

# 分子動力学シミュレーションによる多剤排出トランスポーター

## —AcrB と基質間の反応機構の解明

篠田 恵子

東京大学先端科学技術研究センター

### 1. はじめに

多剤排出トランスポーターAcrAB-ToIC 複合体は、近年社会問題となっている院内感染や末期がん、再発がんにみられる“薬が効かない”という薬剤耐性化に大きな役割を担っている膜タンパク質で、ポンプ機能を担う AcrB、外部チャネルの ToIC とこの2つのタンパク質をつなぐ AcrA、そして AcrB に結合して基質選択性に関与すると言われている AcrZ から構成される巨大なタンパク質複合体である (図1)。トランスポーター複合体の中で AcrB の構造は東工大の村上聡らによって初めて X 線結晶構造解析により解かれ、薬剤の取り込み、結合、排出機能のモデル(機能的回転モデル)が提案されている<sup>1</sup>。機能的回転モデルでは、ホモ三量体である AcrB が非対称構造の時、各プロトマーがそれぞれ薬剤の「取り込み」、「結合」、「排出」型のコンフォメーションをとり、薬剤の動きとともにそのコンフォメーションを変化させ機能を回転させる(「取り込み」→「結合」→「排出」→「取り込み」→…の順)。この時、AcrB の膜貫通ドメイン内にある 408 番目のアスパラギン酸のプロトン化・脱プロトン化によるその周りの残基との相互作用の変化が基質排出機能の駆動力の一つとして知られている。

2017 年に cryo-EM によって取得される<sup>2</sup>までトランスポーター複合体全体の構造が明らかにされてこなかったこともあり、これまで AcrB を中心に各構成タンパク質を対象とした分子シミュレーション計算がなされてきた<sup>3</sup>。我々の最終ゴールは、このトランスポーター複合体のタンパク質相互作用も含めて排出機構全体を明らかにすることである。その中で本研究は AcrB 単体

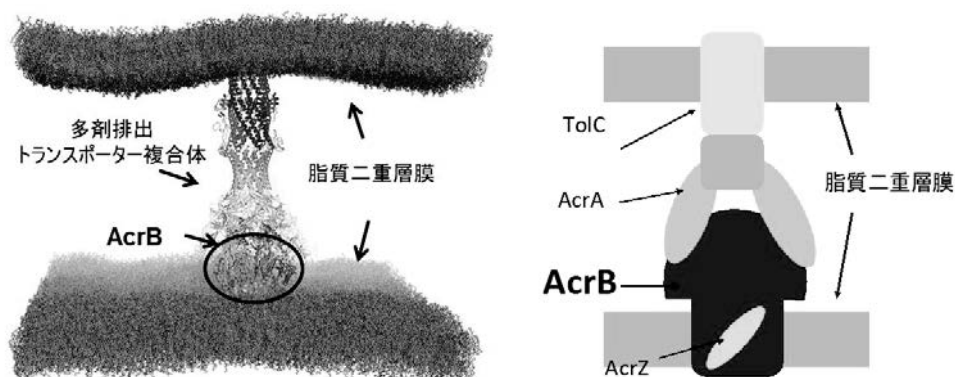


図1 多剤排出トランスポーター複合体-脂質膜系。右図は模式図

のダイナミクスを調べる位置付けである。並行して現在トランスポーター複合体の計算も行っており、比較することによりタンパク質間相互作用を調べる目的もある。本研究ではMDシミュレーションを用いてAcrB-膜系におけるタンパク質や基質のダイナミクス、基質-タンパク質間相互作用を調べた。

## 2. 計算方法

多剤排出トランスポーターAcrBの構造にはEicherらによって取得されたX線結晶構造(PDBID:4DX7)<sup>4</sup>を用いた。脂質分子にはPOPEを用いて256分子からなる二重膜を作成し、200ナノ秒のMDシミュレーションで平衡化した後、トランスポーターAcrBを埋め込み、POPE脂質二重膜-多剤排出トランスポーターのシステム(約70万原子系)を構築した。MDシミュレーションにはGROMACS5.1.4を用い、静電相互作用の計算にはparticle-mesh Ewald(PME)法、Lennard-Jones(LJ)相互作用の計算には、膜の不均一で異方性の性質によって無視できなくなったファンデルワールス力を精度良く求めるためLJ-PME法を用いた。温度298K、圧力1気圧の条件下で基質(doxorubicin)が結合している系と基質を含まない系でそれぞれ3本ずつ300nsのMDシミュレーションを実行した。計算に用いた三量体構造は、「取り込み」「結合」「排出」型のコンフォメーションを持つプロトマーから成る構造であるが、荷電性アミノ酸のプロトン化状態はPosらの予測<sup>5</sup>に準じ、「排出」型プロトマーの膜貫通部分に位置する408番目のアスパラギン酸(Asp408)をプロトン化した。

