

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31日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（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） Elucidation of the functional mechanism of ABC transporters using computer simulations

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ABC トランスポータの機能発現機構を“水と ATP の役割”の観点から研究し、次の成果を得た。1)ATP 及びその関連化合物の加水分解エネルギーは水和の効果によって~10 kcal/mol 程度に収束する、2) 蛋白質-リガンド複合体形成の主たる駆動力は水の並進エントロピー（あるいは排除体積効果）である、3) ATP の結合自由エネルギーはヌクレオチド結合ドメイン(NBD)の2量体化（power stroke）に変換される、4) NBD の2量体化は、水和エンタルピーと水和エントロピーにより駆動されて起こる。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the roles of water and ATP in the functional mechanism of ABC transporter and obtained the following conclusions: 1) the hydrolysis energies of ATP and its related compounds all converge to ~10 kcal/mol by the effect of hydration, 2) the main driving force of the protein-ligand complexation is the translational entropy of water (exclusion volume effect), 3) the binding-free energy of ATP can be converted to a power stroke like the dimerization of NBDs, 4) a long-range hydration force of enthalpic origin and the water-mediated attraction of entropic origin drive the NBD dimerization in ABC transporter.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2008年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 2009年度 | 7,300,000 | 2,190,000 | 9,490,000 |
| 2010年度 | 7,300,000 | 2,190,000 | 9,490,000 |
| 2011年度 | 7,300,000 | 2,190,000 | 9,490,000 |
| 2012年度 | 7,400,000 | 2,220,000 | 9,620,000 |
| 総計 | 33,700,000 | 10,110,000 | 43,810,000 |

研究分野：生物学

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、水和自由エネルギー、水和エントロピー、水和エンタルピー、蛋白質-リガンド結合自由エネルギー、ATP 加水分解自由エネルギー

1. 研究開始当初の背景

ATP は生体活動の「エネルギー通貨」と言われているが、ATP 利用の分子素過程におけるエネルギー移動のメカニズムは未解決のままであった。例えば、F1 モータをはじめとする ATP 駆動蛋白質の構造変化と ATP 加水分解反応の間のエネルギー変換の分子メカニズムはまだほとんど未解明とってよった。エネルギー変換論のポイントは自由エネルギーであり、自由エネルギーの決定に水は本質的な役割を果たす。生体エネルギー論の本質に関わるこの問題を解決するためには、実験のみでは不十分で、(ATP+水+蛋白質) 全系の自由エネルギーを厳密に評価する計算機シミュレーションの開発と水の役割の本質を抽出可能な溶液論が必要であると考えた。さらに、その解答を広く一般に周知し旧来の教科書を書き換えるためには、高い波及効果が期待される適用事例が必須であると考え、本研究では、蛋白質の具体例として ABC (ATP-binding cassette) トランスポータを選択した。

ABC トランスポータは細胞膜を介した薬物の輸送を司る蛋白質であり、薬物の取込を行うインポータと放出を行うエクスポータに分類される。本研究開始少し前に、ヒトのエクスポータ ABCB1 と高いアミノ酸相同性をもつ黄色ブドウ球菌由来のエクスポータ Sav1866 (Nature 2006)、グラム陰性菌由来のエクスポータ MsbA (PNAS 2007) の X 線構造が発表された。その結果、これらの蛋白質は ATP 結合ドメイン、膜貫通ヘリックスドメイン及び両者の接続を司るループ領域の構造からなることが判明した (図 2 と 3 参照)。しかしながら、X 線構造はあくまでスナップショットであり、エネルギー論的情報も与えない。トランスポータのように動いて機能を発現する蛋白質にあっては、「燃料の化学エネルギーがどのようにしてエンジンを回し、それがトランスマッションを介して、どのように動作装置 (タイヤ) を動かすのか」を説明できない限り、動作原理を理解したことにはならない。真の動作原理の理解のためには、蛋白質の構造変化の時間発展及びこれと ATP の加水分解反応とのエネルギー論的共役関係を解析するアプローチが必要であると考えた。

2. 研究の目的

- (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。
- (2) 「蛋白質-リガンド結合自由エネルギーに寄与する最も重要な因子は何か」という問題に対し溶液論的計算から解答を与える。
- (3) 「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」という問題に対し、

inward-facing 構造のトランスポータに対し計算機シミュレーションを行い、ATP の結合自由エネルギーの寄与と水と自由エネルギ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。

(4) 「ATP の加水分解自由エネルギーは何に使われているのか」という問題に対し、ヌクレオチド結合ドメイン (NBD) の二量体化エネルギーの加水分解反応前後の変化から解答を得る。

