

機関番号：14301  
 研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2006～2010  
 課題番号：18074004  
 研究課題名（和文）分子シミュレーションによる F<sub>1</sub> 分子モーターの化学 - 力学エネルギー変換機構の解明  
 研究課題名（英文）Molecular mechanism of chemical-mechanical energy conversion of F<sub>1</sub> molecular motor studied by molecular simulations  
 研究代表者  
 林 重彦 (HAYASHI SHIGEHIKO)  
 京都大学・大学院理学研究科・准教授  
 研究者番号：70402758

研究成果の概要（和文）：分子シミュレーションの手法を用い、可逆的回転分子モーターである F<sub>1</sub>-ATPase の化学 - 力学エネルギー変換機構を原子・電子レベルから解明した。まず、ATP 分子の触媒活性およびその制御機構について、ハイブリッド量子力学・分子力学法を用いて理論的及び実験的に解明するとともに、触媒活性を増強する変異酵素の人工設計を行った。また、分子動力学計算を行うことにより、モーター動作に関わるタンパク質の構造変化を原子レベルから明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Molecular mechanism of chemical-mechanical conversion of a reversible rotary motor protein, F<sub>1</sub>-ATPase, was revealed in electronic and atomic details through molecular simulations. Molecular mechanisms of catalysis of ATP hydrolysis and its regulation were elucidated by means of a hybrid quantum mechanical/molecular mechanical method. Based on the reaction profile revealed, a mutant enzyme with increased catalytic activity was designed theoretically. Molecular dynamics simulations unveiled in an atomic detail protein structural changes responsible for the motor motion.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	19,800,000	0	19,800,000
2007年度	23,200,000	0	23,200,000
2008年度	28,300,000	0	28,300,000
2009年度	28,300,000	0	28,300,000
2010年度	19,800,000	0	19,800,000
総計	119,400,000	0	119,400,000

研究分野：生物物理学・理論化学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：分子モーター・酵素反応・分子シミュレーション・QM/MM 法・分子動力学法

## 1. 研究開始当初の背景

F<sub>1</sub>-ATPase は、ATP 加水分解反応エネルギーを源とする分子モーターであり、その超分子複合体タンパク質立体構造の解明や、一分子測定・操作などの革新的なナノバイオ実験技術の発展により、分子モーター研究のフロントランナーとなっている。しかしながら、いまだ原子レベルでの動的な分子モーター機能の理解には至っていない。

一方、生化学や一分子測定・操作などの実験的知見をタンパク質立体構造に基づき理解することを可能にするアプローチとして分子シミュレーションが挙げられる。特に、近年の方法論の開発により、酵素化学反応のような電子レベルからタンパク質複合体の大きな運動のレベルまで、幅広い現象が記述できるようになってきた。

## 2. 研究の目的

分子シミュレーションの手法を用い、可逆的回転分子モーターである F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の化学 - 力学エネルギー変換機構を原子・電子レベルから解明することを目指す。本領域内の一分子測定・生化学実験グループとのフィードバックループの形成により、原子・電子レベルでの詳細なエネルギー論と、実際の一分子での観察とのリンクを達成し、これまでのアプローチでは困難であった、一分子操作実験での回転計測と、原子・電子レベルでのタンパク質立体構造変化の直接的な対応を目指す。

### 3. 研究の方法

研究代表者の林が開発を行ってきたタンパク質中での化学反応の高精度なシミュレーションを可能にする電子状態/分子力場 (QM/MM) 法と、研究分担者である池口の開発した大規模分子動力学 (MD) 計算と組み合わせ、実験グループとの密接な共同研究を通して研究を進める。

### 4. 研究成果

次のような研究成果を得た。(i) catalytic dwell 構造における平衡揺らぎの解析、(ii) catalytic dwell 構造における加水分解反応機構の解析、(iii) ATP 結合時の  $\beta$  サブユニットの構造変化、(iv) 回転トルク変調変異体の解析、(v)  $\epsilon$  サブユニットの X 線溶液散乱実験と構造モデリング、及び (vi) 水の統計力学理論を用いたタンパク質構造変化と水和の解析。以下にその詳細を述べる。

