

令和元年5月30日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12520

研究課題名(和文)軌道アンサンブルの解析による親水性タンパク質-タンパク質間会合の駆動力の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of hydrophilic protein-protein association

研究代表者

櫻井 実 (Sakurai, Minoru)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・教授

研究者番号：50162342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では親水性タンパク質同士がどのような相互作用で会合に至るのかを分子シミュレーションにより調べた。その結果、同種のタンパク質(ドメイン)間の会合現象であっても、それが水溶液中で孤立した分子同士で起こるか、マルチドメインタンパク質中に組み込まれた状況の下で起こるかによって、駆動力が異なることが判明した。後者では、タンパク質全体の構造的制約があるので、着目するドメイン同士の会合は内部エネルギー変化に有利な軌跡をとるとは限らない。その場合は、遭遇会合体形成までは、水和力が会合を誘導する。しかしながら、その後の安定複合体形成までは、状況によらず水和エントロピーと内部エネルギーが駆動力であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で調べたATPが結合したヌクレオチド結合ドメイン(NBD)同士の会合は、ATPの結合エネルギーによって駆動される過程である。水溶液中の孤立分子間では、ATPエネルギーは静電力として一方のNBDからもう一方のNBDに伝播し会合が誘導される。しかし、マルチドメインタンパク質中では、ATPエネルギーは一度水和エンタルピーのエネルギーに変換されてから会合に必要な引力となるという結果が得られた。生体中のエネルギー通貨はATPであるが、マルチドメインタンパク質中のNBDにATPが結合するとなぜ大きな分子運動が生じるのか必ずしも十分に理解されていなかった。本研究は、教科書にない全く新規な描像を与えた。

研究成果の概要(英文)：The vast majority of protein functions in living cells are mediated by protein-protein associations. In this study, we investigated the mechanism by which hydrophilic proteins (domains) associate each other in water. In general, the molecular association is divided into the following two steps: i) formation of an encounter complex starting from the infinitely separated state and ii) formation of the native structure complex. Our molecular dynamics simulations combined with a theory of solution indicated that the first step is driven by the hydration entropy in the case of domain-domain association in a given multidomain protein, while it is driven by the internal energy in the case of isolated proteins. On the other hand, the second step is driven by the hydration entropy and internal energy irrespective of the conditions under which the association occurs.

研究分野：生物物理学

キーワード：ATP結合自由エネルギー 水和自由エネルギー 水和エンタルピー 水和エントロピー ABCトランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質はほとんどの生物学的プロセスを担っているが単独で生理機能を発揮するタンパク質はまれである。通常、タンパク質はパートナーとの相互作用（複数のタンパク質間複合体形成含む）を介して機能を発現している。

従来、タンパク質間相互作用（特に会合過程に着目）の主たる駆動力は疎水的相互作用である考えられてきた。しかしながら、最近の理論的研究によると、親水的相互作用が駆動力であるという研究成果も多い。このことは、タンパク質間会合における界面残基の約 70% が親水性あるいは解離性残基であるというバイオインフォマティクス解析からも裏付けられる。

通常、タンパク質間会合は、拡散による encounter complex の生成とそれに引き続く障壁の乗り越えの 2 過程として捉えられる。最初の過程に関しては、単なる拡散過程なのか、あるいは何らかの遠達力が働いているのか、という点に興味をもたれる。barstar-barnase 系に対する potential of mean force (反応座標に沿う自由エネルギー変化、以下 PMF) 計算によれば、タンパク質間の静電的相互作用が主要な駆動力である。しかし、最近研究代表者らは、ABC トランスポーター CFTR の親水性ドメインであるヌクレオチド結合ドメインの会合過程を MD 計算を用いて調べ、水和エンタルピーが遠達力として働き encounter complex 形成に導くことを見出した(Furukawa-Hagiya et al., Chem. Phys. Lett., 2014)。この結果は普遍性の確認が必要であるが、それは課題として残されていた。

