

令和元年6月4日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00400

研究課題名(和文) 分子シミュレーションで探るヘテロ2量体ABCトランスポーターの非対称ダイナミクス

研究課題名(英文) Asymmetric dynamics of hetero dimeric ABC transporters explored by molecular simulations

研究代表者

古田 忠臣 (Furuta, Tadaomi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：10431834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ABCトランスポーターは、ATPのエネルギーを用いて膜を介して様々な基質を輸送する膜タンパク質の大きなスーパーファミリーを構成する。本研究では、分子シミュレーションを用いて、ATPや基質の結合により誘導されるABCトランスポーターTM287/288およびCFTRの非対称ダイナミクスの解析を行った。TM287/288において基質結合がアロステリックなドメイン間コミュニケーションを誘導することおよびCFTRの最頻変異がドメイン界面の疎水性クラスターの崩壊を引き起こし機能不全をもたらすことが明らかとなった。これらの知見は、ABCトランスポーターの構造機能相関に重要な洞察を与えるであろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABCトランスポーターおよびその変異は、多剤耐性や様々な疾患に関連している。本研究で得られたABCトランスポーターの構造ダイナミクスに関する重要な知見は、今後の創薬において揺らぎといった観点からも大変有益であると思われる。

研究成果の概要(英文)：ATP-binding cassette (ABC) transporters constitute a large superfamily of membrane proteins that transport various substrates through membranes utilizing the energy of ATP. In this study, we investigated asymmetric dynamics of ABC transporters TM287/288 and CFTR induced by the binding of ATP and substrate using molecular simulations. It was revealed that substrate binding induced allosteric interdomain communication in TM287 / 288 and that the most frequent mutation in CFTR caused the disruption of a hydrophobic cluster at the domain interface, leading to dysfunction. These findings would provide important insights into the structure-function relationship of ABC transporters.

研究分野：生物物理

キーワード：ABCトランスポーター ATP 基質 輸送 変異 構造機能相関 疎水性クラスター 分子シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターは、細菌からヒトまで広く存在し、ATPの結合・加水分解・解離のエネルギーを用いて生体膜を介した基質輸送を行う膜内在性タンパク質の大きなスーパーファミリーを構成する。抗がん剤等の多剤耐性に関連することから医学的にも大変注目されている。ABCトランスポーターの基本構造は、2つのヌクレオチド結合ドメイン(NBDs)と2つ膜貫通ドメイン(TMDs)からなり(図1)、ATPと基質の結合に伴い内向き構造から外向き構造へと構造変化することにより基質を排出(機能)する。

各NBDには、7つのATP結合モチーフが存在し、NBD二量体化において、一方のNBDのコアサブドメインにある5つと他方のNBDのヘリカルサブドメインにある2つのモチーフがATPをサンドイッチすることで、計2つのATP結合ポケット(ABPs)を形成する。ホモ二量体型では、これらATP結合モチーフは良く保存されているものの、ヘテロ二量体型では、片側のABPを形成するモチーフに変異がありATP加水分解が起こらないとされている(図2)。ヒトには約50種のABCトランスポーターがあり、その約半数はヘテロ二量体型である。ヘテロ二量体型の作動機構の詳細は未解明のままであった。