(i) catalytic dwell 構造における平衡揺らぎの解析 F<sub>1</sub> 分子モーターの catalytic dwell 構造と考えられている結晶構造を出発点として、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  サブユニットからなる 3000 残基以上の生体超分子について、周囲の水もすべて含めた MD シミュレーションを遂行した。周囲の環境も含めた全系は 32 万原子以上になる。この系について、30 ns 以上の MD シミュレーションを行った。また、別途、水中における  $\beta$  サブユニット単体の MD シミュレーションも行っており、単体の  $\beta$  サブユニットの揺らぎの中に分子モーターの機能に重要な構造変化が内在していることを見出した。この結果は大阪大学・八木グループの NMR 実験による研究結果と整合するものである。この  $\beta$  サブユニットの機能に関わる揺らぎは、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  の揺らぎの中にも  $\gamma$  サブユニットが相関を伴って見出されており、揺らぎと機能の構造変化の密接な関係を示唆している。

(ii) catalytic dwell 構造における加水分解反応機構の解析 F<sub>1</sub> 分子モーターのエネルギー源である ATP 加水分解反応の反応機構を QM/MM 法を用いて解析した。十分に大きい QM 領域 (80 QM 原子) を持つ QM/MM 系に対して、800 基底を越える豊富な基底関数を用いて反応経路の同定を行った。また、QM/MM 系の初期構造は、池口らの MD シミュレーションにより構築した。その際、安定な水分子の配置を持ついくつかの構造モデルについて反応エネルギー等を計算し、反応性の高い構造を決定した。

図 1 に計算により同定された反応の遷移状態を示す。反応の遷移状態は、従来考えられている  $\gamma$  リン酸の 5 配位構造ではなく、近傍の水分子を通るプロトン移動であることが示された。また、反応の触媒活性は、遷移状態に先立って解離した反応性の高いメタリン酸によりプロトン移動が活性化される連鎖的活性化機構によりもたらされることを明らかにした。さらに、明らかにされた反応モデルに基づき、重水中、基質アナログ、及び変異体を用いた実験をデザインした。そのデザインに従い行った大阪大学の野地グループによる一分子観測実験により、理論的に予測された反応機構が実証された。

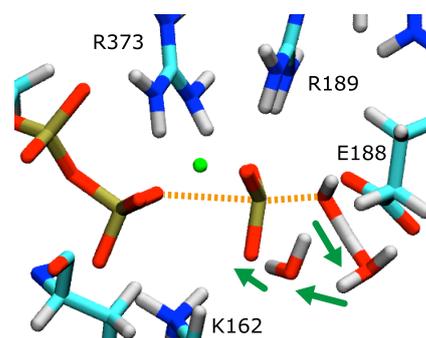


図 1. ATP加水分解反応の遷移状態。緑の矢印のように水二分子を介してプロトンが移動する。

また、実証された反応機構で得られた知見に基づき、酵素活性を増強する新規変異体の人工設計を試みた。触媒活性には、活性部位のアルギニン残基と  $\beta$  リン酸基との相互作用が触媒重要な役割を果たしている。そこで、その相互作用を強める非天然アミノ酸残基を用いた変異を導入したモデルを構築し、酵素反応速度が上がることを分子シミュレーションにより確認した。現在、提案された設計モデルを実験により検証中である。

(iii) ATP 結合時の  $\beta$  サブユニットの構造変化 分子モーターの力学エネルギー発生の主要原因と考えられる ATP 結合時の  $\beta$  サ

βサブユニットの構造変化について、MD シミュレーションにより、構造変化過程の自由エネルギープロファイルを得た。図 2 に ATP 結合状態と非結合状態の双方について、β サブユニットの構造変化過程の自由エネルギープロファイルを示す。それらの間には顕著な違いが認められ、典型的な induced fit 型、すなわち、ATP が結合しないと β サブユニットの構造変化に至らないということを示している。また、反応座標軸に対する局所的な構造変化を網羅的に調べることで、ATP 結合によってどのように β サブユニットの構造変化が誘導されるのかについて、

