

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 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300102

研究課題名（和文） 分子シミュレーションによる F1 分子モーターの回転機構の解明

研究課題名（英文） Study on rotation mechanisms of F1 molecular motor using molecular simulations

研究代表者

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科・准教授

研究者番号：60261955

研究成果の概要（和文）：

本研究では、F1 分子モーターの回転機構について、分子シミュレーションを用いた解析を行った。F1 分子モーターのエンジンである β サブユニットに対し、平衡分子動力学計算および自由エネルギー計算を行い、オープンクローズ構造間の遷移の様子を明らかにすることができた。 $\alpha\beta\gamma$ 複合体では、分子動力学計算および統計熱力学理論を適用し、サブユニット間でのパッキングの非対称性が回転機構の上で重要であるとする packing exchange model を提唱した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the rotation mechanism of the F1 molecular motor was investigated using molecular simulations. Conformational changes in the β subunit, an engine of the F1 molecular motor, were analyzed using equilibrium and free-energy MD simulations. Further, based on the results of MD simulations and statistical thermodynamics theory applied for the $\alpha\beta\gamma$ complex, the packing exchange model, in which the exchange of inter-subunit packing induces the rotational motion of the molecular motor, was proposed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2012年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：分子モーター・F1-ATPase・分子動力学・分子シミュレーション・立体構造変化

1. 研究開始当初の背景

F1 分子モーターは、ATP の加水分解に伴い、中央軸にあたる γ サブユニットが回転する分子モーターである。これまで、1 分子計測により γ サブユニット回転の直接観察が行われ、ATP 1 分子の加水分解あたり、 γ サブユニットは 1/3 回転（120°）すること、

その 120° のうち、80° は ATP 結合によって駆動され、40° は加水分解後に起こることなど、回転メカニズムの概要が明らかになっていた。また、X 線結晶解析により、F1 分子モーター全体の立体構造は原子レベルで決定されていたが、この構造は結晶中の静的な構造であり、分子モーターが作動中の動的過程については推測の域を出ていなかった。

一方、生体分子の分子動力学(Molecular Dynamics; MD)シミュレーションは、超並列型スーパーコンピュータの発展とともに、長足の進歩を遂げていた。この計算法は、すべての原子間の相互作用を逐次計算し、少しずつ(1~2 fs ずつ)原子の動きを追っていく計算法である。十年程度前は小さなモデルタンパク質にしか適用できなかったが、超並列分子動力学計算のアルゴリズム開発が進むにつれて、F1 分子モーターのような周囲の溶媒を含めると 30 万原子以上になる巨大な生体超分子の系に対しても分子動力学シミュレーションが可能になってきた。事実、スーパーコンピュータ「京」においても、生命系の分子動力学シミュレーションは主要なアプリケーションの一つとして位置づけられている。我々は、生体分子用分子動力学プログラム MARBLE を独力で一から開発を進めており、超並列計算を高効率で行うことができるように改良を続けている。すでに膜タンパク質水チャネルアクアポリン、カルシウムイオンポンプ、転写因子・制限酵素などの DNA 結合タンパク質など多くの生体分子に適用して、成果を挙げてきており、それを F1 分子モーターのような巨大系のシステムに対しても、適用可能な状態にあった。

2. 研究の目的

本研究は、コンピュータ・シミュレーションを用いて、F1 分子モーターの回転メカニズムの解明することを目的とした。超並列スーパーコンピュータにおいて、独自に開発した超並列計算用ソフトウェア MARBLE を用い、溶媒も露わに含んだ F1 分子モーターの全原子モデルの分子動力学シミュレーションを行う。F1 分子モーターの回転の際には、ATP 結合、ATP 加水分解、ADP 解離、リン酸解離の素過程があるが、それらの素過程がいかんして回転のトルクを発生させるのか、その分子メカニズムを明らかにする。ATP 結合や ADP やリン酸解離に伴う F1 分子モーター回転のエンジンである β サブユニットの開閉運動、 α - β サブユニット間パッキング変化、 α β γ 複合体での回転などに対する全原子分子動力学シミュレーションを遂行して、分子モーターの回転メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) β サブユニット解析

β サブユニットは、F1 分子モーターにおけるエンジン部分に相当し、ATP 結合に際して大きく屈曲し、回転軸である γ サブユニットを押して回転させる。また、 β サブユニッ

トの ATP 結合サイトにおいて、ATP 加水分解が起こる。

平衡 MD は、特に外力などを与えることなく、水中でのタンパク質の分子動力学計算を行い、その熱揺らぎを解析する計算法である。タンパク質の熱揺らぎの中には、そのタンパク質の立体構造に内在する特異的柔軟性が表れていることが多く、それを解析することで、それぞれのタンパク質の特徴的な運動のあり方を理解することができる。本研究では、水を露わに含んだ F1 β サブユニットに対する 100 ns の分子動力学シミュレーションを実行し、その熱揺らぎのあり方を解析した。

