

PRESS RELEASE

2018年3月12日  
理化学研究所  
横浜市立大学  
東京工業大学

## 多剤排出トランスポーターの薬剤排出機構を解明 ースーパーコンピュータ「京」で巨大分子機械の動きを計算ー

### 要旨

理化学研究所（理研）計算科学研究機構粒子系生物物理研究チームの松永康佑研究員（JST さきがけ研究員）、横浜市立大学大学院の山根努特任助教、池口満徳教授、木寺詔紀教授、東京工業大学の村上聡教授らの共同研究グループ<sup>※</sup>は、社会問題となっている多剤耐性細菌の原因の一つとされる多剤排出トランスポーター<sup>[1]</sup>「AcrB」の薬剤排出機構を、スーパーコンピュータ「京」<sup>[2]</sup>を用いたシミュレーションによって解明しました。

病原菌やがん細胞に対して薬が作用しなくなる「薬剤耐性化」は、現代の医療現場で大きな問題となっています。特に、院内感染を起こす緑膿菌などの薬剤耐性化は、細菌の膜に存在する多剤排出トランスポーターと呼ばれるタンパク質が薬剤を細胞外へ排出することが主な原因と考えられています。そのため、多剤排出トランスポーターの薬剤排出機構の解明が課題となっています。大腸菌由来の多剤排出トランスポーターである AcrB は、村上教授らが 2002 年および 2006 年に X 線結晶構造解析<sup>[3]</sup>によって構造を解明し、それに基づいた作動原理として「機能的回転機構<sup>[4]</sup>」仮説を提唱しました<sup>注1)</sup>。2010 年には、この仮説は京都大学の高田彰二教授らによる粗視化シミュレーション技法<sup>[5]</sup>などによって実証されました<sup>注2)</sup>。しかし、膜を介したプロトン（水素イオン）移動によってどのように AcrB の構造変化が起き、機能的回転が起るのか、その動的な機構は分かっていませんでした。

今回、共同研究グループは、AcrB とその周りの膜や水分子を「丸ごと」模した全原子モデルを計算機上で再現し、「京」の高並列性を生かすアルゴリズムを用いて薬剤排出過程を計算しました。その結果、AcrB の膜内にあるアスパラギン酸にプロトンが結合すると、薬剤排出へつながる構造変化が引き起こされること、また 50 オングストローム（Å、1 Å は 100 億分の 1 メートル）も離れた薬剤排出部位の構造変化へ至る過程を明らかにしました。

本成果は、排出を阻害する薬剤開発の基礎に貢献するとともに、生体分子で見られる化学エネルギー・力学エネルギー変換機構の一例を提供するものです。

本研究は、英国のオンライン科学雑誌『*eLife*』（3月6日付け）に掲載されました。

本研究の一部は、文部科学省「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発」プロジェクトによる支援を受けました。また、本研究は HPCI「京」

一般利用課題「最小自由エネルギー経路探索法による多剤排出トランスポーターの薬剤排出機構の解明（課題番号：hp120027）」、ポスト「京」重点課題1研究開発枠（課題番号：hp150269, hp160223, hp170255）として「京」の計算資源を用いて実施しました。

注 1) S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto, and A. Yamaguchi, "Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism" *Nature* 443, 173-179 (2006). doi:10.1038/nature05076

注 2) 2010年11月17日プレスリリース「多剤排出トランスポーターの機能を分子シミュレーションで初解明」  
<http://www.riken.jp/pr/press/2010/20101117/>

## ※共同研究グループ

理化学研究所 計算科学研究機構 粒子系生物物理研究チーム  
研究員 松永 康佑 (まつなが やすひろ)  
横浜市立大学大学院 生命医科学研究科  
特任助教 山根 努 (やまね つとむ)  
特任准教授 森次 圭 (もりつぐ けい)  
教授 池口 満徳 (いけぐち みつのり)  
教授 木寺 詔紀 (きでら あきのり)  
東京工業大学 生命理工学院  
教授 村上 聡 (むらかみ さとし)  
東京大学 大学院農学生命科学研究科  
特任准教授 寺田 透 (てらだ とおる)  
日本医科大学 物理学教室  
准教授 藤崎 弘士 (ふじさき ひろし)

