

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790060

研究課題名(和文) 熱力学的考察に基づくプロトン共役薬物トランスポーターの基質親和性制御機構の解明

研究課題名(英文) Thermodynamics-based mechanism for the regulation of substrate binding affinity of proton coupled drug transporters

研究代表者

下野 和実 (SHIMONO, Kazumi)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：30415187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：トランスポーターは、“基質の結合親和性を制御する”ことで基質を輸送する。本研究では、基質との相互作用エネルギーを解析できる技術である等温滴定型熱量測定を行い、プロトン共役薬物トランスポーターの基質親和性制御に対する熱力学的考察を行った。対向輸送系EmrEの研究では、Glu25が基質相互作用の駆動力のpH依存的变化に関与していることを見いだした。共輸送系YdgRの研究では、相互作用の駆動力はpHによらずエントロピー変化であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Regulation of the binding affinity of the substrate into transporter is one of crucial factors to transport the substrate through the membrane. In this study, we had investigated the interaction between proton coupled drug transporters and these substrates by isothermal titration calorimetry (ITC) is a technique that can analyze the interaction energy with the substrate, and discussed the thermodynamics based mechanism of proton coupled substrate transport. (1) In the study of EmrE as antiporter, the interaction between EmrE and TPP<sup>+</sup> depends on pH. At higher pH, the affinity increases, and the driving force becomes from enthalpy-driven to entropy-driven, and it is indicated that Glu25 might be one of determinant residues to drive the substrate binding. (2) In the study of YdgR as synporter, it was found that the driving force of interaction between YdgR and Val-Ala is entropy change, and it was not depend on pH.

研究分野：薬物動態学，生物物理学，無細胞生命科学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：等温滴定型熱量計 薬物輸送 分子認識 相互作用エネルギー 多剤排出輸送担体 プロトン/オリゴペプチド輸送担体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、幾つかのトランスポーターの立体構造が報告され、基質結合に伴う立体構造変化について明らかにされつつある。立体構造情報は、原子レベルでの基質結合に関わるアミノ酸残基を明らかにする。しかし、それら残基の寄与や相互作用様式について熱力学情報は与えず、結合親和性制御機構の解明に至っていない。熱量測定では、立体構造情報は与えないものの結合に伴う熱量変化から、結合親和性やその様式についての情報を得ることができる。これら異なる情報をあわせることで、トランスポーターの基質輸送分子機構の本質が解明できると期待できる。

一般的に詳細な物理化学的測定では、大量の試料を必要とする。しかし膜タンパク質の大量発現系構築は困難であることが多い。このことがネックとなり、トランスポーターの熱量測定の報告は数例しかない。我々は、脂質と界面活性剤の共存下で無細胞タンパク質合成を行う膜タンパク質の大量機能合成法を開発した。我々は、この方法を利用し、既に EmrE の大量合成にも成功している。EmrE は、大腸菌由来のトランスポーターで、プロトン濃度勾配を利用して脂溶性カチオン（テトラフェニルフォスフォニウムイオンなど）を排出する。さらに立体構造が報告されており、基質輸送に伴う構造変化や変異実験による分子機構について多くの報告がある。そのため、EmrE は本研究課題に適したトランスポーターの一つである。我々は、既に等温滴定型熱量計を用いた EmrE と基質との相互作用解析から、基質結合の駆動力が pH により変化することを見いだしている。

このような背景のもと、プロトン共役薬物トランスポーターにおける基質輸送分子機構を熱力学的観点から解明するために本研究課題を計画した。

## 2. 研究の目的

多くの薬物や栄養物質は、細胞膜に存在するトランスポーターと呼ばれる膜タンパク質を介して細胞内に輸送される。その輸送機構は、図 1 に示すように、基質の結合（強い親和性）、タンパク質の構造変化、基質の解離（弱い親和性）の 3 過程で表すことができる。すなわち基質輸送の本質は、トランスポーターの立体構造変化によって引き起こされる“基質の結合親和性の制御”といえ

