

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22370057  
 研究課題名（和文）生体分子モーターのシミュレーション研究：運動から化学反応制御への構造機能解析  
 研究課題名（英文）Simulation study of biomolecular motors: Structural analysis of regulation mechanisms of chemical reaction by motor movements  
 研究代表者  
 高田 彰二（TAKADA SHOJI）  
 京都大学・大学院理学研究科・教授  
 研究者番号：60304086

## 研究成果の概要（和文）：

生体分子モーターの作動原理として、運動が酵素構造変化および化学反応を制御する、という“制御”機構が重要である。本研究では生体分子モーターの一つ、双頭キネシンを主な対象として、二つのキネシンヘッドの運動がどのように制御され協調しているか、それを行う分子構造基盤は何か、を理論的に研究した。各ヘッドの構造変化に伴い変化する双頭間の張力が、ヘッド間の協調の基盤であり、それによって一方向的運動、化学反応とタイトに共役したモーター運動が実現できることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

As a working principle of biomolecular motors, it is important to understand the regulation of chemical reactions by motor movements and conformational changes in enzymes. Here, we studied theoretically how a double-headed kinesin, one of the best characterized molecular motors, can regulate motions of two heads and addressed what is the structural basis for this cooperation. We found that the nucleotide-dependent tensions between the two heads are the fundamentals, and by that, unidirectional and chemically tight coupling between two heads are realized.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2011年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

## 研究分野：生物学

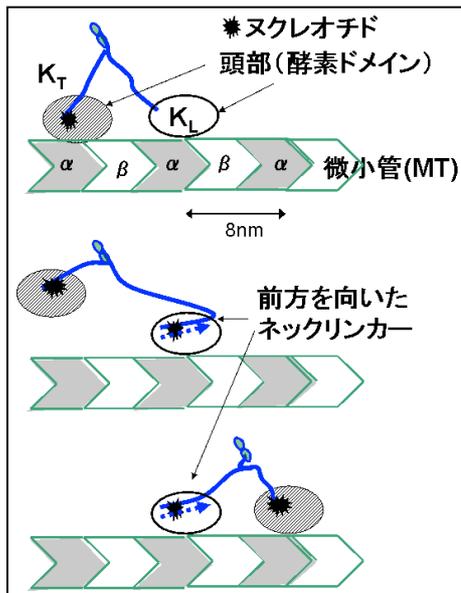
科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：キネシン・ATP加水分解・分子動力学・粗視化モデル

## 1. 研究開始当初の背景

生体分子モーターは、化学反応によって生じるエネルギーを利用して働く分子機械である。例えば ATP 分解酵素モーターの場合、教科書的描像では、酵素における化学反応がその酵素の構造を変化させ、その構

造変化が酵素の運動を惹き起こす（つまり「反応→構造変化→運動」）。私達はこれまでに、この描像に基づいて、構造生物学的知見を基にした独自の粗視化分子シミュレーションによって、回転モーター F<sub>1</sub>-ATPase(Koga & Takada PNAS06)、基



質引き込みモーターAAA+(Koga, Kameda, Okazaki, & Takada PNAS09)などについてその運動再現と理論予測などを行ってきた。しかし、この「反応→構造変化→運動」という描像は分子モーター作動原理の半面でしかない。分子モーターが、他からの指示なしに、自律的に運動を続けるためには、化学反応を正しい順番で進めることが必須である。化学反応それ自身には順番を正確に刻む仕組みはないので、順番を指示するためには、運動が酵素の構造変化を誘起し、それがさらに化学反応を制御するという、**運動→構造変化→反応**、という仕組みが必要である(以降、これを“**制御**”と呼ぶ)。特に、代表的生体分子モーターの一つ、キネシンでは、最近この制御の重要性がクローズアップされつつある。