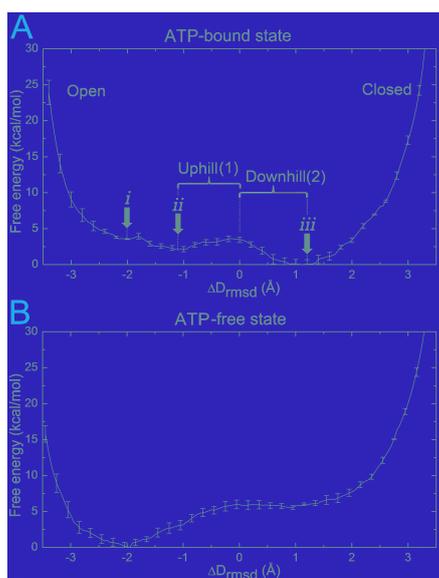


図 2. β サブユニットの構造変化に伴う自由エネルギー変化。(A) ATP 結合型、(B) 非結合型。

側鎖レベルまで詳細なメカニズムが明らかになった。

(iv) 回転トルク変調変異体の解析 β サブユニットの C 末端ドメインで γ サブユニットと接触する部分をグリシンに置き換えた変異体に対し MD シミュレーションを行い、その変異体でトルクが減少するとして一分子実験の結果に一定の解釈を与えた。

(v) ε サブユニットの X 線溶液散乱実験と構造モデリング ε サブユニットの ATP 結合型の結晶構造は得られているが、非結合の構造は得られておらず、その構造変化の詳細はわかっていない。そこで、立教大学の山田グループから提供された ε サブユニットを放射光施設 Spring8 にて、ATP 結合型と非結合型の溶液構造を X 線溶液散乱法により測定した。その結果、ATP 結合型は結晶構

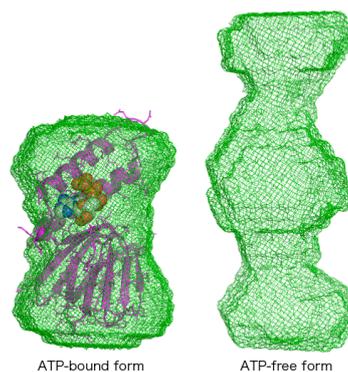


図 3. ε サブユニットの X 線小角散乱による概形図(緑; ダミー原子モデル)とフィットさせた結晶構造。左は ATP 結合状態で、右は ATP 非結合状態。ATP 非結合状態だと長く伸びているのがわかる。

造に相当する散乱が得られたが、非結合型はかなり伸びた構造であることが明らかになった。また、我々が開発した分子動力学-X 線小角散乱法 (MD-SAXS) を用い、非結合型の原子レベルの構造モデリングを行っていることにより、ε サブユニットの構造変化の分子機構を解明した。

(vi) 水の統計力学理論を用いたタンパク質構造変化と水の解析 京都大学・木下グループと共同で、水の統計力学理論を用いた F<sub>1</sub> 分子モーターの解析を行い、MD シミュレーションで観察された、α 及び β サブユニット間の非対称なパッキングとそれに伴う水分子のエントロピー差が分子回転メカニズムにおいて重要な役割を果たしていることを指摘した。

## 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 11 件)

- 1) T. Yoshidome, Y. Ito, M. Ikeguchi, M. Kinoshita, "On the rotation mechanism of F<sub>1</sub>-ATPase: crucial importance of water-entropy effect", *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, vol. **133**, 2011, pp. 4030-4039
- 2) Y. Ito, T. Oroguchi, M. Ikeguchi, "Mechanism of the conformational change of the F<sub>1</sub>-ATPase β subunit revealed by free-energy simulations", *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, vol. **133**, 2011, pp. 3372-3380
- 3) T. Kosugi and S. Hayashi, "Local

