

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590212

研究課題名（和文） ATP加水分解スイッチ仮説に立脚したABCトランスポーター駆動メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study for ATP-driven transport mechanism of ABC transporters based on the “ATP hydrolysis switch” hypothesis.

研究代表者

相馬 義郎 (SOHMA YOSHIRO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：60268183

研究成果の概要（和文）：

ABC トランスポーター・CFTR チャンネルの ATP 依存性ゲーティングの動態を詳解することにより、ATP 結合ドメインにおける ATP 加水分解の可否を決定づけている新規の中間状態の存在を明らかにし、さらには加水分解される ATP 分子数と外に対して行う仕事量が 1 動作サイクルごとに変化している可能性を示した。この結果は ATP の加水分解が、エネルギー源ではなくスイッチとして働いている可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Investigating the ATP-dependent gating kinetics of CFTR channel, a member of ABC transporter superfamily in detail revealed a loose coupling between ATP-hydrolysis cycle (chemical energy generated) and the pore gating cycle (mechanical energy consumed) as well as a novel state for priming the ATP-hydrolysis, which supports an idea that the ATP-hydrolysis functions as a timing switch, not an energy source.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜・チャンネル・トランスポーター・能動輸送

## 1. 研究開始当初の背景

ATP Binding Cassette (ABC) トランスポータースーパーファミリーは、ファミリー共通の分子内ドメイン “Nucleotide Binding Domain (NBD) エンジン” で ATP 加水分解を行いながら、Membrane Spanning Domain (MSD) におけ

る構造変化を引き起こす機械的応力を発生し、薬剤の能動輸送などの機能を発揮している。現在まで、ATP は加水分解によってエネルギーを放出する “高エネルギーγリン酸” を持ち、細胞の「エネルギー通貨」として働き、ABC トランスポーターを含めた能動輸送を

行う膜機能分子（能動輸送ポンプ）が上り坂輸送を行うための主要エネルギー源であるという考え方が主流であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来の「ATP エネルギー通貨説」に反立して、ABC トランスポータ NBD エンジンにおいては、ATP 加水分解エネルギー以外の ATP 結合プロセスや水和状態に依存した自由エネルギー変化によるエネルギー供給が主要であり、NBD エンジンでの ATP 加水分解の主な役割は NBD の状態を変えるためのスイッチであるという「ATP 加水分解スイッチ仮説」に基づいて ABC トランスポータの駆動メカニズムの解明を目指した。具体的には、(1) NBD エンジンでの ATP 加水分解サイクルに伴う構造変化の解明（新規中間状態の同定）(2) NBD での ATP 加水分解サイクルと MSD における構造変化サイクルのカップリング様式の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ABC トランスポータスーパーファミリー中で唯一イオンチャンネルの機能を有する CFTR を研究材料として、電気生理学的手法（パッチクランプ法）を用いたシングルチャンネル電流から NBD の加水分解サイクルをモニターした。そして、NBD への点変異導入が加水分解サイクルに与える影響および非加水分解 ATP アナログである ピロリン酸  $PP_i$  の急速投与・除去が NBD サイクルに与える影響等を測定・比較した。

(2) 以上の実験データに基づいて分子動力学シミュレーションを行い、「ATP エネルギー

一通貨説」および「ATP 加水分解スイッチ仮説」との整合性を検討し、ABC トランスポータの駆動メカニズムの包括的な解明を試みた。

## 4. 研究成果

(1) CFTR チャンネルの NBD における ATP の安定結合に重要な働きをしていることが知られている 1219 番目のチロシン残基に変異導入 (Y1219G/) すると、正常な ATP 加水分解と ATP 加水分解失敗の明確に分けられる 2 つのケースが確率的に起こることを発見した [論文⑥]。このことは、NBD エンジンの動作サイクルにおいて、NBD 二量体形成（チャンネル開口）中に、その次のステップにおける ATP 加水分解の成否を運命づけている、ある隠された「ATP 加水分解のための準備状態」が存在していることを示唆している。この現象は、本研究の中心命題である「ATP 加水分解スイッチ」の存在とそのメカニズムの解明のために非常に重要な情報を含んでいると考えられる。

(2) CFTR 特異的阻害薬 CFTRinh-172 の阻害メカニズムの詳解を行い、CFTR チャンネルには細胞外側にあるイオン透過ゲートの他に、より細胞内側にもうひとつルーズなゲートがあることを明らかにした [文献⑤]。さらに ATP 依存性チャンネルゲート駆動が失われた変異体 G551D-CFTR の薬剤ゲニステイン genistein とクルクミン curcumin によるゲート駆動の回復とそのメカニズムについての研究をおこない [文献④]、本プロジェクトの基盤ターゲットである CFTR 分子の作動メカニズムについての重要な知見を得ることができた。

