位特異的変異法により Trp に変換した M391W を作成した。さらに M391W に対して、内在性の 6 つの Trp のうち輸送機能に影響しないことが判明している 4 つを Tyr にする改変を加え、4WY/M391W 変異体を作製した。

【結果及び考察】野生型や 4WY では、代表的な 5 種類の化合物の添加によっても Trp 蛍光はほとんど減少しなかったが、4WY/M391W 変異体の場合は、大きな蛍光減少が観測され、多様な構造の基質との直接相互作用に由来する消光が起きたことが示唆された。今回注目した M391 は CmABCB1 が内向型から外向型へと大きく構造変化する支点到に位置しているため、M391 が存在する場所は CmABCB1 が基質の輸送経路における関門である可能性が示唆された。

1) A. Kodan, *et al.* (2014) *Proc Natl Acad Sci USA*, **111**,4049.