

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870220

研究課題名(和文)分子シミュレーションによるABCトランスポーターの「ジャンケン」メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of "rock-paper-scissors" mechanism of ABC transporters by molecular simulations

研究代表者

古田 忠臣 (FURUTA, TADAOMI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：10431834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターは、ATPの結合・加水分解・解離のエネルギーを用いて細胞膜を介して様々な基質を輸送する膜内在性タンパク質の大きなスーパーファミリーの一つである。本研究では、細菌のABCトランスポーターMsbA, TM287/288を対象としてカップリングヘリックス(CHs)の役割やATP結合の影響に着目した分子シミュレーションによる解析を行った。天然体とCH変異体の比較の結果、構造変化やATP結合に関して各CHの役割が明らかになった。これら本研究で得られた知見は、ABCトランスポーターの構造機能相関に重要な洞察を与えるであろう。

研究成果の概要(英文)：ATP-binding cassette (ABC) transporters constitute a large superfamily of integral membrane proteins that transport several substrates through cellular membranes using the energy of binding, hydrolysis, and release of ATP. In this study, we investigated the roles of coupling helices (CHs) and the effect of ATP for bacterial ABC transporters MsbA and TM287/288 as targets by molecular simulations. Comparing the wild type and CH mutants, we revealed the roles of each CH on conformational changes and the effect of the binding of ATP. These findings provide important insight into the structure-function relationship of ABC transporters.

研究分野：生物物理学

キーワード：ABCトランスポーター ATP 基質 輸送 カップリングヘリックス 分子シミュレーション 構造変化
構造機能相関

1. 研究開始当初の背景

ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターは、細菌からヒトまで広く存在しており、ATPの結合・加水分解・解離のエネルギーを用いた生体膜を通じた基質輸送を行う膜内在性タンパク質の大きなスーパーファミリーの1つである。(1)ABCインポーターと(2)ABCエクスポーターの大きく2つに分類される(ただし、ABCタンパク質としてはDNA修復などに関わる(3)膜貫通部位を持たないものもある)。(1)ABCインポーターは、細菌において発現され、糖、脂質、ビタミンなど栄養素を細胞内へと摂取する。一方、(2)ABCエクスポーターは、細菌からヒトまで現存する全ての生物に存在し、薬剤や毒など不要物を細胞外へと排出する。本研究では、(2)ABCエクスポーターに焦点を当てる(ここでは単にABCトランスポーターと呼ぶ)。現在、ABCトランスポーターは、抗がん剤などの「多剤耐性(multidrug resistance: MDR)」において重要な役割を演じることから創薬など医学・薬学的にも大変注目されているターゲットの1つである。

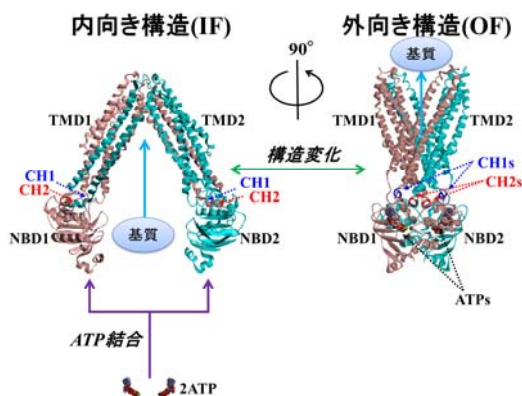


図1. ABCトランスポーターの基質輸送における構造変化: 内向き構造(IF)⇌外向き構造(OF)。それぞれに構成要素であるTMDs, NBDs, CHsの位置を示してある。

ABCトランスポーターの基本構造は、2つのATP(ヌクレオチド)結合ドメイン(nucleotide-binding domains: NBDs)、2つの膜貫通ドメイン(transmembrane domains: TMDs)、そしてNBD-TMD界面にあるカップリングヘリックス(CHs)から構成される(図1)。NBDsは、共通するATP結合モチーフ(後述)を持ちABCトランスポーターを通して配列がよく保存されており、ATPの結合・加水分解・解離を介してABCトランスポーター全体の構造変化を誘導するエンジンとしての役割を持つ。一方、TMDsは、基質の輸送経路(pathway/pore)を形成し、配列は輸送する基質に依存し様々である。そして、2つあるカップリングヘリックス(CH1, CH2)は、ATP駆動エンジンNBDsの力を輸送経路TMDsへと伝搬するとき(NBD-TMDコミュニケーション)の要となっている。

