

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02415

研究課題名(和文)トランスポーターの基質輸送速度を変える変異の理論的予測

研究課題名(英文) Theoretical prediction of mutations that speed up substrate transportation in transporter protein

研究代表者

岡崎 圭一 (Kei-ichi, Okazaki)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・計算科学研究センター・准教授

研究者番号：50792529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、トランスポーターが基質を輸送する際の構造遷移ダイナミクスを分子動力学シミュレーションで明らかにして、基質輸送速度を変える変異の予測を行った。Na⁺/H⁺交換輸送体であるPaNhaPを対象として、基質輸送過程における内向き開・外向き開構造状態間の遷移ダイナミクスの全原子シミュレーションを行い、外側疎水性ゲートの開放が律速過程であることを同定した。そして、外側疎水性ゲートの相互作用を弱めた変異体における基質輸送能の測定実験を行い、野生型よりも基質輸送速度が向上していることを確認した。これにより、トランスポーターの機能制御メカニズムを解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスポーターは細胞内外のイオン等基質濃度の制御に関わっており、その機能不全により様々な病気が引き起こされる。例えば、我々が研究対象としているNa⁺/H⁺交換輸送体はヒトにおいてはNHEと呼ばれており心不全や自閉症の発症に関わっている。従って、トランスポーターの動作メカニズム解明は、創薬など医学的な応用につながり得る。さらに、基質輸送速度を向上させる改変は、植物の塩耐性向上や糖度向上など農学的な応用の可能性もある。このような応用可能性に加えて、トランスポーターの物理化学的メカニズム解明は、分子科学において新しいチャレンジであり重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：In this project, we used molecular dynamics simulations to elucidate the structural transition dynamics during substrate transport by transporter proteins, and to predict mutations that alter the substrate transport rate. We performed all-atom simulations of the transition dynamics between the inward- and outward-open conformations during substrate transport in the Na⁺/H⁺ antiporter PaNhaP, and identified the opening of the outside hydrophobic gate as the rate-limiting process. Then, we experimentally measured the substrate transport rate of the mutant with weakened interaction of the outside hydrophobic gate, and confirmed that the substrate transport rate was enhanced compared with the wild type. This study helped to elucidate the mechanism of functional regulation of the transporter.

研究分野：生物物理学

キーワード：トランスポーター 分子動力学シミュレーション 遷移パス 基質輸送速度 疎水性ゲート

1. 研究開始当初の背景

近年、膜タンパク質の結晶化技術の向上や、クライオ電子顕微鏡法の解像度向上により、トランスポーターの構造が徐々に解かれている状況にある。一般的に、トランスポーターは内向き開構造と外向き開構造を交互に取る交互アクセスメカニズムで動作しているが、それらの状態やその中間状態に対応する高解像度な構造が、様々なトランスポーターで得られてきている。本研究課題で主に対象とする Na^+/H^+ アンチポーターについても、 Na^+ と H^+ を 1:1 で交換するタイプについて、結晶構造解析による高解像度の内向き開構造と電子顕微鏡法による低解像度の外向き開構造が得られた。

しかしながら、このような静的なスナップショット構造のみでは、基質輸送メカニズムの全貌は分からない。動的な基質輸送過程を原子レベルで解明できるのが、分子動力学シミュレーションである。申請者は、上記の Na^+/H^+ アンチポーターにおける外向き開構造の原子レベル構造をモデリング後、基質イオン輸送の律速過程である内向き開構造 \leftrightarrow 外向き開構造間遷移の予備的なシミュレーションを行っている。

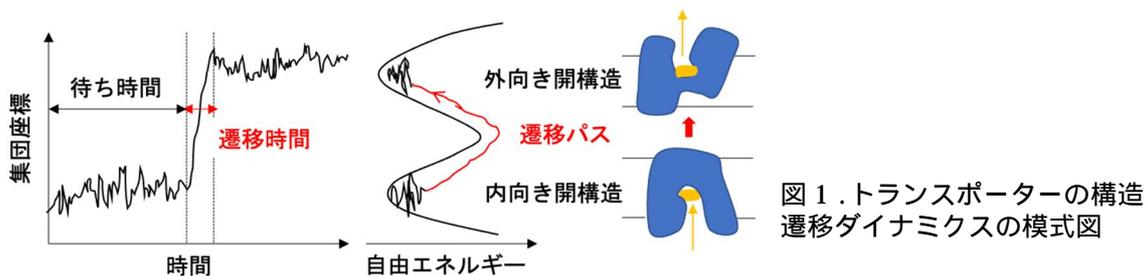
本研究課題では、トランスポーターの構造遷移ダイナミクスに基づいて、基質輸送速度を変える変異の予測を行う。それによって、基質輸送速度はどのように制御されているのかという問いに取り組む。輸送速度は、細胞内外での濃度調節をうまく行うために最適化されていると考えられ、それを変化させる変異の予測ができれば、トランスポーターを意のままに操作できるようになる可能性がある。また、内向き開構造 \leftrightarrow 外向き開構造遷移の行き・帰りの速度定数の比(つまり両状態の相対的安定性)を改変する変異を見つければ、野生型で不安定な状態を安定化して高解像度結晶構造が解ける可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、 Na^+/H^+ アンチポーターを主な対象にして、その基質輸送速度改変を目標に、以下のような2つの目的を持って進める。

