

課題名 (タイトル) :

糖やペプチドなどの栄養素や薬剤の取り込みに関わる MFS の分子動力学シミュレーション

利用者氏名 : 石谷 隆一郎

所属 : 和光研究所 基幹研究所 杉田理論分子科学研究室

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

Major Facilitator Superfamily (MFS) は H^+ や Na^+ などの濃度勾配を駆動力とする輸送体の中で、5000 以上のメンバーを有する最大のスーパーファミリーであり、ヒトを含む真核生物から、細菌にまで広く保存されている。MFS には、 H^+ 濃度勾配を利用して糖やペプチドなどの栄養素、薬剤の取り込みに関与する重要な輸送体が含まれるが、これらの輸送体で H^+ 輸送を担う残基や、inward-facing 状態から outward-facing 状態の構造変化の経路を含む基本的な動作機構は未解明である。その理由として、膜タンパク質である MFS は構造解析が困難であり、水や水素結合が議論できない 3 \AA 程度の構造 (Abramson et al., Science, 2003 等) しか報告されていないことが挙げられる。そのため、MFS に属する LacY の構造に基づいて MD シミュレーションが行われ動作モデルについて提案されているもの (Yin et al., Biophysical J., 2005, Sansom et al., Structure, 2007)、実験結果との矛盾点があるなど、その信頼性は低かった。MFS の輸送動作メカニズムに関する知見を得るためには、信頼性の高い高分解能の結晶構造を初期構造とした長時間の MD シミュレーションが必要不可欠である。

一方、本研究室では MFS に属する POT (proton-dependent oligopeptide transporter) 輸送体の構造解析に取り組んできた。POT は数千種類という非常に多様なペプチドを認識し輸送することが知られている。さらに、ヒトにおける POT 輸送体メンバー PEPT (Peptide transporter) 1, PEPT2 は、本来の基質であるペプチドの取り込み以外にも、経口摂取した薬剤の血流への取り込みに重要な役割を果たしており、薬物動態の観点からも興味深い膜輸送体である。我々は POT の inward-facing 状態の構造を 1.9 \AA という高分解能

で決定することに成功した (図 1)。その結果、水

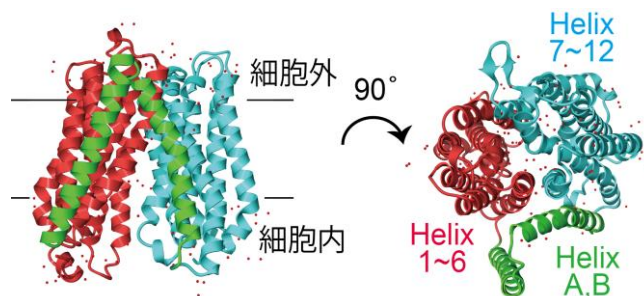


図 1: POT の高分解能結晶構造

分子との相互作用や水素結合などを原子レベルで議論可能になり、MFS の輸送動作メカニズムを解明する構造基盤を得ることができた。そこで、さらにこの POT の動的な輸送機構を解明するために、POT の高分解能構造に基づいた MD シミュレーションを、RICC を使用して実施した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

高度に並列化が可能なソフトウェアである NAMD2 を用い、脂質二重膜と水分子を頭にて考慮した系の分子動力学シミュレーションを行った。POT が取りうる状態には、(1) 基質と H^+ 共になし (図 2A, G, H), (2) 基質なし・ H^+ あり (図 2B, F), (3) 基質と H^+ 共にあり (図 2C, D, E) の 3 パターンが考えられる。そこで初期構造として、「(1) 基質と H^+ 共になし」、「(2) 基質なし・ H^+ あり」、「(3) 基質と H^+ 共にあり」の合計 3 通りを作成して使用した。 H^+ の結合サイトは、結晶構造や生化学的実験の結果に基づき Glu310 側鎖を仮定した。また、基質結合状態は、POT とペプチドアナログ複合体の結

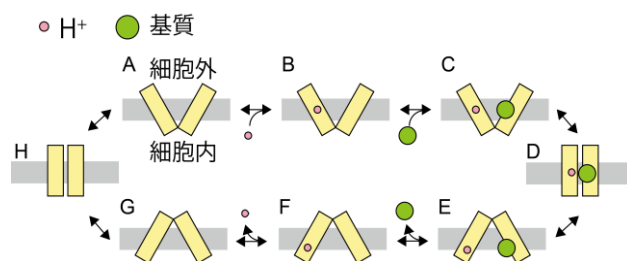


図 2: MFS の動作機構モデル

晶構造を基に作成した。各初期構造について、それぞれ 200 ns 以上のシミュレーションを行った。得られたトレジェクトリからシミュレーション中の構造変化を検出し、それが POT の初期構造ごとにどのような差異があるのか、またそれは基質や H⁺のどのような作用で生じるのかを解析した。

3. 結果

基質・H⁺共に結合していない POT (図 2G) を初期構造とした MD シミュレーション (シミュレーション 1) では、100 ns 程度で inward-facing 状態から自発的に構造変化を起こし occluded 状態 (図 2H) に至ることが明らかになった (図 3)。そしてその後、100 ns 程度で自発的に inward-facing 状態に戻ることが明らかになった。この結果は、inward-facing 状態 (図 2G) の状態の POT は occluded 状態 (図 2H) と平衡状態にあり、2 状態間の自由エネルギー障壁は低く、その間を比較的高速に変化できることを意味している。