## 3. 結果

まず基質の結合構造はどうなるかを調べるために、基質(doxorubicin)のRMSD(Root mean square deviation)を計算した(図2)。図から基質の揺らぎは大きく、結晶構造からズレているのが分かる。トラジェクトリをアニメーションにして観察すると300nsの間、トラジェクトリ毎に基質のダイナミクスが異なり、少し回転するものや位置が0.1nmほど移動したりしながら揺らいでいる様子がみられた。そこで基質と周りのアミノ酸との相互作用は結晶の場合と比べてどのような違いがあるかを調べるために、基質とその周りのアミノ酸との相互作用を調べ

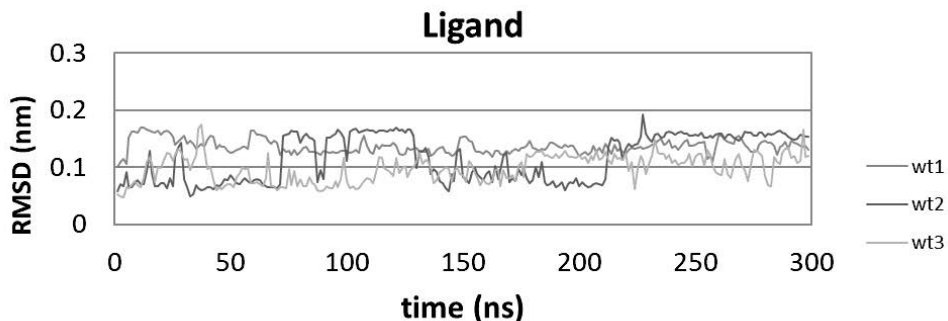


図2 基質(doxorubicin)のRMSD。3本のトラジェクトリに対して示している。

た。図3は基質と、基質の周り0.8 nm内に存在するアミノ酸それぞれに対する相互作用エネルギー

ギーである。結晶構造と比べて 89 番目のグルタミンは大きく減少し、逆に 178 番目のフェニルアラニン (Phe178) では増加しているのが分かる。また MD シミュレーションの結果では見られなかったが、結晶構造では僅かではあるが 46 番目のセリンは正の相互作用になっている。本研究で用いた基質は疎水性の低分子である doxorubicin である。AcrB の基質結合サイトには疎水性アミノ酸であるフェニルアラニンが複数存在し、結合様式を変えることで様々な基質を認識していることが X 線結晶構造解析により報告されている<sup>4</sup>が、MD の結果で得られた相互作用の大きいアミノ酸もフェニルアラニンを含んでいることが分かる (Phe178 と Phe615)。その他にも 5kJ/mol 以下の小さな相互作用を入れると合計 5 つのフェニルアラニンと相互作用していることがわかった。この解析では、10kJ/mol 以上の相互作用として新たに 628 番目のフェニルアラニンや 620 番目のアルギニンとの相互作用も見出した。これらのアミノ酸が基質の移動に影響

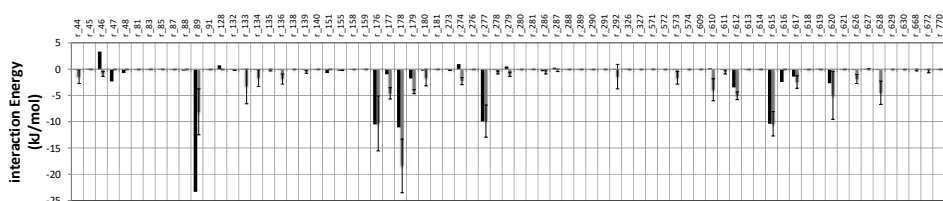


図3 基質 (doxorubicin) とその周り 0.8 nm 以内に存在するアミノ酸との相互作用エネルギー (kJ/mol)。黒色は結晶構造、オレンジ色は MD シミュレーションの結果を示す。平均値は 3 本のトラジェクトリで 250ns-300ns の範囲から計算した。誤差棒は標準誤差を示す。