ATP結合に関して、各NBDはRecA-like core subdomain (CSD)と α -helical subdomain (HSD)から構成される。CSDにはWalker A(P-loop), Walker B, A-loop, H-loop, Q-loopの5つのATP結合モチーフがあり、HSDにはABC signature motif (C-loop), D-loopの2つのATP結合モチーフがあり、それぞれハーフポケットを形成している。NBDs二量体化において、各サイトでCSDとHSDが向かい合い、これらハーフポケットがATPをサンドイッチして、計2つのATP結合ポケット(ABPs)を形成する。

ABCトランスポーターの輸送機構に関して、HSDのATP結合モチーフへのATP結合およびTMDsでの基質結合を伴い内向き構造(IF)から外向き構造(OF)へと構造変化し、基質は細胞外へと排出される(図1)。その後、ATP加水分解やADP、Piの解離を伴い、OF→IFへと構造変化し元の状態へと戻る。輸送機構に関して、他の膜輸送タンパク質同様、Jardetzkyが提唱した“alternating-access”モデルが一般的に受け入れられている。ここで特に興味深い点は、IFにおいてNBDsが閉じる方向とOFへ向かってTMDsが開く方向がほぼ直交している点である(図1でIFとOFの構造は90°回転させて表示してある)。

ABCトランスポーターの結晶構造としては、2006年のDawsonらの細菌Sav1866(OF構造)を皮切りに、2007年のWardらの細菌MsbA(IF, closed-apo(CA), OF構造)、2009年のAllerらのマウスP-gp(IF構造)、そして現在では線虫P-gp(IF構造)、細菌TM287/288(IF構造)、ヒトABCB10(IF構造)など数種の構造解析が行われてきた。中でも、MsbAは外向き構造(OF)、中間様構造(CA)、内向き構造(IF)が構造解析されている唯一の例であり、その構造変化があたかもジャンケンのグー、チョキ、パーに似ていることから、本研究では課題名に「ジャンケン」メカニズムと名付けてある。MsbAでは、IF、OF双方の構造解析が行われているもののIFの分解能は粗く、また他のABCトランスポーターではIFもしくはOFの一方の構造解析のみであり、ABCトランスポーターにおけるIF⇌OF間の構造遷移の原子レベルでの詳細は未解明のままである。

MsbAの計算的な先行研究としては、Targeted MDを用いてOF→CAの構造変化を解析したもの(Weng et al. 2010)および粗視化モデルを用いてIF→OFの構造変化を解析したもの(Ward et al. 2012)などあるがATP結合・非結合状態の分子動力学(MD)シミュレーションは未だ行われていなかった。

また、TM287/288は2012年にHohlらにより構造解析された初めてのヘテロ二量体ABCトランスポーターであり、ABCトランスポーターの構造変化の解析において大変重要と思われる。(そこで、本研究計画時は含まれていなかったものの、研究開始当初において新たに対象に加えることとした。)

2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究ではまず、細菌の ABC トランスポーター MsbA を対象とし、ATP 結合・非結合状態において分子シミュレーションを用いた解析を行うことにより、ABC トランスポーターの ATP のエネルギーを駆動力とした基質輸送における構造変化メカニズムを解明(特に、ATP の役割を解明)することを第一の目的とした。

次に、上述の様に ATP の結合・加水分解・解離は ATP(ヌクレオチド)結合ドメイン(NBDs)で行われ、基質の取り込み・排出は膜貫通ドメイン(TMDs)で行われる。これら NBD-TMD 界面に存在し、NBD-TMD コミュニケーションの要とされる 2 つのカップリングヘリックス(CH1, CH2)に着目し、MsbA のおける CH1, CH2 に変異を導入した場合での分子シミュレーションを実行し、天然体、CH1 変異体、CH2 変異体の比較を行うことにより、カップリングヘリックスの役割の解明を行うとすることを第二の目的とした。

