

報 文

ヒト ABC 輸送体 ABCB1 の基質輸送に関わるアミノ酸残基の *in silico* 予測佐竹一紘¹⁾, 三谷勇仁¹⁾, 中村一郎¹⁾, 今井律子¹⁾, Efferth Thomas²⁾, 中川大¹⁾¹⁾中部大学大学院 応用生物学研究科 応用生物学専攻,²⁾Department of Pharmaceutical Biology, Institute of Pharmacy and Biochemistry, University of Mainz

要 旨

患者の 3 分の 1 が現役世代であり日本人最多の死因である「がん」の化学療法において、「がん細胞の薬剤耐性」が長年問題になっている。高齢化が進行する我が国において健やかな高齢社会を実現するためには、高齢者の健康維持に加えて「現役世代の健康維持」も不可欠である。本研究では、がん細胞に薬剤耐性を付与する代表的な因子の1つ「ABC 輸送体 ABCB1」に注目し、ABCB1 の基質輸送に強く関わるアミノ酸残基の予測を試みた。マウス *Abcb1a* の X 線結晶構造データ(PDB code : 3G60)を基にヒト ABCB1 のホモロジーモデルを構築し、基質化合物とのドッキングスタディを実施した結果、Phe303, Tyr307, Ala342, Phe343 が ABCB1 による化合物の捕捉に高頻度で利用され、Ala342, Phe343 が ABCB1 の基質輸送に関与するアミノ酸残基であると予測した。

1. はじめに

内閣府が発表した令和 4 年版高齢社会白書によると、我が国の高齢化は、現役世代(20~64 歳)2.1 人で高齢者 1 人を支える状況にまで進行している。今後も同様に高齢化が進行すると、2065 年には現役世代 1.3 人で高齢者 1 人を支える社会になると考えられており、我が国における「社会の高齢化」は深刻である。また、日本人最多の死因は「がん」であり、がん患者の 3 分の 1 が現役世代であることから、健やかな高齢社会を実現するためには、高齢者の健康維持に加えて「現役世代の健康維持」も不可欠である。

がんの三大療法の一つ「化学療法」で使用される抗腫瘍薬の歴史は、第一次・第二次世界大戦中に使用されたナイトロジェンマスタードの研究に端を発する。抗腫瘍薬は、がん細胞とは言え自身の細胞を殺傷する薬であるため、抗がん作用と副作用が背中合わせにある。それでも、血液を含む体液を介して全身をめぐる、体内の潜在的ながん細胞にたいしても治療効果を期待することができることもあってか、がん

患者の約 3 割に実施されている。そして、1990 年代後半から登場した「分子標的薬」は、がん特有の分子を標的にしているため、一部の化学療法では、「患者に優しい治療」が可能になった。しかしながら、化学療法では「がん細胞の薬剤耐性」が長年の課題であり、人類が「がん」を克服するためには、薬剤耐性の克服は不可欠である。

本研究では、がん細胞に薬剤耐性を付与する代表的な因子の1つ「ABC 輸送体 ABCB1 (MDR1/ P-glycoprotein)」に注目した。ATP の加水分解エネルギーを利用して生体膜を隔てた基質輸送を行う膜タンパク質 ABCB1 は、肝臓、血液脳関門、小腸、腎臓、精巣、胎盤に高発現し、薬物や生体異物の吸収および排泄、これらの物質の組織/細胞内濃度を制御している(Borst and Schinkel, 2013)。つまり、ABCB1 は生体内への異物の侵入を妨げると共に、生体内に侵入した異物や生体内で生じた代謝産物を生体外に排出することによって生体防御に貢献する。一方、がん細胞に発現する ABCB1 は、がん細胞の防御に働

き、がん細胞に薬剤耐性を付与する。したがって、ABCB1 の基質輸送機能や遺伝子発現機構を理解することは、薬剤耐性の克服に向けた第一歩である。

ABCB1 は、アミノ酸残基を介して化合物を捕捉し、基質としての適性を満たした化合物を選別して輸送するはずである。しかしながら、ABCB1 の基質が多岐に渡るため、化合物を捕捉して基質と認識し輸送するメカニズムは、十分に理解されていない。そこで本研究では、2009 年に解かれたマウス *Abcb1a* の X 線結晶構造データ (PDB code : 3G60) (Aller et al. 2009) に基づいてヒト ABCB1 ホモロジーモデルを構築し、構造が大きく異なる化合物を対象にしてドッキングスタディを実施した。そして、ドッキングスタディで返された結果を ABCB1 が基質を輸送する際に発現する ATPase 活性と照らし合わせて化合物の捕捉に関与するアミノ酸残基を選定し、ABCB1 の基質輸送に関わるアミノ酸残基を予測した。