キネシンは、ATP加水分解エネルギーを利用して微小管上を歩くりニア分子モーターであり(右図)、国内外においてその機構が詳しく調べられてきた(代表的研究者としてVale, Block, 廣川, 石渡, 柳田, 樋口, 吉川, 富重, 広瀬など)。通常型キネシンはY字型をしており、Y字の腕の先に二つの頭部をもつ(右図)。各頭部が、ATP加水分解酵素ドメインであり、また微小管との結合ドメインでもある。キネシンが微小管上を進むとき、双頭が互いに8nm離れた状態で微小管と結合している状態から、後ろの頭部が微小管から離れ、軸足となる頭部よりも8nm前方に着地することによって、“歩く”ことが実験的に分かっている(右図)。構造生物学研究から、ネックリンカー(酵素ドメインからY字のつなぎ目にむかう途中の部位)が一つの鍵になるといわれてきた。ATP結合状態ではネックリンカーは酵素ドメインにくっついて進行方向前方を向いた構造をとるのに対して、ADP結合状態ではネックリンカーはdisorder状態となる。そこで、主流モデルでは、後ろの

頭部が浮いたときに軸足の酵素ドメインにATPが結合するとネックリンカーがdisorder状態から前方へ折れるので、これをレバーアームとして、後ろの頭部が前方へ移動する、という考え方がされている。

しかし最近の富重らの実験結果はこのモデルと矛盾している(Mori 2009)。そこで吉川や富重らは、後ろの頭部は微小管から離れた後、ランダムに運動するが、前方の結合サイトに結合するときだけ双頭間の張力依存的にADP解離が起こり強結合状態になることができるというモデルを提案している(例えばKikkawa 2008)。これは、運動がADP解離を制御することで分子モーターの自律的歩行運動が実現することを前面に出した**制御強調モデル**である。

このような背景のもとで本研究の目的は、様々な分子シミュレーションを駆使して、キネシンを中心とした生体分子モーターにおいて、運動から化学反応への制御がどのような仕組みで実現されているのかを、構造に立脚した具体的な機構として解明することである。一分子実験や構造生物学的実験と比べて、分子シミュレーションは詳細な構造ダイナミクスを明らかに出来る可能性を持っている。その利点を生かして、実験研究者と議論を密に取りながら、実験と相補的な情報を得ることを目指す。

## 2. 研究の目的

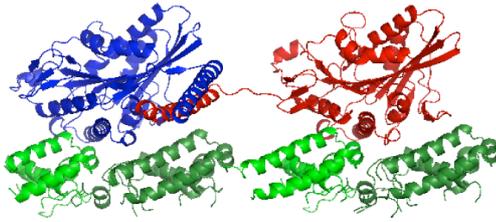
生体分子モーターの作動原理は「化学反応→酵素の構造変化→運動」という関係で説明されることが多いが、分子が“自律的”に動くためには、逆に「運動が酵素構造変化および化学反応を制御する」という“制御”機構も同程度に重要である。とくに近年のキネシン研究のなかでその点がクローズアップされつつある。しかし制御の帰結は化学反応であり、それを実験的に直接“観る”ことは困難である。そこで本研究の目的は、原子レベルおよび粗視化レベルの分子シミュレーションを駆使して、キネシンを中心とした分子モーターにおける、「運動→構造変化→反応」の制御機構を、構造に立脚したメカニズムとして明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

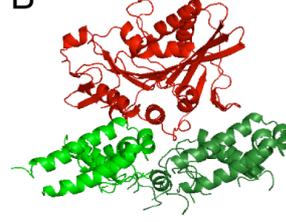
キネシンを中心とした生体分子モーターに、種々の階層のシミュレーション・計算研究を行う。まずキネシン歩行の中間状態にあたる種々の原子レベル構造モデルを構築し、そのヌクレオチド周辺を解析する(以下AからD)。次にそれらの知見を数理モデルに組込む(E)。

A) キネシン頭部と微小管要素分子チューブリン、各々の単体のX線構造と複合体電子顕微鏡像とから、原子レベルの分子動力学(MD)シミュレーションによって複合体の

A



B



原子分解能モデリングを行う。

- B) A をもとにチューブリン結合による酵素ドメインの ADP 結合能の変化を解析する。  
 C) 双頭キネシンで双頭が互いに 8nm 離れた位置でチューブリンと結合する状態の原子レベルの MD シミュレーションを行い、張力依存的な ADP 解離能を解析する。  
 D) 量子化学計算を行い、酵素ドメインの構造変化と ATP 加水分解能の関係を解析する。  
 E) A~D の結果を数理モデルに組み込み、反応⇌構造変化⇌運動を統合的に理解する。