第二の過程（反応障壁の乗り越え）に関して言えば、親水的相互作用は不利かもしれない。なぜなら、大きな脱水和のペナルティを伴うはずだからである。ところが、自然界で最も強いタンパク質間相互作用である barstar-barnase の系においてさえ、重心間距離を反応座標として PMF 計算すると、この会合は barrierless であるという結果が得られている。この予想外の結果はどのように解釈されるべきか課題として残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、前述した親水性タンパク質間会合に関する 2 つの課題を解決するため、分子シミュレーションにより会合過程の熱力学量の解析、言い換えると軌道アンサンブルの解析を行う。その結果より、タンパク質間会合における、遠達力の物理起源（水の役割等）と反応障壁低下のメカニズムを明らかにする。このような解析をなるべく広範なタンパク質（親水性球状タンパク質天然変性タンパク質など）について行う。

3. 研究の方法

3 - 1) 水中での親水性タンパク質 - タンパク質間会合の駆動力

解離定数 K_d (会合定数の逆数) の広い範囲をカバーするように、次の 3 つの系を選択した。すなわち、i) UBA-ubiquitin 系 ($K_d \sim 10^{-5}$ M)、ii) ヌクレオチド結合ドメイン (NBD) のプロトタイプとして MJ0796 をとりあげ、このタンパク質 2 つが会合する系 ($K_d \sim 10^{-6}$ M)、および iii) Barnase-Barstar 系 ($K_d \sim 10^{-14}$ M)。これらの系に対し、タンパク質を剛体近似した複合体形成シミュレーション、targeted MD (TMD) や conventional MD による複合体形成シミュレーションの実行と構造サンプリングを行い、次のプロトコールに従い解析を行った。

- 1) 各軌道について、時間発展に沿ってスナップショットを取得する。
- 2) 各スナップショットに対して内部エネルギーを AMBER 力場にしがたって計算する。
- 3) 各スナップショットに対して水和自由エネルギー、水和エンタルピー及び水和エンタルピーを溶液論の 3D-RISM 法を用いて計算する。
- 4) 2) の内部エネルギーと 3) の水和自由エネルギーの和を計算し、与えられたスナップショットに対する自由エネルギーとする。
- 5) 得られた各軌道に沿った自由エネルギープロファイルに対して次の 2 点の解析を行う。

初期構造から encounter complex が形成されるまでの過程の駆動力（遠達力）は何か？

2 つの親水性タンパク質間の会合において、静電的相互作用（内部エネルギー項）が遠達力として働いているのか？それとも水和エンタルピー項が遠達力として働いているのか？

encounter complex から native complex 形成までの過程については、各軌道の自由エネルギープロファイルから反応障壁を評価する。

3 - 2) マルチドメインタンパク質における親水性ドメイン同士の会合

マルチドメインタンパク質としてマルトーストランスポーターを選択した。このタンパク質は、2 つの膜貫通ドメイン (TMD: MalG と MalF)、2 つの NBD (MalK₂) およびマルトース結合タンパク質 (MalE) から構成されている (図 1)。図 1 では NBD に ATP が結合していない状態に対応しており、TMD は細胞内側に向かって開いている (inward-facing)。X 線解析によると、NBD への ATP の結合に伴って NBD の二量体化が起こり、その後 TMD は細胞外側に向かって開く (outward-facing)。本研究では、前半の NBD の 2 量体化過程に特に興味があるので、まず、図 1 の構造の

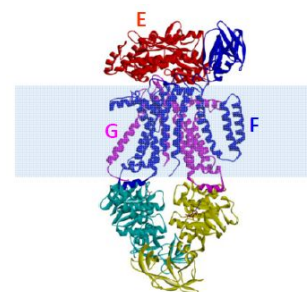


図 1 MalK₂

NBD(MalK₂ 部分)に 2 個の ATP を結合させたモデルを作成し、これを POPC からなる水和リン脂質二重膜中に埋め込み、MD シミュレーションを行った。ついで、前報(Furukawa-Hagiya et al.2014) と同様の方法で解析を行った。具体的には、NBD 部分のトラジェクトリーを抽出し、それに対し 3 - 1 の 1) ~ 5) と同様の解析を行った。

4 . 研究成果

4 - 1) 水中での親水性タンパク質 - タンパク質間会合の駆動力

図 2 に MJ0796 2 量体に対する TMD の結果を示す。重心間距離 (COM distance) 80 Å ~ 35 Å の領域は encounter complex 形成過程であり、それ以下は native complex 形成過程である。また、 ΔG 、 ΔE 、 ΔH 、 Δh 、 $-T\Delta S$ は、それぞれ自由エネルギー、内部エネルギー、エン