(5) 「ABC トランスポータ内のエンジン部分 (NBD) と動作部分 (膜貫通ヘリックス; TMD) を接続するトランスマッション部分 (カップリングヘリックス) の役割は何か」という問題に対し、計算機シミュレーションから解答を与える。

(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“水と ATP の役割”の観点から解答を得る。

3. 研究の方法

(1) 水や蛋白質を模した種々の誘電率環境中で ATP 及びそのモデル化合物の加水分解自由エネルギーを量子化学計算により評価し、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) 蛋白質-リガンド間の結合自由エネルギーをエントロピー項のみで評価し、実験値をどの程度再現するかを調べる。この際、エントロピーは次の 3 種のものを用いる。すなわち、①統計力学の公式より、並進・回転のエントロピー、②基準振動解析と統計力学の公式より振動のエントロピー、及び③形態熱力学理論より水和のエントロピーである。

(3) 分子動力学シミュレーションにより、ATP 結合状態及び非結合状態 (apo 状態) の ABC トランスポータの構造・ダイナミクスを調べる。得られた蛋白質部分のトラジェクトリーデータに対し、3D-RISM 法により水和の自由エネルギーを計算し、水和エンタルピーや水和エントロピーの効果の評価する。

(4) MM 法と 3D-RISM 法を組み合わせたエンドポイント型結合自由エネルギー計算法を用いて、NBD の二量体化エネルギーを次の 3 状態に対して評価し比較する。すなわち、①ATP 結合状態、② ADP+Pi 結合状態、③ ADP 結合状態。その際、相互作用エネルギーをいくつかの物理因子の寄与に分割し、水とエントロピーの寄与を明確にする。

(5) ABC トランスポータ MsbA の wild-type とカップリングヘリックス (CH) にアミノ酸置換を入れた変異体に対し分子動力学シミュレーションを行い、構造やダイナミクスを比較する。さらに、ATPase 活性の実験値と比較し、カップリングヘリックスの役割を解明する。

4. 研究成果

(1) ピロリン酸をはじめとする ATP のモデル化合物の加水分解自由エネルギーの誘電率依存性を評価した結果、真空中でのエネルギーは発熱、吸熱様々であるが、誘電率を増大させると 0~10 kcal/mol の一定の値に収束していくことが明らかとなった。詳細な分析の結果、分子内効果 (内部エネルギー) が発熱 (or 吸熱) 過程の場合、分子間効果 (静電的溶媒和エネルギー) は吸熱 (or 発熱) 過程となり、互いに大部分が相殺され、結局水 (誘電率=80) 中では、全エネルギーは~10 kcal/mol 程度に収まるのである。例として、ATP に比較的近いモデルである-4 価のピロリン酸に対する結果を図 1 に示す。これより、水は ATP が本来持っている莫大な (280 kcal/mol) 加水分解エネルギーを生体にとって使いやすいエネルギー値まで落とし込む役割をしていると言える。多くの高名な生化学の教科書では、ATP の高エネルギー結合の説明の際、水の役割に関して間違った記述 (水は ATP の加水分解エネルギーの増大に寄与する) をしていることが明らかとなった。

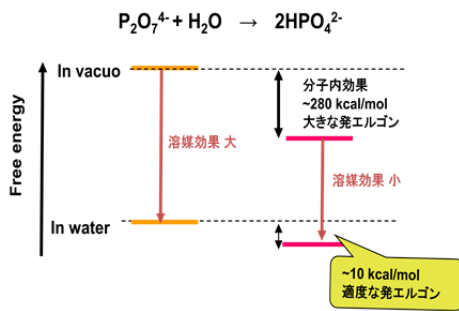


図 1 ピロリン酸の加水分解エネルギー

(2) 3-(2) で述べたエントロピーに焦点を当てた手法を酵素 FKBP12-リガンド系に適用した結果を図 2 上に示す。計算値は、相関係数 $R=0.95$ で実験値をよく再現している。

どのようなエントロピーが効いているのかを調べたところ、水和エントロピーの寄与が最も大きく、これのみで結合エネルギーの大小関係はほとんど再現できることが判明した (図 2 下)。さらに、詳細な分析を行ったところ、水和エントロピーの中では排除体積効果が支配的であることが明らかとなった。この結果は、次のように解釈される。すなわち、蛋白質-リガンド間の結合は、排除体積が減少することによって水の動き回れる空間が増大し、結果として水の並進エントロピーが増大することにより駆動される。

