

【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、リン脂質とスカ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 につい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