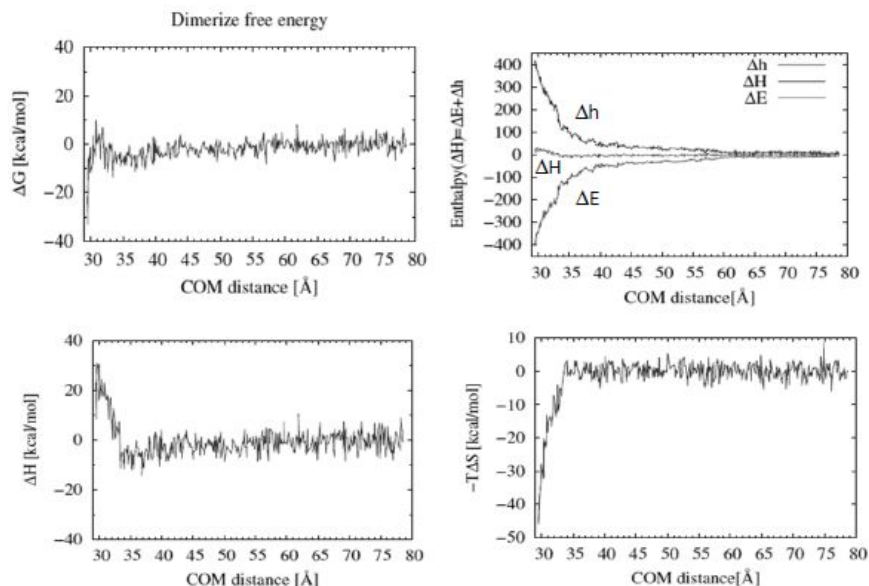


図 2

タルピー ($\Delta E + \Delta h$)、水和エンタルピーおよび水和エントロピー変化を表している。encounter complex 形成過程では、COM 減少に伴いわずかに自由エネルギーが減少するが、この原因は ΔH の減少によるものである。また、この ΔH の減少は、 ΔE の減少が Δh の増大をわずかに上回るために生ずる。したがって、この過程の駆動力は静電的引力に起因する ΔE であると結論できる。一方、native complex 形成過程では、脱水和のエンタルピー増大 (Δh の増大) が ΔE の減少を上回り、 ΔH は反応障壁の原因であることが判明した。対照的に、 $-T\Delta S$ は COM の減少とともに減少し、この過程の駆動力として働いていることが明らかとなった。詳細は省くが、 $-T\Delta S$ の減少は、排除体積の減少に伴う水の並進・回転エントロピーの増大によって起こり、脱水和のペナルティを補って余りあるほど大きい。なお、タンパク質を剛体近似した複合体形成モデル、TMD および conventional MD シミュレーションの結果を比較することにより、脱水和が起こるためにはタンパク質 - タンパク質界面の熱揺らぎが重要であることも明らかにした (Sakaizawa et al., Chem. Phys. Lett. **643**, 114-118 (2016))。以上より、反応の自由エネルギー障壁は大幅に低下し、10 kcal/mol 程度までさがりため (conventional MD ではほぼ barrierless) 水中での親水性タンパク質間会合は高速で起こりえることが判明した。

UBA-ubiquitin 系および Barnase-Barstar 系でも同様の結果・結論が得られた。

4 - 2) マルチドメインタンパク質における親水性ドメイン同士の会合

図 3 は、2 つの ATP binding pocket (ABP1 と ABP2) の形成過程を示している。縦軸は、ポケットの閉じ具合を表しており、10 Å 程度になるとほぼ完全に閉じた (ポケットが形成された) と言える。図からわかるとおり、ABP1 は約 40 ns、ABP2 は約 120 ns で形成された。ポケット形成に伴い当然 NBD 間 COM 距離も短縮され、2 つの ABP 形成が終了する (約 120 ns) あたりで、COM は急激に減少する。水溶液中での会合同様に (図 2) 会合過程は 2 つの段階に分けられる。第一段階は encounter complex 形成過程で COM 距離 28 Å ~ 25 Å (0 ~ 120 ns)、第 2 段階は COM 距離 25 Å ~ 23 Å (120 ~ 200 ns) に相当する。