目的1は、基質輸送の律速過程となっているトランスポーターの構造変化(内向き開構造 \leftrightarrow 外向き開構造)ダイナミクスを全原子分子動力学シミュレーションによりサンプリングすることである。トランスポーターのような大規模シミュレーション系(水や脂質膜も含め数十万原子数)だと、現状ではマイクロ秒程度のシミュレーションがやっとであるが、これは実際に基質輸送が起こるミリ秒~秒のオーダーに遠く及ばない。そこで、この機能的運動の時間スケールのうちほとんどは何も起こらない待ち時間であり、今注目する遷移が始まって終わるまでに要する時間はずっと短いことに着目して、この遷移する部分を集中的にシミュレーションする(図1)。この遷移パスシミュレーションにより、基質輸送ダイナミクスの律速になっている構造遷移を原子レベルで「見て」メカニズムを理解することが可能になる。また、輸送速度改変への重要な情報を得ることができる。

目的2は、解明した構造遷移ダイナミクスに基づいて、輸送速度を変える変異を予測することである。遷移パスシミュレーションの結果から得られた構造遷移パス・アンサンブル(統計集団)から、遷移過程のどの段階で特定の相互作用が形成・消滅するのかを解析して、特定の変異が与える影響を定量化する。変異トランスポーターについて遷移パスシミュレーションをやり直すのではなく、野生型での構造遷移パス・アンサンブルの解析から、それぞれの変異が構造遷移の遷移状態もしくは始・終状態の安定性のどちらに影響するのかを定量化する。前者の場合は構造遷移速度の改変、後者の場合は安定性の改変につながる。



3. 研究の方法

全原子モデルを用いた分子動力学法を用いて、トランスポーターにおける構造遷移をシミュレーションした。しかしながら、上で述べたように実際に基質輸送が起こるミリ秒~秒の時間オーダーの直接的シミュレーションは現時点で不可能であるので、遷移パスサンプリング

(Transition Path Sampling) を用いて遷移ダイナミクスを集中的にシミュレーションした。この手法は 1998 年頃から開発されてきたが、我々が開発した Shooting from the top アルゴリズム¹⁾を用いることでより効率的に新しい遷移パスを生成でき大規模系でも使える。さらに、遷移パスシューティングの結果を用いた最尤法による反応座標の解析を行うことで遷移状態を決めている律速過程を同定した。この律速過程に基づいて、基質輸送速度を変える変異の予測を行った。

予測された基質輸送速度を変える変異体トランスポーターを実験的に検証するために、リポソームに発現させて、外向きにプロトン濃度勾配をかけた状況で放射性ナトリウムイオンがリポソーム内に輸送される速度を測定した。

4. 研究成果

Na^+/H^+ アンチポーターは、ナトリウムイオンとプロトン細胞内外で交換するトランスポーターで、ヒトにおいては NHE と呼ばれていて心不全や自閉症などの発症に関与している創薬ターゲットにもなっている。ヒト由来 NHE の立体構造はよくわかっていないが、古細菌由来のもの (PaNhaP) の内向き開構造は結晶構造解析で得られていた。

まず我々は、未解決であった外向き開構造について、低分解能電子顕微鏡像を用いた構造モデリングとマイクロ秒オーダーの長時間シミュレーションを行うにより安定な外向き開構造を得た(図2)²⁾。