響を与えていることが示唆される。図3における誤差棒が比較的大きいことは図2に示した基質の揺らぎが関係していると考えられる。

図4は基質の周りの水分子とアミノ酸の数の時間変化である。これを見ると基質周りの水の

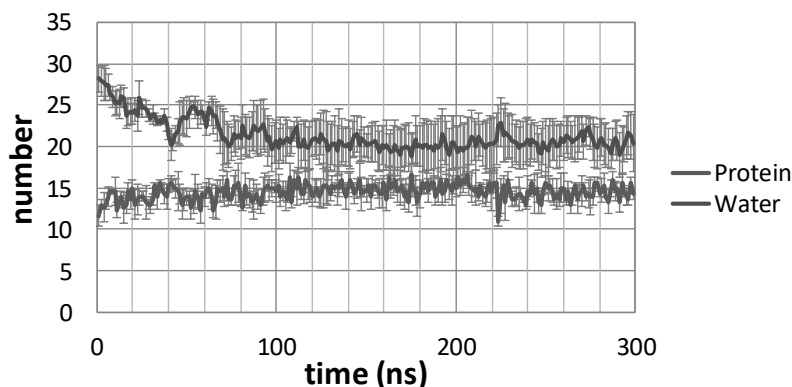


図4 基質の周りの水分子とアミノ酸の数の時間変化。

数は 100ns あたりから 20 分子ほどで落ち着いていることから、基質は疎水性分子であるが、そ

の周りには水分子が 20 分子ほど存在していることが分かった。これに対し、アミノ酸の数は 300 ns 全体ではほぼ一定で 15 個前後のアミノ酸とリガンドが相互作用していることが分かった。これは図 3 の  $-2\text{kJ/mol}$  以下で相互作用しているアミノ酸の数に相当する。

AcrB トランスポーターはホモ三量体で、各プロトマーはそれぞれ図 5 に示したようにサブドメインを持ち、DN ドメインの長いヘアピンループが隣のプロトマーに突き刺さるような構造になっている。次にこれらのサブドメインの RMSD (Root mean square deviation) を調べた。図 6 を見ると、基質が結合している系と基質無しの系のどちらにおいても、取り込み型プロトマーでは各ドメインの RMSD 差はそれほど無いが、プロトマー C (排出型) では DC ドメインが顕著に大きいことが分かる。またプロトマー B (結合型) の PC2 ドメインも DC 程ではないが大きくなっている。これは、結晶構造から DC ドメインや PC2 ドメインが大きくズレたことを示している。プロトマー C (排出型) の DC ドメインとプロトマー B (結合型) の PC2 ドメインの RMSD は、基質が結合している系と基質無しの系の合計 6 本のトラジェクトリ全てにおいて大きくなっていた。一方、以前行った排出型プロトマーの Asp408 をプロトン化しない系では、基質が結合している系と基質無しの系のどちらにおいてもこのような傾向は見られなかった。そこで、Asp408 がプロトン化された系と脱プロトン化された系で、Asp408 の周りの 407 番目のアスパラギン酸、940 番目のリシン (Lys940)、978 番目のスレオニン (Thu978) がコンフォメーションを変化させるかどうかを調べた。ここでは 3 つのプロトマーに対して Asp408 と Lys940 の間の最小距離を示したものを示す (図 7)。排出型のプロトマーは他の 2 つのプロトマーと比べて Lys940 が Asp408 ではなく反対側に位置する Thu978 と強く相互作用しているため、アスパラギン酸-リシン間の距離が長くなっている。まず大きな違いは、結合型プロトマーにおける Asp408 と Lys940 との距離である。プロトン化した Asp408 の系では 30ns 付近から大きく揺れ出し、排出型プロトマーにおける Asp408-Lys940 距離に迫るほど大きくなっている。この振る舞いは 3 つのトラジェクトリのうち 1 つに見られたが、Asp408 を脱プロトン化した系では 3 つのトラジェクトリ全てにおいて見られず 300ns の間安定にその距離を保っていた。排出型プロトマーの Asp408-Lys940 距離を見ると、プロトン化した Asp408 の系では初めの 10ns で約 0.2nm 短くなり 300ns では 0.5nm 付近になっている。脱プロトン化した Asp408 でもやはり Asp408-Lys940 距離は減少し、初めの 100ns ではかなり揺らいでいるのが分かる。このようにプロトン化した Asp408 の系では Asp408-Lys940 距離は、結合型プロトマーでは大きく揺らぎ、排出型プロトマーでは少し減少、そして取り込み型プロトマーでは変化しないことが分かった。脱プロトン化した Asp408 の系では、Asp408-Lys940 距離は、排出型プロトマーでは減少したが結合型プロトマーや取り込み型プロトマーでは一定に保たれていた。これらの変化は、「取り込み」型→「結合」型、「結合」型→「排出」型、「排出」型→「取り込み」型の構造変化に矛盾しない。先行研究で、Yamane らは、PCA 解析によって Asp408 のプロトン化状態を変化させることで誘起されるポータードメインの運動モードを示した<sup>6</sup>が、本研究はそれをサポートする結果になっている。