## 1. 背景

効くはずの薬が効かなくなるという「薬剤耐性化」の問題は、現代の医療現場で大きな問題となっています。病原菌やがん細胞がこのような薬剤耐性を持つメカニズムはいくつかありますが、細胞膜に埋まっている多剤排出トランスポーターと呼ばれるタンパク質が原因の一つであることが分かっています。このタンパク質は巨大な分子機械で、抗生物質や毒物などの異物を取り込んで細胞外に排出します。これにより、病原菌などに作用するはずの薬剤が効かなくなる現象が起こります。特に、院内感染で社会問題となっている緑膿菌などの薬剤耐性化は、RND型<sup>[6]</sup>と呼ばれる多剤排出トランスポーターが主な要因になっています。

RND型の多剤排出トランスポーターは、細胞膜内外の酸性度(pH)の違いによりプロトン(水素イオン)が移動することを利用して薬剤を排出します。大腸菌由来のRND型多剤排出トランスポーター「AcrB」の構造は、2002年および2006年に村上教授らがX線結晶構造解析によって解明しました。AcrBは約1,000個のアミノ酸からなる巨大な分子が三つ集合した3量体で、三つの分子はそれぞれ異なる構造をとり、取込状態→結合状態→排出状態と順に構造変化して薬剤を排出していると考え、「機能的回転機構」仮説を提唱しました。

AcrB の構造で興味深いことは、薬剤排出に関わっている部位が、細胞膜内のプロトン結合部位と約 50 オングストローム( $\text{\AA}$ 、 $1 \text{\AA}$  は 100 億分の 1 メートル)も離れている点です。プロトン移動という非常に小さな動きが、どのように増幅されて機能的回転につながる大きな構造変化と関わっているのか、機能的回転やプロトンを実験で観測することは難しく、その詳細は未解明でした (図 1)。

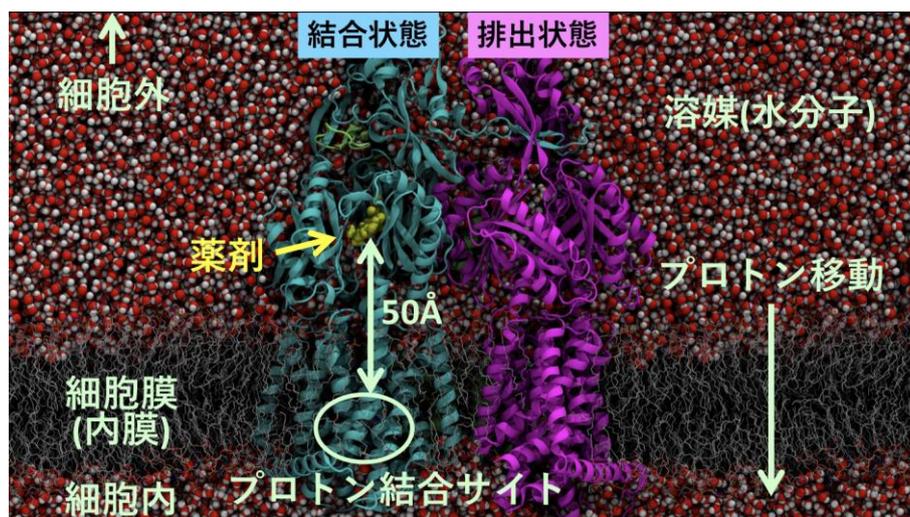


図 1 多剤排出トランスポーターAcrB の構造

多剤排出トランスポーターAcrB の構造を横から見た図。上が細胞外、下が細胞内に対応する。結合状態にある分子に薬剤が結合している。プロトン結合サイトは膜内に存在する。

2010 年に京都大学の高田彰二教授らは、AcrB を構成する原子を粗視化したモデルのシミュレーションを行って、機能的回転機構仮説を実証しました。その粗視化モデルでは、プロトン移動による駆動力を抽象的に扱い、機能的回転が起こると薬剤を排出することを示しました。さらに 2013 年には、山根特任助教と池口教授らが、AcrB の全原子モデルのシミュレーションを行い、プロトン移動の際に膜内のどこの部位にプロトンが一時的に結合するのかを解明しました。プロトンをいくつかのアミノ酸に結合させ、シミュレーションを多数行うことで、排出型分子の膜内のアスパラギン酸 (Asp408) というアミノ酸にプロトンが結合していると安定であることを示しました<sup>注 3)</sup>。

