総説

計算科学と実験科学の組み合わせにより明らかになった 多剤排出トランスポーターAcrBの分子メカニズム

村上 聡¹, 山根 努², 池口満徳², 高田彰二³

¹東京工業大学大学院生命理工学研究科

²横浜市立大学大学院生命医科学研究科

³京都大学大学院理学研究科

Since nearly all protein molecules acting in cell are working dynamically, dynamic aspects of them are indispensable to understand each biological system. Recent advances in synchrotron-based crystallography and computational chemistry have allowed to provide dynamic aspect in high-resolution crystal structures. Here we review our structural and functional studies on multi-drug efflux transporter, AcrB. Crystal structure analysis and molecular dynamics (MD) simulation are complementary techniques. And synergy between them makes static crystal structures more animate. Proton is another nuisance in protein crystallography, since it is almost invisible technically. MD simulation can allow systematic examination of protonation states in titratable residues.

Membrane transport / Multi-drug resistance / Molecular dynamics simulation / Membrane Protein / Protein crystallography

1. はじめに: 結晶解析と分子動力学計算

蛋白質や核酸などの原子レベルの立体構造を基にその働きを研究する構造生物学は、最近の分子生物学的手法、シンクロトロン放射光や計算機技術の発達により、近年旺然たる進展をみせ、多くの興味深い生体反応をつかさどる蛋白質、蛋白質複合体の原子レベルでの立体構造を明らかにし、構造に基づくそれら反応の本質的な理解に大きく貢献してきた。ここ十年のノーベル化学賞を見ると 2012 年 (G 蛋白質共役受容体の研究), 2009 年 (リボソームの構造と機能の研究), 2006 年 (真核生物における転写の研究), 2003 年 (イオンチャネルの構造および機能の研究) と数年に一度の頻度で生体高分子の構造に基づく機能の本質的解明にノーベル化学賞が与えられている。ここでとりわけ着目したいのがノーベル化学賞であり、医学生理学賞でないという点である。受容体、とりわけ G 蛋白質や、蛋白質合成、イオンチャネルに関する研究は、ノーベル化学賞以前に、それぞれノーベル医学生理学賞を受けている¹⁾。つまり改めてノーベル化学賞が与えられたのは、それらの生命現象の理解が化学の領域に達したということを意味している。蛋白質分子中で

起こる種々の反応や相互作用をつかさどる官能基の立体配置を原子レベルで観察し、現象を化学や物理の言葉での理解へと導く X 線結晶構造解析は、構造生物学分野における中心的役割を演じてきたことは異論の余地がない。X 線結晶構造解析の結果得られる構造は結晶中に含まれる数多ある分子の平均構造であり、精度が極めて高い特長がある。その一方で、それ故ある定位の構造を反映する。生体内でダイナミックに揺らぎ機能する蛋白質分子の動的な様相は、これもまた平均化され、静的な情報を与えるのみとなる。このことは X 線結晶構造解析の欠点というべきかもしれない。反応中間体を多数、詳細に結晶構造解析することで、至極尤もらしい機構図を表すスムーズな動画を与えた目覚ましい解析例もあるが²⁾、これも所謂バラバラ漫画であり各々は静止した図画である。その欠点を補い、構造に動的な知見を与えると考えられるのが、分子動力学 (MD) シミュレーション計算である。

かつて著者 (村上) の恩師は、「X 線結晶構造解析はこれまで成されてきた多くの生化学実験などの合理的解釈の答え合わせとして使われる側面を持つため、それは当該学問分野におけるゴールであると思われる節がある。しかし、それは誤りでむしろスタートであ

Molecular Mechanism of Multi-drug Efflux Transporter, AcrB Revealed by the Synergy between Molecular Dynamics Simulation and Crystallography

Satoshi MURAKAMI¹, Tsutomu YAMANE², Mitsunori IKEGUCHI² and Shoji TAKADA³

¹Graduate School of Bioscience & Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

²Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

³Graduate School of Science, Kyoto University

る。結晶構造を基に研究を展開することで、よりリアルティのある研究が開始できるのである。」と宣った。MD 計算は高精度の分子構造モデルがないと開始できない。また結晶構造はMD 計算なくしては動的な様相を得ることは難しい。そういった意味において、MD 計算と結晶構造解析は極めて相補的な技法であるといえる。これまで実験科学を旨とする結晶学者は、シミュレーションは比較的小さな分子による速い反応の場合のみに適用しうるもので、巨大な蛋白質に含まれる何万個もの原子を、水中や脂質膜中の然るべき環境下で、且つ然るべき反応時間計算することは、技術的な限界を超えていると考えていた。しかし、昨今の計算機や計算技法の発達によりそれが可能となり、既に多くの興味深い研究を支えている。而して2013年ノーベル化学賞は複雑な化学反応に関するマルチスケールモデルの開発に与えられた¹⁾。構造生物学の1つの手法として、MD 計算が積極的に使われる時代が来たことを意味すると考えている。

2. 動機:Post-structure の3つの新たな動機

著者らは細菌の多剤耐性化の主因の1つである多剤排出トランスポーターの構造と機能に興味を持って共同研究を進めてきた。世界初となった多剤排出トランスポーターの結晶構造解析は大腸菌 AcrB について2002年に行われた³⁾。さらに2006年には基質複合体など分子機構解明に迫る非対称的な構造が得られた⁴⁾。AcrB はホモ三量体で機能するが、各々のプロトマーは、構造が異なり、それに応じて薬剤排出機構における機能状態が異なる。それぞれ、基質を取り込む状態 (Access)、結合する状態 (Binding)、排出する状態 (Extrusion) にあると解釈できた。それを基に **ATP 合成酵素の回転触媒説**⁵⁾ の類推によって動的な解釈がなされ機能的回転メカニズムを提唱した⁴⁾。しかし、先述のとおり結晶構造は静的な構造であり、動的な解釈については想像の域を脱することはない。そこでMD 計算による検証が必要となる3つの新たな動機が生まれた。①この構造非対称性は、類推の元となったATP 合成酵素においては、ヌクレオチド結合状態の違いであるとされたが、AcrB における非対称性でも同様に、基質の結合が要因になっているのではないかと考えた。さらに2002年に解かれた構造では結晶学的な対称性によりこの三量体が対称的な構造を取っていたが、それが単なる結晶学的なアーチファクトなのか生理的に意義のあるものか? 新たな動機が生まれた。

さらに、結晶学における上記の欠点の他に挙げられ

ることは、プロトンを観察することが困難 (或いは不可能) である点である。AcrB の機能的回転は細胞膜を介したプロトン濃度勾配をエネルギー源としている。結晶構造解析では、3種のプロトマー各々が持つ膜貫通ヘリックスの束の中央部分に、2つのアスパラギン残基と、それらと塩橋をつくる1つのリジン残基があり、その部分がプロトン化/脱プロトン化することで膜貫通部分に構造変化を来し、それが遠隔構造変化伝搬により分子全体の動きとなると考えられている。そこで②3種のプロトマーのうち、どのプロトマーの有するどのアスパラギン酸がプロトン化されるのか? に興味を持たれる。プロトン化状態を変えた構造を観察すれば、3種のうちどの機能状態となるかを明らかにする新たな動機が生まれた。

さらに、この種の薬剤排出トランスポーターは細胞膜上で働く掃除機に例えられており (Vacuum cleaner theory)⁶⁾、細胞膜の外葉付近にある脂溶性に富んだ基質を言えば分子中に「吸い込む」。このような動的な様相はやはり結晶構造では得ることは難しく、③基質が想定される基質取り込み口から、基質結合部位へと透過経路中を動いて行く様を観察したいという動機が生まれた。このように結晶構造の解析後、機能を考察する際に新たな3つの動機が生まれた。

