

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 F1 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) Mechanism of chemical-mechanical energy conversion of F1 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：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. 研究計画の概要

研究代表者の林と分担者の池口は、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 F₁-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。サブユニット回転に伴うタンパク質の大域的構造変化から電子レベルの基質化学反応までの広い現象間の相関を考慮する最先端分子シミュレーション技術を駆使し、回転に伴う立体構造変化、及び ATP 合成・加水分解反応過程を原子・電子レベルから明らかにする。また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し、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。

2. 研究の進捗状況

研究代表者と分担者は、本特定領域でのこれまでの研究において、化学反応のシミュレーションを可能にするハイブリッド電子状態 / 分子力場 (QM/MM) 法と大規模分子動力学 (MD) 法を用いて、ATP 合成・加水分解反応過程の経路を同定した。その結果、プロトン移動反応が反応律速段階であることを予測し、ATP

加水分解反応の基本的機構を明らかにした。またその予測された反応機構は、本領域の野地らの D₂O を用いた一分子測定実験によって確認された。また、大規模 MD シミュレーションにより、ATP 反応待ち構造における揺らぎの解析を行い、β 及び γ サブユニットの間の顕著な相関を見出した。まだタンパク質構造の得られていない ATP 結合待ち状態の構造を、本領域の西坂らによって得られた β サブユニットの角度変化に基づき、targeted MD 法等を用いてモデリングを行った。得られた構造モデルに基づき、野地らのクロスリンク実験のデザインを行い、現在実験が進行中である。また、本領域の久堀ら及び加藤らの実験グループとの共同研究により、ε サブユニットに関する MD シミュレーションの研究を行った。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

ATP 反応待ち構造における加水分解反応機構の QM/MM 法を用いた解析：当初の計画では、以前の我々の研究 (Dittrich et al., Biophys. J. 87, 2954, 2004) の結果に基づき、さらに高精度の QM/MM 計算を進める予定であった。しかしながら、

本研究での予備的計算により、Dittrichらの計算はその精度に問題があり、高精度の計算による検証では実験事実と矛盾することがわかった。これは、以前の研究では、計算機資源の限界により結合部位の分子構造のモデリングが十分でなかったことに起因する。そこで、池口らのMD計算との緊密な連携により、様々な結合部位構造モデルの反応性を検証し、適切な反応部位構造モデルを構築した。これは、まさに本研究が提案する、異なる手法の密接な連携によるアプローチの成功例であるといえる。

4. 今後の研究の推進方策

MD計算により、ATP結合待ち状態のタンパク質構造のモデリングを完成する。さらに、ATP反応待ち状態から結合待ち状態に至る遷移途中構造のモデリングを開始し、 γ サブユニット回転中の構造変化の詳細を明らかにする。また、構造遷移における自由エネルギー変化も併せて見積もる。 ε サブユニットについても、MD-SAXS法により、ATP非結合型の構造モデリングを完成させる。また、QM/MM計算により、反応性の制御に重要である残基の変異体や基質アナログの反応性を明らかにする。特に実験的知見が得られつつあるアルギニンフィンガーの置換について活性化及び反応エネルギーの計算を行い、反応機構の詳細な解析を行う。また、ATP γ S等の基質アナログの反応性を解析することにより、求核攻撃をする水分子の活性化と γ リン酸の結合解離を明確に分離し、ATP加水分解反応の基本的な反応機構の決定を行う。さらに非天然アミノ酸を用いた変異体も検討することにより、顕著な機能活性を持つ変異体のデザインを行い、実験グループに提案する。

またMD計算によるATP反応待ち状態から結合待ち状態に至る回転遷移途中構造のモデリングを完了する。また遷移途中の構造において、構造揺らぎの解析を行うことにより、ドメイン回転運動を制御する分子機構を明らかにする。また、QM/MM計算により、回転遷移途中の反応性解析を完了し、加水分解反応性

を制御する機構を明らかにする。 ε サブユニットについては、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ サブユニットとの複合体のモデリングを行い、阻害機構の分子モデルを確立する。

5. 代表的な研究成果

(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19件)

1 T. Oroguchi, H. Hashimoto, T. Shimizu, M. Sato, M. Ikeguchi, Intrinsic dynamics of restriction endonuclease EcoO109I studied by molecular dynamics simulations and x-ray scattering data analysis (2009), *Biophys. J.* **96**, 2808-2822. 査読あり

2 Higashi, M., Hayashi, S., *Kato, S., Transition state determination of enzyme reaction on free energy surface: Application to chorismate mutase. (2007) *Chem. Phys. Lett.*, **437**, 293-297. 査読有

[学会発表](計42件)

1 Shigehiko Hayashi, Chemical Reactions in Photoreceptor and Motor Proteins Studied by hybrid QM/MM Simulations, Telluride Science Research Center Workshop on "Protein Dynamics", July 30-August 3, 2008 Telluride, Colorado (USA). 招待講演

2 Ikeguchi, M.: Molecular Dynamics Simulations of Protein Folding/Unfolding (2006) The 3rd Open Workshop: Chemistry of Biological Process Created by Water and Biomolecules, National Institutes of Natural Sciences, Okazaki (Japan). 招待講演

[図書](計2件)

1 池口満徳, 化学同人, 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(2008)6頁