

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840051

研究課題名(和文)ATPaseファミリー全体に当てはまる一般的な構造変化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigating the structural change mechanism commonly underlying over the ATPase family

研究代表者

伊藤 祐子 (Ito, Yuko)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教

研究者番号：00608698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ATPaseはエネルギーに関する広汎な反応を担う蛋白質ファミリーであり、構造変化を通して、多種多様な機能発現に至る。申請者は、このATPase蛋白質の構造変化に共通するメカニズムを明らかにすべく研究を行った。

一連のATPaseの構造変化は、基質であるATPの3つのイベント(ATP結合、加水分解反応、生成物解離)によって引き起こされる。従って、構造変化の全貌を知るには、それら異なるステップによる構造変化のメカニズムを個別に明らかにする必要がある。申請者は、F1-ATPaseのbetaサブユニットを用いすべてのステップのメカニズムを明らかにし、他のATPaseに当てはまるかどうか検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Enzymes of the ATPase family accomplish various functions using ATP hydrolysis energy, which is widely used in all living organisms. All proteins including this important ATPase, proceed their own reaction (function) along with the structural change. So as to understand the ATPase mechanism commonly underlying over ATPase family, the structural change of ATPase were investigated. The structural change of ATPase comprises the three different conformational changes: by ATP binding, by ATP hydrolysis, and by product release. To obtain the whole mechanism, all the steps need to be clarified. The beta subunit of F1-ATPase which has been studied extensively, was selected as representation of the ATPase family protein. Using the MD simulations, all the steps of the conformational change in the beta subunit were revealed. The mechanism obtained here was compared with that of other ATPases.

研究分野：生体分子のシミュレーション

キーワード：分子動力学計算

1. 研究開始当初の背景

ATPase 蛋白質は、筋収縮や細胞内物質輸送、ATP の合成などエネルギーに関する広汎な反応を担う重要な蛋白質ファミリーである。その多様な機能発現の際には、ATP 分子を介して立体構造を変化させている。

すべての(Walker型)ATPase蛋白質はヌクレオチド結合部位に、Walker A/Bモチーフと P-loop を共通に保持するが、それらがATP加水分解反応に重要な役割を果たすことは明らかになっている。<sup>1</sup> しかし、それら局所構造がATPase蛋白質の全体の構造変化に関わることは知られていない。もし、は機能発現に至る構造変化の過程で何らかの重要な役割を果たしているとするならば、Walker A/BモチーフとP-loop はATPaseファミリー間で非常に強く保存されていることから、それらが構造変化で果たす役割は、ATPase間で共通な可能性がある。

2. 研究の目的

ATPase 蛋白質に普遍的に存在する Walker A/Bモチーフと P-loop はATPase の構造変化の過程で重要な役割を果たしているかどうかを明らかにする。

もし、その部分が ATPase の構造変化の重要な部分を担っているとするならば、それらはATPase ファミリー間で共通かどうかを調べる。

3. 研究の方法

ATPase蛋白質の構造変化は、基質であるATPの3つのイベント(ATP結合、加水分解反応、生成物解離)によって引き起こされる。従って構造の全貌を知るには、それら異なるステップによって引き起こされるすべての構造変化のメカニズムを個別に明らかにしていく必要がある。これらメカニズムを明らかにする対象として、回転分子モーター F<sub>1</sub>-ATPaseをATPaseファミリーの代表として選んだ。選んだ理由は、ATPaseの中でもっとも研究が進んでおり多くの実験データが存在するからである。しかし、F<sub>1</sub>-ATPaseはα<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ複合体の巨大分子であり、実際ATPを介して直接構造変化する部分は、βサブユニットのみであるため、本研究ではF<sub>1</sub>-ATPaseのβサブユニットに照準を絞って研究を進めた。

