

2P101

EcCIC 対向輸送体におけるプロトン移動経路に関する密度汎関数計算

(三重大院工) ○三谷 昌輝・吉岡 泰規

Density Functional Study on Proton Transfer Pathway of the EcCIC Antiporter

(Mie Univ.) ○Masaki Mitani, Yasunori Yoshioka

【序】膜貫通タンパク質である CIC 対向輸送体は、塩化物イオンとプロトンを細胞の内と外へ逆方向に 2 : 1 で交換する。大腸菌由来の EcCIC 対向輸送体では、外側と内側の 2 つのグルタミン酸残基 (E148 と E203) がプロトン輸送に関与していると考えられている (図 1)。

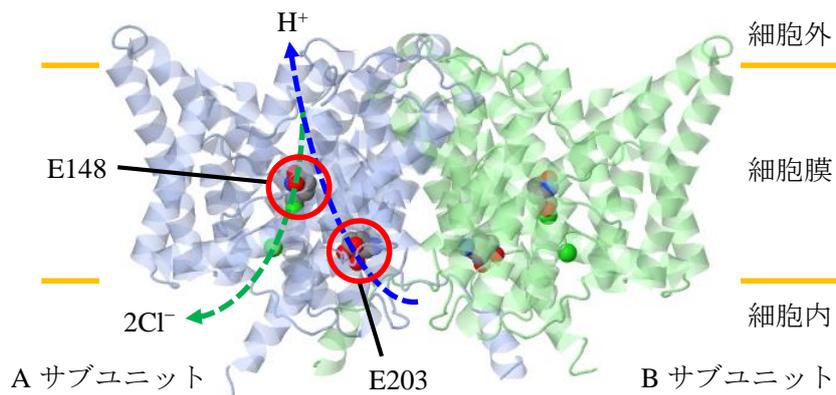


図 1. EcCIC 対向輸送体の X 線構造 (PDB ID: 1OTS)

X 線構造解析から、塩化物イオン結合サイトは S_{ext} , S_{cen} , S_{int} の 3 箇所があり、その占有状態と対応してグルタミン酸残基の側鎖が回転し、out, ext, cen の配向をとることが確認されている (図 2)。

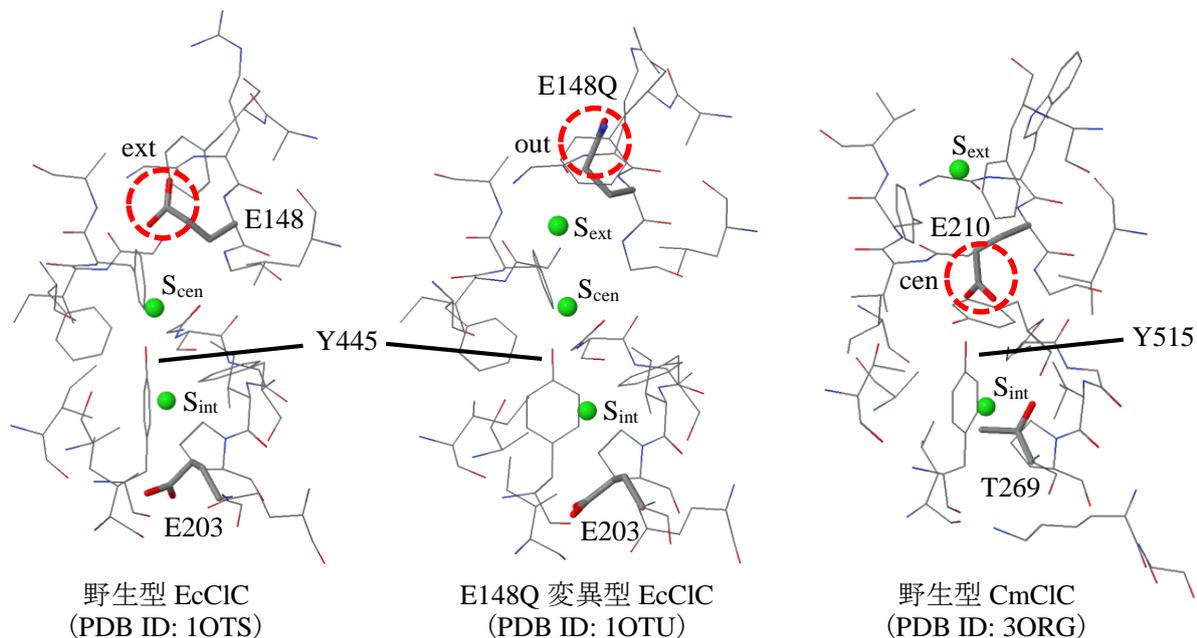


図 2. CIC 対向輸送体の塩化物イオン結合サイトの X 線構造

EcCIC 対向輸送体では、プロトンは細胞内→E203→E148→細胞外と輸送されるが、イオン輸送機構の詳細は未だに不明である。これまでに、E203→E148 のプロトン移動に対して、E148 が cen 配向でプロトン移動するモデル [1] と ext 配向でプロトン移動するモデル [2] が提案されている。