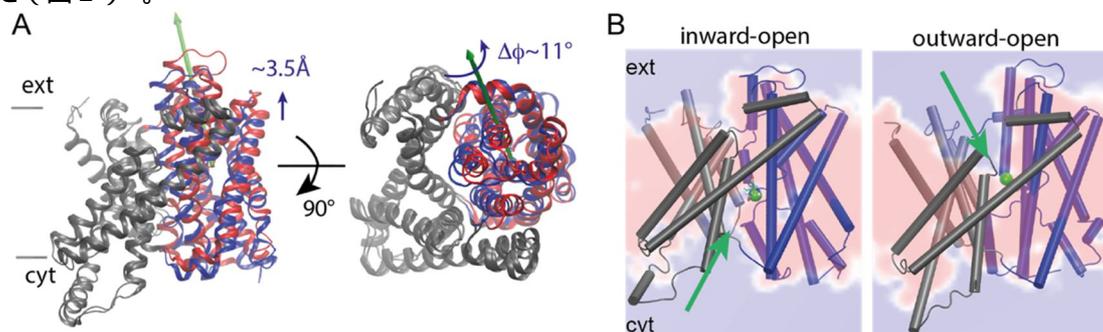


図 2. 交互アクセスメカニズムにおける内向き開・外向き開構造。(A) 内向き開・外向き開構造の比較。ダイマー化ドメイン(灰色)を重ねあわせた時のトランスポータードメイン(青色: 内向き開、赤色: 外向き開)の変化。(B) 内向き開・外向き開構造における水の平均密度(青色: バルク水、赤色: 水なし)と結合サイト(緑色)。

さらに我々は、遷移パスサンプリングという重要な動きが起こる瞬間だけを切り出してシミュレーションを行う技術を応用することで、イオン輸送が起こる瞬間のシミュレーションに成功した。そして、そのシミュレーション結果から、イオン結合サイトへのゲートの役割を果たしている疎水性残基ペアを発見した(図3)²⁾。

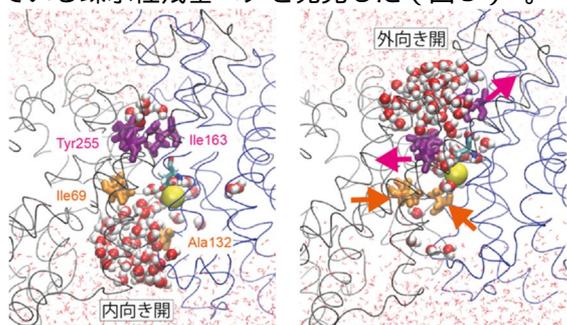


図 3. イオン輸送が起こる瞬間のシミュレーションと疎水性ゲート。発見された疎水性ゲート(Ile163-Tyr255, Ile69-Ala132)をそれぞれ紫色とオレンジ色で示した。

シミュレーション結果から分かったドメイン運動や疎水性ゲートを取り入れた反応座標解析により、外側疎水性ゲートの開放が律速過程であることが分かった。従って、その相互作用を弱める変異により構造遷移が起こりやすくなり基質輸送速度向上につながると予測した。実験的にこの相互作用を弱める変異を施してやると、予測通り野生型よりもイオンを2倍以上速く輸送するということが分かった²⁾。このように、構造遷移メカニズムに基づいて基質輸送速度を変化させた改変は前例がなく重要な成果である。

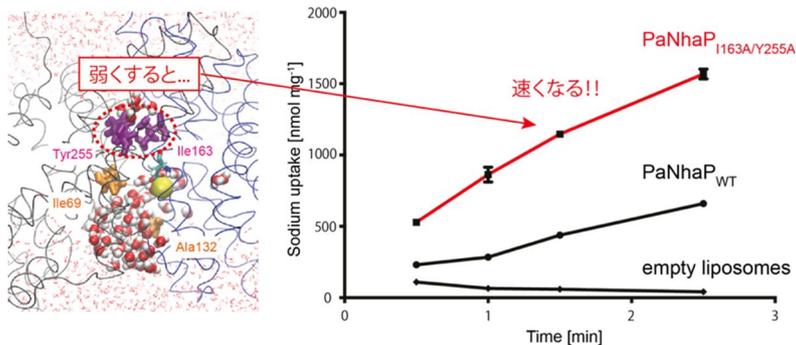


図 4. 疎水性ゲートの相互作用を弱くすると、輸送速度が上がる。

上記の成果以外にも、 Na^+/H^+ アンチポーターにおけるイオン選択性の自由エネルギー計算を行った³⁾。また、反応座標解析等の方法論開発^{4,5)}や生体膜変形現象の分子シミュレーション^{6,7)}も行った。