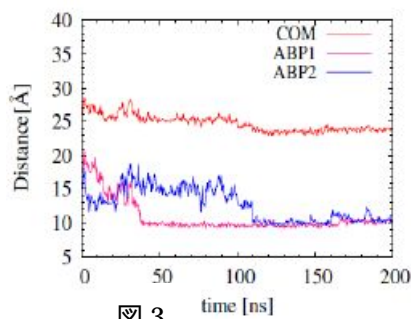


図 3

図 4 に熱力学量を COM 距離に対してプロットした。興味あることに、第一段階において、 ΔE は距離の減少とともに増大し駆動力になってない。この段階の駆動力は Δh である。すなわち、通常遠達力として働く静電エネルギーは、ここでは反発力になっており、水和力が遠方から 2 つのドメインを接近させる役割を果たしている。したがって、水溶液中における 2 つの孤

立した NBD 間の会合 (図 2 右上) の場合とは全く異なる結果となった。一方、第 2 段階に関しては、主たる駆動力は ΔE と $-T\Delta S$ であり、図 2 と同様の結果が得られた。

以上の結果は、複数回の MD 計算を通じて再現性の確認を行っている。したがって、同種の親水性タンパク質 (ドメイン) 間の会合現象であっても、それが水溶液中で孤立した分子同士で起こるか、マルチドメインタンパク質中に組み込まれた状況の下で起こるかによって、駆動力が異なることが判明した。後者では、タンパク質全体の構造的制約があるので、着目するドメイン (上の場合 NBD) 同士の会合は、それら自身の内部エネルギー変化 ΔE が最も有利な軌跡を描けるとは限らない。その場合は、水和力がアシストして、会合に導くと言う描像が得られた。

ATP が結合した NBD 同士の会合は、ATP の結合エネルギーによって駆動される過程である。水溶液中の孤立分子間では、ATP エネルギーは静電力として一方の NBD からもう一方の NBD に伝播し会合が誘導される。しかし、マルチドメインタンパク質中では、ATP エネルギーは一度水和エンタルピーのエネルギーに変換されてから会合に必要な引力となる、と言えるだろう。この描像は、まさに本研究の背景となった CFTR タンパク質に関する前報 (Furukawa-Hagiya et al., Chem. Phys. Lett., 2014) で見出され、その普遍性の確認が本研究の第一目的であったが、その目的は十分に達成されたと言える。

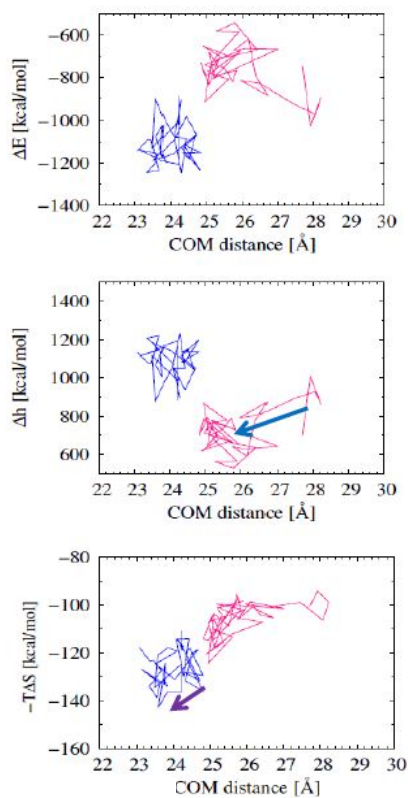


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Wei-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

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 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, 熊本, 9/19-21, 2017.
- 2) 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, 新潟, 6/26-28, 2018.

〔図書〕(計 1 件)

1) Tadaomi Furuta, Minoru Sakurai, Functional mechanisms of ABC transporters as revealed by molecular simulations, in “The role of water in ATP hydrolysis energy transduction by protein machinery” ed. by M. Suzuki, Springer, Singapore, (2018) 353.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年:
 国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。