

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291036

研究課題名(和文)分子シミュレーションによるV型ATPaseの回転機構の解明

研究課題名(英文)Molecular simulation study on the rotation mechanism of V-ATPase

研究代表者

池口 満徳 (IKEGUCHI, Mitsunori)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：60261955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ATP加水分解のエネルギーを利用してイオンを運ぶ分子モーターであるV型ATPaseについて、分子動力学(MD)シミュレーションを用いた回転機構の研究を行った。水素まで考慮する全原子モデルと、アミノ酸を粒子と考える粗視化モデルの両方を用いたマルチスケールMDシミュレーションによって、軸回転の再現に成功し、その構造変化の解析から、どのようにV型ATPaseが回転しているのか、そのメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The rotation mechanism of molecular motor V-ATPase, which transports ions utilizing ATP-hydrolysis energies, was studied using molecular dynamics (MD) simulations. Multiscale MD simulations employing both an all-atom model involving hydrogen atoms and a coarse-grained model approximating amino acids as particles successfully reproduced the rotation of a central stalk in V-ATPase. From analyses of the trajectories, the rotation mechanism of V-ATPase was elucidated structurally.

研究分野：生物物理学

キーワード：V型ATPase 分子動力学 マルチスケールシミュレーション 分子モーター

1. 研究開始当初の背景

V型 ATPase は、F型 ATPase 同様、中心軸が回転する分子モーターであるが、多くの F型 ATPase では ATP 合成が生体中での主たる機能であるのに対し、V型 ATPase では ATP 分解に伴うプロトンやカチオンポンプが主たる機能であるという違いがある。F型 ATPase では、水溶性部分である F_1 -ATPase に関しては特に、X線結晶構造解析や一分子測定など、膨大な研究が蓄積されてきた。我々も、理論的な側面から F_1 -ATPase モーターの回転メカニズムの理解を目指し、水も露わに入れた全原子巨大系分子動力学シミュレーション、 F_1 分子モーターのエンジンであるサブユニットの ATP 結合に伴う構造変化過程の自由エネルギー計算、 F_1 -ATPase 中における ATP 加水分解過程の量子化学(QM/MM 計算)、 F_1 分子モーターの液体統計力学理論解析などを行い、その知見を元に一分子測定や構造生物学の実験研究者との共同研究がなされてきた。このように、 F_1 -ATPase の機能メカニズムについては、実験的にも理論的にも、かなりの研究蓄積がなされてきたが、一方、 V_1 -ATPase については、まだ未解明なことが数多くある。特に、原子レベルの立体構造の解明があまり進んでいないことが大きな足かせとなり、シミュレーション等の理論的研究の進展を阻んできた。しかし、本研究の連携研究者である村田武士博士により、 V_1 -ATPase の高解像度の立体構造が解かれ、 F_1 -ATPase とはかなり異なった構造変化をすることが明らかになってきた。しかも、ヌクレオチド結合型、非結合型、回転軸が入った型、入っていない型など、数多くの異なる V_1 -ATPase の構造が解かれ、どのようなメカニズムで構造遷移が起こり回転するのかという新たな疑問が生じていた。結晶構造は、あくまでもある条件におけるスナップショットであり、分子が機能を果たすときには、ATP 加水分解のエネルギーをどう利用し、分子全体がどのように運動し、そしてどのように外部にトルクを出すのか、その過程を明らかにする必要がある。そのような分子機構を解析するには、分子シミュレーションは適した研究手法であり、さらには、そこで得た知見を実験にフィードバックすることによって、分子シミュレーションの知見の是非を検証することができる。

近年、スパコン「京」に代表されるように、計算機的能力が拡大の一途をたどっている。生体分子シミュレーションは、そのようなスパコンの主たるアプリケーションの一つであり、その成果が期待されている。我々も、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参画し、我々独自に一から開発した生体分子用シミュレーションソフトウェアパッケージ MARBLE をスパコン「京」用に最適化して、数

万コア以上での並列効率向上を実現している。MARBLE は「京」専用でなく、横浜市立大学にある 5000 コア以上からなる CRAY XE6 においても、良好な性能を示している。すでに、この MARBLE を利用して、 F_1 -ATPase を始めたとして数多くの生体超分子の機能・構造解析の研究を行ってきた。