一方、平衡 MD では、時間スケールが 100 ns \cdot μ s 程度に限定されるため、リガンド結合などに伴うタンパク質の大きな構造変化を扱うことが困難である。その問題を乗り越えるために、構造変化について、Nudged Elastic Band (NEB) 法を用いて、エネルギー極小経路を求め、それを初期経路として、構造サンプリングを行い、構造変化の自由エネルギー曲面の計算を行った。具体的には、 β サブユニットにおける ATP 結合状態と非結合状態の双方に対し、アンブレラサンプリング MD シミュレーションを行い、構造変化に対する自由エネルギー曲線を得た。さらに、どのような因子がその自由エネルギーに寄与しているのかを解析した。

(2) α β γ 複合体解析

ここまでは、 β サブユニット単体に注目した計算であったが、回転運動を行う α β γ 複合体全体についても、水を露わに含んだ平衡 MD による構造揺らぎの解析を行った。この MD では、それぞれのサブユニットの構造揺らぎだけでなく、複数サブユニット間の相互作用にも着目して解析を行った。最初の計算では、牛のミトコンドリアの F1 分子モーターを対象としたが、続いては、リン酸解離に対応して、16 度中心軸が回転している酵母の F1 分子モーターを対象として MD 計算を行った。

MD 計算では、構造揺らぎやサブユニット間相互作用についての解析が可能であるが、回転メカニズムについての統計熱力学的な原理を探求するには、液体統計力学理論などの理論的アプローチを組み合わせる必要がある。本研究では、液体統計力学理論の専門家である京都大学の木下正弘教授のグループと共同研究を行い、F1 分子モーターの回転機構における水の役割について、木下先生のグループで開発を行っている分子性流体の積分方程式論と形態熱力学のハイブリッドアプローチを用いた研究を行った。

4. 研究成果

(1) β サブユニット解析

β サブユニットは、F1分子モーターにおけるエンジン部分に相当し、ATP結合に際し、大きく屈曲すると言われている。この研究を開始する前に、 β サブユニット単体のヌクレオチド非結合状態でのMD計算が行われており、その結果では、ヌクレオチド非結合状態であっても、 β サブユニットはクローズ構造になるということであった。一方、NMRを用いた実験では、ヌクレオチド非結合状態では、 β サブユニットはオープン構造のままであり、ヌクレオチド(ATPやADP)が結合して始めて、クローズ状態になるということであり、MDとNMR間で結果が一致していなかった。そこで、本研究では、従来のMDの約8倍の時間のMDを実行し、NMR結果との比較を行った。その結果、ヌクレオチド非結合状態の β サブユニットは、非常にフレキシブルであり、時々屈曲に近い構造になるものの、平均としてはオープン状態のままであり、NMR実験と一致していることがわかった。さらに、 β サブユニットの構造揺らぎのあり方について、主成分解析法を用いて解析を行ったところ、構造揺らぎの中に、機能に重要なオープン-クローズ方向の構造揺らぎが内在していることが明らかになった。しかし、完全にクローズ構造になるわけではないので、オープン-クローズ構造間にはある程度の自由エネルギーバリアが存在することを示唆している。

このような自由エネルギーバリアを平衡MDで超えるためには長時間の計算が必要になるが、現実的にはそのような計算を実行することは難しい。そこで、NEB法によって、オープン-クローズ構造間の構造遷移のエネルギー極小経路を求め、その経路周辺でのアンブレラサンプリングを行うことで、 β サブユニット構造変化の自由エネルギー曲面を求めた。ATP結合状態と非結合状態の双方に対し、構造変化の自由エネルギー曲面を計算したが、ATP非結合状態だとオープン構造のほうが安定で、ATP結合状態だとクローズ構造のほうが安定であるという、上記平衡MDおよびNMR実験と一致する結果を得た。さらに、リン酸周囲での水素結合ネットワークの掛け替えなど、いくつかの重要なイベントを構造変化経路上に同定した。さらに、ATP結合に際して、 β サブユニット屈曲の自由エネルギー減少をもたらす駆動力として、Bヘリックスがスライドすることによる疎水性効果を見出した。

(2) $\alpha\beta\gamma$ 複合体解析

β サブユニットの屈曲は、F1分子モーターの回転の鍵ではあるが、 β サブユニットだけで回転を引き起こしているわけではない。そこで、 $\alpha\beta\gamma$ 複合体全体の水を露わに含んだMDシミュレーションを実行し、複合体における構造揺らぎを解析した。複合体中には β サブユニットは三つ存在しているが、そのうち一つがオープン構造、二つがクローズ構造である。二つのクローズ構造は極めてよく類似しているにも関わらず、MD計算を行うとその揺らぎは大きく異なるという結果を得た。この原因は、隣の α サブユニットとの相互作用にあった。二つのクローズ構造のうち β_{DP} は、周囲を α サブユニットと極めて密なパッキングをしているのに対し、もう一つのクローズ構造である β_{TP} は、周囲の α サブユニットとそれほどパッキングが密でない。加えて、オープン構造である β_E は、さらに疎なパッキングをしており、それが構造揺らぎに関係していることが明らかになった。