#### 4. 研究成果

- A-C) キネシンのネックリンカー部位を通して働く内部張力が、触媒部位(ヌクレオチド結合部位)に対してアロステリックにどう影響を与えられるか、その可能性について分子動力学シミュレーションによって解析した。  
 まず、新たに得られた結晶構造(apo 状態のキネシン構造 [牧野 等, unpublished])をキネシン-微小管の複合体構造の電子顕微鏡像に剛体フィッティングし、上図の様な A) on-pathway 状態 [前足が apo 状態で後足が ATP 結合状態] のダイマーモデルと B) apo-状態のモノマーモデルを構築した。  
 そしてこの二つのモデルを初期構造とする全原子 MD 計算 (80~100ns 程度)を行い、内部張力が存在する A) ダイマーモデルと内部張力が無い B) モノマーモデルの間でヌクレオチド結合部位の構造(揺らぎ)を比較した。  
 その結果、ヌクレオチド結合部位(apo 状態)の構造は、B) モノマーの方が A) ダイマーよりも開いた構造で保持されている事が判明した:ヌクレオチド結合部位を構成している switch-I ループと p-ループの幾つかの代表的な残基間距離の時系列を調べたところ、サンプルによって多少のばらつきはあるものの、B) モノマーにおける switch-I と p-loop の距離の方が A) ダイマーにおける対応する距離に比べて大きいことが見出された。この定性的傾向は、実験により提唱されていた "front-gate メカニズム" (キネシンの内部張力は ATP 結合過程を阻害する傾向がある)と整合性があると考えられる。

- D) 我々は、キネシン 5 の一つ、Eg5 について、量子・古典ハイブリッド計算法をメタダイナミクスと組み合わせて、ATP 加水分解機構を研究した。触媒部位付近の約 200 原子を dispersion corrected density functional により取扱い、計 13 セット、累積 0.7ns のメタダイナミクスシミュレーションを行った。メタダイナミクス計算を行うことにより、従来よく行われてきた最低エネルギー経路ではなく、揺らぎを取り込んだ自由エネルギー曲面による議論が初めて可能になった。収束したセットを使って自由エネルギー曲線を描き、それから ATP 加水分解経路を求めた。二つの水分子をリレーしたプロトン移動を伴う加水分解機構は、F1-ATPase およびミオシンで示唆されている機構と興味深い共通点を示した。
- E) A~D で得られた構造からくる知見、およびこれまでの様々な実験による速度論的データを用いて、キネシン歩行に関する数理モデルを構築し、それに基づいて双頭間の協調の役割について考察した。  
 まず、キネシンの各ヘッドの状態として、チューブリンに結合した ATP 結合状態 (TM)、チューブリンに結合した ADP 結合状態 (DM)、チューブリンから解離した ADP 結合状態 (D)、およびチューブリンに結合したヌクレオチド非結合状態 (EM) の 4 状態を仮定しその状態間の遷移速度定数を実験データから算出した。このヘッドが二つ、互いに 8nm の距離を隔てて結合しているものを双頭キネシンと考える。双頭キネシンは 16 状態をもつ。双頭間に、特別な協調がない場合をまず計算すると、予想通り、キネシンは確率的に前後に動き、バイアスのない運動を示した。  
 つぎに双頭間の協調をモデル化するために、16 状態のうち、双頭がチューブリンに結合している 9 状態のうち各一つの状態のエネルギーを、僅かに安定化、あるいは不安定化させた時の運動を各々について計算した。全 18 通りのうち、対称性を破ったエネルギー変化を与えたものは、前方かまたは後方へのバイアスを生じた。  
 前方へのバイアスが生じたものをもとに、さらにもう一度、二度と、別の状態の