2. 研究の目的

V型 ATPase の結晶構造によると、ATP 加水分解能を有する A サブユニットは、F型 ATPase のサブユニットと比較して、全体構造は類似しているが、その構造変化様式が大きく異なることが明らかになってきた。ATP を結合すると、オープン構造からクローズ構造に遷移するという点は同じなのだが、動的な構造ドメインが全く異なるのである。なぜ、全体構造は類似しているのに、動的な構造ドメインが異なるのか、まずその仕組みを解明する。このようなドメインの動的性質は、水を露わに入れた全原子分子動力学シミュレーションによる構造揺らぎ解析と、ドメイン内およびドメイン間の相互作用解析によって、その成り立ちが明らかになると思われる。すなわち、構造のどこが硬くどこが柔らかいのか、構造揺らぎ情報にもとづいて解析を行い、その結果を実際の構造変化と比較することで、その構造変化のメカニズムの解明を目指す。

次に、そのサブユニットの構造変化が、どのように中心軸の回転をもたらすのか、その動作メカニズムの解明を目指す。軸回転のような大きな構造変化については、時間スケールの制約のため、全原子分子動力学シミュレーションでは全過程を計算することは難しい。そこで、粗視化分子動力学シミュレーションを導入し、 V_1 -ATPase の軸回転過程の計算を試みる。粗視化分子動力学シミュレーションにより、軸回転を観察することが可能になった後、周囲の A、B サブユニットと中心軸の間のどのような相互作用が回転をもたらすのかについて解析を行う。A、B サブユニットと軸の間の相互作用について、立体障害、静電相互作用、疎水相互作用をそれぞれオン/オフして、回転の様子を観察することで、各相互作用の軸回転に対する効果を理解する。

中心軸の周りには A、B サブユニットが交互に計 6 個並んでいる。そのサブユニット間インターフェースも、 V_1 -ATPase の立体構造の特徴になっている。A、B サブユニット間パッキングが、場所によって、密～疎というように非対称になっている。それが軸回転の際に、どのように構造変化するのか、さらに、その構造変化の軸回転への影響についても解析する。以上のように、全原子モデル、粗視化モデル双方を用いたマルチスケール分

子力学によって、回転分子モーター V_1 -ATPase の回転機構の全体像を解明する。

3. 研究の方法

最初に、 V_1 -ATPase に対する溶媒を露わに含んだ全原子平衡分子力学シミュレーションを遂行し、構造揺らぎを解析した。タンパク質の構造揺らぎの中には、機能に重要な構造変化の情報が含まれていることが多い。そこで、分子力学シミュレーションの結果から、 V_1 -ATPase の構造揺らぎの情報を解析し、 V_1 -ATPase の構造柔軟性の特性を得た。そこで得られた構造柔軟性の特性と、機能に重要な構造変化を比較することで、 V_1 -ATPase の立体構造や動特性と、機能的構造変化の関係を明らかにした。そのために、まず、結晶構造を元にして、欠損部位の分子モデリングを行い、結晶構造で ATP アナログであった部分を ATP など、元の基質分子など、実際に機能を果たしている状態に置換する。さらに周囲に水分子やイオンなどの溶媒分子を配置し、全原子分子力学計算用の力場パラメータをアサインし、初期構造モデルを完成させた。その後、スーパーコンピュータ上で、我々が開発してきた分子シミュレーションソフトウェア MARBLE を用いて、全原子平衡分子力学シミュレーションを遂行した。その座標履歴を用いて、構造揺らぎの解析を行った。

上記の溶媒を露わに含めた全原子平衡分子力学シミュレーションは、ある一つの状態における構造揺らぎを解析するための計算であり、構造柔軟性などの重要な情報を得ることができた。そして、それは V_1 -ATPase の構造変化のメカニズムを示唆するものであった（研究成果の節を参照）。しかし、通常の全原子分子力学シミュレーションでは、時間スケールが数百ナノ秒にとどまってしまうため、そのままの方法では軸回転などの状態間遷移を扱うのは難しい。そこで、粗視化モデルを導入し、状態間遷移も含めた、より大規模な構造変化の分子シミュレーションを実施した。粗視化分子力学シミュレーションでは、ソフトウェア CafeMol を用い、構造変化を誘起する Switching Go モデルを用いて、軸回転シミュレーションを行った。その際に、中心軸と周囲の A、B サブユニットの間の相互作用として、1. 斥力のみ、2. 斥力 + 静電相互作用、3. 斥力 + 疎水相互作用、4. 斥力 + 静電相互作用 + 疎水相互作用の 4 種の相互作用を導入して、軸回転に対する影響を観察した。