(3) ABC トランスポータ・CFTR チャンネルの ATP 依存性ゲーティングサイクルを ATP アナ

ログであるピロリン酸 PPi を用いて詳しく解析した。その結果、CFTR チャンネルが、開口状態から ATP の加水分解をきっかけとして閉口状態へと移行する過程において、ATP 加水分解から NBD 部分が解離した閉口状態になるまでの間に、PPi によって極めて速いレートで開口状態に移行が起こる新規の中間状態 Xi が存在することを明らかにした [文献③]。本論文では、この新規の中間状態 Xi においてポアが開状態・閉状態のいずれにあるかについては最終的な断定できなかつたが、もし新規中間状態 Xi においてポアが開口状態にある可能性は非常に高く、それが真実とすれば、今回の発見は、CFTR チャンネルの 1 回の開状態中に複数回の ATP 加水分解サイクルが回することを意味している。

(4) さらに R352C 変異 CFTR が、開口中に起こる ATP 加水分解の前と後でシングルチャンネルコンダクタンスが変化することを発見した。この R352C-CFTR に新規中間状態 Xi の安定性に影響を与える W401F 変異を導入してその効果を検討することにより、ATP 加水分解サイクルとゲーティングサイクルとのルーズカップリングが追確認できた [文献②]。

(5) CFTR チャンネルにおける ATP 加水分解サイクルとゲーティングサイクルとのルーズカップリングの可能性についての発見は、CFTR がメンバーである ABC トランスポータースーパーファミリーの P-glycoprotein などの他の輸送ポンプ分子の場合に当てはめて考えると、基質 1 分子を上り坂輸送するのに消費される ATP の数が確率的に変化している可能性があることを意味している。1 分子の基質を一定の電気化学ポテンシャル差に逆らって行う仕事（外部仕事）は常に一定であるので、もし ATP が従来から考えられているように生体のエネルギー通貨として自由エネルギーを供給しているとするれば、余剰のエネ

ルギーは熱として確率論的に放散されている可能性が考えられた。その一方で、ATP 加水分解が単に ATP 結合エネルギーから ADP-Pi 間静電反発エネルギーへのスイッチ機能を果たしていると仮定した場合には、熱エントロピーの確率論的生成は起こらないはずである。したがって、作動中の CFTR 分子からの熱エントロピーの測定が、本研究課題の中心命題である ATP 加水分解スイッチ仮説の検証の鍵になると考えられた。

(6) CFTR 分子全体の結晶構造はまだ得られていないが、最近発表された CFTR と同じ膜トポロジーを持つ P-glycoprotein (ABCB1) の内向き構造に基づいた CFTR ホモロジーモデルを作成した。そのモデルを用いて MD シミュレーションを行い、ATP 非結合状態では 2 つの NBD が乖離した状態で平衡状態に入り、次に 2 つの NBD に ATP を結合させることにより NBD の 2 量体化に成功した [文献①]。これは、ABC トランスポーターにおける NBD の ATP 駆動性 2 量体化を MD で再現できた最初の仕事であり、2 つの ATP 仮説の検証のための有用なツールとなると期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Furukawa-Hagiya T, Furuta T, Chiba S, Sohma Y, Sakurai M (2013) The power stroke driven by ATP binding in CFTR as studied by molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* **117**: 83 - 93 査読有  
doi: 10.1021/jp308315w
- ② Jih KY, Sohma Y, Hwang TC (2012) Non-integral stoichiometry in CFTR gating revealed by a pore-lining