しかし、Asp408 にプロトンが一時的に結合・解離することが、どのように機能的回転へとつながる構造変化を引き起こすのかは解明されていません。プロトンと他の原子の相互作用を観察するには、全原子モデルを使う必要がありますが、機能的回転はおおよそミリ秒 (1,000 分の 1 秒) で起こる非常に遅いプロセスのため、全原子モデルでシミュレーションすることは困難でした。そこで、共同研究グループはスーパーコンピュータ「京」とその高並列性を生かすアルゴリズムを用いて、解明に取り組みました。

注 3) T. Yamane, S. Murakami, and M. Ikeguchi, "Functional rotation induced by alternating protonation states in the multidrug

## 2. 研究手法と成果

共同研究グループは、AcrB 3 量体の全原子モデル（周りの水分子や脂質、薬剤を全て含めて約 50 万原子系）について、「京」を用いて機能的回転へとつながる構造変化を分子動力学法<sup>[7]</sup>でシミュレーションしました。分子動力学法では、1 フェムト秒（1,000 兆分の 1 秒）の 1 ステップごとに各原子に働く力を計算する必要があります。機能的回転は約 1 ミリ秒（1,000 分の 1 秒）で起こるので、シミュレーションするには 1 兆回もの計算が必要となります。これを達成するには、例え 1 ステップを実時間で 1 ミリ秒で計算したとしても、数十年かかってしまいます。

そこで、計算を時間方向に分割するストリング法<sup>[8]</sup>というアルゴリズムを組み合わせました。ストリング法では、一つの系をシミュレーションする代わりに、構造変化の経路を表した複数の系の分子動力学計算をまとめて行い、最も起こりやすい構造変化経路を探します。複数の系をまとめてシミュレーションするため、「京」の高並列環境があつて初めて可能となった計算です（図 2）。

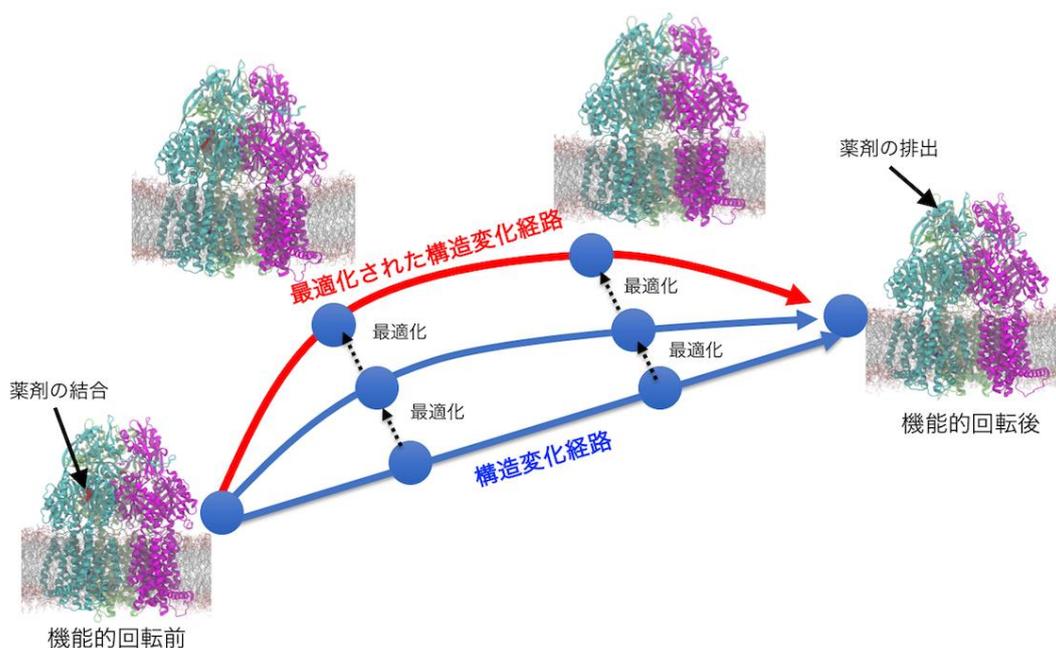


図 2 ストリング法の概念図

最初に始状態と終状態を設定し、機能的回転へとつながる構造変化経路を複数のシミュレーション系（青の丸）で表現する。それらを連携させながらまとめてシミュレーションを行うことで、赤の線のように構造変化経路を最適化する。