このF<sub>1</sub>-ATPaseのβサブユニットの構造変化のメカニズムを知る手段としては、原子レベルで連続した情報が得られる理論手法、アンサンブルサンプリング法を用いた。この方法は1つの時系列のMD計算ではなく、複数のMD計算を独立に行い、得られる中間体の個体数から、構造変化に伴う自由エネルギー変化量を求める。この手法では、タンパク質の構造変化を定量的に評価できる

以上のようにして得られたメカニズムが

ATPase ファミリー間で共通かどうかを他の蛋白質でも調べた。

4. 研究成果

まずATP結合によるβサブユニットの構造変化(Open → Closed)をシミュレーションした。ATP結合/非結合型での、βの構造変化に伴う自由エネルギー変化を図1Aに示す。(反応座標には、OpenとClosed構造からのRMSD(平均二乗偏差)の差: ΔDrmsdを選んだ。)ATP結合型ではClosed構造のエネルギー状態が低く、逆に非結合型ではOpen構造が低い。これは、ATPを結合したβサブユニットは自発的に構造変化(Open → Closed)するが、非結合の場合、Openのままであることを示す。次に、自由エネルギー地形で(図1A)その変化量の原因となっている局所部分の変化を探るため、アミノ酸の相互作用距離や側鎖配座変化などを測定した。それらの結果を反応座標軸に沿ってまとめると、局所部分の変化の順序やその因果関係、つまり“メカニズム”がわかる(図1C)。βのATP結合による構造変化は、大まかに2段階から成る。

- ① ATP 周りの水素結合の架け替え。(図1AとC, Open → Int.)
  - ② C 端ドメインの大規模な構造変化。(図1AとC, Int. → Closed)
- Int. および i, ii, iii, Uphill (1), Downhill (2), 等は図説を参照。

得られた計算結果は、既存の実験データと整合するうえ、さらにそこから未知の事象も明らかになった。

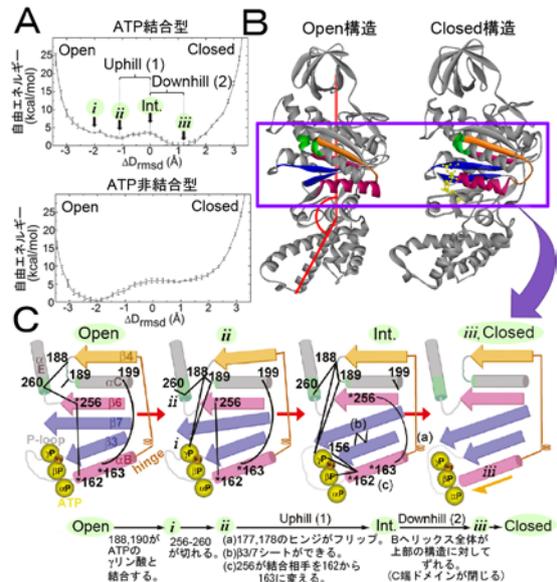


図1 (A) : B の構造変化に伴う自由エネルギー地形。ATP結合型での各極小点は i, ii, iii, エネルギーが上下する部分を Uphill(1), Downhill(2) とし、その峠を Intermediate, Int. とした。(C) : 各極小を遷移する間の局所部分の構造変化を段階的に示す。トポロジー図は(B)の四角部分に対応 (配色も対応)。数字はアミノ酸番号 (Bovine の F<sub>1</sub>-ATPase) を示し、黒線は水素結合。