このパッキングの非対称性について、京都大学の木下教授のグループと共同して、液体統計熱力学理論に基づく水のエン트로ピー解析を行った。生体分子の立体構造によく見られる密なパッキング構造は、水の並進エン트로ピー効果によってもたらされているが、水のエン트로ピー効果は、必ずしも均質なパッキングをもたらさず、優先的に局所的に密なパッキングに至ることもあることが知られている。F1分子モーターにおいても、そのような状態になっており、 β_{DP} 周辺において極めて密、 β_{TP} 周辺は中間的、 β_E 周辺は疎な状態というように、パッキング上、極めて非対称的な状態になっており、このようなパッキングの非対称性が、F1分子モーターの回転の際に伝搬し、回転の原動力となっているのではないかというpacking exchange modelを提案するに至った。この研究の実施後に、軸が欠落したF1分子モーターにおいて非対称な状態が「回転」しているということがAFM実験により明らかになった。このことは、packing exchange modelの妥当性を示唆している。

上記のMDおよび統計熱力学理論研究は、ある一つの複合体構造の構造に基づいて行ったのであるが、複数の状態間の遷移を扱うことで、よりモデルの妥当性を検討できる。しかし、上記のMDおよび統計熱力学理論計算に用いた牛ミトコンドリアのF1モーターでは、多数のX線結晶構造が報告されているものの、それらの複合体構造が対応する状態は本質的に一通りであり、異なった状態間の遷移を扱うという観点では難点があった。最近、酵母のF1モーターのX線結晶構造が発

表され、その研究ではリン酸解離に伴って、16 度 γ サブユニットが回転している二つの状態の立体構造が解かれていた。そこで、この二つの構造について MD および統計熱力学理論計算を行うことで、packing exchange model の検討を行った。その結果、リン酸解離に伴って変化するサブユニット間パッキングの変化は、packing exchange model と整合するものであった。

この他、F1 分子モーターに対する MD では複数の共同研究を行った。その中の一つは、量子化学計算の専門家である京都大学の林准教授のグループ、および、一分子計測の専門家である東京大学の野地教授のグループとの共同で行った F1 分子モーターにおける ATP 加水分解反応計算である。この研究では、量子化学計算により、F1 分子モーター内の ATP 加水分解反応経路の特定を行い、一分子実験による検証を行った。この研究では、我々のグループは MD 計算を担当した。また、東京大学の野地グループとは、 β サブユニットの DELSEED ループの変異体に関して、一分子計測と MD 計算の共同研究を行った。この研究では、 β サブユニットと γ サブユニットの接触部位である DELSEED ループをすべてアラニンやグリシンに変異させ、それがどのように回転トルクに影響するのかという研究を行った。我々のグループでは変異体構造を計算機中でモデリングし、その構造に対して MD 計算を行うことにより、変異の影響についてのモデルを提案した。

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 9 件)

- ① Y. Ito, T. Yoshidome, N. Matubayasi, M. Kinoshita, M. Ikeguchi: Molecular dynamics simulations of yeast F₁-ATPase before and after 16-degree rotation of the γ Subunit. *J. Phys. Chem. B*, 117, 3298-3307 (2013). 査読有, DOI: 10.1021/jp312499u
- ② S. Hayashi, H. Ueno, A.R. Shaikh, M. Umemura, M. Kamiya, Y. Ito, M. Ikeguchi, Y. Komoriya, R. Iino, H. Noji: Molecular mechanism of ATP hydrolysis in F₁-ATPase revealed by molecular simulations and single molecule observations. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 8447-8454 (2012). 査読有, DOI: 10.1021/ja211027m
- ③ T. Yoshidome, Y. Ito, N. Matubayasi, M. Ikeguchi, M. Kinoshita: Structural characteristics of yeast F₁-ATPase before

and after 16-degree rotation of the γ subunit: Theoretical analysis focused on the water-entropy effect. *J. Chem. Phys.*, 137, 035102 (8 pages) (2012). 査読有, DOI: 10.1063/1.4734298