そして、第三の目的としては、MsbA とは別の細菌の ABC トランスポーター TM287/288 を対象とした。ここで TM287/288 は、一方の ATP 結合ポケット(ABP1)にのみ ATP アナログが結合した状態で近年結晶構造解析された(Hohl et al. 2012)。この構造を基に異なる ATP 結合状態等に着目し分子シミュレーションを用いた解析を行うことにより、ABC トランスポーターの構造変化における ATP の影響等を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

MsbA に関して、IF 構造、CA 構造では分解能が悪く Ca 原子座標のみしか得られていない為、OF 構造(PDB: 3B60)のみを初期構造の作成では用いた。天然体(Wt)の ATP 結合状態(Wt-ATP)での初期構造の作成手順は以下である。

- (1) OF 構造の 2 つの ATP アナログ(AMP-PNP)を ATP に置換する。
- (2) 高分解能の ATP 結合 NBD 二量体構造である細菌 MJ0796 構造(PDB: 1L2T)を基に Mg²⁺を各 ATP に配置する。
- (3) OPM データベース情報を基に膜貫通ドメイン(TMDs)の適切な位置に脂質膜(POPCs)を配置する。
- (4) 上記、タンパク質・膜構造を水ボックスで水和し、カウンターイオンを追加する。

天然体の apo 状態の初期構造(Wt-apo)は、上記構造から Mg, ATP を取り除き、適切なカウンターイオン数に変更した。

また、CH1 変異体(Mt1)、CH2 変異体(Mt2)の初期構造に関しては、上記 Wt-ATP および Wt-apo 構造を基に、CH1 の 7 残基もしくは CH2 の 5 残基をそれぞれすべて Ala に変異させることで得た(それぞれ、Mt1-ATP, Mt1-apo, Mt2-ATP, Mt2-apo と呼ぶ)。ここ

でも適切なカウンターイオン数に調整した。これら得られた 6 つの系を用い以下の手順に従い各系 100 ns の MD シミュレーションを実行した。

- (1) タンパク質、ATP, Mg²⁺重原子に束縛を課したエネルギー最小化を行う。
- (2) 同束縛で 1 bar、310 K の NPT 条件で 5 ns の平衡化を行う。
- (3) 束縛を除き、NPT 条件で 100 ns のプロダクションランを実行する。

上記で得られたトラジェクトリーを用いて平均二乗変位(RMSD), 主成分分析(PCA), 距離等の解析を行った。

次に、TM287/288 に関して、IF 構造(PDB: 3QF4)を初期構造の作成に用いた。簡潔な作成手順は、まず結晶の AMP-PNP を ATP に変換し 1 つの ATP が ABP1 に結合した構造(1ATP)を作成した。その構造を用いて、MJ0796 構造を基に apo 状態の ABP2 に ATP, Mg²⁺を結合させ 2 つ ATP が結合した構造(2ATP)を作成し、1ATP から ATP, Mg²⁺取り除き apo 構造(apo)を作成した。以降、膜の設置など系の作成や MD シミュレーションは上記 MsbA の場合と同様に行った。

4. 研究成果

MsbA に関して、第一と第二の目的を合わせた形で学術誌に発表してあるので、その中から主な成果を以下に述べる(詳しくは雑談論文 1 を参照)。

各系での 100 ns の MD シミュレーションの結果、構造変化に関して、本来 ATP の結合によって安定化されるべき OF 構造において、Wt-ATP, Mt1-ATP 系では細胞外末端間距離は保たれていたものの、Mt2-ATP 系ではその距離が減少し、不安定な構造となっていた。また、apo 状態では先行研究等で NBDs が開く際非対称性運動が観測されるといった報告があるが、Wt-apo, Mt1-apo 系ではその様な非対称性運動が観測されたものの、Mt2-apo 系では観測されなかった。