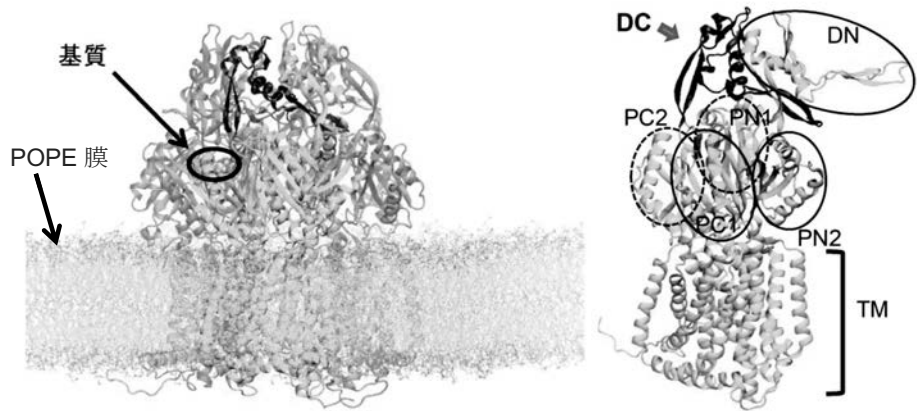


図5 AcrB トランスポーター三量体 (左) プロトマーの構造 (右)

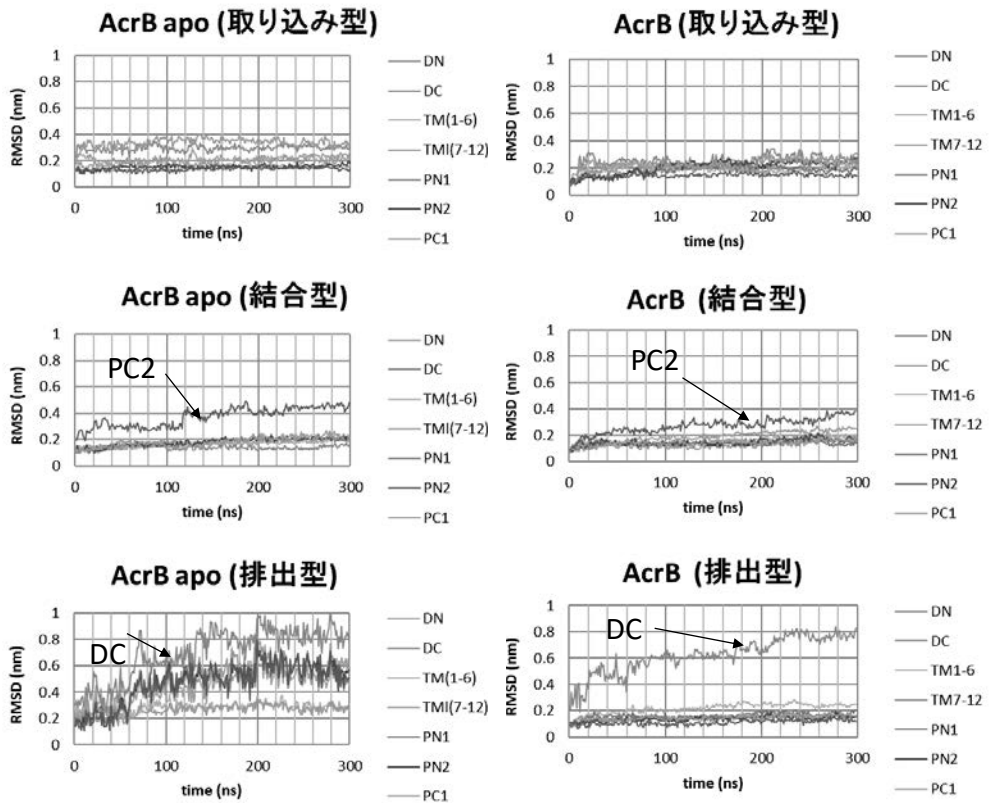


図6 AcrB の各ドメインの RMSD。左：基質を含まない AcrB。右：基質が含まれる AcrB。それぞれ 3 つのプロトマーについて示す。基質は結合型プロトマーの PC 1, PN 1, PN 2 の間に結合している。