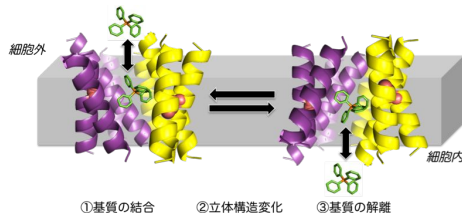


図 1. トランスポーターの基質取り込み輸送概念図：①基質結合状態では、トランスポーターは外側が開いた構造をとり、基質との親和性が高い。②基質結合に誘起され、立体構造変化が起こり、③トランスポーターの内側が開いた構造となる。この状態では基質との親和性が低く、基質を解離しやすい状態となる。基質の解離に誘起され、再び元の外側が開いた状態となり、基質輸送サイクルが完結する。

る。プロトン共役薬物トランスポーターは、プロトンの結合と解離（プロトン輸送）と共役して基質の結合親和性が制御（基質輸送）されている。一方、熱量測定によって得られる情報から、結合親和性やその様式について、相互作用エネルギーの駆動力とその割合から議論ができる。このことは、基質親和性制御機構を理解する上で有用な情報となる。

そこで本研究では、プロトン共役薬物トランスポーターにおいて、外部 pH が基質親和性や相互作用の熱力学量に与える影響を、等温滴定型熱量計を用いた測定から明らかにし、基質輸送分子機構を熱力学的観点から解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

プロトン共役薬物トランスポーターのモデルとして、対向輸送系は、大腸菌由来多剤排出タンパク質 EmrE を用い、共輸送系には、大腸菌由来プロトン/オリゴペプチド輸送担体 YdgR を用いた。ITC 測定は、VP-ITC calorimeter (Microcal) を用い、25 °C で行った。試料は、5 min 脱気した試料をセルまたはシリンジに注入した。タンパク質の定量は、SDS-PAGE CBB 染色の BSA とのバンド強度比により行った。解析は、付属のソフトウェア (Origin) の ITC One set of site function model を用いた。

### (1) プロトン対向輸送系 EmrE の熱量測定

EmrE は、透析法を用いた大腸菌抽出液由来の無細胞タンパク質合成によって大量合成した。反応液（透析内液）に 0.4 % w/v ジギトニン (Wako) と 6.7 mg/mL の大腸菌極性脂質 (Avanti) を添加した。反応は、30 °C、6 時間回転震盪することで行った。合成スケールは、0.9 mL 反応液で行った。合成沈殿物を 10 mM TrisHCl pH 6.8, 400 mM NaCl, 1 % ドデシルマルトシド (DDM, Anatrace) で可溶化後、ニッケル親和性カラムクロマトグラフィー (HisTrap 1 mL, GE healthcare) にて EmrE を精製した。カラム洗浄は、50 mM TrisHCl, pH 6.8, 400 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0.05 % DDM, 1 mM DTT, 20 mM Imidazole で行い、溶出は、Imidazole 濃度を 500 mM にしたバッファーとの線形勾配により行った。すべての精製は、4 °C で行った。精製試料を目的の pH の 10 mM バッファー、0.025 % DDM に対して一晚透析 (50 kDa cutoff) することでバッファ交換を行った。ITC 測定の EmrE 試料は、10-30 μM、リガンドである TPP<sup>+</sup> 試料は、80 または 120 μM とした。リガンド溶液を 5 μL ずつ 25-50 回添加した。

### (2) プロトン共輸送系 YdgR の熱量測定

pET システムを利用して大腸菌 BL21 (DE3) 株にて YdgR を大量発現させた。培地は、OvernightExpress (Novagen) を用い、1 L のスケールで 24 時間培養した。常法に従って

膜画分を調製後、1 % DDM で可溶化後、ニッケル親和性カラムクロマトグラフィー (HisTrap 5 mL, GE healthcare) にて精製した。カラム洗浄は、20 mM TrisHCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0.01 % Na<sub>3</sub>N, 0.04 % DDM, 2 mM ヒスチジンで行い、溶出は、ヒスチジン濃度を 200 mM にしたバッファーとの段階的線形勾配により行った。すべての精製は、4 で行った。精製試料を目的の pH の 10 mM バッファー、0.04 % DDM に対して一晚透析 (50 kDa cutoff) することでバッファー交換を行った。ITC 測定の YdgR 試料は、3.6-8 μM, リガンドである Val-Ala 試料は、2 または 5 mM とした。リガンド溶液を 8 または 5 μL ずつ 30, 50 回添加した。