2. 材料と方法

2-1. ヒト ABCB1 ホモロジーモデルの作製

ドッキングスタディで使用したヒト ABCB1 の構造データは、マウス *Abcb1a* の X 線結晶構造データ (PDB code : 3G60) (Aller et al. 2009) を基にホモロジーモデリングを行い導き出した。実際には、欧州分子生物学研究所 (EMBL; European Molecular Biology Laboratory) がインターネット上で公開しているオーブ

ンソース解析パッケージ「EMBOSS」に収録されている Needleman-Wunsch global algorithm (Needle) (Needleman and Wunsch 1970) を採用し、ヒト ABCB1 およびマウス *Abcb1a* の一次構造を整列させた。そして、コンピュータープログラム MODELLER 9.11 (Fiser and Sali 2003; Venkatachalam et al. 2003) と構造バイオインフォマティクス Web サーバー SWISS-MODEL (Kiefer et al. 2009) の Alignment Mode を用いてヒト ABCB1 ホモロジーモデルを完成させた (図 1)。

2-2. 試験化合物

Ohnishi らが ABCB1 の ATPase 活性を評価した 41 化合物 (Ohnishi et al. 2003) を対象にして、本研究で使用する試験化合物を選定した。ABCB1 の基質輸送に関わるアミノ酸残基を予測することを目指す本研究では、基質輸送に必要なエネルギーを産出する ATPase 活性に注目した。そして、ABCB1 の代表的な基質である Verapamil によって誘導された ABCB1 の ATPase 活性を 100% とした場合に 75% 以上であった「高い ATPase 活性を誘導した 5 化合物 (Bepiridil, Fendiline, FK506, Nicardipine, Prenylamine)」と 5% 以下であった「ATPase 活性を誘導しなかった 5 化合物 (Epinephrine, Histamine, Mepirizole, Novobiocin, Penicillin G)」を解析対象として選定し、ドッキングスタディを実施した。

2-3. 化合物構造の最適化

試験対象化合物の三次元構造の最適化は、当該化合物の構造データをソフトウェア CS Chem3D Pro Ver 5.0 (PerkinElmer, Inc.) 上に表示させ、半経験的分子軌道法 (AM1) に基づいて行った。そのために、ソフトウェア CS ChemDraw Ultra Ver 6.0 (PerkinElmer, Inc.) を用いて試験化合物の構造式を描画した。そして、これらの構造データをソフトウェア CS Chem3D Pro Ver 5.0 (PerkinElmer, Inc.) 上に表示させ、計算化学プログラム MOPAC を利用して、半経験的分子軌道法 (AM1) に基づいた構造の最適化を行った。

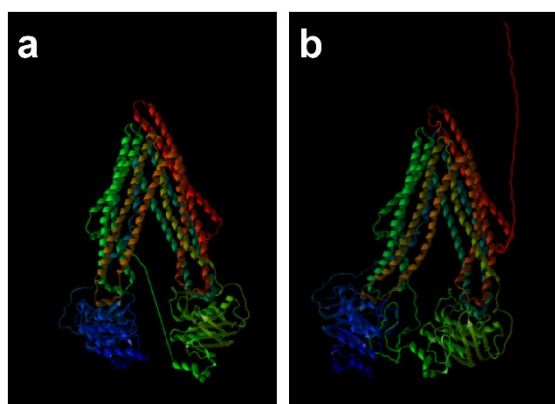


図1. マウス *Abcb1a* および構築したヒト ABCB1 の構造

- (a) X 線結晶構造データに基づいたマウス *Abcb1a* の構造 (PDB code : 3G60)
- (b) マウス *Abcb1a* の構造から構築したヒト ABCB1 ホモロジーモデルの構造

2-4. ドッキングスタディ

ドッキングシミュレーションソフトウェア Molegro Virtual Docker 6.0 (Northern Science Consulting Inc.) 上に ABCB1 のホモロジーモデルを表示させ、試験対象化合物の構造を 1 つずつ選択してはドッキングシミュレーションを 1 化合物につき 1000 回実施した。ドッキングスタディは、ABCB1 の基質結合ポケットが存在すると考えられている約 6000 Å³ の空洞 (Aller et al. 2009) を含む直径 50 Å の球空間 (球空間の中心座標: X = 0, Y = 80, Z = 45) (図 2) を対象にして実施した。Aller らの研究では、ABCB1 に捕捉された化合物に近接するアミノ酸残基として Met69, Leu304, Tyr307, Phe336, Leu339, Ile340, Phe343, Gln725, Phe728, Phe732, Leu762, Thr837, Tyr953, Phe978, Ser979, Val982, Ala985, Met986, Gly989, Gln990, Ser993 が提示された (Aller et al. 2009)。また, Aller らは, ABCB1 の代表的な基質 Verapamil が ABCB1 によって捕捉される際に近接するアミノ酸残基が His61, Gly64, Leu65, Met69, Ser222, Leu304, Ile306, Tyr307, Phe336, Leu339, Ile340, Ala342, Gln725, Phe728, Phe732, Leu762, Thr837, Ile868, Gly872, Phe942, Thr945, Tyr953, Leu975, Phe978, Ser979, Val982, Gly984, Ala985, Met986, Gly989, Gln990, Ser993 であることを Loo らの研究結果 (Loo et al. 1997, 2000, 2001, 2006) に基づいて提示した (Aller et al. 2009)。本研究で解析対象として設定した空間には、これらのアミノ酸残基が全て含まれる。アルゴリズムには MolDock SE を採用し, population size: 50, energy threshold: 100, grid resolution: 0.3 Å, maximum interaction: 1500 の条件を設定した。そして, シミュレーション後に水素結合の最適化が行われるように設定した。なお, シミュレーションは Rigid body mode にて行った。