- entropy difference upon a substrate binding of a psychrophilic  $\alpha$ -amylase and a mesophilic homologue”, *Chemical Physics Letters*, 査読有, vol. **501**, 2011, pp. 517-522
- 4) Y. Nishihara, S. Kato, and S. Hayashi, “Protein collective motions coupled to ligand migration in myoglobin”, *Biophysical Journal*, 査読有, vol. **98**, 2010, pp. 1649-1657.
- 5) H. Yagi, H. Konno, T. Murakami-Fuse, A. Isu, T. Oroguchi, H. Akutsu, M. Ikeguchi, T. Hisabori, “Structural and functional analysis of the intrinsic inhibitor subunit  $\epsilon$  of F<sub>1</sub>-ATPase from photosynthetic organisms”, *Biophysical Journal*, 査読有, vol. **425**, 2010, pp. 85-94.
- 6) Y. Ito, M. Ikeguchi, “Structural fluctuation and concerted motions in F<sub>1</sub>-ATPase: a molecular dynamics study”, *Journal of Computational Chemistry*, 査読有, vol. **31**, 2010, pp. 2175-2185.
- 7) Y. Ito, M. Ikeguchi, “Molecular dynamics simulations of the isolated  $\beta$  subunit of F<sub>1</sub>-ATPase”, *Chemical Physics Letters*, 査読有, vol. **490**, 2010, pp. 80-83.
- 8) Y. Kaneko, S. Hayashi, and I. Ohmine, “Proton transfer reactions in reaction center of photosynthetic bacteria, *Rhodobacter sphaeroides*”, *Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, vol. **113**, 2009, pp. 8993-9003.
- 9) M. Higashi, S. Hayashi, and S. Kato, “Transition state determination of enzyme reaction on free energy surface: Application to chorismate mutase”, *Chemical Physics Letters*, 査読有, vol. **437**, 2007, pp. 293-297.
- 10) 林 重彦, “分子シミュレーションによる F<sub>1</sub>-ATPase の構造機能解析”, *蛋白質核酸酵素*, 査読無, vol. **52**, 2007, pp. 329-334.
- 11) 池口満徳, “生物系の分子動力学シミュレーション”, *日本物理学会誌*, 査読有, vol. **62**, 2007, pp. 777-784.
- [学会発表] (計 24 件)
- 1) S. Hayashi, “Chemical reactions and molecular dynamics in functional processes of motor and photoreceptor proteins”, Pacificchem 2010 Symposium “Computational Quantum Chemistry: Theory and Interactions with Experiment”, 2010 年 12 月 15 日-12 月 20 日, Honolulu (米国)
- 2) M. Ikeguchi, “Theoretical study on rotation mechanism of molecular motor F<sub>1</sub>-ATPase”, Pacificchem 2010 Symposium “Computational Quantum Chemistry: Theory and Interactions with Experiment”, 2010 年 12 月 15 日-12 月 20 日, Honolulu (米国)
- 3) 吉留崇, 伊藤祐子, 池口満徳, 木下正弘, “F<sub>1</sub>-ATPase の回転のメカニズムにおける水のエンタロピーの重要性”, 日本物理学会秋季大会, 2010 年 9 月 23 日-9 月 26 日, 大阪.
- 4) Y. Ito, T. Oroguchi, M. Ikeguchi, “Investigation of the conformational change of the F<sub>1</sub>-ATPase ( $\beta$  subunit) via molecular dynamics simulation”, 日本生物物理学会第 48 回年会, 2010 年 9 月 20 日-9 月 22 日, 仙台.
- 5) T. Yoshidome, Y. Ito, M. Ikeguchi, M. Kinoshita, “Crucial importance of translational entropy of water in rotation mechanism of F<sub>1</sub>-ATPase”, 日本生物物理学会第 48 回年会, 2010 年 9 月 20 日-9 月 22 日, 仙台.
- 6) 林 重彦, “分子シミュレーションによるタンパク質機能の分子機構の解明”, 新学術領域研究「高次  $\pi$  空間の創発と機能開発」第三回公開シンポジウム, 2010 年 3 月 15 日, 分子科学研究所.
- 7) S. Hayashi, “Chemical Reactions and Molecular Dynamics in Functional Processes of Motor and Photoreceptor Proteins”, 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences – Experiments and Simulations, 2009 年 12 月 23 日, 名古屋大学.
- 8) Y. Ito, M. Ikeguchi, “Structural fluctuation and cooperativity in F<sub>1</sub>-ATPase: a molecular dynamics study”, 日本生物物理学会第 46 回年会, 2009 年 10 月 30 日-11 月 1 日, 徳島文理大学.
- 9) S. Hayashi, M. Umemura, Y. Ito, and M. Ikeguchi, “Molecular Simulations on Enzymatic Reactions and Structural Dynamics of F<sub>1</sub>-ATPase”, International Symposium on “Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembrane”, 2009 年 9 月 9 日, 京都大学.
- 10) S. Hayashi, “Molecular Mechanisms of Enzymatic Activities in Motor and Photoreceptor Proteins”, CREST International Symposium on Theory and Simulations of Complex Molecular Systems, 2009 年 7 月 21 日, 福井謙一記