ストリング法を使ったシミュレーションの結果、AcrB 3 量体の内で結合状態にある分子の Asp408 にプロトンが結合すると、機能的回転へとつながる構造変化が引き起こされることが分かりました。実際、構造変化経路に沿ったエネルギー

ギー変化を計算すると、結合状態が不安定化する一方で、排出状態が安定化することが示されました。対照実験として、排出状態にある分子の Asp408 にプロトンを結合させて計算すると、排出状態が安定化したままで機能的回転は誘起されませんでした。

また、得られた構造変化経路を解析することで、離れた部位が連携して動いていることが明らかになりました。まず、膜に埋まっている Asp408 の周りで何が起きているのかを構造解析したところ、プロトン結合により膜に埋まっている部位で特定の  $\alpha$ ヘリックス<sup>[9]</sup>が下がる運動が生じていることが分かりました。興味深いことに、この下がる運動はプロトン供給源である水分子の出入りを制御しており、結合状態においてプロトンの取り込み、排出状態においてプロトンの放出を起こしやすくしていました。これは結合状態においてプロトンが結合し機能的回転を起こすという結果とつじつまが合います。

さらに、膜に埋まっている部位と薬剤排出部位の動きの網羅的な相関解析を行ったところ、プロトン結合から薬剤排出へと至る相互作用の連鎖が明らかになりました。具体的には、 $\alpha$ ヘリックスが下がる運動が、膜に埋まっている部位と薬剤排出部位をつなぐ部位のコイル・ヘリックス転移<sup>[10]</sup>を制御しており、その転移が薬剤排出部位の大規模な構造変化を引き起こしていました (図 3)。

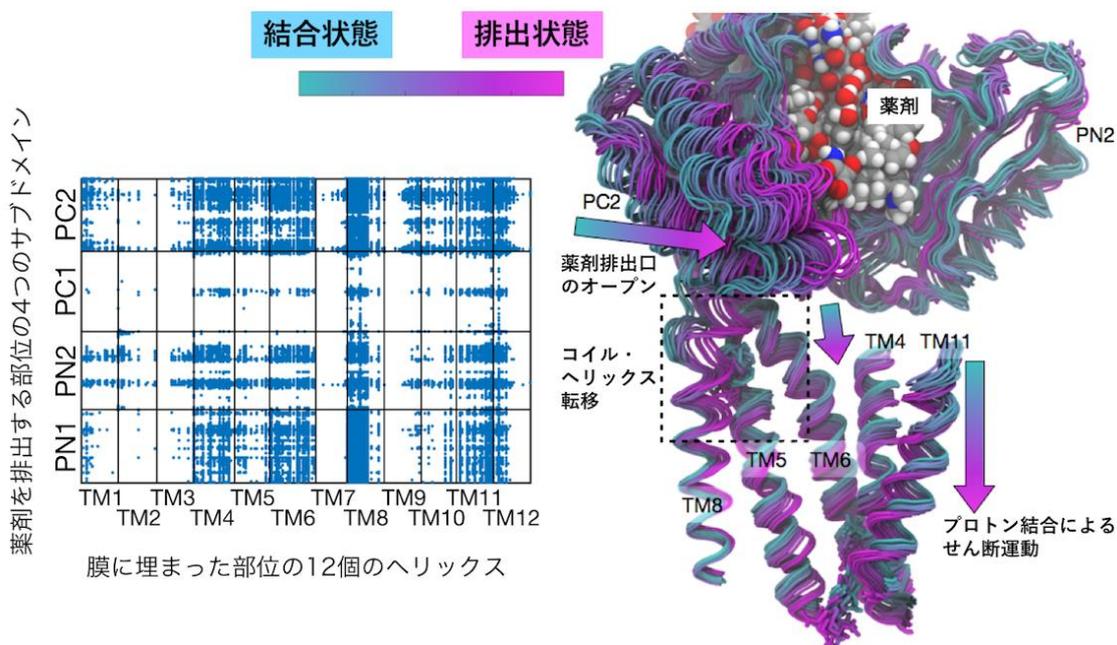


図 3 膜に埋まった部位と薬剤排出部位の動きの網羅的な相関解析の結果

- (左) 相関のあるアミノ酸残基のペアをプロットしたもの。特定の  $\alpha$ ヘリックスとサブドメイン間に相関があることを示す。
- (右) 相関のある部位の動いている構造を重ねて描いたもの。図の右側から、プロトン結合による並進運動 ( $\alpha$ ヘリックスが下がる運動) →ヘリックス・コイル転移→ドメイン運動による薬剤排出口のオープンを示す。