- ④ M. Tanigawara, K.V. Tabata, Y. Ito, J. Ito, R. Watanabe, H. Ueno, M. Ikeguchi, H. Noji: Role of the DELSEED loop in torque transmission of F₁-ATPase. *Biophys. J.*, 103, 970-978 (2012). 査読有, DOI: 10.1016/j.bpj.2012.06.054
- ⑤ Y. Ito, T. Oroguchi, M. Ikeguchi: Mechanism of the conformational change of the F₁-ATPase β subunit revealed by free-energy simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 3372-3380 (2011). 査読有, DOI: 10.1021/ja1070152
- ⑥ T. Yoshidome, Y. Ito, M. Ikeguchi, M. Kinoshita: Rotation mechanism of F₁-ATPase: crucial importance of water-entropy effect. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 4030-4039 (2011). 査読有, DOI: 10.1021/ja109594y
- ⑦ 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 ϵ of F₁-ATPase from photosynthetic organisms. *Biochem. J.*, 425, 85-94 (2010). 査読有, DOI: 10.1042/BJ20091247
- ⑧ Y. Ito, M. Ikeguchi: Structural fluctuation and concerted motions in F₁-ATPase: a molecular dynamics study. *J. Comput. Chem.*, 31, 2175-2185 (2010). 査読有, DOI: 10.1002/jcc.21508
- ⑨ Y. Ito, M. Ikeguchi: Molecular dynamics simulations of the isolated β subunit of F₁-ATPase. *Chem. Phys. Lett.*, 490, 80-83 (2010). 査読有, DOI: 10.1016/j.cplett.2010.03.015

[学会発表] (計 13 件)

- ① Y. Ito, T. Yoshidome, N. Matubayasi, M. Kinoshita, M. Ikeguchi: Molecular dynamics simulation on structural characteristics of yeast F₁-ATPase before and after 16-degree rotation of gamma subunit, The 57th Annual Meeting of Biophysical Society, 2013 年 2 月 2 日 ~ 6 日, Philadelphia, USA.
- ② M. Ikeguchi: Theoretical study on rotation mechanism of molecular motor F₁-ATPase,

- The 12th KIAS Conference on Protein Structure and Function, 2012年10月11日～13日, Seoul, Korea. 招待講演.
- ③ 池口満徳: F1分子モーターの分子シミュレーション, 計算物質科学イニシアティブ計算分子科学研究拠点第3回研究会, 2012年10月9日～10日, 岡崎, 招待講演.
- ④ Y. Ito, T. Yoshidome, N. Matsubayashi, M. Kinoshita, M. Ikeguchi: Molecular dynamics simulation on structural characteristics of yeast F_1 -ATPase before and after 16-degree rotation of gamma subunit, 日本生物物理学会第50回年会, 2012年9月22日～24日, 名古屋
- ⑤ Y. Ito, T. Oroguchi, M. Ikeguchi: Mechanism of the conformational change of the F_1 -ATPase β subunit revealed by free-energy simulations, 56th Annual Meeting of Biophysical Society, 2012年2月25日～29日, San Diego, USA.
- ⑥ T. Yoshidome, Y. Ito, N. Matubayasi, M. Ikeguchi, M. Kinoshita: A novel rotation mechanism of F_1 -ATPase based on the water-entropy effect, 56th Annual Meeting of Biophysical Society, 2012年2月25日～29日, San Diego, USA.
- ⑦ M. Tanigawara, J. Ito, Y. Ito, R. Watanabe, K. Koyasu, M. Ikeguchi, K. V. Tabata, H. Noji: Specific interaction between C terminal domain of β and γ of F_1 -ATPase is dispensable for torque transmission, 日本生物物理学会第49回年会, 2011年9月16日～18日, 姫路
- ⑧ T. Yoshidome, M. Ikeguchi, M. Kinoshita: A theoretical analysis on water-entropy change in yeast F_1 -ATPase during 16 degrees rotation of gamma subunit, 日本生物物理学会第49回年会, 2011年9月16日～18日, 姫路
- ⑨ M. Ikeguchi: Theoretical study on rotational mechanism of F1 molecular motor and asymmetric structures, 日本生物物理学会第49回年会, 2011年9月16日～18日, 姫路, 招待講演
- ⑩ M. Ikeguchi: Theoretical study on rotation mechanism of molecular motor F_1 -ATPase, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010年12月15日～20日, Honolulu, USA, 招待講演
- ⑪ 吉留崇, 伊藤祐子, 池口満徳, 木下正弘: F_1 -ATPaseの回転のメカニズムにおける水のエン트로ピーの重要性, 日本物理学会秋季大会2010年9月23日～26日, 大阪
- ⑫ T. Yoshidome, Y. Ito, M. Ikeguchi, M. Kinoshita: Crucial importance of

translational entropy of water in rotation mechanism of F_1 -ATPase, 日本生物物理学会第48回年会2010年9月20日～22日, 仙台

- ⑬ Y. Ito, T. Oroguchi, M. Ikeguchi: Investigation of the conformational change of the F_1 -ATPase (β subunit) via molecular dynamics simulation, 日本生物物理学会第48回年会, 2010年9月20日～22日, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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科・准教授
 研究者番号: 60261955