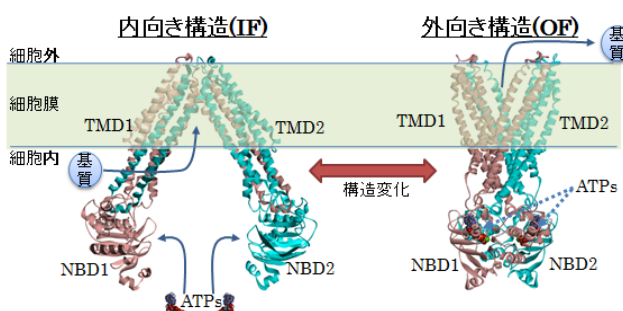


図1. ABCトランスポーターの構造変化と基質排出

	A	WaA(P)	Q	C(Sig)WaB	D	H(Switch)
	φ	GxxGxGKx	Q	LSGGQ	φφφφDE	SALD H
ホモ二量体型ABCトランスポーター						
TM287	Y	GETGSGKS	Q	FSGGQ	VLLLDE	SSVD H
TM288	Y	GPTGSGKFT	Q	LSGGQ	ILLLDE	SNVD H
TAP1	Y	FGNGSGKS	Q	LSGGQ	VLLLDE	SALD H
TAP2	Y	FGNGSGKS	Q	LSAAG	VLLLDE	SALD H
CFTR-N	W	GSTGAGKT	Q	LSGGQ	VLLLDS	GYLD H
CFTR-C	Y	GRTGSGKS	Q	LSHGQ	ILLLDE	ALLD H
MRP1-N	W	GVVGGGKS	Q	LSGGQ	VLLLDE	SAVD H
MRP1-C	Y	GRTGAGKS	Q	LSVQK	ILLLDE	SAVD H
SUR1-N	W	GVVGGGKS	Q	LSGGQ	VVFLDE	SALD H
SUR1-C	Y	GRTGSGKS	Q	FSGGQ	IFIMDE	ASID H
(TAP1=ABC2, TAP2=ABC3, CFTR=ABC7, MRP1=ABCC1, SUR1=ABCC8)						
ヘテロ二量体型ABCトランスポーター						
Fgp-N	Y	GNSGGGKS	Q	LSGGQ	ILLLDE	SALD H
Fgp-C	Y	GSSGGGKS	Q	LSGGQ	ILLLDE	SALD H
ABC10	Y	FGSGGKS	Q	LSGGQ	ILLLDE	SALD H
Sav1866	Y	GRSGGKS	Q	LSGGQ	ILLLDE	SALD H
MsbA	Y	GRSGGKS	Q	LSGGQ	ILLLDE	SALD H
BtuD ^{tr}	R'	FGNGGKS	Q	LSGGE	LLLLDE	NSLD H
MalK ^{tr}	W	FGSGGKS	Q	LSGGQ	VFLLE	SNLD H
HlsP ^{tr}	Y	GSSGGGKS	Q	LSGGQ	VLLLDE	SALD H
MJ0796 ⁷	Y	FGSGGKS	Q	LSGGQ	ILLLDE	GALD H
(Fgp=ABC1)						

図2. ATP結合モチーフ(ホモ・ヘテロ)

2. 研究の目的

本研究では、近年初めてヘテロ二量体型ABCトランスポーターとして構造解析された細菌TM287/288のATP・基質結合に伴う構造変化を分子シミュレーションにより解析することを第一の目的とした。また、ヘテロ二量体型ABCトランスポーターである(研究開始時には構造解析されていなかった)ヒトCFTRの最頻変異ΔF508における機能障害の原因を分子シミュレーションにより解析することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

まず、TM287/288に関して、4つの異なる状態(apo, 1ATP, 2ATP, 2ATP+S、ここでSは基質)において、複数の分子シミュレーションを実行することにより、結合するATP分子数の違いや基質結合による影響の解析を行った。初期構造に関して、OPM(Orientations of protein in membranes)データベースの膜貫通領域の情報に基づき、TM287/288(PDB ID: 3QF4)周りにDPPC二重膜を設置し、apo, 1ATP, 2ATP状態の構造を作成した。基質結合状態(2ATP+S)の構造作成には、Discovery Studio 4.0ソフトウェアのZDOCKモジュールを用いて、基質(Hoechst 33342)をドッキングした。各系、水・カウンターイオンを挿入し初期構造とした。これら初期構造を基に、TM287/288の至適温度が高いことに基づき2つの温度: 310 Kおよび323 Kで100 nsの分子シミュレーションを複数回(apo: 4回, 1ATP: 4回, 2ATP: 10回, 2ATP+S: 10回の計2.4 μs)実行し、得られた軌道の解析を行った。

次に、CFTRに関して、既知構造がないためホモロジーモデリングによりモデル構造の構築を行った後、野生型とΔF508変異体の比較解析を行った。初期構造に関して、TMDsにP-gp構造(PDB ID: 3G5U)、NBD1,NBD2にそれぞれCFTR構造(PDB ID: 1XMI, 3GD7)を用いてホモロジーモデリングによりモデル構造を構築し、各系、水・カウンターイオンを挿入し初期構造とした。野生型およびΔF508変異体に関して、まず各系100 nsの分子シミュレーションを実行した。その後、初期の構造変化に着目し20 nsの分子シミュレーションを各系3回実行し、得られた軌道の解析を行った。