3. 結果と考察:MD 計算だからできたこと

①については2006年に用いた非対称性を観察することが可能な晶系で、基質を加えずに結晶構造を解けば答えが得られると考えられるが、そこで問題が生じた。それはAcrB が界面活性剤を基質とする事実である。抗生物質や抗がん剤などの基質を加えずとも、精製のために界面活性剤を加えるため、厳密な意味でのアポ体は得ることが難しい。勿論界面活性剤を用いずには結晶化はおろか精製も不可能である。そこで分子動力学計算に依ることにした。方法としては、2006年に明らかにしたAcrB ミノサイクリン複合体の結晶構造を出発モデルとし、分子動力学シミュレーション計算を開始する。十分な時間を経て安定を観た後、あるタイミングで座標トラジェクトリーから、結合基質の座標のみを消し去り、計算を続行する。その後再び十分な時間シミュレーション計算を行った後、得られた三量体が各々3種のうちどの構造状態にあるか? を構造的特徴から分類しその出現頻度を調べた。このような計算を何本も走らせ、結論として基質存在下、非存在下での構造の安定化や構造変化を統計的に解析した (図1)。ここでは、340 kDa もの巨大な蛋白質のMD

②について、プロトン化状態を変化させなければ、例えば酸性或いは塩基性の緩衝液に結晶を浸潤させ、構造を解くことによりプロトン化/脱プロトン化状態の構造の違いを観察することができるが、我々の研究目的に対してそれは全く意味をなさない。非対称的な三量体は各々プロトン化状態が異なっている。そのため、結晶をある水素イオン濃度の緩衝液に浸潤させれば、三量体に含まれる荷電性アミノ酸の状態が遍く変化してしまうだろう。我々はそうではなく、ある特定のプロトマーに含まれる2つのアスパラギン酸側鎖の片方ずつのプロトン化状態を変化させたいのである。それには、シミュレーション計算以外には方法はないと思われた。方法としては、2006年に明らかにした結晶構造を出発モデルとし、三量体にそれぞれ含まれる2つのアスパラギン酸と、1つのリジン残基の荷電状態を幾種類か仮定し、それで分子動力学シミュレーションを開始する。十分な時間シミュレーション計算を行った後、座標トラジェクトリーの構造的特徴を観察し構造の安定性を調べた⁹⁾。荷電状態の仮定が間違っているならば構造は安定せず変化する。このような計算を証明に必要な場合の数だけ多数実行した。その結果、三量体のうち、「基質排出型」と呼ばれる構造機能状態の持つ片方のアスパラギン酸 D408 のみが

③こそこは、分子動力学シミュレーション計算以外でそれを調べる方法はないと考えられる。方法としては、2006年に明らかにした結晶構造を基に、排出されるべき基質が存在するであろう基質取り込み口近傍に薬剤分子モデルを置きシミュレーション計算を行い、座標トラジェクトリーの薬剤分子の動きの軌跡に着目した。複数の取り込み口の可能性を考えて複数の計算を行い、それらの統計処理を施しどのような経路で薬剤分子がAcrB分子中に取り込まれ排出されてゆくのかを見た¹⁰⁾。その結果、AcrBの薬剤取り込み口 (vestibule) と考えられている部位から予想通り基質は取り込まれることをシミュレーション計算でも観察することができたが、さらに基質の大きさや疎水性の違いにより、考えていた基質透過経路以外にも幾らか他の経路を経る可能性が見いだされた(図3)¹⁰⁾。これらの経路はいずれもAcrB分子内に開いた疎水性のトンネルで、細胞膜外葉にほぼ接するように存在する基質取り込み口を形

図 3

計算により求められた基質輸送の軌跡。細胞膜に対して平行な方向（左）からと垂直な方向（右）からのリボン図。基質分子の重心位置の軌跡をトラジェクトリーの時間により色分けした（初期：黄色→終期：マゼンタ）。また、基質結合部位に結合したミノサイクリン分子（マゼンタ）と基質透過経路を成す幾らかのアミノ酸残基（緑）を描いた。

作っており、疎水性に富む基質がそこを経てゆくと考えられた。さらにその経路の信憑性を検証するために、示された新たな基質透過経路を成すアミノ酸残基に対して部位特異的変異導入を行い、得られた変異体の基質排出活性を測定した。その結果、計算科学により新たに見いだされた基質透過経路もまた基質輸送に重要な役割を担うということが実験的にも示された¹⁰⁾。これについては、各アミノ酸を主鎖と側鎖の2つの球で近似する粗視化モデルによるMD計算を行った。