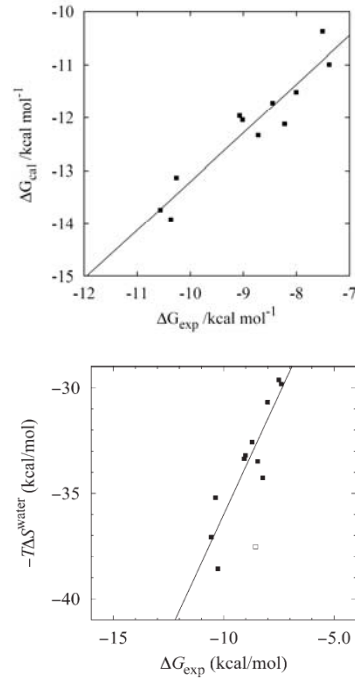


図 2 結合エネルギーの計算値と実験値の相関

(3) ホモロジーモデリングにより ABC トランスポータ CFTR (Cl⁻ イオンチャネル) の inward-facing 構造を作成し、MD シミュレーションを実行した。NBD に ATP が結合した系と結合していない系の挙動を比較したところ、前者では ATP 分子が Walker A と Signature モチーフにサンドイッチされることにより、NBD が二量体化した (図 3)。一方、後者では NBD 間は離れたままであった (データ省略)。同様な MD シミュレーションを ABC トランスポータ ABCB1 (P-glycoprotein、生体の多剤耐性に関与) に対しても実行したところ、CFTR の場合と同様な結果が得られた。以上より、ATP は”分子糊”として 2 つのドメインを結合させる役割を果たすことが明らかとなった。言い換えると、ATP の結合自由エネルギーは蛋白質の力学的運動 (power stroke) に転換されることが実証された。

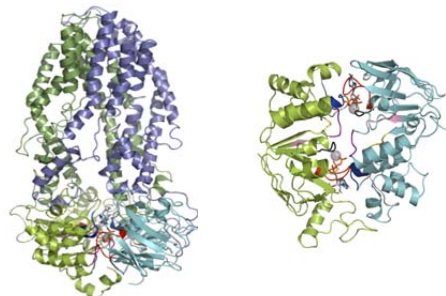


図 3 MD シミュレーション後 (100 ns) の構造
左: 全体像側面図、右: NBD のみ

次に、inward-facing の初期構造において数 10 Å も離れた 2 つの NBD が、“ATP が存在するとなぜ接近し接着するのか” また “その過程に水がどのように関与しているのか” を解明するため、MD シミュレーションのトラジェクトリーデータから NBD 部分のみをピックアップし、各のスナップショット構造に対し 3D-RISM 法で水和の熱力学量を計算した。その結果を図 4 に示す。上図は MD シミュレーション時間に対して、2 つの NBD の重心間距離をプロットしたものである。これより、この 2 量体化過程は 3 つのフェーズに分割されることがわかる (緑、青、赤)。中央と下の図は、それぞれ重心間距離に対して水和エンタルピーと水和エントロピーをプロットしたものである。これらより、最初のフェーズ (緑) では、水和エンタルピー ΔH の減少が起こり、第 2 と 3 のフェーズでは、水和エントロピー $T\Delta S$ の寄与が減少することがわかる。別途計算した蛋白質の内部エネルギーは、第 1 フェーズでは上昇することがわかっている。したがって、2 量体化過程の初期段階、すなわち 2 つの NBD の接近過程は、水和エンタルピー駆動で起こると言える。一方、その後、2 つの NBD が接触し始め最終的に密着するまでの過程は水和エントロピーによって支配されていると言える。これらの第 2, 3 フェーズは排除体積が減少する過程なので、これらは 4-(2) の蛋白質-リガンド系と同様に水の並進エントロピーによって駆動されると考えられる。