2-5. 化合物の認識に関与するアミノ酸残基の数値化

アミノ酸残基が化合物を認識する程度を数値化するために、以下の操作を行い、化合物認識におけるアミノ酸残基の「寄与率」を算出した。この計算は、1 つの試験対象化合物に対して実施した 1000 回のド

ッキングシミュレーションから返される Total Energy のうち、値が小さい上位 10 回分の結果を対象に行った。具体的には、Total Energy に占めるアミノ酸残基ごとのエネルギー値を百分率で算出し、上位 10 回分の結果から算出された百分率の平均値を化合物認識におけるアミノ酸残基の「寄与率」と定義した。

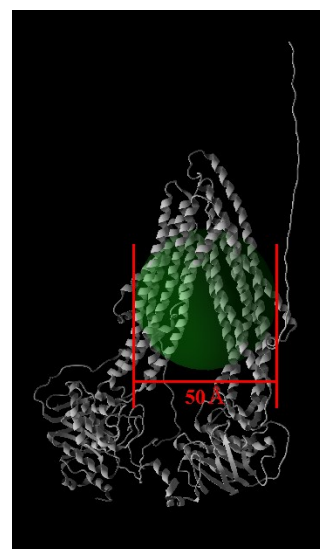


図 2. ABCB1 ホモロジーモデルにおける解析対象空間
緑色で示す球体領域を解析対象とした。

3. 結果と考察

3-1. ABCB1 と Verapamil とのドッキングスタディ

ABCB1 の代表的な基質の一つである Verapamil を対象にしてドッキングスタディを行った結果、寄与率が大きい順に寄与率 5% 以上のアミノ酸残基が Phe303 > Phe343 > Ala342 > Leu339 > Gly226 > Tyr307 > Ser222 と返された (表 1)。このうち、一番目に大きい寄与率が返された Phe303 と五番目に大きい寄与率が返された Gly226 については、Loo らの研究および Aller らの研究では言及されず本研究において新規に返されたアミノ酸残基である。この違いは、ヒト ABCB1 変異体を対象にした Loo らの研究およびマウス Abcb1a を対象にした Aller らの研究と、ヒト ABCB1 のホモロジーモデルを対象にした本研究における解析対象の違いに起因する可能性が考えられる。一方、寄与率 5% 以上のアミノ酸残基として返された Ser222, Tyr307, Leu339, Ala342, Phe343 は、Loo らの研究と Aller らの研究において化

化合物に近接することが示されているアミノ酸残基である (Aller et al. 2009; Loo et al. 1997, 2000, 2001, 2006). したがって, 本研究で採用した方法および条件でも ABCB1 の基質輸送に関わるアミノ酸残基を予測できると結論付けた.

表1. Verapamil の認識に寄与するアミノ酸残基と寄与率

Rank	amino acid residue	Contribution ratio (%)
1	Phe303	10.9
2	Phe343	9.3
3	Ala342	6.5
4	Leu339	6.2
5	Gly226	6.2
6	Tyr307	6.0
7	Ser222	5.2
8	Pro223	4.7
9	Lys234	4.6
10	Tyr310	3.8
	Others	36.7

3-2. ヒト ABC 輸送体 ABCB1 の基質認識に関わるアミノ酸残基の予測

ABCB1 の基質化合物の構造は多岐に渡るため, ABCB1 の基質となる化合物も ABCB1 の基質にならない化合物も ABCB1 の基質結合ポケットに侵入すると考えられる. また, ABCB1 は, 基質を輸送する際に ATP を加水分解する. ABCB1 による化合物の捕捉に関わるアミノ酸残基の中から基質輸送に関わるアミノ酸残基を予想することを目指す本研究では, 化学構造が大きく異なる化合物を解析対象とすることにした. そのために, Ohnishi らが ABCB1 の ATPase 活性を評価する際に使用した構造が異なる 41 種の化合物 (Ohnishi et al. 2003) の中から本研究で使用する化合物を選定することにした. 実際には, Verapamil によって誘導された ABCB1 の ATPase 活性を 100% とした場合に 75% 以上の「高い ATPase 活性を誘導した 5 化合物 (Bepridil, Fendiline, FK506, Nicardipine, Prenylamine)」と 5% 以下の「ATPase 活性を誘導しなかった 5 化合物 (Epinephrine, Histamine, Mepirizole, Novobiocin, Penicillin G)」を選定し, ドッキングスタディを実施した.