#### 4. 研究成果

研究期間内に得た成果は、1) プロトン対向輸送系 EmrE の pH 依存的結合様式に寄与するアミノ酸残基の同定、2) プロトン共輸送系 YdgR の大量試料調製法の確立および熱量測定、である。さらに薬物輸送担体の熱力学量について統一的に解釈するために行った 3) ナトリウム共役輸送担体およびチャネル様輸送担体の大量試料調製法の検討、である。以下に具体的な内容を記す。

##### (1) プロトン対向輸送系 EmrE の pH 依存的結合様式に寄与するアミノ酸残基の同定

我々は、既に EmrE の熱力学パラメータの pH 依存性について検討している。その結果、結合親和性 ( $K_D$ ), 放出プロトン量, タンパク質安定性に pH 依存性があること。pH が高くなると、基質結合の駆動力に対する寄与が、エンタルピーよりもエントロピーの方が大きくなることを明らかにしている。

そこで、研究期間内には、EmrE における結合様式の pH 依存性に寄与するアミノ酸残基の同定するために、変異 EmrE と基質 (テトラフェニルフォスホニウムイオン、TPP<sup>+</sup>) との結合認識機構を等温滴定型熱量計 (ITC) により解析した。EmrE には、酸性残基が 3 ヶ所 (Glu14, Glu25, Asp84), 塩基性残基が 5 ヶ所 (Lys22, Arg29, Arg82, Arg106, His110) 存在している。このうち中性付近で解離しうる残基として Glu14, Glu25, Asp85, His110 を選択して、それぞれ非解離性残基に置換した変異体 (E14Q, E25Q, D84N, H110F) を作製した。

E14Q または D, E25Q 変異体を、野生型と同様に無細胞タンパク質合成系を利用して調製した。精製量は、それぞれ 0.7, 1.2, 1.0 mg/1mL 反応液であり、ITC 測定に十分な量の試料を調製できた。E14Q では、結合に伴う熱量変化は観測されなかった。E14D, E25Q におけるイオン化熱が異なる緩衝液での測定の結果 pH 6.5 において E14D では 1 分子の TPP<sup>+</sup> の結合に伴い 0.76 分子の H<sup>+</sup> が放出されることが分かり、Asp14 は、脱プロトン化状態と

考えられる。しかし E14D と TPP<sup>+</sup> 結合の  $H_{bind}$  は -6.8 kcal/mol,  $-T \Delta S$  は -2.8 kcal/mol であり、野生型と同様にエンタルピー ( $H$ ) 駆動型であった。一方、E25Q では、pH 7.4 において  $H$  の寄与が若干大きくなった ( $H/G$ ; 0.26 (WT), 0.38 (E25Q))。従って、Glu25 が、基質結合を駆動するエネルギー変化に関与していると考えられる (表 1)。以上の結果から推察される熱力学量変化を考慮した基質輸送モデルを図 2 に示す。酸性では基質解離型 (細胞外側が開いた構造) に、アルカリ性では結合型 (細胞内側が開いた構造) もしくは包括型 (両方が閉じた構造) に基質が相互作用していると考えられる。また構造変化中間体では、逆平行のトポロジーを持った 2 量体の 2 つの Glu25 はプロトン化された状態であると考えられる。Glu25 の一方が、脱プロトン化された状態となるとなることで、一方側が閉じるように構造変化を誘起していると考えられる。しかしながら Glu25 のみの効果では、基質結合駆動力の pH 依存性が説明できないことから、他の残基との協同作用によって基質結合親和性制御が行われていると考えられる。

	野生型 pH 6.5	E14D pH 6.5	野生型 pH 7.4	E25Q pH 7.4
結合数	0.29	0.25	0.23	0.49
$K_D$ , nM	266	77	36	50
$\Delta G$ [kcal/mol]	-9.02	-9.85	-10.23	-10.02
放出プロトン数	1.73	0.76	1.75	2.14
$\Delta H_{bind}$ [kcal/mol]	-5.84	-6.79	-2.71	-3.84
$-T\Delta S$ [kcal/mol]	-3.17	-3.06	-7.52	-6.18
エンタルピー寄与率 [%]	65	69	26	38