上記の粗視化分子力学シミュレーションでは、一定の成果は得られたものの、採用した力場パラメータの精度に問題があった。そこで、ここで実施した全原子分子力学シミュレーションによる V_1 -ATPase の構造揺らぎの情報を元にして、それが再現できるよう

な粗視化モデルの調整を行った。そして、調整された粗視化モデルパラメータを用い、複数のエネルギー極小点間を遷移可能な Multiple Go モデルを用いて、粗視化分子シミュレーションを実施した。その時間発展を観察することで、軸回転のメカニズムの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 平衡全原子分子力学シミュレーション

V_1 -ATPase の立体構造に対し、溶媒を露わに含んだ全原子分子力学シミュレーションを実行した結果、 V_1 -ATPase の構造柔軟性の特徴や相関運動のあり方を解析することができた。 V_1 -ATPase の活性サブユニットは、A サブユニットであるが、ATP が結合したときの構造変化は、 F_1 -ATPase の対応するサブユニットの構造変化と大きく異なる。 F_1 -ATPase のサブユニットでは、ATP が結合するところを境目にして、二つのおおよそ同等なサイズの動的ドメインがオープン-クローズの構造変化を起こすのだが、 V_1 -ATPase の A サブユニットでは、N 端ドメインと ATP のリン酸が結合する Arm ヘリックスだけが片方の動的ドメインとなり、残りすべてがもう一方の動的ドメインとなって構造変化を起こす。平衡全原子分子力学シミュレーションにおける構造揺らぎにおいても、 V_1 -ATPase の構造変化様式を反映した揺らぎが観察された。すなわち、Arm ヘリックスは、A サブユニットの他の部位とは孤立して運動しており、その間の相関運動は少なかった。むしろ、Arm ヘリックスは隣の B サブユニットと連携して運動していた。さらに、Arm ヘリックスと協調して構造変化する N 端ドメインも B サブユニットと強く連携して運動していた。このことから、N 端ドメインと Arm ヘリックスは単独で A サブユニットの他の部分とのオープン-クローズ運動を起こすのではなく、N 端ドメイン-Arm ヘリックス-B サブユニット複合ドメインと、A サブユニットの残りドメインとの間で、オープン-クローズ運動を起こしていることが明らかになった。

(2) 粗視化分子力学シミュレーション

以上の溶媒を露わに含んだ全原子分子力学シミュレーションは、安定構造の周囲の構造揺らぎを計算する平衡分子力学シミュレーションであり、 V_1 -ATPase の構造柔軟性の特徴や相関運動のありかたについて多くの知見を得ることができたが、実際に軸が回転する現象を観察するには、シミュレーションの時間スケールが短すぎるといった問題があった。そこで、各アミノ酸を一つの粒子として取り扱う粗視化分子力学シミュレーションを導入することで、長時間ダイナミクス計算を実現し、軸の回転を直接計算する

ことを試みた。粗視化分子動力学シミュレーションのモデルでは、類似のF1-ATPaseの回転分子機構解析でも成果を上げているSwitching Goモデルを採用し、A、Bサブユニットの構造変化を誘導することで、軸がどのように回転するのかを観察した。AまたはBサブユニットと軸の間の相互作用として、1.斥力のみ、2.斥力+静電相互作用、3.斥力+疎水相互作用、4.斥力+静電+疎水相互作用の4通りを試した。それぞれの計算では、統計性を上げるために100回計算を実施した。その結果、まず、1の斥力だけでも、軸が回転する場合があるが回転は不安定であり、斥力に加え、静電、疎水相互作用を導入すると回転が安定することがわかった。このことは、AまたはBサブユニットが作る中心部分の空隙の形が異方的であって、その形に合わせて軸が回転するが、一方、AまたはBサブユニットと軸の間の静電相互作用、疎水相互作用も回転に貢献していることを示唆している。