まず①の部分で Walker A モチーフと B モチーフの間での水素結合の切り替えと、<sup>2</sup>ヒンジ部分 (His177, Gly178) の二面角回転<sup>3</sup>が起こる。これらは実験で、構造変化に必要な不可欠な部分であることが確かめられている。さらに、Walker A/B は P-loop と協奏的に構造を変化させ、この変化が主なエネルギー障壁 (ii → Int. の Uphill (1), 図 1A) になっていることがこの計算で明らかになった。次に②は、①で蓄積された ATP 結合周辺の構造歪みを解消すべく、B helix (図 2C の赤矢印) が隣接する上部構造に対して相対配置を変化させることで起こる。B helix の構造変化自体は helix の 1 巻き分ほどだが、作用点である C 端ドメインでは大きな構造変化となって現れる (図 2C)。配置変化により自由エネルギーが約 5 kcal/mol 安定になるが、(B helix の RMSD が Downhill (2) に相当する  $\Delta Drmsd = 0 \rightarrow 1.4$  にかけて、変化している。図 2B) これは helix 上の疎水性相互作用が増えることによる。複合体では、②こそが  $\alpha_3\beta_3$  リングの形状を積極的に変化させ、軸回転を促しているため、いわゆるトルクの出所である。

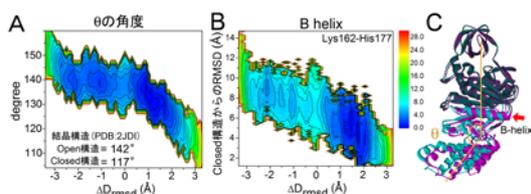


図 2 (A) (B) : 横軸は反応座標  $\Delta Drmsd$ , 縦軸は局所構造の変化、色は自由エネルギーの変化量。(A) : C に示す  $\theta$  の角度変化量 (C 端ドメイン全体の構造変化)。(B) : B helix の配置変化を Closed 構造からの RMSD 値で示す。(C) : ピンクとシアンは B helix 変化前後 ( $\Delta Drmsd = 0.0, 1.4$ ) の構造。

次に ATP 加水分解による  $\beta$  サブユニットの構造変化 (Closed  $\rightarrow$  Open) をシミュレーションした。この ATP 加水分解過程でまず問題になっているのが、ATP 加水分解生成物の一つであるリン酸が加水分解後すぐに解離してから、 $\beta$  サブユニットの構造が Open になるのか、それともリン酸は加水分解後、反応サイトにとどまったまま、構造は Open になるのかという問題であった。そこで、この ATP 加水分解後の構造変化のシミュレーションは、リン酸がサイトに結合したまま構造が Open になるパターンと、リン酸がすぐに解離した (結合サイトには ADP のみ) 状態で Open になる 2 つのパターンについて、同様にアンサンブルサンプリングを行い、自由エネルギー地形を得た。そのプロファイルを図 3 に示す。図 3B が示すように、リン酸が解離してから構造が Open になる場合には、Closed から Open 構造になる間に大きなエネルギーのバリアがあるのに対して、リン酸が結合サイトにとどまった場合は、構造変化はバリアレスに起こる。従って、この計算によ

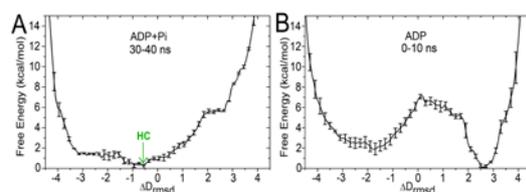


図 3  $\beta$  の構造変化に伴う自由エネルギー地形。A はリン酸が活性部位に結合したままでの構造変化。B はリン酸が解離した状態での構造変化。

り、リン酸が解離のタイミングを明らかにすることができた。そこでさらに、リン酸を伴って構造が Open になる場合のメカニズムを調べてみた。すると、図 4 に示すように生成物のリン酸と ADP のお互いが徐々に離れていくのに伴い、(ATP 結合による closed 方向の構造変化でも重要であった) B-helix が、Open 方向にスライドすることで全体構造を Open に向かわせることが分かった。このリン酸と ADP をそれぞれガイドする残基は、Walker A/B であった。ここでは、リン酸と ADP の距離が十分離れたところで、Walker A/B の側鎖配座が変化し、それに伴って P-loop の主鎖にも変化する。最終的には P-loop に結合していた生成物 (ADP) の解離が起こる。以上のように、活性部位の重要なアミノ酸の連動したの動きにより生成物が解離することも明らかになっている。