一方で、基質なし・H⁺ありの状態 (図 2F) を初期構造とした MD シミュレーション (シミュレーション 2) も同様に 200 ns 以上行った。その結果、シミュレーション 1 で見られたような自発的な構造変化は観察されなかった (図 3)。このことは、H⁺のみ結合した inward-facing 状態と outward-facing 状態との間 (図 2B, F 間) には高い自由エネルギー障壁が存在することを示唆する。

さらに、基質と H⁺共にありの状態 (図 2E) を初期

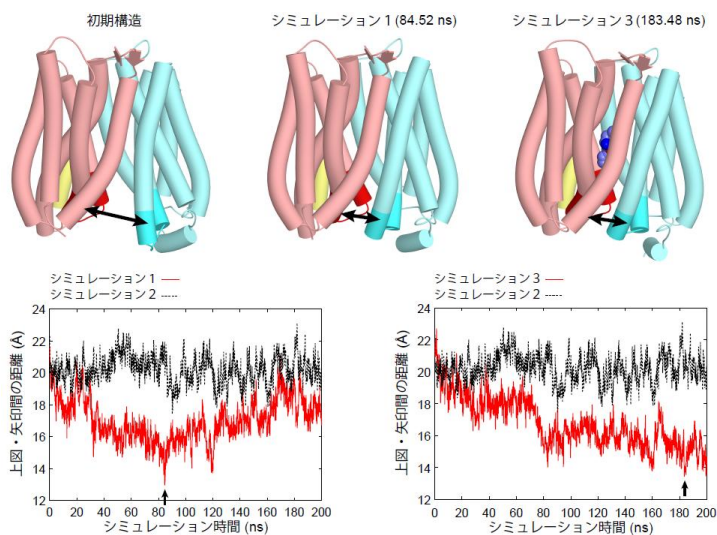


図 3:MD シミュレーションの結果

構造とした MD シミュレーション (シミュレーション 3) も同様に 200 ns 以上行った (図 3)。その結果シミュレーション 1 で見られたのと同様の構造変化が観察された。この結果は、基質と H⁺共に結合した場合も、inward-facing 状態 (図 2G) の状態の POT は occluded 状態 (図 2H) と平衡状態にあり、2 状態間の自由エネルギー障壁が低いことを示唆している。

さらに、シミュレーション 1 で構造変化が起こる原因を、原子間相互作用レベルで詳細に検討した。その結果、シミュレーション 1 では Arg43 側鎖が脱プロトン化した Glu310 側鎖と新たな塩橋を形成していることが判明した。このような相互作用は、結晶構造やシミュレーション 2 では見られなかった。以上を総合すると、図 2G の状態では、この相互作用が、N 末端側ドメインと C 末端側ドメインが近づくことを可能とし、構造変化が起こると考えられる (図 4)。一方で、図 2F の状態では、プロトン化した Glu310 と Arg43 の反発によりエネルギー障壁が高くなり、構造変化を阻害していると推測される (図 4)。これらの仮説を検証するために Arg43 の変異体を作成し活性測定を行ったところ、仮説と合致する (すなわち図 2A・G 間の状態変化のみが阻害される) 結果が得られた。

一方で、シミュレーション 3 で構造変化が起こる原因を同様に検討した。その結果、結合した基質ペプチドとプロトン化した Glu310 の間に水素結合が形成され、それにより Glu310 と Arg43 間の反発が緩和されることが示唆された (図 4)。さらに、基質ペプチドと輸送体の疎水性相互作用が形成さ

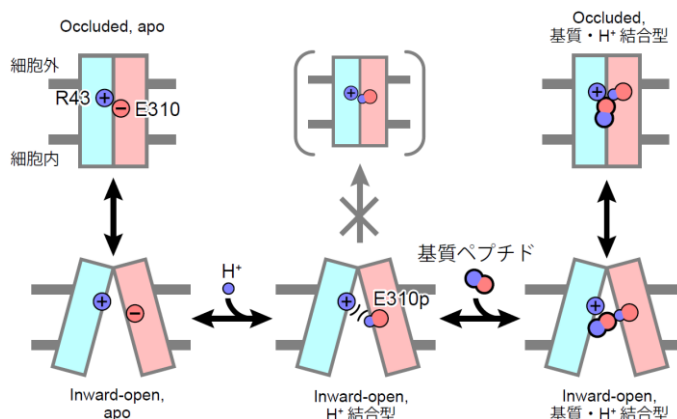


図 4:基質結合と構造変化のカップリング機構

れ、それにより N 末端側ドメインと C 末端側ドメインが近づけるようになることが示唆された。

4. まとめ

以上のように、本研究の結果から POT の構造変化が、「何も結合していない状態」と「プロトンとペプチド両方結合した状態」のみで誘起され、それ以外では変化が起こらない理由が説明できる。このような基質結合状態と構造変化のカップリングが、プロトン濃度勾配を輸送基質濃度勾配へと効率的に変換できるメカニズムの根底となっていると考えられる。

5. 今後の計画・展望

以上の結果をまとめ、現在論文投稿準備中である。

6. 利用がなかった場合の理由

演算時間はほぼ使い切ることができた。申請時間は妥当であったと言える。

平成 24 年度 RICC 利用研究成果リスト

【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】

Koyama M, Nishimasu H, Ishitani R, Nureki O, “Molecular Dynamics Simulation of Autotaxin: Roles of the Nuclease-like Domain and the Glycan Modification.” *J Phys Chem B*, 116 11798–11808 (2012).