(3) マルチスケール分子動力学シミュレーション

以上のように粗視化分子動力学シミュレーションを導入することで、長時間ダイナミクス計算を実現し、軸の回転を直接計算することができた。しかし、回転機構の解明には、用いたポテンシャルパラメータの精度に問題があった。そこで、平衡全原子分子動力学シミュレーションからの知見をもとにして、粗視化分子動力学シミュレーションのパラメータを調整し、軸回転のシミュレーション計算を行うというマルチスケール分子動力学シミュレーションを実施した。具体的には、まず、全原子分子動力学シミュレーションから得られた構造ゆらぎを再現するように、粗視化分子動力学シミュレーションのパラメータを調整した。その結果、構造ゆらぎの指標であるRMSFが相関係数0.8程度で一致した。このように、結晶構造周辺での構造ゆらぎを粗視化分子動力学シミュレーションで再現することに成功したので、120度回転前と回転後の2構造を繋ぐシミュレーションをMultiple-Goモデルを用いて実施した。その結果、軸回転の再現に成功し、その回転過程には、ATPの結合を促すような大きく開いた結晶構造に類似した構造が出現するなど、回転前と回転後の構造を単純に繋いだ径路からは得られない回転機構が明らかになった。

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4件)

T. Yoshidome, T. Ekimoto, N. Matubayasi, Y. Harano, M. Kinoshita, and M. Ikeguchi,

An accurate and efficient computation method of the hydration free energy of a large, complex molecule. *J. Chem. Phys.*, 査読有, 142, 175101 (11 pages), (2015) doi: 10.1063/1.4919636.

T. Ekimoto, N. Matubayasi, M. Ikeguchi: Finite-size effect on the charging free energy of protein in explicit solvent. *J. Chem. Theory Comput.*, 査読有, 11, 215-223 (2015) doi: 10.1021/ct5008394.

Y. Ito, M. Ikeguchi: Mechanism of the $\alpha\beta$ conformational change in F_1 -ATPase after ATP hydrolysis: free energy simulations. *Biophys. J.*, 査読有, 108, 85-97, (2015) doi: 10.1016/j.bpj.2014.11.1853.

T. Yamane, S. Murakami, M. Ikeguchi: Functional rotation induced by alternating protonation states in the multidrug transporter AcrB: All-atom molecular dynamics simulations. *Biochemistry*, 査読有, 52, 7648-7658 (2013) doi: 10.1021/bi400119v.

[学会発表](計7件)

Y. Isaka, Y. Kokabu, T. Ekimoto, T. Murata, M. Ikeguchi: Rotation mechanism of V_1 -ATPase studied by multi-scale MD simulation, 日本生物物理学会第53回年会, 金沢大学(石川県・金沢市)平成27年9月13-15日.

井阪悠太, 小甲裕一, 浴本亨, 村田武土, 池口満徳: マルチスケール分子動力学シミュレーションによる V_1 -ATPase の回転機構の解明, 日本蛋白質科学会第15回年会, あわぎんホール(徳島県・徳島市), 平成27年6月24-26日.

H. Kashimura, Y. Isaka, Y. Kokabu, M. Ikeguchi: Course-grained molecular dynamics simulation of V_1 -ATPase, 日本生物物理学会第52回年会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)平成26年9月25-27日.

Y. Isaka, T. Murata, M. Ikeguchi: Rotation mechanism of V_1 -ATPase studied by MD simulation, 日本生物物理学会第52回年会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)平成26年9月25-27日.

井阪悠太, 池口満徳: MDシミュレーションによる V_1 -ATPase の回転機構の解明, 日本蛋白質科学会第14回年会, ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)平成26年6月25-27日.

Y. Isaka, I. Yamato, T. Murata, M. Ikeguchi: Rotation mechanism of V_1 -ATPase studied by steered MD simulations, 日本生物物理学会第51回年会, 京都国際会館(京都府・京都市)平成25年10月28-30日.

池口満徳, エクサフロップス時代の計算蛋白質科学, 日本蛋白質科学会第13回年

会，とりぎん文化会館(鳥取県・鳥取市)平成
25年6月12-14日。

〔図書〕(計3件)

Y. Ito, M. Ikeguchi: Molecular dynamics simulations of F_1 -ATPase, in Protein Conformational Dynamics, K-L. Han, X. Zhang, M. Yang, Editors. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, 411-440 (2014).

池口満徳，山根努：生体系の分子シミュレーションと多剤排出トランスポーターへの応用．実験医学増刊 構造生命科学で何がわかるのか何ができるのか，32，64-67 (2014)．

伊藤祐子，池口満徳：全原子分子動力学計算が解き明かす回転分子モーターの作用機構．1 分子ナノバイオ計測，化学同人，99-109 (2014)．

6．研究組織

(1)研究代表者

池口 満徳 (IKEGUCHI, Mitsunori)
横浜市立大学・生命医科学研究科・教授
研究者番号：60261955

(2)連携研究者

村田 武士 (MURATA, Takeshi)
千葉大学・理学研究科・教授
研究者番号：80415322