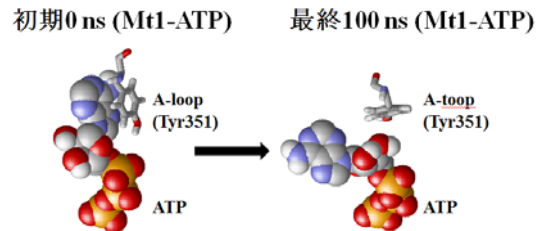


図 2. Mt1-ATP 系での初期および最終構造における A-loop と ATP との相互作用

また ATP 結合に関して、Wt-ATP 系では安定に保たれているものの、両変異体(Mt1-ATP, Mt2-ATP)共に ATP 結合モチーフと ATP との相互作用が弱まるなどの結果が得られた(図 2)。これらシミュレーションか

ら得られた結果をまとめると、構造変化(ATPase 活性)には CH2 の方が重要であり、ATP 結合(親和性)には CH1 と CH2 が共に寄与していると判明した。これらの結果は、共同研究として行われた生化学実験(酵素アッセイ)の結果とも一致した(雑誌論文 1 では、共同研究としてまとめてある)。

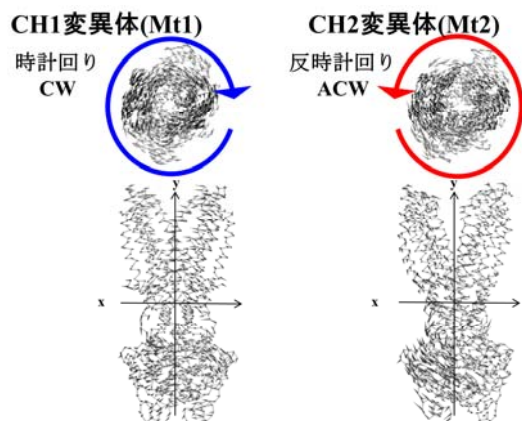


図 3. MsbA 変異体(Mt1, Mt2)における MD シミュレーションにおける主成分分析(PCA)の結果

さらに、ATP 結合状態における初期緩和(0-20 ns)に関して主成分分析により、ABC トランスポーター全体での運動性を解析したところ、Wt-ATP 系ではサブドメインなどに分散され明確な巨視的な運動は解析観測されなかったものの、Mt1-ATP、Mt2-ATP 系では、第一モードにどちらも寄与率が 50 % にも近いものが得られた。さらに、Mt1-ATP 系では時計回りである一方、Mt2-ATP 系では反時計回りであるという大変興味深い結果が得られた(図 3)。この結果に基づいた IF⇌OF 間の変形(morphing)および CSD、HSD と各 CH の相互作用の考察から、NBD の TMD-Wing に対する「うなずき運動」と NBD-TMD の対称軸に対する「逆回転運動」が IF⇌OF 構造遷移において必須であると提唱した。以上、MsbA に関する解析により、ABC トランスポーターの構造機能に関する重要な知見が得られた。

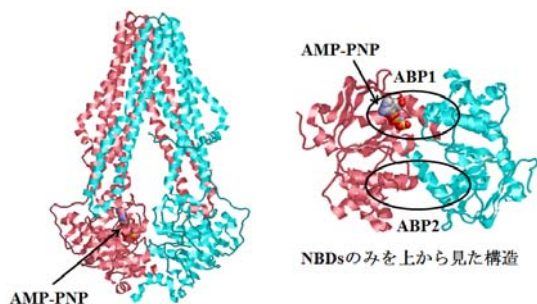


図 4. TM287/288 の結晶構造(PDB: 3QF4)。ABP1 に ATP アナログ(AMP-PNP)が結合している。

次に、TM287/288(図 4)に関して、ATP 結合の影響に着目して行った複数本の MD シミュレーションの結果、結晶状態で ATP アナログが結合している ABP1 に 1 つの ATP を結合させた系(1ATP)および apo 状態の系(apo)では、NBDs が閉じる運動は解析されなかった。一方、両方の ABPs に ATP が結合した系(2ATP)では、結晶構造において開いている ABP2 において NBDs が閉じ、ABP の形成が観測された。ここで得られた ATP 結合の影響により NBDs が閉じ、ABP が形成される振る舞いは先行研究等でも観測されている基質輸送に重要な構造変化の一つである。