4. 研究成果

TM287/288 に関して、解析の結果、2ATP および 2ATP+S 状態では NBD 二量体化が起ることが観測された。一方、apo および 1ATP 状態では NBD 二量体化が起らなかった。すなわち、NBD 二量体化には 2 つの ATP 分子の結合が必要であることを明らかにした。この結果は、実験的な先行研究(Zoghbi & Altenberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014))とも一致するものであった。また、2ATP 状態と 2ATP+S 状態の比較の結果、基質が結合した 2ATP+S 状態において、ATP 結合ポケット形成距離でのより高い確率をもつ分布が得られた。すなわち、NBDs への ATP 結合と TMDs への基質結合というアロステリックな TMD-NBD コミュニケーションにより、NBD 二量体化が促進されることが明らかになった(図 3 左)。さらに、apo 状態において、ATP 結合に適する様にヘリカルサブドメインが近づきコアサブドメインが露出するという「コア露出」モデルも提唱した(図 3 右)。これら成果は、発表論文⑤として *Biochemistry* 誌に出版した。

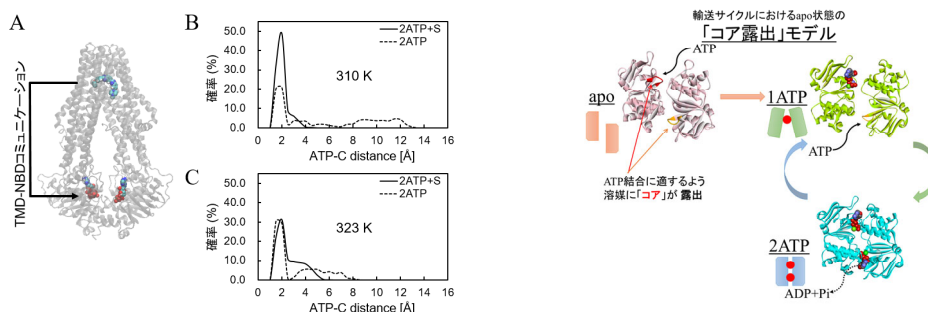


図 3. TMD-NBD コミュニケーションと「コア露出」モデル

CFTR に関して、解析の結果、野生型では適切な NBD 二量体化が起るものの、 $\Delta F508$ 変異体では NBD 二量体化が適切には起こらないことが分かった。また、CFTR の NBD1 には Regulatory Insertion (RI) という制御領域が存在するが、野生型ではこの RI が NBD2 と相互作用することで適切な NBD 二量体化に至るものの、 $\Delta F508$ 変異体ではその相互作用が乱されていることも分かった。そして、変異箇所周辺の詳細を調べたところ、野生型では F508 付近に疎水性残基が集まりクラスターを形成しているものの、 $\Delta F508$ 変異体ではそのクラスターが崩壊していた(図 4)。すなわち、この疎水性クラスターの崩壊が機能障害の原因であることを明らかにした。また、ここで観測された NBD 二量体化は、NBD1 にある F508 が細胞内ループ IF4 にある残基と相互作用して起こるが、ここで見られた NBDs の運動は、我々の先行研究(Furuta et al., *Biochemistry* (2014))で議論した運動と類似のものであった。これら成果は、発表論文⑨として *Biophys. Physicobiol.* 誌に出版した。

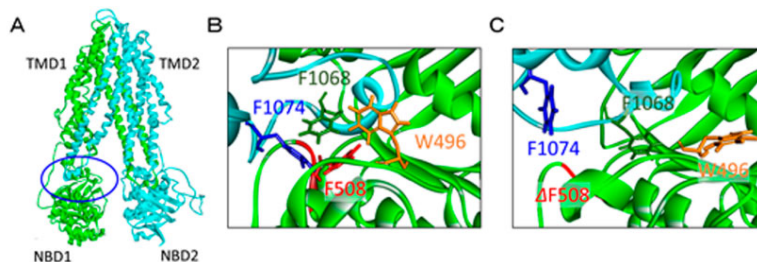


図 4. 疎水性クラスターの形成(野生型)および崩壊($\Delta F508$ 変異体)

その他、これまで ABC トランスポーターに関して行ったきた研究の総括として、構造変化に関する粗視化シミュレーションや ATP 加水分解に関する QM/MM 計算の結果なども含めた総説を、図書②(第 12 章執筆)として Springer から出版した。