表 1. EmrE 変異体 (E14D, E25Q) と TPP<sup>+</sup> との相互作用熱力学量

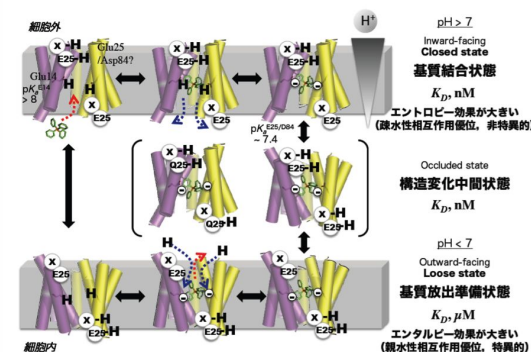


図 2. 熱力学量を考慮した EmrE のプロトン共役基質対向輸送サイクルモデル: 基質結合状態では、エントロピー効果が大きい。このことは多剤を認識するために有利なと考えられる。構造変化中間状態では、Glu25 と他の残基 (Asp84 と予想される) がプロトン化し両側が開いた状態と考えられる。基質放出準備状態では、エンタルピー効果が大きくなり、基質の逆流を防いでいると考えられる。

D84N, H110F 変異体については、熱量測定には至っておらず試料調製の段階である。しかし、両変異体ともに無細胞タンパク質合成系を利用した合成には成功しており、D84N 変異体は野生型と同程度の合成量であり、ITC 測定には十分な量であった。一方、H110F 変異体は、野生型の 1/5 程度であったが、熱量測定が可能な量であった。現在、等温滴定型熱量測定の準備とともに E25Q/D84N 2 重変異体の調製も進めている。

##### (2) プロトン共輸送系 YdgR の大量試料調製法の確立および熱量測定

プロトン/オリゴペプチド共輸送系である大腸菌由来 YdgR の大量発現精製法の確立を

行った。さらに外部 pH が YdgR/基質相互作用に及ぼす影響を、等温滴定型熱量計 (ITC) を用いて検討した。

YdgR は、pET システムと OvernightExpress (Novagen) を用いることにより、1 L 大腸菌培養液から 1 mg 程度の ITC 測定に十分な量の精製 YdgR 試料を調製できた。

ITC 測定の結果、基質結合に伴う吸熱ピークを観測することができた。さらに基質結合に伴うタンパク質内外のプロトン移動および真の結合反応熱を検討するため、緩衝液成分を変えた測定を行った結果、pH 6.0 では、基質結合に伴いプロトンが取り込まれることが示唆された。pH 7.0 でも同様の測定を行った結果、プロトン取り込みに関与するアミノ酸残基の  $pK_a$  は、6.3 と予想された。緩衝液成分のイオン化熱を考慮することにより Val-Ala の YdgR に対する真の結合反応熱が算出でき、その相互作用は、pH 6.0 および 7.0 とともに少なくとも界面活性剤中ではエントロピー駆動型であり、脱水和の寄与またはコンフォメーションの多様性が大きいことが明らかとなった。このことは、YdgR の広範な基質認識性に関与している可能性がある。pH の増加に伴い、結合親和性は増大し、またエントロピーの効果が小さくなった (図 3)。このことから酸性では、Inward-facing の Closed state に、アルカリ性では、Outward-facing, Open state に結合すると推察される。この結果は、対向輸送と逆であり輸送方向決定に関与している可能性がある。