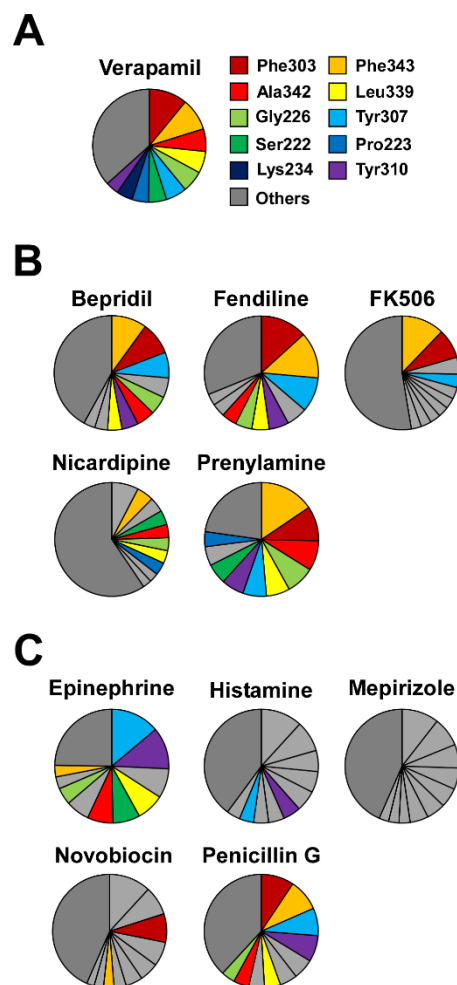


図3. 化合物の認識に寄与するアミノ酸残基と寄与率

(A) Verapamil の認識に寄与するアミノ酸残基と寄与率寄与率上位 10 アミノ酸残基について着色した.

(B) 高い ATPase 活性を誘導した 5 化合物の認識に寄与するアミノ酸残基と寄与率

(C) ATPase 活性を誘導しなかった 5 化合物の認識に寄与するアミノ酸残基と寄与率

ATPase 活性上位 5 化合物 (Bepridil, Fendiline, FK506, Nicardipine, Prenylamine) とのドッキングスタディでは, Verapamil を対象に行ったドッキングスタディと同じアミノ酸残基が複数返された (図 3A, B). いずれの化合物を対象にしたドッキングスタディにおいても, Phe343 が一番目もしくは二番目に大きい寄与率を返し, Nicardipine を除いた 4 化合物においては, Phe303 が一番目もしくは二番目に大きい寄与率を返した (図 3B, 表 2). また, Verapamil を対象に行ったドッキングスタディにおいて三番目～五番目に大きい寄与率を返した Ala342, Leu339, Gly226 も, FK506 を除いた 4 化合物において返された (図 3B, 表 2).

さらに, Verapamil を対象に行ったドッキングスタディにおいて六番目に大きい寄与率を返した Tyr307 も Nifedipine を除いた 4 化合物において返され, 七番目に大きい寄与率を返した Ser222 も FK506 を除いた 4 化合物において返された(図 3B, 表 2). 一方, ATPase 活性を誘導しなかった 5 化合物(Epinephrine, Histamine, Mepirizole, Novobiocin, Penicillin G)とのドッキングスタディでは, Verapamil や ATPase 活性上位 5 化合物とのドッキングスタディで返されたアミノ

酸残基とは異なるアミノ酸残基が返される傾向が強かった(図 3C). 一方, Mepirizole 以外の化合物を対象に行ったドッキングスタディでは, Verapamil や ATPase 活性上位 5 化合物とのドッキングスタディで返されたアミノ酸残基も返され, Phe303 が Epinephrine および Novobiocin, Penicillin G とのドッキングスタディで 5%以上の寄与率を示し, Tyr307 が Epinephrine および Penicillin G とのドッキングスタディで 5%以上の寄与率を示した(図 3 C, 表 3).

