

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20118006

研究課題名（和文） 溶液論と計算科学的手法による ABC トランスポータの構造変化と機能発現機構の解明

研究課題名（英文） Study on the structure and functional mechanism of ABC transporter based on the theory of solution chemistry and computer simulation

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

研究分野：生物物理学、計算化学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ABC トランスポータ、ATP、水、分子動力学シミュレーション、量子化学計算、自由エネルギー

1. 研究計画の概要

(1) 「ATP の高エネルギーリン酸結合の物理起源は何か」の問題に対し、溶媒効果を含む量子化学計算から解答を得る。すなわち、水や蛋白質を模した種々の誘電率環境中で ATP の加水分解自由エネルギーを評価し、その結果を内部エネルギー効果、静電的及び非静電的溶媒和などに分割し各項の寄与を明らかにする。

(2) 「ABC トランスポータの構造変化のエネルギー源は何なのか」という問に対し、エネルギー表示自由エネルギー計算法や分子性流体積分方程式論に基づく計算機シミュレーションを行い、ATP の結合にともなう系の自由エネルギー変化と水の並進エントロピーの寄与を明らかにし、ATP のリガンドとしての特異性及び水の役割を解明する。

(3) 「ATP の化学エネルギーは何に使われているのか」という問題に対し、ATP を含む化学反応部位と周囲の蛋白質部位との相互作用を量子力学/古典力学練成(QM/MM)計算から評価し、蛋白質中での加水分解反応の自由エネルギープロファイルを得る。その結果より化学→力学エネルギー変換機構を解明する。

(4) ABC トランスポータ内の力学→力学エネルギー伝達機構を解明するため、エンジン部分（ヌクレオチド結合ドメイン：NBD）と動作部分（膜貫通ヘリックス；TMD）を接続するトランスミッション部分（カップリングヘリックス）の役割を分子動力学シミュレーションを用いて調べる。

(2)～(4)の結果を総合して、最終的にトランスポータの動作原理について原子レベルの描像を得る。

2. 研究の進捗状況

(1) ATP のモデル化合物の加水分解自由エネルギーを連続体近似の溶媒モデルと ab initio 分子軌道計算により評価し、分子内及び分子間エネルギーの寄与を明確にした。その結果、前者は大きな発熱過程であるが、後者の吸熱過程によりその大部分が相殺され、全エネルギーは高々～10 kcal/mol 程度になることが判明した。これより、多くの生化学の教科書は ATP の高エネルギー結合の起源に関して間違った記述をしていることが明らかとなった。

(2) 分子性流体積分方程式論に基づいて定式化された形態熱力学理論を用いて、タンパク質-リガンド間結合エネルギーを予測する計算手法を開発した。一方、ABC トランスポータが ATP の結合によりどのように構造変化するかを探るため、マウス ABCB1 トランスポータの inward-facing 構造に対し MD シミュレーションを実行した。その結果、時間の経過とともに 2 つの NBD の間隔は閉じていき、ATP 結合ポケットのうち片側だけが互いに接近した構造に到達した。主成分解析によると、このタンパク質は 2 つの NBD が互いに逆回転する運動モードを第一主成分として持つことが判明し、このような非対称構造に到達する理由が説明できた。この構造は、outward-facing 構造に至る過程で生じる中間体ではないかと推定される。

(3) ABC トランスポータ (Sav1866) の outward-facing 構造に対し、ATP 結合状態、(ADP+Pi) 状態、ADP 結合状態及びヌクレオ

チド非結合状態の構造を作成し、MD シミュレーションを実行し、ATP 加水分解後のどの段階で inward-facing へ向かう運動が誘起されるか調べた。その結果、ADP 結合状態以降であることが判明し、ATP の加水分解反応と蛋白質の力学的動作は直接的には共役していないことが示唆された。

(4) ABCトランスポータ (MsbA) のNBDとTMDを接続するトランスミッション部分(カップリングヘリックス)の役割を調べるため、この部位にアミノ酸変異を導入した変異体の分子動力学シミュレーションを実行した。NBD-TMD間の相関運動の変化を解析したところ、変異体ではTMDの蝶番運動モードが消失することがわかった。この結果より、カップリングヘリックスを介して、NBDとTMDが力学的結合をしているということが判明した。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