### 3. 今後の期待

本成果は、多くの生体分子にみられるプロトン結合による化学エネルギーと薬剤輸送という力学的エネルギーの間の変換という基礎的問題に対して、一つの機構を提供します。それと同時に、多剤排出トランスポーターによって排出されない薬剤や、排出を阻害する薬剤の開発に資すると期待できます。

また、「京」などのスーパーコンピュータを用いた高性能計算により、実験では観察することが難しい分子機械の動く様子を明らかにできることを示しています。今後、ポスト「京」<sup>[1]</sup>により網羅的な計算が可能になると、さまざまな薬剤の排出過程を観測して、排出される薬剤とされない薬剤の違いを解明したり、AcrB と結合する AcrZ などの他のタンパク質の影響を明らかにできると期待されます。

### 4. 論文情報

<タイトル>

Energetics and conformational pathways of functional rotation in the multidrug transporter AcrB

<著者名>

Yasuhiro Matsunaga, Tsutomu Yamane, Tohru Terada, Kei Moritsugu, Hiroshi Fujisaki, Satoshi Murakami, Mitsunori Ikeguchi, and Akinori Kidera

<雑誌>

*eLife*

<DOI>

10.7554/eLife.31715

### 5. 補足説明

#### [1] 多剤排出トランスポーター

細胞膜を介して分子を輸送する膜タンパク質を総称してトランスポーターと呼ぶが、抗生物質などいくつかの薬剤を排出するトランスポーターを特に多剤排出トランスポーターという。

#### [2] スーパーコンピュータ「京」

文部科学省が推進する「革新的ハイパフォーマンス・コンピューティング・インフラ（HPCI）の構築」プログラムの中核システムとして、理研と富士通が共同で開発を行い、2012年9月に共用を開始した計算速度10ペタFLOPS級のスーパーコンピュータ。