- 念研究センター。
- 11) S. Hayashi, “Molecular Dynamics in Functional Processes of Photosensitive Proteins”, Japan-Korea Symposium on Molecular Science 2009 “Chemical Dynamics in Materials and Biological”, 2009年7月13日, 淡路夢舞台国際会議場。
  - 12) 伊藤祐子, 池口満徳, “分子動力学を用いた F<sub>1</sub>-ATPase の構造と機能解析”, 日本蛋白質科学会第9回年会, 2009年5月20日-5月22日, 熊本全日空ホテルニュースカイ。
  - 13) Y. Ito and M. Ikeguchi, “Structure analysis of F<sub>1</sub>-ATPase via molecular dynamics”, 53rd Annual Meeting of Biophysical Society, 2009年2月28日-3月4日, Boston.
  - 14) T. Oroguchi, T. Kato-Yamada, H. Hashimoto, S. Unzai, M. Sato, M. Ikeguchi, “Conformational change of F<sub>1</sub>-ATPase ε subunit upon ATP binding studied by molecular dynamics simulations and X-ray scattering”, 53rd Annual Meeting of Biophysical Society, 2009年2月28日-3月4日, Boston.
  - 15) A.R. Shaikh, Y. Ito, M. Ikeguchi, H. Ueno, H. Noji, and S. Hayashi, “Molecular Mechanism of ATP hydrolysis reaction in F<sub>1</sub>-ATPase molecular motor”, 日本生物物理学会第46回年会, 2008年12月3日-5日, 福岡。
  - 16) Y. Ito and M. Ikeguchi, “Structure and function analysis of F<sub>1</sub>-ATPase by molecular dynamics”, 日本生物物理学会第46回年会, 2008年12月3日-5日, 福岡。
  - 17) T. Oroguchi, T. Kato-Yamada, H. Hashimoto, S. Unzai, M. Ikeguchi, “Conformational change of F<sub>1</sub>-ATPase epsilon subunit upon ATP binding studied by molecular dynamics simulations and X-ray scattering”, 日本生物物理学会第46回年会, 2008年12月3日-5日。
  - 18) 林 重彦, “ハイブリッド分子シミュレーションで探る F<sub>1</sub>-ATPase 分子モーターの化学-力学エネルギー変換機構”, 生物物理学会シンポジウム「F<sub>1</sub>-ATPase 分子モーターの分子機構」, 2008年12月22日, 神奈川・横浜。
  - 19) 池口満徳, “分子動力学シミュレーションによる F<sub>1</sub>-ATPase の構造変化の研究”, 日本生物物理学会第45回年会, 2007年12月21日-23日, 横浜。
  - 20) S. Hayashi, “Chemical Reactions in Photoreceptor and Motor Proteins

- Studied by hybrid QM/MM Simulations”, Telluride Science Research Center Workshop on “Protein Dynamics”, 2007年8月1日, Telluride, Colorado.
- 21) S. Hayashi, “Chemical Reactions in Photoreceptor and Motor Proteins Studied by hybrid QM/MM Simulations”, I2CAM Exploratory Workshop “Quantum Dynamics and Biomolecular Function”, 2007年4月12日, Yeppoon, Australia.
  - 22) M. Ikeguchi, S. Fuchigami, A. Kidera, “Detecting domain motions of proteins in molecular dynamics simulations and normal mode analyses”, 50th Annual Meeting of Biophysical Society, 2007, Baltimore, Maryland.
  - 23) S. Hayashi, “Chemical Reactions in Photoreceptor and Motor Proteins Studied by hybrid QM/MM Simulations”, Discussion on “Theory and Simulation of biomolecular nano-machines”, 2006年12月13日~15日, 兵庫・舞子。
  - 24) 池口満徳, 林 重彦, “膜超分子の分子シミュレーション”, 日本分子生物学会2006 フォーラム「分子生物学の未来」シンポジウム「生命科学の革新的ナノバイオロジー」, 2006年12月6日~8日, 愛知・名古屋。

〔図書〕(計2件)

- 1) K. Kuwajima, T. Oroguchi, T. Nakamura, M. Ikeguchi, A. Kidera, 「Experimental and simulation studies of the folding/unfolding of goat α-lactoalbumin, in Water and Biomolecules: Physical Chemistry of Life Phenomena」, *Springer Verlag*, 2009, 総ページ数24.
- 2) 池口 満徳, 「最新分子マシン ナノで働く"高度な機械"を目指して水を輸送する分子マシン アクアポリンの分子シミュレーション」, *化学同人*, 2008, 総ページ数6.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 重彦 (HAYASHI SHIGEHICO)

京都大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：70402758

(2)研究分担者

池口満徳 (IKEGUCHI MITSUNORI)  
横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究所・准教授  
研究者番号：60261955

(3)連携研究者

なし。