表 2. 高い ATPase 活性を誘導した化合物の認識に寄与するアミノ酸残基と寄与率

Bepridil			Fendiline			FK506			Nifedipine			Prenylamine		
Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)
1	Phe 343	10.0	1	Phe 303	13.2	1	Phe 343	12.2	1	Trp 136	7.6	1	Phe 343	15.5
2	Phe 303	9.2	2	Phe 343	13.2	2	Phe 303	8.4	2	Phe 343	4.8	2	Phe 303	9.9
3	Tyr 307	7.3	3	Tyr 307	9.9	3	Gln 347	4.8	3	Phe 938	4.3	3	Ala 342	8.5
4	Tyr 953	5.6	4	Ile 306	5.9	4	Tyr 307	3.8	4	Ser 222	4.1	4	Gly 226	8.0
5	Gly 226	5.2	5	Tyr 310	5.6	5	Phe 942	3.3	5	Ala 342	3.8	5	Leu 339	6.7
6	Ala 342	5.1	6	Leu 339	4.9	6	Tyr 953	3.1	6	Gly 226	3.7	6	Tyr 307	6.7
7	Tyr 310	4.7	7	Gly 226	4.8	7	Trp 136	3.0	7	Leu 339	3.6	7	Tyr 310	6.4
8	Leu 339	4.0	8	Ala 342	4.3	8	Phe 336	3.0	8	Pro 223	3.6	8	Ser 222	5.8
9	Ile 306	3.6	9	Leu 225	3.8	9	Ala 985	3.0	9	Asn 183	2.6	9	Ile 306	5.4
10	Ala 229	3.3	10	Ala 229	3.3	10	Val 982	2.9	10	Phe 994	2.5	10	Pro 223	4.3
	Others	42.0		Others	31.2		Others	52.6		Others	59.4		Others	22.8

表 3. ATPase 活性を誘導しなかった化合物の認識に寄与するアミノ酸残基と寄与率

Epinephrine			Histamine			Mepirizole			Novobiocin			PenicillinG		
Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)
1	Tyr 307	13.9	1	Trp 136	11.8	1	Phe 72	10.5	1	Trp 136	11.8	1	Phe 303	9.3
2	Tyr 310	11.9	2	Phe 938	8.8	2	Tyr 953	8.3	2	Phe 938	8.2	2	Phe 343	9.1
3	Ile 306	8.4	3	Ala 995	6.0	3	Trp 136	6.7	3	Phe 303	8.2	3	Tyr 307	7.8
4	Leu 339	7.8	4	Phe 994	6.0	4	Phe 336	6.1	4	Phe 994	6.9	4	Tyr 310	7.5
5	Ser 222	7.7	5	Val 991	5.9	5	Met 69	5.6	5	Asn 296	5.4	5	Tyr 953	5.8
6	Phe 303	7.2	6	Tyr 310	5.0	6	Met 68	5.3	6	Phe 942	4.8	6	Ile 306	5.0
7	Leu 225	6.8	7	Ser 993	4.5	7	Phe 938	5.2	7	Ile 297	3.5	7	Leu 339	4.6
8	Gly 226	4.8	8	Asp 997	4.3	8	Phe 957	3.2	8	Phe 343	3.0	8	Leu 225	4.5
9	Phe 938	3.4	9	Tyr 307	4.1	9	Phe 978	2.9	9	Asn 183	2.7	9	Ala 342	4.4
10	Phe 343	3.3	10	Ile 306	3.8	10	Cys 137	2.8	10	Asp 886	2.2	10	Gly 226	3.9
	Others	24.8		Others	39.9		Others	43.4		Others	43.4		Others	38.2

3-3. ABCB1 の基質輸送に関わるアミノ酸残基の推定

本研究では, 寄与率 5%以上あるいは寄与率上位 5 位以内のアミノ酸残基を「ABCB1 による化合物の捕捉に関与するアミノ酸残基の候補」とした. その結果, 高い ATPase 活性を誘導した 5 化合物に対して実施したドッキングスタディにおいて「ABCB1 による化合物の捕捉に関与するアミノ酸残基の候補」に挙がる回数が多かった順に Phe343 > Phe303 = Tyr307 > Ala342 となった. ATPase 活性を誘導しなかった 5 化合物とのドッキングスタディにおいて 2 化合物以上の結果で 5%以上の寄与率を示した Phe303 および Tyr307 は, ABCB1 による化合物の捕捉には関与するかもしれないが, ABCB1 の基質輸送機能の起動に関与するアミノ酸残基ではない可能性がある.