引用文献

- 1) Jung, Okazaki and Hummer, *J Chem Phys*, **147**, 152716 (2017)
- 2) Okazaki *et al.* *Nat. Commun.* **10**, 1742 (2019)
- 3) Warnau *et al.* *J. Phys. Chem. B* **124**, 2, 336-344 (2020)
- 4) Mori *et al.* *J. Chem. Phys.* **153**, 054115 (2020)
- 5) Okazaki, Nakamura, and Iino, *J. Phys. Chem. B* **124**, 30, 6475–6487 (2020)
- 6) Mahmood, Noguchi, and Okazaki, *Sci. Rep.*, **9**, 14557 (2019)
- 7) Mahmood, Poma, and Okazaki, *Front. Mol. Biosci.* **8**, 619381 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okazaki Kei-ichi, Nakamura Akihiko, Iino Ryota	4. 巻 124
2. 論文標題 Chemical-State-Dependent Free Energy Profile from Single-Molecule Trajectories of Biomolecular Motors: Application to Processive Chitinase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6475 ~ 6487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c02698	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Yusuke, Okazaki Kei-ichi, Mori Toshifumi, Kim Kang, Matubayasi Nobuyuki	4. 巻 153
2. 論文標題 Learning reaction coordinates via cross-entropy minimization: Application to alanine dipeptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 054115 ~ 054115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0009066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mahmood Md. Iqbal, Poma Adolfo B., Okazaki Kei-ichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Optimizing Go-MARTINI Coarse-Grained Model for F-BAR Protein on Lipid Membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 619381 ~ 619381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2021.619381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Okazaki Kei-ichi, Wohler David, Warnau Judith, Jung Hendrik, Yildiz Ozkan, Kuhlbrandt Werner, Hummer Gerhard	4. 巻 10
2. 論文標題 Mechanism of the electroneutral sodium/proton antiporter PaNhaP from transition-path shooting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09739-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mahmood Md. Iqbal, Noguchi Hiroshi, Okazaki Kei-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Curvature induction and sensing of the F-BAR protein Pacsin1 on lipid membranes via molecular dynamics simulations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51202-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Warnau Judith, Wohlert David, Okazaki Kei-ichi, Yildiz Ozkan, Gamiz-Hernandez Ana P., Kaila Ville R. I., Kuhlbrandt Werner, Hummer Gerhard	4. 巻 124
2. 論文標題 Ion Binding and Selectivity of the Na ⁺ /H ⁺ Antiporter MjNhaP1 from Experiment and Simulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 336 ~ 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b08552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kei-ichi Okazaki
2. 発表標題 Curvature induction and sensing of the F-BAR protein Pacsin1 on lipid membranes via molecular dynamics simulations
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎圭一
2. 発表標題 分子モーターの1方向性運動モデルの新規推定法の開発 キチナーゼへの応用
3. 学会等名 第10回分子モーター討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kei-ichi Okazaki
2. 発表標題 Mechanism of Na ⁺ /H ⁺ antiporter from transition path sampling and engineering of a faster transporter
3. 学会等名 Frontiers of Computational Physics from meV to MeV (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎圭一
2. 発表標題 生体分子マシンにおける機能発現ダイナミクスの解明とその制御
3. 学会等名 第1回生体分子シミュレーション・モデリング研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kei-ichi Okazaki
2. 発表標題 Dynamic energy landscape of a linear motor chitinase from single-particle tracking trajectories
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kei-ichi Okazaki
2. 発表標題 Molecular simulation and modeling of functional dynamics in FoF1 ATP synthase
3. 学会等名 2nd Tokyo ATPase Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kei-ichi Okazaki
2. 発表標題 Mechanism of electroneutral sodium/proton antiporter from transition-path shooting
3. 学会等名 Institute Seminar, Max-Planck Institute of Biophysics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡崎圭一
2. 発表標題 生体分子マシンにおける機能ダイナミクスの解明
3. 学会等名 生物物理若手の会第58回夏の学校 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei-ichi Okazaki
2. 発表標題 Mechanism of Na ⁺ /H ⁺ antiporter from transition-path simulations: Making faster transporter based on mechanism
3. 学会等名 Workshop: Trends in Computational Molecular Biophysics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei-ichi Okazaki
2. 発表標題 Transport mechanism of sodium/proton antiporter from transition-path simulations
3. 学会等名 the 2nd workshop on Advances in Theory and Computation of Complex Systems --- Biological Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡崎圭一
2. 発表標題 遷移バスサンプリングによる膜輸送タンパク質の基質輸送メカニズムの解明
3. 学会等名 スーパーコンピュータワークショップ2018 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>トランスポーターがイオンを輸送する瞬間のシミュレーションに成功 高速トランスポーターをデザイン https://www.ims.ac.jp/news/2019/04/17_4308.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 力也 (Watanabe Rikiya) (30540108)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	マックスプランク生物物理学研究所		
ポーランド	ポーランド科学アカデミー		