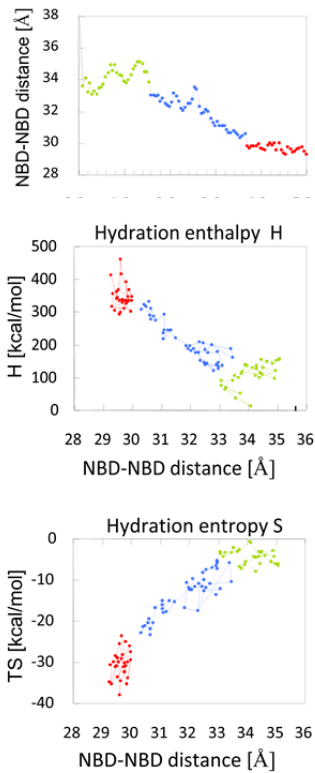


図 4 NBD の 2 量体形成過程の水の役割

(4) ATP の加水分解の役割を調べるため、NBD 二量体化の自由エネルギーを次の 3 つの状態について計算した。すなわち、1) 加水分解前で 2 つの ATP が結合している状態、2) 加水分解直後で ADP+Pi の状態、3) Pi 放出後で 2 つの ADP が結合している状態。その結果、1) では 6 ~ 7 kcal/mol 程度の結合エネルギー利得が得られた。2) ではエネルギー利得は 2.5 kcal/mol 程度まで減少していたが、まだ二量体は十分安定に存在し得ると推定された。3) の Pi 放出後はじめて結合エネルギーは正となり二量体は解離することが判明した。したがって、ATP の加水分解が直接の原因となって蛋白質の運動 (NBD の分離に伴う TMD の構造変化) が誘起されることは考えにくい。言い換えると、ATP の加水分解エネルギーは直接力学運動に変換されるわけではないと結論できる。

さらに、1) と 2) の状態で NBD 二量体化の自由エネルギーを以下の①~③の因子に分割して評価したところ、結合自由エネルギーが負になる主要な原因は水のエントロピー効果であることが判明した。この場合のエントロピーは (3) で論じた水の並進エントロピーであると考えられる。

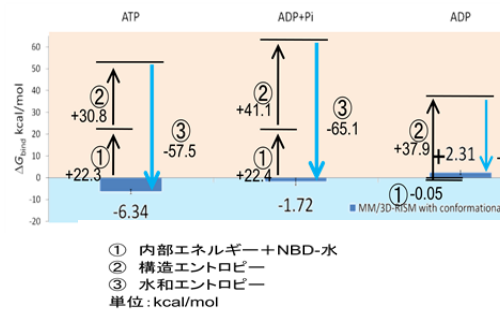


図 5 NBD の 2 量体化自由エネルギー

(5) 前述した CFTR の MD シミュレーションでは、NBD の 2 量体化に伴って、 α -ヘリックスから成る膜貫通ドメイン (TMD) に構造変化が誘起されることが判明した。興味あることに、細胞質側から細胞外側に向かって、Cl⁻ イオンの輸送経路と考えられる空洞が見出された (図 6)。また、イオン選択フィルターやリガンドゲートなどの機能部位と思われる部分も同定された。

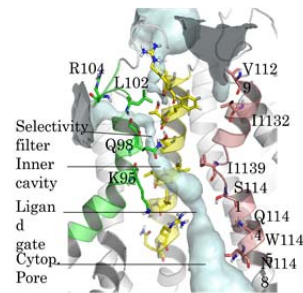


図 6 TMD を貫く空洞 (水色)

このような、NBD から TMD への力学的伝達のメカニズムを調べるため、2つのカップリングヘリックス(CH1 と CH2)の片方もしくは両方にアミノ酸変異を導入した変異体の MD シミュレーションを実行した。その結果 NBD-TMD 間の力の伝達にはカップリングヘリックス CH2 が重要な役割を担い、ATP の結合に関しては CH1 と CH2 のいずれも影響があることが判明した。

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 5 件)

- ① T. Furukawa-Hagiya, T. Furuta, S. Chiba, Y. Sohma, M. Sakurai, The Power Stroke Driven by ATP Binding in CFTR As Studied by Molecular Dynamics Simulations, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 83-93 (2013), DOI:10.1021/jp308315w, 査読有
- ② Y. Watanabe, W-L. Hsu, S. Chiba, T. Hayashi, T. Furuta, M. Sakurai, Dynamics and structural changes induced by ATP and/or substrate binding in the inward-facing conformation state of P-glycoprotein, *Chem. Phys. Lett.*, **557**, 145-149 (2013), DOI:10.1016/j.cplett.2012.12.040, 査読有
- ③ S. Chiba, Y. Harano, R. Roth, M. Kinoshita and M. Sakurai, Evaluation of Protein-Ligand Binding Free Energy Focused on its Entropic Components, *J. Comput. Chem.*, **33**, 550-560 (2012), DOI:10.1002/jcc.22891 査読有
- ④ Y. Harano, Application of Hydration Thermodynamics to the Evaluation of Protein Structures and Protein-Ligand Binding, *Entropy*, **14**, 1443-1468 (2012), DOI:10.3390/e14081443, 査読有
- ⑤ 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), DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.01.005 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① Wei-Lin Hsu, Y. Watanabe, T. Furuta, M. Sakurai, Dynamics and structural changes of ABCB1 transporter induced by binding of substrates and inhibitors, 第 50 回生物物理学会, 2012 年 09 月 22 日~2012 年 09 月 24 日、名古屋大学 (愛知).
- ② T. Hagiya, T. Furuta, S. Chiba, Y. Sohma,

M. Sakurai, ATP-binding induced conformational change in CFTR as studied by MD simulation, 第 50 回生物物理学会, 2012 年 09 月 22 日~2012 年 09 月 24 日、名古屋大学 (愛知).