一方, Ala342 は ABCB1 によって認識された Verapamil に近接することが Aller らの解析において示されている (Aller et al. 2009). また, Phe343 は立体異性体の関係にある二つの ABCB1 阻害剤(QZ59-RRR, QZ59-SSS)との結合に関与することが Aller らの解析において示されている (Aller et al. 2009). したがって, Ala342 と Phe343 は, ABCB1 による化合物の捕捉に関与しそうである. しかしながら, この可能性に加えて ABCB1 の基質輸送機能の起動における Ala342 および Phe343 の関与については, Ohnishi らの研究で試験された残り 30 化合物を対象にしたドッキングスタディや Phe303 および Tyr307, Ala342, Phe343 のアミノ酸残基置換体を用いた生化学的解析を行う等, 結論に至るまでには複数の研

究が必要である。

Dönmez Caki らは、ABCB1 を一過的に発現させた細胞を用いて、Tyr953 が Rhodamine123 と Propafenone の認識に関わる可能性を示した (Dönmez Caki et al. 2014)。また、Loo と Clarke は、メタンチオスルホン酸 rhodamine B を用いて、Ile340, Ala841, Leu975, Val981, Val982 が ABCB1 の基質認識に関与する可能性を示した (Loo and Clarke. 2002)。近年では、ドッキングスタディによって Doxorubicin との結合に Glu875, Gln946, Gln990 が関与すること (Morsy et al. 2022)、Lubeluzole との結合に Phe335, Phe336, Phe343, Gln838, Phe983, Gln990 が関与すること (Morsy et al. 2022)、Carnosine との結合に Glu875, Gln946, Glu875 が関与すること (Viale et al. 2022) も報告されている。このように、ABCB1 の基質認識に関与するアミノ酸残基については試験化合物や実験方法によって異なり、ABCB1 の基質輸送機能の起動に関与するアミノ酸残基については結論に至っていない。今後、ABCB1 と基質の共結晶化の事例が増えると共に Cryogenic 電子顕微鏡を用いた解析が本分野に浸透し、新たな知見が増えて ABCB1 の基質輸送機能の起動に関与するアミノ酸残基が同定されることが期待される。

3-4. ABCB1 の基質認識における Phe303 および Tyr307, Ala342, Phe343 の可能性

本研究で実施したドッキングスタディでは、ABCB1 による化合物の捕捉に関わるアミノ酸残基の候補として Phe303 および Tyr307, Ala342, Phe343 を挙げた。これら 4 つのアミノ酸残基は 1 つのループ領域を挟んで前後の α ヘリックスに分かれて存在した (図 4Ab, Bb, Bd, Bf, Bh, Bj)。また、本研究で使用した化合物のうち ABCB1 の ATPase 活性を誘導することが出来る Bepridil, Fendiline, FK506, Nicardipine, Prenylamine, Verapamil は、最も安定して ABCB1 と相互作用する時、いずれも Phe303・Tyr307 を含む α ヘリックスと Ala342・Phe343 を含む α ヘリックスに挟まれる位置に存在していた (図 4)。

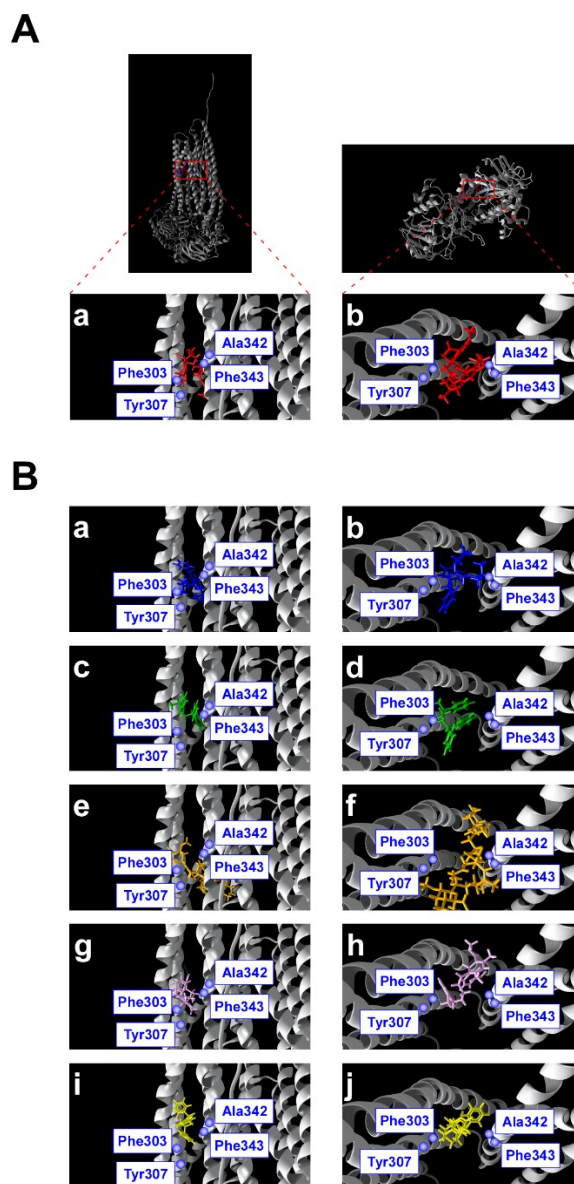


図 4. 試験化合物と Phe303 および Tyr307, Ala342, Phe343 の位置関係

1000 回のシミュレーションの中で最も低い Total Energy が返された時の結果を示す (A, B)。赤色; Verapamil, 青色; Bepridil, 緑色; Fendiline, 橙色; FK506, 紫色; Nicardipine, 黄色; Prenylamine。