本研究では、提案された2つのモデルに対して、プロトン移動の前後の構造を密度汎関数計算により決定し、相対安定性の観点からモデルの妥当性を検討する。

【計算】1OTSのX線構造からE148→E203経路の周辺のアミノ酸残基(Aサブユニット:G106, S107, G108, I109, P110, E113, G146, R147, E148, G149, L186, A189, F190, F199, E203, F348, G355, I356, F357, A358, I402, A404, Y445, I448; Bサブユニット:R28)を取り出し、ペプチド結合を水素原子で終端してモデル分子とした。E113とE203の側鎖は水素結合する距離に位置しているため、E113の側鎖はプロトン化した。また、 S_{ext} と S_{int} を占有する塩化物イオンの周囲に水分子を追加した。

提案された2つの輸送サイクル[1,2]をモデル1及び2とする。モデル1では、塩化物イオンが S_{ext} と S_{int} を占有しE148がcen配向の状態、E203からE148へプロトン移動するが、移動過程の詳細については何も述べられていない。モデル2では、まず、塩化物イオンが S_{cen} と S_{int} を占有しE148がout配向の状態、E203からのプロトン移動によりY445に水素結合したオキシニウムイオンが形成される。次に、E148がext配向の状態へ変化して、 $H_3O^+ \rightarrow Y445 \rightarrow Cl^- (S_{cen})$ のプロトン移動により塩化水素が生成し、その後、塩化水素からE148へプロトン移動する。

プロトン輸送におけるY445の役割は明らかになっておらず、プロトン移動に関与するという考え方と関与しないという考え方がある。そこで、モデル1に対しては、プロトンがY445を経由する間接移動と経路しない直接移動を検討した。モデル2において、E203からのプロトン移動は水分子を介して起こると考えられており、モデル1及び2のプロトン移動経路として4個の水分子を追加した(図3)。

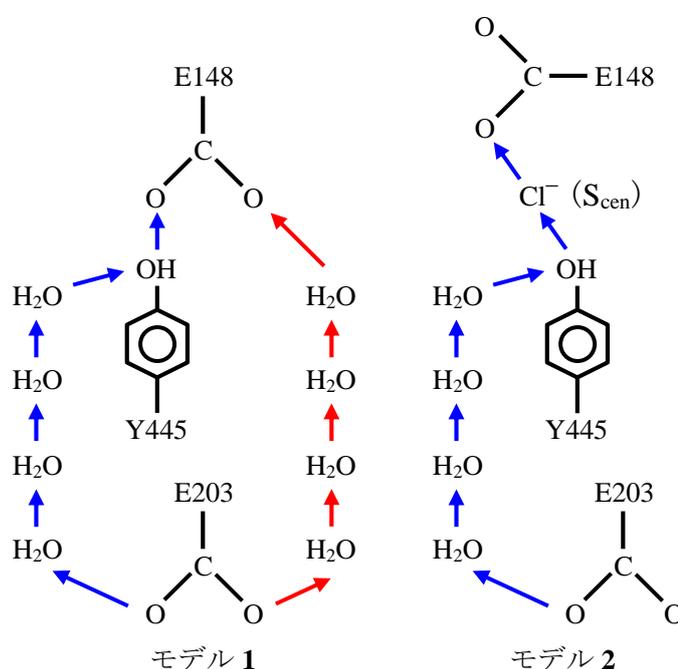


図3. EcClC 対向輸送体のプロトン移動モデル

本研究では、モデル1のE203がプロトン化した構造(プロトン移動前)とE148がプロトン化した構造(プロトン移動後)、及び、モデル2のY445にオキシニウムイオンが結合した構造(プロトン移動前)と塩化水素が生成した構造(プロトン移動後)の最適化を実行している。密度汎関数計算にはB3LYP汎関数を用い、基底関数には6-31+G*(Cl)と6-31G*(C, O, N, H)を適用した。構造最適化の際に、ペプチド結合を終端する水素原子の位置を固定するとともに、ペプチド主鎖の原子(N, C_{α} , C)も1OTSのX線構造の位置に固定した。

【結果】構造最適化の途中段階であるが、4個の水分子により、E203とY445及びE203とE148を水素結合で連結した構造が可能である。各モデルとも、プロトン移動により安定化する。相対安定性はモデル1(直接移動) < モデル1(間接移動) < モデル2であり、E148がcen配向の状態プロトンが移動することが示唆される。結果の詳細は、発表当日に報告する。

[1] L. Feng, E. B. Campbell, Y. Hsiung, R. MacKinnon, *Science*, **330**, 635-641 (2010).

[2] G. Kieseritzky, E. W. Knapp, *J. Biol. Chem.*, **286**, 2976-2986 (2011).