4. まとめと考察：相乗効果サイクル

細胞内では蛋白質はダイナミックに揺らぎながら機能しているのだから、動的な解釈は必須で、静止画である結晶構造にライブなイメージを与える分子動力学シミュレーション計算は構造生物学分野において大変重要な意義を持つ。座標データが無いと計算ははじめることができないので、結晶解析、MD計算という順序になるが、計算の後、結果を検証するために、再び実験科学に下駄が戻されることもある。生化学実験や変異体の構造解析などが行われ、座標トラジェクトリーに観られる構造の確かさが検証される。さらにその検証の結果を受けて、次なる実験或いは計算の動機が生まれるかもしれないし、計算アルゴリズムの改良などにも生かされるかもしれない。結晶解析や生化学測定を行う実験屋と、MD計算を行う計算屋の研究は極めて相補的であり、且つそのシナジー（相乗効果）により面白い構造研究へと繋がっていく。米国では

MD専用計算機が開発され、桁外れに大規模な計算が行われているが、我が国でもソフト、ハード両面からの当該分野の発展および国家的な支援が望まれる。

文 献

- 1) <http://www.nobelprize.org>
- 2) Toyoshima, C. (2008) Arch. Biochem. Biophys. **476**, 3-11. DOI: 10.1016/j.abb.2008.04.017.
- 3) Murakami, S. *et al.* (2002) Nature **419**, 587-593. DOI: 10.1038/nature01050.
- 4) Murakami, S. *et al.* (2006) Nature **443**, 173-179. DOI: 10.1038/nature05076.
- 5) Boyer, P. D. (1993) Biochim. Biophys. Acta **1140**, 215-250. DOI: 10.1016/0005-2728(93)90063-L.
- 6) Bolhuis, H. *et al.* (1997) FEMS Microbiol. Rev. **21**, 55-84. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00345.x.
- 7) Kenzaki, H. *et al.* (2011) J. Chem. Theor. Comp. **7**, 1979-1989. DOI: 10.1021/ct2001045.
- 8) Yao, X. Q. *et al.* (2010) Nat. Commun. **1**, 117. DOI: 10.1038/ncomms1116.
- 9) Yamane, T. *et al.* (2013) Biochemistry **52**, 7648-7658. DOI: 10.1021/bi400119v.
- 10) Yao, X. Q. *et al.* (2013) J. Am. Chem. Soc. **135**, 7474-7485. DOI: 10.1021/ja310548h.

村上 聡

村上 聡（むらかみ さとし）

東京工業大学大学院生命理工学研究科教授
1997年大阪大学大学院博士後期課程修了、大阪大学産業科学研究所助手、助教授を経て2008年より現職。
研究内容：膜蛋白質、とりわけ膜輸送体の構造生物学

連絡先：〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町4259

E-mail: murakami@bio.titech.ac.jp

山根 努

山根 努（やまね つとむ）

横浜市立大学大学院生命医科学研究科特任助教
1999年東京工業大学大学院博士後期課程修了、横浜市立大学大学院博士研究員を経て2007年より現職。

研究内容：蛋白質の分子シミュレーション

連絡先：〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29

E-mail: tyamane@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

池口満徳

池口満徳（いけぐち みつなり）

横浜市立大学大学院生命医科学研究科准教授
1994年東京大学大学院農学系研究科博士課程修了、東京大学助手、横浜市立大学大学院助教授を経て2007年より現職。

研究内容：生体分子の分子シミュレーション

連絡先：〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29

E-mail: ike@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

高田彰二

高田彰二（たかだ しょうじ）

京都大学大学院理学研究科教授
1990年京都大学大学院修士課程修了、神戸大学講師、助教授、京大准教授を経て2013年より現職。
研究内容：理論生物物理学、特に生体分子複合系の分子シミュレーション

連絡先：〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

E-mail: takada@biophys.kyoto-u.ac.jp