a, c, e, g, i および b, d, f, h, j は、それぞれ同一の視野であり、互いに 90 度回転させた位置関係にある。

これまでの研究では、ATP が ABCB1 に結合しても ABCB1 の構造が変化しないことが報告されている (Moeller et al. 2015; Esser et al. 2017)。また、Kodan らは、計算化学的手法を用いて、ATP と基質の両者が ABCB1 に結合することによって ABCB1 の構造が内向型 (細胞内側に口を開けた状態) から外向型 (細胞外側に口を開けた状態) に変化することを示した (Kodan et al.

2021). Aller らの共結晶化の実験では、内向型 ABCB1 が細胞の内側に約 6000 Å³ の空洞を形成し、この空洞に二分子までが安定して共存できることを示した (Aller et al. 2009). この結果は、二分子が存在する領域のいずれかもしくは両者が基質結合ポケットであることを示唆する. Phe303 および Tyr307, Ala342, Phe343 は、同一の基質結合ポケットで機能していると考えられ、Phe303 および Tyr307 で化合物を捕捉し、Ala342 および Phe343 によっても認識されると、ABCB1 が基質輸送を開始するのかもしれない。つまり、ABCB1 が基質を輸送する際、Phe303 および Tyr307, Ala342, Phe343 が協同している可能性も考えられる。ABCB1 の基質の多くが水素結合供与基を有するので (Seelig, 1998; Ecker et al. 1999), Phe343 の電子状態の変化が、ABCB1 が基質の輸送を開始するトリガーになるかもしれない。

4. おわりに

本研究では、ABCB1 とのドッキングスタディを実施し、ABCB1 の ATPase 活性と照らし合わせて ABCB1 の基質輸送に関するアミノ酸残基を予測した。先行研究とは異なり構造が異なる 11 化合物を採用した本研究では、ABCB1 による化合物の捕捉に高頻度で利用されるアミノ酸残基として Phe303, Tyr307, Ala342, Phe343 を提示することができた。また、Ala342, Phe343 が ABCB1 の基質輸送機能の起動に関する可能性を提示することができた。

1976 年に ABCB1 が発見されてから、40 年以上が経過している (Juliano and Ling, 1976)。これまでに ABCB1 による基質認識および基質輸送のメカニズムが研究されてきたが、今日においても全容の解明には至っていない。2009 年に Aller らが X 線結晶構造解析を行ってマウス *Abcb1a* の構造を 3.8~4.4Å の分解能で解いて以降 (Aller et al. 2009), Cryogenic 電子顕微鏡を用いた解析も可能となった (Alam et al. 2019)。また、近年では ABCB1 のドッキングスタディを行った結果も相次いで報告されている (Morsy et al. 2022; Viale et al. 2022)。また、ABCB1 による基質輸送のメカニズムの概要も明らかとなり (Kodan et al. 2021), 本研究を含め

ABCB1 の基質輸送に関するアミノ酸残基の候補も報告されている (Loo and Clarke, 2002; Aller et al. 2009; Dönmez Caki et al. 2014)。近い将来、ABCB1 による基質認識および基質輸送のメカニズムが完全に明らかになり、ABCB1 によって捕捉・輸送される程度を事前に理解した創薬が始まることが期待される。

引用文献

- Alam A, Kowal J, Broude E, Roninson I, Locher KP. 2019. Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein. *Science*. 363, 753-756.
- Aller SG, Jodie Yu, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*. 323, 1718-1722.
- Barbieri A, Thonghin N, Shafi T, Prince SM, Collins RF, Ford RC. 2021. Structure of ABCB1/P-Glycoprotein in the Presence of the CFTR Potentiator Ivacaftor. *Membranes (Basel)*. 11, 923.
- Borst P, Schinkel AH. 2013. P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals. *J Clin Invest*. 123, 4131-4133
- Dönmez Caki Y, Khunweeraphong N, Parveen Z, Schmid D, Artaker M, Ecker GF, Sitte HH, Pusch O, Stockner T, Chiba P. 2014. Pore-exposed tyrosine residues of P-glycoprotein are important hydrogen-bonding partners for drugs. *Mol Pharmacol*. 85, 420-428.
- Ecker G, Huber M, Schmid D, Chiba P. 1999. The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance. *Mol Pharmacol*. 56, 791-796.
- Esser L, Zhou F, Pluchino KM, Shiloach J, Ma J, Tang W,