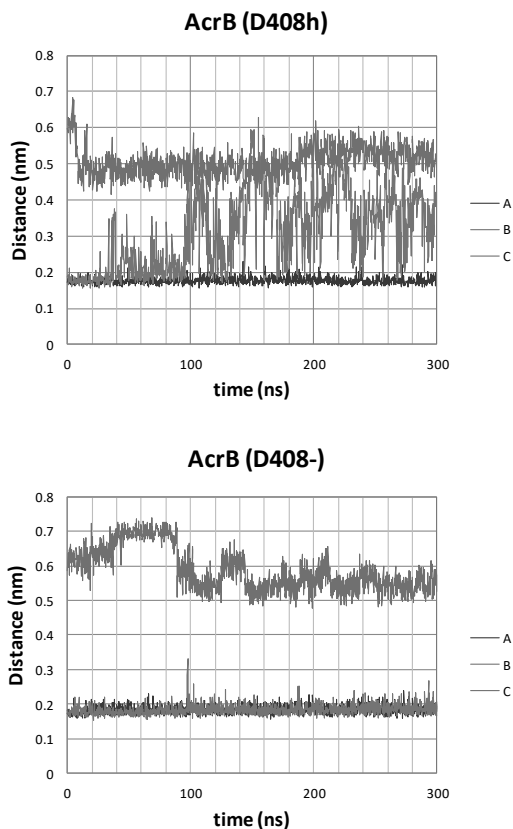


図7 Asp408 と Lys940 の間の minimum distance。取り込み型 (A : 赤) 結合型 (B : 青) 排出型 (C : 緑) の各プロトマーを示す。上は排出型モノマーの Asp408 がプロトン化した系，下は Asp408 がプロトン化していない系。それぞれ，3つのシミュレーションのうちの一つを示している。

### まとめと展望

本研究では多剤排出トランスポーター複合体のポンプ部分の役割を担う AcrB のダイナミクスを中心に解析し，膜貫通領域に位置する Asp408 のプロトン化がそこから離れた領域のダイナミクスに影響を与えることを観察した。これらの AcrB 単体での結果であり，複合体を形成した時に生じるタンパク質間相互作用は考慮されていない。例えば TolC と AcrB をつなぐ AcrA タンパク質は TolC ドッキングドメインと AcrB のポータードメインの PC1 と PC2 に覆いかぶさるように位置しているため，本研究で観察された DC，PC2 ドメインのダイナミクスは何らかの影響を受けると予測される。AcrA によって本研究で観測された PC2 の揺らぎが抑えられるなら，その相互作用はポータードメインの構造を変化させる影響を与えるかもしれない。その影響が基質の排出機構にどのように関わっているか，現在トランスポーター複合体での MD シミュレーションを行っているところである。

## 謝辞

本研究は平成 29 年度東京大学情報基盤センター若手・女性利用者推薦（後期）及び学際大規模情報基盤共同利用・共同研究拠点（JHPCN）萌芽型共同研究採択課題「分子動力学シミュレーションによる多剤排出トランスポーターAcrB と基質間の反応機構の解明」によって行われたものです。東京大学情報基盤センターによる支援に感謝申し上げます。また計算の一部は自然科学研究機構 岡崎共同利用施設計算科学研究センターを利用させていただきました。合わせて感謝申し上げます。

## 引用文献

- [1] Murakami, S. et al. (2002) *Nature* **419**, 587-593.; Murakami, S. et al. (2006) *Nature* **443**, 173-179.
- [2] Wang et al., (2017) *eLIFE* **6**, e24905.
- [3] Yao, X. Q. et al. (2010) *Nat. Commun.* **1**, 117.; Yao, X. Q. et al. (2013) *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7474-7485.; Matunaga, Y. et al., (2018) *eLIFE* **7**, e31715.; Fischer, N. et al., *Proteins* **79** 2871-2885.; Vargiu, A. V. et al. (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10704-10707.
- [4] Eicher, T. et al., (2012) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* **109**, 5687-5692.
- [5] Eicher, T. et al., (2014) *eLIFE* **3**, e03145.
- [6] Yamane, T. et al. (2013) *Biochemistry* **52**, 7648-7658.