最後にまとめとして、本研究では、ABC トランスポーターの輸送機構における構造変化に焦点を当て、分子シミュレーションによる解析を行った。細菌の ABC トランスポーター MsbA の NBD-TMD コミュニケーションの要となるカップリングヘリックスに着目した天然体と各 CH 変異体の比較解析では、細胞末端間距離や非対称運動など天然体に対する変異体の差異が観測され、構造変化(ATPase 活性)および ATP 結合(親和性)に関して生化学実験と一致する結果が得られた。また、構造変化に重要と思われる TMD に対する NBD の相関した「逆回転運動」と「うなずき運動」といったものが考察された。そして、細菌の ABC トランスポーター TM287/288 の ATP 結合に着目した解析では、apo 状態もしくは ATP が 1 つのみ結合した系では閉開運動は観測されないものの、ATP が 2 つ結合した系において ABP の形成が観測された。これら本研究で得られた知見は、ABC トランスポーターの輸送機構における構造機能に関する重要な洞察を提供するであろう。

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 1 件)

1. Tadaomi Furuta, Tomohiro Yamaguchi, Hiroaki Kato, Minoru Sakurai, "Analysis of the structural and functional roles of coupling helices in the ATP-binding cassette transporter MsbA through enzyme assays and molecular dynamics simulations", *Biochemistry* 53, 4261-4272 (2014). DOI: 10.1021/bi500255j 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 許維麟, 古田忠臣, 櫻井実, MD シミュレーションで探るマルトーストランスポーター ATP アーゼ (MalK) のダイナミクスと構造変化, 第 52 回日本生物物理学会大会, 2014 年 9 月 27 日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)

2. 荒井直樹, 古田忠臣, 櫻井実、Elastic Network Model を用いた ABC トランスポーターの global motion の解析、第 52 回日本生物物理学会大会、2014 年 9 月 27 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
3. 西本達志, 古田忠臣, 櫻井実、MD シミュレーションを用いたマウス・線虫 ABCB1 トランスポーターの構造・ダイナミクスの解析、第 52 回日本生物物理学会大会、2014 年 9 月 25 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
4. 西本達志, 古田忠臣, 櫻井実、MD シミュレーションを用いたマウスと線虫の ABCB1 トランスポーターの動的性質の解析、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 27 日、横浜産貿ホール マリネリア (横浜市)
5. 荒井直樹, 古田忠臣, 櫻井実、Elastic Network Model を用いた ABC トランスポーターの global motion の解析、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 27 日、横浜産貿ホール マリネリア (横浜市)
6. 許維麟, 古田忠臣, 櫻井実、MD シミュレーションで探るマルトーストランスポーター ATP アーゼ (MalK) のダイナミクスと構造変化、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 25 日、横浜産貿ホール マリネリア (横浜市)
7. 佐藤雪子, 古田忠臣, 櫻井実、分子動力学シミュレーションを用いた ABC トランスポーター TM287/288 における ATP・基質結合による構造変化、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 7 月 13 日、とりぎん文化会館 (鳥取市)
8. 小寺充彦, 萩谷朋佳, 古田忠臣, 相馬義郎、櫻井実、分子動力学シミュレーションで探る CFTR における変異の影響、第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月 28 日、国立京都国際会館 (京都市)
9. 林智彦, 萩谷朋佳, 千葉峻太郎, 古田忠臣, 吉田紀生、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二量体化の理論的解析—ATP と水の役割、第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月 28 日、国立京都国際会館 (京都市)

〔図書〕 (計 0 件)

なし

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

古田 忠臣 (FURUTA, TADAOMI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：10431834

(2)研究分担者

なし ()

(3)連携研究者

なし ()