エネルギーを安定化、または不安定化することにより、さらに大きな前方へのバイアスを生み出す場合を、網羅的に探索した。前方へのバイアスを生じる、双頭間の協調は、上記の双頭間の張力が大きい場合を不安定化するものであった。さらに、キネシンの運動速度、エネルギー変換効率も最適化していくことにより、実際のキネシンの機能アッセイで見られるキネシンの物性に近いものに到達することができた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. M. J. McGrath, I-F. W. Kuo, S. Hayashi, S. Takada, ATP hydrolysis mechanism in kinesin studied by combined quantum-mechanical molecular-mechanical metadynamics, *J. Amer. Chem. Soc.*, 査読有、2013、in press, DOI: 10.1021/ja401540g
2. L. Chang, T. Ishikawa, K. Kuwata, and S. Takada, Protein-Specific Force Field Derived from the Fragment Molecular Orbital Method can Improve Protein-Ligand Binding Interactions, *J. Comp. Chem.*, 査読有、vol. 34, 2013, pp.1251-1257, DOI:10.1002/jcc.23250
3. R. Kanada, T. Kuwata, H. Kenzaki, S. Takada, Structure-based Molecular Simulations Reveal the Enhancement of Biased Brownian Motions in Single-headed Kinesin, *PLOS Comp. Biol.*, 査読有、9(2): e1002907, 2013, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002907
4. T. Terakawa, H. Kenzaki, S. Takada, p53 searches on DNA by rotation-uncoupled sliding at C-terminal tails and restricted hopping of core domains, *J. Amer. Chem. Soc.*, 査読有、134, 2012, pp.14555-14562, DOI: 10.1021/ja305369u
5. N. Hori and S. Takada, Coarse-Grained Structure-Based Model for RNA-Protein Complexes Developed by Fluctuation Matching, *J. Chem. Theory and Comp.*, 査読有、8, 2012, pp.3384-3394, DOI: 10.1021/ct300361j
6. W. Li, T. Terakawa, W. Wang, S. Takada, Energy landscape and multi-route folding of topologically complex proteins adenylate kinase and 2ouf-knot, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 査読有、44, 2012, pp. 17789-17794, DOI:10.1073/pnas.1201807109
7. S. Takada, Coarse-grained molecular simulations of large biomolecules, *Curr. Opinion Struct. Biol.*, 査読有、Vol.22, 2012, pp.130-137, DOI: 10.1016/j.sbi.2012.01.010
8. Y. Murakami and S. Takada, Rigor of cell fate decision by variable p53 pulses and roles of cooperative gene expression by p53, *BIOPHYSICS*, 査読有、Vol.8, 2012, pp.41-50, DOI: 10.2142/biophysics.8.41
9. T. Terakawa, S. Takada, Multiscale ensemble modeling of intrinsically disordered proteins: p53 N-terminal domain, *Biophys. J.*, 査読有、vol.101, 2011, pp.1450-1458, DOI: 10.1016/j.bpj.2011.08.003
10. H. Kenzaki, N. Koga, N. Hori, R. Kanada, W. Li, K. Okazaki, X-Q. Yao, S. Takada, CafeMol: A coarse-grained biomolecular simulator for simulating proteins at work, *J. Chem. Theory and Comp.*, 査読有、2011,7(6), 2011, pp.1979-1989, DOI: 10.1021/ct2001045
11. K. Okazaki S. Takada, Structural comparison of F1-ATPase: Interplay among enzyme structures, catalysis, and rotations, *Structure*, 査読有、vol.19, 2011, pp.588-598, DOI: 10.1016/j.str.2011.01.013
12. W. Li, P. G. Wolynes, S. Takada, Frustration, specific sequence dependence, and nonlinearity in large-amplitude fluctuations of allosteric proteins, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 査読有、vol.108, No.9, 2011, pp.3504-3509, DOI:10.1073/pnas.1018983108
13. T. Terakawa, T. Kameda, S. Takada, On easy implementation of a variant of the replica exchange with solute tempering in GROMACS, *J. Comp. Chem.*, 査読有、vol.32, No.7, 2011, pp.1228-1234, DOI: 10.1002/jcc.21703
14. X-Q. Yao, H. Kenzaki, S. Murakami, S. Takada, Drug export and allosteric coupling in a multidrug transporter revealed by molecular simulations, *Nature communications*, 査読有、vol.1.1, 2010, pp.117(8pages), DOI:10.1038/ncomms1116