- mutation *J. Gen. Physiol.* **140**: 347 - 359  
doi:10.1085/jgp.201210834 査読有
- ③ Jih KY, Sohma Y, Li M, Hwang TC (2012)  
Identification of a novel  
post-hydrolytic state in CFTR gating *J.  
Gen. Physiol.* **139**: 359 - 370 査読有  
doi: 10.1085/jgp.201210789
- ④ Yu YC, Miki H, Nakamura Y, Hanyuda A,  
Matsuzaki Y, Abe Y, Yasui M, Tanaka K,  
Hwang TC, Bompadre SB, Sohma Y. (2011)  
Curcumin and genistein additively  
potentiate G551D-CFTR. *J. Cystic  
Fibrosis.* **10**: 243 - 252 査読有  
doi: 10.1016/j.jcf.2011.03.001
- ⑤ Kopeikin Z, Sohma Y, Li M, Hwang TC  
(2010) On the mechanism of CFTR  
inhibition by a thiazolidinone  
derivative. *J. Gen. Physiol.* **136**: 659  
- 671 査読有  
doi: 10.1085/jgp.201010518
- ⑥ Shimizu H, Yu YC, Kono K, Kubota T,  
Yasui M, Li M, Hwang TC, Sohma Y (2010)  
A stable ATP binding to nucleotide  
binding domain is important for  
reliable gating cycle in an ABC  
transporter CFTR. *J. Physiol. Sci.* **60**:  
353 - 362 査読有  
doi: 10.1007/s12576-010-0102-2
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 相馬義郎 高速 AFM による CFTR チャンネル  
のゆらぎの一分子動態観察 第 90 回日  
本生理学会年会シンポジウム 2013 年  
03 月 27-29 日 東京
- ② Yamashita H, Mio K, Mio M, Uehashi T,  
Yasui M, Ando T, Sohma Y 高速 AFM に  
よる CFTR チャンネルの動態観察 第 50 回  
日本生物物理学会年会 2012 年 09 月  
22-24 日 名古屋
- ③ 相馬 義郎 ABC トランスポータ CFTR チャ  
ネルの ATP 加水分解駆動性ゲーティング  
の構造機能連関 第 89 回日本生理学会  
年会 シンポジウム 2012 年 3 月 29-31 日  
松本
- ④ 相馬 義郎 ABC トランスポータ CFTR チャ  
ネルの ATP 駆動性ゲーティング: 静止画  
から動画へ 第 85 回日本薬理学会年会  
シンポジウム 2012 年 3 月 14 日 京都
- ⑤ Nakamura Y, Hanyuda A, Yu YC,  
Hagiya-Furukawa T, Odera M, Hwang TC,  
Sakurai M, Yasui M, Sohma Y. Effects of  
genistein and curcumin on  
non-hydrolytic CFTR mutants 56th  
Biophysical Society Annual Meeting  
2012 年 2 月 25 - 29 日 San Diego, USA
- ⑥ 余 盈君, 古川(萩谷) 朋佳, 安井 正人,  
Hwang TC, 櫻井 実, 相馬 義郎 ABC トラ  
ンスポータ・CFTR チャンネルにおける ATP  
加水分解の成否を決めている作動サイク  
ル中間状態 第 49 回日本生物物理学会年  
会 2011 年 9 月 16-18 日 姫路
- ⑦ Sohma Y, Yu YC, Yasui M, Hwang TC. A  
hidden intermediate state for priming  
ATP-hydrolysis during open  
conformation in CFTR channels. 55th  
Biophysical Society Annual Meeting  
March 5 - 9, 2011 Baltimore, Maryland,  
USA
- ⑧ Yu YC, Furukawa-Hagiya T, Nakamura Y,  
Yasui M, Hwang TC, Sakurai M, Sohma Y.  
A hidden open state for priming  
ATP-hydrolysis in an ABC transporter  
CFTR channel. 第 88 回 日本生理学会年  
会 2011 年 3 月 Journal of  
Physiological Sciences 誌上開催
- ⑨ Yu YC, Sohma Y, Hwang TC, Yasui M. Two

possible mechanisms underlying a halt of NBD gating engine induced by instability of ATP binding in an ABC transporter CFTR. 第 48 回 日本生物物理学会年会 2010 年 9 月 20-22 日 仙台

[図書] (計 2 件)

- ① Sohma Y, Yu YC, Miki H, Nakamura Y, Hanyuda A, Lin HY, Yasui M, Bompadre SG and Hwang TC (2012) Pharmaceutical implications of curcumin in the development of drugs for CF pharmacotherapy: combined effects with genistein *In: Curcumin: Biosynthesis, Medicinal Uses and Health Benefits.* pp. 223 - 234. Editors Sasaki J & Kichida M, Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, USA.
- ② Cai Z, Sohma Y, Bompadre SG, Sheppard DN and Hwang TC (2011) Application of high-resolution single-channel recording to functional studies of cystic fibrosis mutants. *In: Cystic Fibrosis Protocols and Diagnosis, Methods in Molecular Biology*, 741: 419 - 441. Editors Amaral MD & Kunzelmann K, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA

[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

- ① 慶應義塾大学医学部薬理学教室  
<http://www.pharm.med.keio.ac.jp/about/sohma.html>
- ② John M. Dalton Cardiovascular Research Center, Univ of Missouri - Columbia, MO, USA  
<http://dalton.missouri.edu/investigators/sohmay.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相馬 義郎 (SOHMA YOSHIRO)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60268183

### (2) 研究分担者

林 真理子 (HAYASHI MARIKO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 30525811

### (3) 連携研究者

佐藤 主税 (SATO CHIKARA)  
独立行政法人産業技術総合研究所・  
脳神経情報研究部門・研究グループ長  
研究者番号: 00357146

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

安井 正人 (YASUI MASATO)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号: 90246637