研究概要の(1)に関しては、ほぼ目標を達成し、生化学の教科書を書き換えるほどの成果を得た。(2)に関しては、理論的手法の開発及びABCトランスポータの系のシミュレーションが順調に進んでいる。特に、中間体様の構造が得られたことにより、構造変化過程を解釈する上での見通しがよくなった。(3)に関しては、ダイナミクスの観点から一応の結果が出たが、今後は電子状態に関する議論が必要である。(4)に関しては、カップリングヘリックスの役割に関して、ほぼ予想通りの結果が得られたが、今後ATPの役割などと絡めて議論してゆく必要がある。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 嚢胞性線維症(CF)の原因タンパク質であるCFTR(Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)の分子動力学シミュレーションを実行し、Cl⁻イオンチャンネルとしての機能発現メカニズムを解明する。

(2) マウス ABCB1 トランスポータの MD シミュレーションを続行し、以下の項目を実施する。1) 基質(or 阻害剤)結合及びATP結合によって inward-facing 構造からどのような構造・ダイナミクス変化が起こるか、2) メタダイナミクスMDやターゲットMD計算を用いた inward-facing から outward-facing への移行過程の自由エネルギーランドスケープの探索。

(3) 分子の形状から高速に熱力学量の計算を可能にする“形態熱力学”の方法をATPを含んだ系に適用するには、あらわに静電項を含んだ形への理論の拡張が必要になる。形態熱力学の計算において、タンパク質を構成する原子の大きさを表現する原子パラメータ

と、分子形態と溶媒の性質に応じて算出される環境パラメータが必須である。詳細は省くが、今後は静電項を含む系のこれらパラメータをA01班長松林の開発したエネルギー表示法を利用することによって求め、その結果に基づいて高速に結合エネルギーや水のエン트로ピー効果を計算する方法を確立する。

(4) Sav1866のoutward-facing構造のATP結合状態に対しQM/MM計算を実行し、ATP加水分解反応の自由エネルギー変化及び生成物の構造を求める。この加水分解直後の構造、ADP結合状態及びヌクレオチド非結合状態に対しMDシミュレーションを実行し、ATP加水分解反応の役割を解明する。

5. 代表的な研究成果

(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7件)

① T. Ishikawa, A. Sakurai, H. Hirano, A. Lezhava, M. Sakurai, Y. Hayashizaki, Emerging New Technologies in Pharamcogenomics: Rapid SNP detection, molecular dynamic simulation, and QSAR analysis methods to validate clinically important genetic variants of human ABC Transporter ABCB1 (P-gp/MDR1), *Pharmacology & Therapeutics*, 126, 69-81 (2010). 査読有り

② S. Yasuda, T. Yoshidome, H. Oshima, R. Kodama, Y. Harano, M. Kinoshita, Effects of side-chain packing on the formation of secondary structures in protein folding, *J. Chem. Phys.*, 132, #065105 (2010). 査読有り

③ S. Du, M. Sakurai, Multivariate analysis of properties of amino acid residues in proteins from a viewpoint of functional site prediction, *Chem. Phys. Lett.* 488, 81-85 (2010). 査読有り

[学会発表](計21件)

① 足立健太郎、櫻井実、計算機シミュレーションによるABCトランスポータSav1866の薬剤排出機構の解明、第47回日本生物物理学会年会、2009年11月1日、アスティ徳島(徳島)。

② 千葉峻太郎、野村淳磨、原野雄一、木下政弘、櫻井実、水のエン트로ピーに焦点を置いたタンパク質-リガンド間結合能の新規計算手法、第47回日本生物物理学会年会、2009年11月1日、アスティ徳島(徳島)。

③ M. Sakurai, Brief review and the present understanding of ATP hydrolysis energy, *International Symposium on Hydration and ATP Energy*, 2010年3月8日、仙台秋保。

④ 櫻井実、ATPの加水分解エネルギー—量子化学計算の現状—、第46回生物物理学会年会、2008年12月4日、福岡国際会議場。