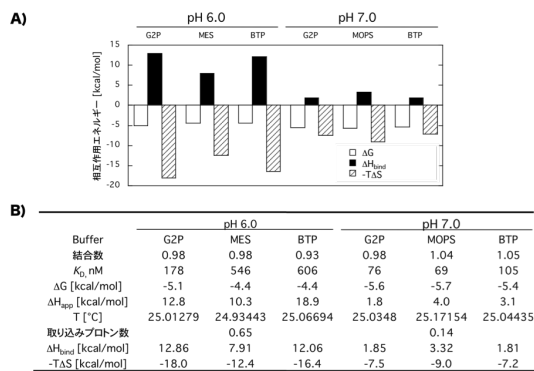


図 3. YdgR と Val-Ala との相互作用エネルギー (A) と結合に伴う熱力学量 (B) : G2P, glycerol-2-phosphate ( $\Delta H_{ion}$ , -0.17 kcal/mol); MES ( $\Delta H_{ion}$ , 3.71 kcal/mol); MOPS ( $\Delta H_{ion}$ , 5.21 kcal/mol); BTP, Bis-tris propane ( $\Delta H_{ion}$ , 10.37 kcal/mol).

### (3) ナトリウム共役輸送担体およびチャネル様輸送担体の大量試料調製法の検討

$Na^+$  共役輸送担体とチャネル様輸送担体の試料調製にも着手した。 $Na^+$ /モノカルボン酸共輸送担体 (SMCT) の試料調製では、無細胞タンパク質合成系による合成を試みたが、その合成量は  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  反応液と微量であり、熱量計を用いた機能解析に至らなかった。現在、収量を増大させるために、N 末タグの変更を含む合成方法の検討中である。

チャネル様輸送担体 (銅輸送担体, CTR1) の試料調製では、高濃度の界面活性剤と脂質共存下で無細胞タンパク質合成を行い、可溶性画分として合成できた。本方法で合成、精

製した試料は、Blue-Native PAGE および分子間架橋剤による検討から、3 量体を保持していることが示唆され、その収量は  $0.1 \text{ mg}/\text{mL}$  反応液であり、熱量測定可能な量であった。

### 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)

Sakiyama, M., Matsuo, H., Shimizu, S., Chiba, T., Nakayama, A., Takada, Y., Nakamura, T., Takada, T., Morita, E., Naito, M., Wakai, K., Inoue, H., Tatsukawa, S., Sato, J., Shimono, K., Makino, T., Satoh, T., Suzuki, H., Kanai, Y., Hamajima, N., Sakurai, Y., Ichida, K., Shimizu, T., Shinomiya, N. (2014) "A common variant of leucine-rich repeat containing 16A (LRRC16A) gene is associated with gout susceptibility" *Human Cell*, 27(1), 1-4. 査読有  
DOI: 10.1007/s13577-013-0081-8

Osanai, H., Ikehara, T., Miyauchi, S., Shimono, K., Tamogami, J., Nara, T., and Kamo, N. (2013) "Interaction of Drugs with Liposome: Study Using Isothermal Titration Calorimetry" *Journal of Biophysical Chemistry*, 4, 11-21. 査読有  
DOI: 10.4236/jbpc.2013.41002

Hayashi, S., Tamogami, J., Kikukawa, T., Okamoto, H., Shimono, K., Miyauchi, S., Demura, M., Nara, T., and Kamo, N. (2013) "Thermodynamic Parameters of Anion Binding to Halorhodopsin from Natronomonas pharaonis by Isothermal Titration Calorimetry" *Biophysical Chemistry*, 172, 61-67. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bpc.2013.01.001

Tamogami, J., Kikukawa, T., Nara, T., Shimono, K., Demura, M., and Kamo, N. (2012) "The Photo-induced Proton Release in Proteorhodopsin at Low pH: The Possibility of the  $pK_a$  Decrease of Asp227" *Biochemistry*, 51, 9290-9301. 査読有  
DOI: 10.1021/bi300940p

Kikukawa, T., Shimono, K., Tamogami, J., Miyauchi, S., Kim, S.Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Jung, K.-H., Yokoyama, S., Kamo, N. (2011) "Photochemistry of Acetabularia

Rhodopsin II from a Marine Plant, *Acetabularia acetabulum*" *Biochemistry*, 50, 8888-8898. 査読有  
DOI; 10.1021/bi2009932