本研究で得られた知見は、ABC トランスポーターの構造ダイナミクスに重要な洞察を提供するであろう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ①Wei-Lin Hsu, [Tadaomi Furuta](#), Minoru Sakurai, Analysis of the free energy landscapes for the opening-closing dynamics of the maltose transporter ATPase MalK₂ using enhanced-sampling molecular dynamics simulation, *J. Phys. Chem. B* 119, 9717-9725 (2015). DOI:10.1021/acs.jpcc.5b05432 査読有
- ②Honami Sakaizawa, Hiroshi C. Watanabe, [Tadaomi Furuta](#), Minoru Sakurai, Thermal fluctuations enable rapid protein-protein associations in aqueous solution by lowering the reaction barrier, *Chem. Phys. Lett.* 643, 114-118 (2016). DOI:10.1016/j.cplett.2015.11.014 査読有
- ③古田忠臣, 山口知宏, 加藤博章, 櫻井実, 実験とシミュレーションを用いた ABC トランスポーターによる物質輸送の機構解明, *生物物理* 56, 005-008 (2016). DOI:10.2142/biophys.56.005 査読有
- ④Wei-Lin Hsu, [Tadaomi Furuta](#), Minoru Sakurai, ATP hydrolysis mechanism in a maltose transporter explored by QM/MM metadynamics simulation, *J. Phys. Chem. B* 120, 11102-11112 (2016). DOI:10.1021/acs.jpcc.6b07332 査読有
- ⑤[Tadaomi Furuta](#), Yukiko Sato, Minoru Sakurai, Structural dynamics of the heterodimeric ABC transporter TM287/288 induced by ATP and substrate binding, *Biochemistry* 55, 6730-6738 (2016). DOI:10.1021/acs.biochem.6b00947 査読有
- ⑥Daiki Tatsumi, Kei Nanatani, Yuto Koike, Kiyoto Kamagata, Satoshi Takahashi, Ayumu Konno, [Tadaomi Furuta](#), Minoru Sakurai, Nobuyuki Uozumi, Probing native metal ion association sites through quenching of fluorophores in the nucleotide-binding domains of the ABC transporter MsbA, *Biochem. J.* 474, 1993-2007 (2017). DOI:10.1042/BCJ20161051 査読有
- ⑦Naoki Arai, [Tadaomi Furuta](#), Minoru Sakurai, Analysis of an ATP-induced conformational transition of ABC transporter MsbA using a coarsegrained model, *Biophys. Physicobiol.* 14, 161-171 (2017). DOI:10.2142/biophysico.14.0_161 査読有
- ⑧Wei-Lin Hsu, [Tadaomi Furuta](#), Minoru Sakurai, The mechanism of nucleotide - binding domain dimerization in the intact maltose transporter as studied by all-atom molecular dynamics simulations, *Proteins* 86, 237-247 (2018). DOI:10.1002/prot.25433 査読有
- ⑨Mitsuhiko Odera, [Tadaomi Furuta](#), Yoshiro Sohma, Minoru Sakurai, Molecular dynamics simulation study on the structural instability of the most common cystic fibrosis-associated mutant Δ F508-CFTR, *Biophys. Physicobiol.* 15, 33-44 (2018). DOI:10.2142/biophysico.15.0_33 査読有
- ⑩Ryosuke Hirano, Tsubasa Yabuchi, Minoru Sakurai, [Tadaomi Furuta](#), Development of an ATP force field for coarse - grained simulation of ATPases and its application to the maltose transporter, *J. Comput. Chem.* in press (2019). DOI:10.1002/jcc.25861 査読有

[学会発表] (計 22 件)