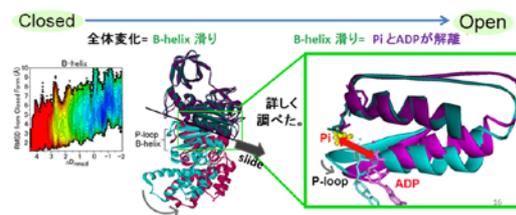


図 4 Closed から Open 構造になるときの主要な変化をまとめた。

この  $F_1$ -ATPase で明らかになったメカニズムが他の ATPase 蛋白質に当てはまるかどうかを調べてみた。まず立体構造を調べてみると、Walker A/B モチーフと P-loop は、1 次元のアミノ酸配列上に保存されているだけでなく、立体構造上でも  $F_1$ -ATPase と同じような空間配置に位置していることが確かめられた。またさらに、ATPase にとどまらず他のヌクレオチド (GTP) 加水分解酵素にもそれらに相当する部位が存在することも分かってきている。このことから、ここに示した  $F_1$ -ATPase での構造変化のメカニズムが共通であることが強く示唆される。その詳細を明らかにする研究は、現在進行中である。

#### <引用文献>

- ① S. Hayashi, et al., (2012) J. Am. Chem. Soc. 34: 8447-8454.
- ② Yagi, H. et al. (2009) J. Biol. Chem. 284,

2374-2382.

③Masaike, T. et al. (2000) J. Exp. Biol. 203, 1-8

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 3 件)

① 藤村 章子、伊藤 祐子、池口 満徳、足立 健吾、矢島 潤一郎、西坂 崇之、Dissection of the angle of single fluorophore attached to the nucleotide in corkscrewing microtubules. Biochemical and Biophysical Research Communications 485: 614-620 (2017) DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.165 査読有

② 伊藤 祐子、池口 満徳、The mechanism of the  $\alpha\beta$  conformational change in  $F_1$ -ATPase after the ATP hydrolysis: Free-energy simulation. Biophysical Journal 108: 85-97 (2015) DOI:10.1016/j.bpj.2014.11.1853 査読有

③ 伊藤 祐子、池口 満徳、全原子分子動力学計算が解き明かす分子モーターの回転機構. 生物物理 55: 23-26 (2015) DOI: 10.2142/biophys.55.023 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 三上 渚、伊藤 祐子、須河 光弘、池口 満徳、西坂 崇之、1 分子観察とドッキングシミュレーションで蛍光基質を通じで明らかになった化学反応に伴う酵素の構造変化、第 54 日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 26 日、つくば国際会議場 (茨城、つくば)

② 藤村 章子、伊藤 祐子、足立 健吾、池口 満徳、西坂 崇之、等方型TRIFMとデフォーカスイメージングによる単一蛍光色素の角度と回転方向の検出、第 53 日本生物物理学会年会、2015 年 9 月 13 日、金沢大学(石川、金沢)

③ 伊藤 祐子、池口 満徳、The conformational change mechanism of the  $\beta$  subunit in  $F_1$ -ATPase revealed by all-atom MD simulations. 第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 27 日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌)

④ 伊藤 祐子、池口 満徳、Molecular dynamics simulations of  $F_1$ -ATPase. 第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 27 日、ワークピア横浜 (神奈川、横浜)

[図書] (計 2 件)

① 伊藤 祐子、池口 満徳、Molecular dynamics simulation of  $F_1$ -ATPase (chapter 17), Protein Conformational

Dynamics (Ming-jun Yang, ed). Springer, Dordrecht, Netherlands 411-440 (2014)

② 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 (第 7 章)、一分子ナノバイオ計測 (野地博行編). 化学同人 京都 99-109 (2014)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 祐子 (ITO, Yuko)  
横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教  
研究者番号: 00608698

(2) 研究協力者

政池 知子 (MASAIKE, Tomoko)  
東京理科大学・理学部応用生物科学科・講師  
研究者番号: 60406882