Wada, T., Shimono, K., Kikukawa, T., Hato, M., Shinya, N., Kim, S.Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Tamogami, J., Miyauchi, S., Jung, K.-H., Kamo, N., Yokoyama, S. (2011) "Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton pumping rhodopsin, *Acetabularia rhodopsin II* from marine alga" *Journal of Molecular Biology*, 411, 986-998. 査読有  
DOI; 10.1016/j.jmb.2011.06.028

〔学会発表〕(計 11 件)

下野和実, 水谷賢人, 池本友寛, 小丸明日香, 染谷友美, 白水美香子, 横山茂之, 宮内正二「白金錯体抗がん薬を輸送するヒト銅トランスポーター (hCTR1) の無細胞膜タンパク質合成系を利用した大量合成」日本薬学会第 134 年会 (熊本) 2014 年 3 月 29 日

下野和実, 森喜郎, 奈良敏文, 染谷友美, 白水美香子, 横山茂之, 宮内正二「等温滴定量熱計による多剤輸送担体 EmrE の基質結合様式の解析」第 51 回日本生物物理学会年会 (京都) 2013 年 10 月 29 日

下野和実, 福田恭大, 丸山晴美, 田母神淳, 紙谷浩之, 奈良敏文, 宮内正二「アポトーシスを誘導する核酸誘導体の濃縮型核酸輸送担体による輸送」第 8 回トランスポーター研究会年会 (熊本) 2013 年 6 月 15 日

下野和実, 森喜郎, 奈良敏文, 染谷友美, 白水美香子, 横山茂之, 宮内正二「等温滴定量熱計による大腸菌由来多剤輸送担体 EmrE の基質結合様式の解析」第 2 回日本生物物理関東支部研究会 (小金井, 東京) 2013 年 3 月 5 日

下野和実, 水谷賢人, 横山茂之, 宮内正二「無細胞膜タンパク質合成系を利用したヒト銅トランスポーター (hCtr1) の大量合成」第 7 回トランスポーター研究会年会 (京都) 2012 年 6 月 9 日

下野和実「無細胞タンパク質合成技術を利用した膜タンパク質の構造・機能解析」よこはま NMR 構造生物学研究会第 44 回ワークショップ (横浜) 2012 年 3

月 14 日 招待講演

下野和実「膜タンパク質の構造・機能研究を加速する無細胞タンパク質合成技術」東邦大学薬学部特別講演 (船橋, 千葉) 2011 年 12 月 21 日 招待講演

下野和実, 浅倉祐未, 宮内正二「等温滴定量熱計による大腸菌由来プロトン/オリゴペプチド共輸送担体と基質との相互作用解析」第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (岡山) 2011 年 11 月 25 日

下野和実, 上野裕美, 駄場崎泰洋, 加茂直樹, 宮内正二「Na<sup>+</sup>/モノカルボン酸共輸送担体 (SMCT) を介して体内に蓄積する毒性化合物に対する解毒剤の検討」第 50 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (高松) 2011 年 11 月 12 日

下野和実「調製困難なロドプシン類の機能的な大量合成法」特定領域研究「高次系分子科学」第 1 2 回公開ミニシンポジウム「光受容タンパク質」(蒲郡, 愛知) 2011 年 10 月 26 日 招待講演

下野和実, 浅倉祐未, 宮内正二「等温滴定量熱計を用いた大腸菌由来 H<sup>+</sup>/オリゴペプチド共輸送担体 (YdgR) の基質結合の熱力学的解析」第 6 回トランスポーター研究会 (仙台) 2011 年 6 月 11 日

〔図書〕(計 2 件)

下野和実 (2013) オプトジェネティックスー光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線-; 第 1 編第 2 章第 1 節, pp45-54. "調製困難なロドプシン類の機能的な大量合成法" (株式会社エヌティイーエス) 総ページ数 324  
ISBN; 978-4-86469-071-3

Kikukawa, T., Tamogami, J., Shimono, K., Demura, M., Nara, T., Kamo, N. (2012) Photo-induced proton transfers of microbial rhodopsins. *Molecular Photochemistry - Various Aspects* (Book edited by Dr. Satyen Saha), Intech, 89-108 (Chaper 5) 総ページ数 282  
DOI; 10.5772/34105

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下野 和実 (SHIMONO, Kazumi)  
東邦大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 30415187