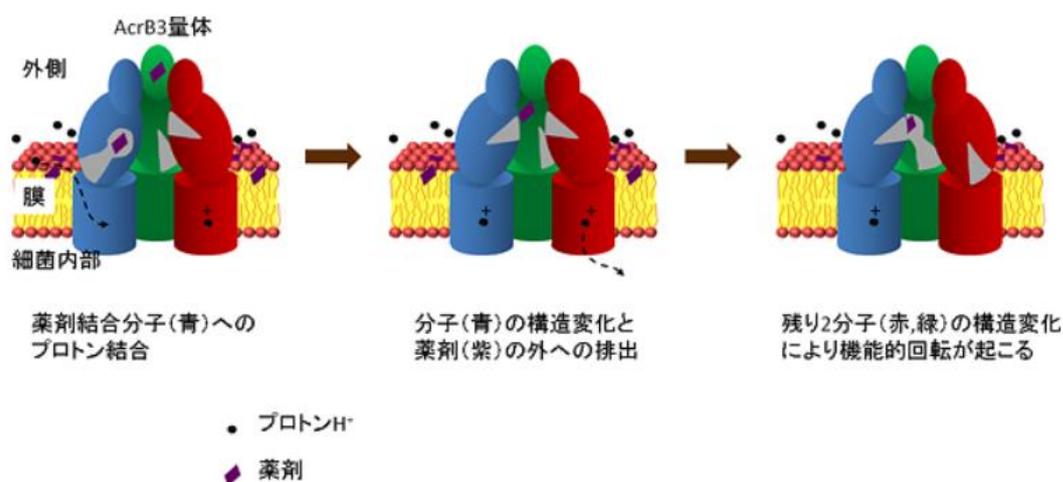
#### [3] X線結晶構造解析

タンパク質の結晶を作製し、その結晶にX線を照射して得られる回折データを解析することにより、タンパク質の内部の原子の立体的な配置を調べる方法。この方法によ

って、タンパク質の立体構造や内部構造を知ることができる。

#### [4] 機能的回転機構

X線結晶構造解析で得た AcrB3 量体の非対称構造をもとに、2006 年に村上教授らが提案した AcrB の作動原理を説明するモデル。非対称構造では 3 量体の各分子は三つの異なる状態をとる。一つ目の分子は薬剤待ちの「取込状態」、二つ目の分子は薬剤に結合する「結合状態」、三つ目の分子は薬剤排出する「排出状態」と呼ばれる。薬剤 1 分子を排出すると 3 量体の構造状態がちょうど 1 段階ずつ変化し、一つ目の分子が結合型、二つ目の分子が排出型、三つ目の分子が取込型になると考えた。図に示したように、細胞外側からみると、3 量体の構造状態が 120 度回転していることに対応するので、機能的回転機構と呼ばれる。この変化によって薬剤 1 分子が外側に運ばれる。同じ分子でできた 3 量体が非対称な構造状態をとる様子は、ATP 合成酵素の  $F_1$ -ATPase と類似していることから、 $F_1$ -ATPase の作動原理との類推によって考案された。



プロトン結合に起因した AcrB の薬剤排出と機能的回転

#### [5] 粗視化シミュレーション技法

広義には「もとの問題の重要な側面だけを残してより簡単な表現にする」ことを粗視化というが、ここでは原子レベルによるタンパク質表現から、アミノ酸 1 個を 1 粒子として近似する粗視化による分子動力学シミュレーションの技法を表す。

#### [6] RND 型

RND スーパーファミリーは、大腸菌、緑膿菌などのグラム陰性菌にみられるトランスポーター群であり、主に、pH の差に起因するプロトン輸送を駆動力としてリガンドを輸送する機能を持つ。RND は Resistance-nodulation-cell division の略。

#### [7] 分子動力学法

計算機の中でモデルの原子間に働く力を計算し、ニュートンの運動方程式を繰り返し解くことで、分子の動きを追跡する方法。

#### [8] スtring法

ニュートンの運動方程式を解く代わりに、最初に始状態と終状態を設定し、その間をつなぐ構造変化経路が物理的にもっともらしくなるように最適化する手法。始状態と終状態の間には、複数の少しずつ構造の異なるシミュレーション系を配置して、構造変化経路を表現する。それらを連携させながらまとめてシミュレーションを行うことで、構造変化経路を最適化する。

[9]  $\alpha$ ヘリックス

タンパク質の二次構造の共通モチーフの一つで、バネのような右巻きらせんの形をしている。

[10] コイル・ヘリックス転移

タンパク質やポリペプチド鎖の一部または全部が、特定の構造をとらないランダムコイル構造から $\alpha$ ヘリックスへと構造転移する現象。

[11] ポスト「京」

「京」の後継機として、2021年から2022年の運用開始を目標に、理化学研究所が主体となって開発を進めている次世代フラッグシップスーパーコンピュータ。

## 6. 発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせ下さい  
理化学研究所 計算科学研究機構 粒子系生物物理研究チーム  
研究員 松永 康佑 (まつなが やすひろ)  
TEL : 078-304-5323 FAX : 078-569-8820  
E-mail : ymatsunaga@riken.jp

横浜市立大学大学院 生命医科学研究科  
特任助教 山根 努 (やまね つとむ)  
教授 池口 満徳 (いけぐち みつのり)  
教授 木寺 詔紀 (きでら あきのり)  
TEL : 045-508-7232 FAX : 045-508-7367  
E-mail : ike@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

東京工業大学 生命理工学院  
教授 村上 聡 (むらかみ さとし)  
TEL : 045-924-5748 FAX : 045-924-5709  
E-mail : murakami@bio.titech.ac.jp

<機関窓口>  
理化学研究所 広報室 報道担当  
TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715  
E-mail : ex-press@riken.jp

横浜市立大学 研究企画・産学連携推進課長 渡邊 誠



Tokyo Tech

参考資料配布

---

TEL : 045-787-2510 FAX : 045-787-2509

E-mail : kenki@yokohama-cu.ac.jp

東京工業大学 広報・社会連携本部 広報・地域連携部門

TEL : 03-5734-2975 FAX : 03-5734-3661

E-mail : media@jim.titech.ac.jp

---