- ①境澤穂波, 渡邊宙志, 古田忠臣, 櫻井実, 熱ゆらぎと水和効果に着目した ABC トランスポーターの NBD 二量体化過程の統計熱力学的解析, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015.
- ②許維麟, 古田忠臣, 櫻井実, Analysis of the Free Energy Landscapes for the Open-Closing Dynamics of MalK₂ Using Enhanced Sampling MD Simulation, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015.
- ③境澤穂波, 渡邊宙志, 古田忠臣, 櫻井実, 熱ゆらぎと水和効果に着目した ABC トランスポーターの NBD 二量体化過程の統計熱力学的解析, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015.
- ④Tomohiko Hayashi, Shuntaro Chiba, [Tadaomi Furuta](#), Minoru Sakurai, Free energy calculation for the ATP-induced dimerization of the nucleotide-binding domains in a maltose transporter: Importance of the water-mediated entropic force, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), 2015.
- ⑤Tomoka Furukawa-Hagiya, Norio Yoshida, Shuntaro Chiba, Tomohiko Hayashi, [Tadaomi Furuta](#), Minoru Sakurai, 3D-RISM study of water-mediated forces between the nucleotide binding domains responsible for the power stroke in an ABC transporter, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), 2015.
- ⑥[Tadaomi Furuta](#), Tomohiro Yamaguchi, Hiroaki Kato, Minoru Sakurai, Structural and functional roles of coupling helices in ABC transporter MsbA: Experimental and computational studies, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), 2015.
- ⑦Wei-Lin Hsu, [Tadaomi Furuta](#), Minoru Sakurai, Analysis of the free energy landscape for the open-close dynamics of maltose transporter ATPase, MalK, using enhanced sampling MD simulation, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), 2015.
- ⑧古田忠臣, 分子シミュレーションで探る ABC トランスポーターの機能的ダイナミクス, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 2016. 招待講演

- ⑨許維麟, 古田忠臣, 櫻井実, QM/MM Metadynamics で探るマルトーストランスポーターの ATP 加水分解メカニズム, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016.
- ⑩クライヤー篠塚一帆, 古田忠臣, 櫻井実, 多剤認識転写因子 LmrR における薬剤分子認識機構の計算化学的解析, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016.
- ⑪古田忠臣, 南條舜, 相馬義朗, 櫻井実, MD シミュレーションによる CFTR チャネルの基質輸送機構及び変異による影響の解析, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016.
- ⑫クライヤー篠塚一帆, 古田忠臣, 櫻井実, 多剤認識転写因子 LmrR における薬剤分子認識機構の計算化学的解析, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016.
- ⑬許維麟, 古田忠臣, 櫻井実, Molecular dynamics investigation of the full maltose transporter with and without the maltose binding protein MalE, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016.
- ⑭矢渕翼, 南條舜, 古田忠臣, 櫻井実, Martini 力場を用いた粗視化シミュレーションによる Cl⁻チャネル CFTR のダイナミクスの解析, 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 2017.
- ⑮境澤穂波, 古田忠臣, 櫻井実, 親水性タンパク質-タンパク質間会合の駆動力に関する MD 及び 3D-RISM 計算, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017.
- ⑯平野諒輔, 古田忠臣, 櫻井実, 粗視化 MD シミュレーションを用いた ATP 結合により誘起されるマルトーストランスポーターの構造変化の解析, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018.
- ⑰境澤穂波, 許維麟, 古田忠臣, 櫻井実, ABC トランスポーターにおけるヌクレオチドドメイン 2 量体化の駆動力に関する計算化学的解析, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018.
- ⑱千葉一輝, 古田忠臣, 櫻井実, ABC トランスポーター CFTR の構造変化及び基質輸送機構の計算化学的解析, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018.
- ⑲中田康太, 古田忠臣, 櫻井実, MD シミュレーションを用いたグルコーストランスポーター 8(GLUT8)の膜貫通ヘリックス 7(TM7)に関する解析, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018.
- ⑳クライヤー篠塚一帆, 古田忠臣, 櫻井実, 転写制御因子 LmrR および QacR における多剤認識メカニズムに関する分子シミュレーション研究, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018.
- ㉑Tadaomi Furuta, Structural and Functional dynamics of ABC transporters explored by molecular simulations, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018. 招待講演
- ㉒Ryosuke Hirano, Tsubasa Yabuchi, Minoru Sakurai, Tadaomi Furuta, Development of an ATP force field for coarse-grained simulation of ATPases and its application to the maltose transporter, The 63rd Annual Meeting of the Biophysical Society, 2019.

[図書] (計 1 件)

- ①Tadaomi Furuta, Minoru Sakurai, The Role of Water in ATP Hydrolysis Energy Transduction by Protein Machinery, Springer, 353 (179-201) (2018).

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

- (1) 研究分担者
なし
- (2) 研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。