15. W. Li, S. Takada, Characterizing protein energy landscape by the self-learning multiscale simulations: Application to a designed  $\beta$ -hairpin, *Biophys. J.*, 査読有, vol.99, No.9, 2010, pp.3029-3037, DOI:10.1016/j.bpj.2010.08.041
16. W. Li, H. Yoshii, N. Hori, T. Kameda, S. Takada, Multiscale methods for protein folding simulations, *Methods*, 査読有, vol.52, No.1, 2010, pp.106-114, DOI:10.1016/j.ymeth.2010.04.014

〔学会発表〕 (計 29 件)

1. 村上陽平、Kinetic parameter analysis of the mathematical model of caspase cascade by Bayesian statistics with MCMC、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡国際会議場 (福岡市)
2. M. Ito、Research of Split Point and Fluorescent Recovery of Green Fluorescent Protein by Molecular Dynamics Simulation、第50回日本生物物理学会年会、2012年09月22日～24日、名古屋大学東山キャンパス (名古屋市)
3. R. Kanada、The effect of the internal tension between two heads on the nucleotide binding site of kinesin-1 studied by All-atom MD、第50回日本生物物理学会年会、2012年09月22日～24日、名古屋大学東山キャンパス (名古屋市)
4. M. J. McGrath、ATP Hydrolysis Free Energy Barriers in Kinesin、JST International Symposium on Multi-scale Simulation of Condensed-phase Reacting Systems、2012年05月10日～12日、名古屋大学ESホール (名古屋市)
5. S. Takada、Coarse-grained molecular simulations of large biomolecules: From theory to applications、The 9th Fukui Inst Fundamental Chemistry Seminar (招待講演)、2012年03月06日、Fukui Inst. Fundamental Chem. (Kyoto)
6. 金田亮、全原子シミュレーションによるキネシン-微小管間の界面構造のリファインメント、バイオスーパーコンピューティングサマースクール2011 (招待講演)、2011年09月26日～27日、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)
7. 高田彰二、粗視化分子モデルによる生体分子機械の作動原理研究、日本物理学会2011年秋期大会 (招待講演)、2011年09月21日～24日、富山大学五福キャンパス (富山市)
8. S. Takada、Multiscale computational approach to kinesin and F1-ATPase、Telluride Science Research center meeting (招待講演)、2011年08月09日、Telluride (USA)
9. 高田彰二、粗視化生体分子シミュレーター CafeMol、蛋白質研究所セミナー (招待講演)、2011年3月5日、大阪大学蛋白質研究所 (吹田市)
10. X-Q. Yao, H. Kenzaki, S. Takada、FUNCTIONALLY ROTATING MECHANISM OF A MULTIDRUG TRANSPORTER STUDIED BY COARSE-GRAINED SIMULATION: EXPLORING THE BINDING PATHWAYS OF DRUGS、Biophysical Society 55th Annual Meeting、2011年3月5日～9日、Baltimore(USA)
11. H. Kenzaki, S. Takada、COARSE-GRAINED SIMULATION OF PROTEIN-DNA COMPLEX: MECHANICAL UNZIPPING OF NUCLEOSOME、Biophys. Soc. 55th Ann. Meeting、2011年3月5日～9日、Baltimore(USA)
12. R. Kanada, T. Makino, M. Tomishige, S. Takada、KINESIN INTERNAL TENSION FOR THE COORDINATED WALK ESTIMATED BY ALL-ATOM MD SIMULATION、Biophys. Soc. 55th Ann. Meeting、2011年3月5日～9日、Baltimore(USA)
13. X-Q. Yao、Drug export and allosteric coupling in a multidrug transporter revealed by molecular simulations、蛋白質研究所セミナー、2011年3月4日、大阪大学蛋白質研究所 (吹田市)
14. 高田彰二、シミュレーションで観る生体分子機械のゆらぎと機能、自然科学研究機構プロジェクト「機能生命科学における揺らぎと決定」(招待講演)、2011年2月23日、生理学研究所 (岡崎市)
15. 金田亮、牧野司、富重道雄、高田彰二、Kinesin internal tension for the coordinated walk estimated by all-atom MD simulation(全原子MDによる双頭キネシン分子モーターの内部張力評価)、第3回バイオスーパーコンピューティングシンポジウム、2011年2月21日～22日、理化学研究所計算科学研究機構 (神戸市)
16. 村上陽平、高田彰二、ミトコンドリア依存アポトーシスシグナル伝達系の数理モデル化とその応答、第33回日本分子生物学会年会、2011年1月6日～7日、神戸