- ③ Y. Kaneta, S. Chiba, T. Furuta, M. Sakurai, Calculation of the binding free energy of ATP to the nucleotide binding domain of an ABC transporter, 第 50 回生物物理学会, 2012 年 09 月 22 日~2012 年 09 月 24 日、名古屋大学 (愛知).
- ④ 金田祐輔、千葉峻太郎、古田忠臣、櫻井実、ABC トランスポーターのヌクレオチド結合ドメインへの ATP の結合エネルギーの計算、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 06 月 20 日~2012 年 06 月 22 日、名古屋国際会議場 (愛知).
- ⑤ 古田忠臣、山口知宏、加藤博章、櫻井実、分子動力学シミュレーションによる ABC トランスポーター MsbA におけるカップリング・ヘリックス変異の構造的影響、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 06 月 20 日~2012 年 06 月 22 日、名古屋国際会議場 (愛知).
- ⑥ 小寺充彦、萩谷朋佳、古田忠臣、相馬義郎、櫻井実、ABC トランスポーター CFTR チャネルの ATP 加水分解駆動ゲーティング機構の解析、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 06 月 20 日~2012 年 06 月 22 日、名古屋国際会議場 (愛知).
- ⑦ 萩谷朋佳、千葉峻太郎、古田忠臣、相馬義郎、櫻井実、MD シミュレーションによる CFTR タンパク質の ATP 結合誘導 NBD 二量体化の解析、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 06 月 20 日~2012 年 06 月 22 日、名古屋国際会議場 (愛知).
- ⑧ T. Hagiya, T. Furuta, Y. Sohma, M. Sakurai, ATP-binding induced conformational change in CFTR of the inward-facing state using a simulation study, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13-16 日、パシフィコ横浜.
- ⑨ M. Sakurai, Unidirectional structure changes of ABC transporters driven by binding of ATP and its hydrolysis, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 16-18 日、兵庫県立大姫路書写キャンパス.
- ⑩ 田中 翔、櫻井実、コンピューターシミュレーションから探る ABC トランスポーターの動的構造と ATP 加水分解の関係、第 11 回日本蛋白質科学会年会、2011 年 6 月 7-9 日、ホテル阪急エキスポパーク (吹田).
- ⑪ S. Chiba, Y. Harano, M. Kinoshita and M. Sakurai, A novel method for evaluating protein-ligand binding affinity based on thermodynamics: focusing on entropy, Pacificchem 2010 Congress, 2010 年 12 月 15-19 日、ホノルル (アメリカ).
- ⑫ Y. Watanabe, D. Sato, M. Sakurai,

Conformational change of mouse ABC transporter ABCB1 from an inward-facing conformation as studied by molecular dynamics simulation、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20～22 日、東北大。⑬ W. Uchida, T. Hagiya, D. Satoh, Y. Sohma, M. Sakurai, MD simulation study on the atomic-level structure of ABCC7 (CFTR)、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20～22 日、東北大。

⑭ 渡辺百合香、足立健太郎、櫻井実、マウス ABCB1 トランスポーターの Inward-facing 構造からの分子動力学シミュレーション、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010 年 6 月 16～18 日、札幌。

⑮ 打田和香、古川一萩谷朋佳、足立健太郎、相馬義郎、櫻井実、MD シミュレーションによる ABCC7 (CFTR) のクロライドイオン透過機構の解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010 年 6 月 16～18 日、札幌。

⑯ 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。

⑰ 足立健太郎、櫻井実、計算機シミュレーションによる ABC トランスポーター 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)。

⑱ 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)。

⑲ 千葉峻太郎、野村淳磨、原野雄一、木下政弘、櫻井実、リガンド-タンパク質間の結合自由エネルギーに対するマルチフィジクスの計算手法の比較および評価、第 9 回日本蛋白質科学会年会、2009 年 5 月 20～22 日、熊本全日空ホテル。

⑳ 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。

[その他]

ホームページ等

<http://www.cherry.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

原野 雄一 (HARANO YUICHI)

大阪大学・蛋白質研究所・特任准教授
研究者番号：60456259

(3) 連携研究者

なし