- Gutierrez C, Zhang A, Shukla S, Madigan JP, Zhou T, Kwong PD, Ambudkar SV, Gottesman MM, Xia D. 2017. Structures of the multidrug transporter P-glycoprotein reveal asymmetric ATP binding and the mechanism of polyspecificity. *J Biol Chem.* 292, 446–461.
- Fiser A, Sali A. 2003. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol.* 374, 461–491.
- Juliano RL, Ling V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 455, 152–162.
- Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37, D387-92.
- Kodan A, Futamata R, Kimura Y, Kioka N, Nakatsu T, Kato H, Ueda K. 2021. ABCB1/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs. *FEBS Lett.* 595, 707-716.
- Loo TW, Clarke DM. 1997. Identification of Residues in the Drug-binding Site of Human P-glycoprotein Using a Thiol-reactive Substrate. *J Biol Chem.* 272, 31945-31948.
- Loo TW, Clarke DM. 2000. Identification of Residues within the Drug-binding Domain of the Human Multidrug Resistance P-glycoprotein by Cysteine-scanning Mutagenesis and Reaction with Dibromobimane. *J Biol Chem.* 275, 39272-39278.
- Loo TW, Clarke DM. 2001. Defining the Drug-binding Site in the Human Multidrug Resistance P-glycoprotein Using a Methanethiosulfonate Analog of Verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem.* 276, 14972-14979.
- Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. 2006. Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket. *Biochem J.* 399, 351-359.
- Loo TW, Clarke DM. 2002. Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem.* 277, 44332–44338.
- Moeller A, Lee SC, Tao H, Speir JA, Chang G, Urbatsch IL, Potter CS, Carragher B, Zhang Q. 2015. Distinct conformational spectrum of homologous multidrug ABC transporters. *Structure.* 23, 450–460.
- Morsy MA, Kandeel M, Ibrahim ARN, Abdel-Gaber SA, Jacob S, Venugopala KN, Shinu P, El-Daly M. 2022. Carnosine Potentiates Doxorubicin-Induced Cytotoxicity in Resistant NCI/ADR-RES Cells by Inhibiting P-Glycoprotein-In Silico and In Vitro Evidence. *Molecules.* 27, 7383.
- Ohnishi Y, Hirano H, Nakata K, Oosumi K, Nagakura M, Tarui S, Ishikawa T. 2003. High-Speed Screening and Structure-Activity Relationship Analysis for the Substrate Specificity of P-Glycoprotein (ABCB1). *Chem-Bio Informatics J.* 3, 175-193.
- Seelig A. 1998. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem.* 251, 252–261.
- Venkatachalam TK, Qazi S, Samuel P, Uckun FM. 2003. Inhibition of mast cell leukotriene release by thiourea derivatives. *Bioorg. Med Chem Lett.* 13, 485–488.
- Viale M, Lentini G, Gangemi R, Castagnola P, Milani G, Ravera S, Bertola N, Carrieri A, Cavalluzzi MM. 2022. Lubeluzole Repositioning as Chemosensitizing Agent on Multidrug-Resistant Human Ovarian A2780/DX3 Cancer Cells. *Molecules.* 27, 7870.

Title : *In silico* prediction of amino acid residues involved in substrate recognition by the human ABC transporter ABCB1.

Authors : Kazuhiro Satake¹⁾, Yuji Mitani¹⁾, Ichiro Nakamura¹⁾, Ritsuko Imai¹⁾, Thomas Efferth²⁾, Hiroshi Nakagawa¹⁾

Addresses : ¹⁾ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

²⁾ Department of Pharmaceutical Biology, Institute of Pharmacy and Biochemistry, University of Mainz.

Keywords : ABC transporter, ABCB1, P-glycoprotein, Docking study

Summary

***In silico* prediction of amino acid residues involved in substrate transport by the human ABC transporter ABCB1.**

**Kazuhiro Satake¹⁾, Yuji Mitani¹⁾, Ichiro Nakamura¹⁾, Ritsuko Imai¹⁾,
Thomas Efferth²⁾, Hiroshi Nakagawa¹⁾**

1) Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

2) Department of Pharmaceutical Biology, Institute of Pharmacy and Biochemistry, University of Mainz.

Cancer is the most common cause of death in Japan, and one-third of patients are of working age. It is essential to maintain the health of the working-age population and the elderly to realize a healthy aging society in Japan. Drug resistance of cancer cells has been a barrier to successful chemotherapy for cancer for a long time. In the present study, we focused on the ABC transporter ABCB1, one of the representative factors that conferred drug resistance to cancer cells. A homology model of human ABCB1 was constructed based on the X-ray crystal structure data of mouse Abcb1a (PDB code: 3G60), and docking studies was performed to predict amino acid residues intensely involved in substrate recognition by ABCB1. The present study indicated a possibility that Phe303, Tyr307, Ala342, and Phe343 are highly utilized in the capture of compounds by ABCB1 and that Ala342 and Phe343 are amino acid residues involved in substrate transport by ABCB1.