- ポートアイランド (神戸市)
17. 高田彰二、分子シミュレーションによる多剤排出トランスポーターの作動機構研究、第33回日本分子生物学会年会 (招待講演)、2011年1月6日～7日、神戸ポートアイランド (神戸市)
  18. X-Q. Yao, H. Kenzaki, S. Takada、Functionally rotating mechanism of a multidrug transporter studied by coarse-grained simulation、揺らぎと生体機能 第4回公開シンポジウム、2010年11月30日、滋賀県立県民交流センターピアザ淡海 (大津市)
  19. T. Terakawa, S. Takada、ENSEMBLE MODELING OF P53 INTRINSICALLY DISORDERED N-TERMINAL DOMAIN BY COMBINING MULTI-SCALE SIMULATIONS WITH NMR EXPERIMENTS、揺らぎと生体機能 第4回公開シンポジウム、2010年11月30日、滋賀県立県民交流センターピアザ淡海 (大津市)
  20. R. Kanada, S. Takada、Kinesin internal tension for the coordinated walk estimated by all-atom MD simulation、第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20日～22日、東北大学川内キャンパス (仙台市)
  21. H. Kenzaki, S. Takada、Coarse-grained simulation of protein-DNA complex: mechanical unzipping of nucleosome、第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20日～22日、東北大学川内キャンパス (仙台市)
  22. X-Q. Yao, H. Kenzaki, S. Takada、Functionally rotating mechanism of a multidrug transporter studied、第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20日～22日、東北大学川内キャンパス (仙台市)
  23. M. Takayama, H. Kenzaki, S. Takada、Nucleosome unwrapping dynamic studied by coarse-grained molecular simulations、2010年9月20日～22日、東北大学川内キャンパス (仙台市)
  24. N. Hori, W. Li, S. Takada、Coarse-grained model of RNA-protein complexes based on all-atom simulations、2010年9月20日～22日、東北大学川内キャンパス (仙台市)
  25. T. Terakawa, S. Takada、Molecular Dynamics Simulation Study of p53 Intrinsically Disordered N Terminal Domain、2010年9月20日～22日、東北大学川内キャンパス (仙台市)
  26. F. Sakai, S. Takada、Modeling Rhodopsin active conformation (Meta II) by molecular dynamics simulations、2010年9月20日～22日、東北大学川内キャンパス (仙台市)
  27. S. Takada、CG modeling of biomolecular machines: Specificity, non-linearity, and function、Characterizing Landscapes: From Biomolecules to Cellular Networks (招待講演)、2010年7月5日、Telluride(USA)
  28. W. Li, S. Takada、Modulations of protein allosteric dynamics by physicochemical features、Characterizing Landscapes: From Biomolecules to Cellular Networks、2010年6月14日～18日、Telluride(USA)
  29. 寺川剛, 高田彰二、p53のN末端天然変性ドメインの分子動力学シミュレーション研究、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月16日～18日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
- [図書] (計3件)
1. 高田彰二、分子シミュレーション研究会、アンサンブル vol.12, No.2 (ハミルトニアシミュレーション交換法)、2010、4
  2. 高田彰二、日本生物物理学会、生物物理 vol.50, No.4 (郷モデルの35年)、2010、2
  3. 高田彰二、講談社、タンパク質の立体構造入門—基礎から構造バイオインフォマティクスへ—、編集: 藤博幸 (2章タンパク質構造の物理化学, 5章アミノ酸配列からの構造予測とデザイン, 6章分子シミュレーション的な技法)、2010、81
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- [その他]
- ホームページ等  
なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
高田彰二 (TAKADA SHOJI)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 60304086
  - (2) 研究分担者  
なし ( )
  - (3) 連携研究者  
なし ( )