

# 分子シミュレーションによる生体分子マシンの機能ダイナミクス解明とその制御

岡崎 圭一 理論・計算分子科学研究領域 特任准教授(若手独立フェロー)

おかざき けいいち

2004年京都大学理学部卒業。2009年神戸大学大学院自然科学研究科博士課程修了、博士(理学)。2009年早稲田大学理工学術院にて日本学術振興会特別研究員(PD)、2012年米国国立衛生研究所にて日本学術振興会海外特別研究員、2014年マックスプランク生物物理学研究所博士研究員を経て、2016年6月より現職。専門は、理論生物物理学。



## はじめに

私が研究の対象としているモータータンパク質やトランスポータータンパク質は、生体分子マシンと呼ばれている。「生体分子マシン」という言葉は、生物進化の結果生み出された生体分子が、人工的なマシンのように動作しているという印象に由来している。分子マシン(モレキュラーマシン)という言葉が最初に使われたのは1970年代初頭で、生物物理学のパイオニア的存在である大沢文夫が発案したらしい<sup>[1]</sup>。実際に、リニアモーター、回転モーター、ポンプといった機能をする生体分子マシンが発見されてきた。しかし、このような生体分子マシンが原子・分

子レベルでどのように動作しているのかについては、まだ分かっていないことが多い。私は、生体分子マシンが機能する際の構造ダイナミクスを分子シミュレーションで明らかにすることで、生体分子マシンの動作メカニズムとそのデザイン原理を深く理解することを目指している。本記事では、回転モーターであるF<sub>1</sub>-ATPase、特殊なポンプであるNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の研究を中心に紹介する。

## F<sub>1</sub>-ATPaseの回転メカニズム

ATP合成酵素は、バクテリアからヒトまで、あらゆる生物の生命活動に必須なエネルギー源ATPを合成す

る酵素である。このATP合成酵素は、プロトン勾配を用いて、回転運動を介した触媒機構により、ATPを合成する。プロトン勾配を回転運動に変換する膜部位はF<sub>o</sub>、その回転運動からATPを合成する触媒部位はF<sub>1</sub>とそれぞれ呼ばれている。F<sub>1</sub>(F<sub>1</sub>-ATPase)自体は、ATPを加水分解して回転子γサブユニットを逆方向に回転させるナノモーターである。つまり、ATP合成酵素は、F<sub>o</sub>とF<sub>1</sub>という異なる動力源により動く2つのモーターから成っており、プロトン勾配によりF<sub>o</sub>主導で働くと本来の役割通りATPを合成するが、ATP加水分解によりF<sub>1</sub>主導で働くとプロトンを汲み出すポンプになるという可逆的なマシンである。以下では、F<sub>1</sub>の動作メカニズムについての研究について述べたい。

初めてF<sub>1</sub>のγサブユニットの回転を直接観察した1997年の1分子実験から、日本のグループを中心にその回転メカニズムの解明が行われてきた。主な興味としては、F<sub>1</sub>の3つの触媒部位における化学状態とγサブユニットの回転がどのように共役しているのかという化学力学共役メカニズムについてである(図1)。特に、私がF<sub>1</sub>の研究を始めた2010年前後には、回

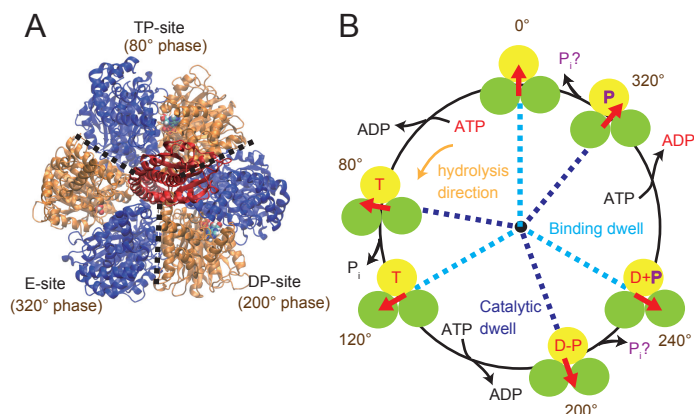


図1. (A) F<sub>1</sub>-ATPaseの構造を示す。触媒サイトは、αサブユニット(青色)とβサブユニット(オレンジ色)の界面にある。回転子γサブユニット(赤色)は、リング状構造の中心にはまっている。(B) 化学力学共役スキームを示す。黄色・緑色の丸は触媒サイトを表す。

転力を生み出す過程であるリン酸解離がどのタイミングで起きているか、という点が議論になっていた。簡単に言うと、ATP加水分解反応が起こるとADPとリン酸になるが、リン酸がADPより先に解離するか、もしくは、後に解離するかという問題である。1分子実験により、あるグループは先に解離説を唱え<sup>[2]</sup>、別のグループは後に解離説を唱えていた<sup>[3]</sup>。結晶構造に基づいて言うと、リン酸がDPサイトから解離するか、もしくは、Eサイトから解離するかという問題である(図1)。

この問題に、全原子分子動力学(MD)シミュレーションを用いて取り組んだ<sup>[4]</sup>。しかしながら、溶媒分子も含めたF<sub>1</sub>-ATPaseの系は、約30万原子とかなり大規模になるため、機能的時間スケール(ミリ秒)の直接的シミュレーションは非現実的である。そこで、外力を加えて機能的運動を促進させる手法の一つであるMetadynamicsを用いて、リン酸解離のシミュレーションをDPサイトからとEサイトから行った。すると、2つのサイトからまるで異なる経路で解離することが分かった(図2)。EサイトからはP-loop(青色で示されている)を経由して解離するのに対し

て、DPサイトからは右側(リングの内側)に向かって解離する経路を取る。この過程の自由エネルギーを見積もると、Eサイトからの障壁は5~10 kcal/molなのに対して、DPサイトから障壁は~30 kcal/molとかなり高い。さらに、この自由エネルギープロファイルとリン酸の拡散係数からクラマース理論を用いて計算した時定数を実験と比べると、Eサイトから2価のリン酸イオンが解離する場合に実験値とよく合うことが分かった。以上により、リン酸がEサイトから解離する(つまり、ADPの後に解離)ことを、初めて原子レベルのダイナミクスから示した。

この他にも、リン酸解離による触媒サブユニット界面の構造変化が、γサブユニットの回転と連動していることを示して、リン酸解離による回転力発生メカニズムを明らかにした<sup>[4]</sup>。さらに、外力をかけてγサブユニットを回転させることで、そのねじれ弾性と摩擦係数を見積もり、最大回転速度の理論値を導き出した<sup>[5]</sup>。これにより、F<sub>1</sub>の“瞬間”回転速度は、1 MHz(1マイクロ秒で1回転に相当する)にも達する高速回転モーターであることを理論的に予測した。

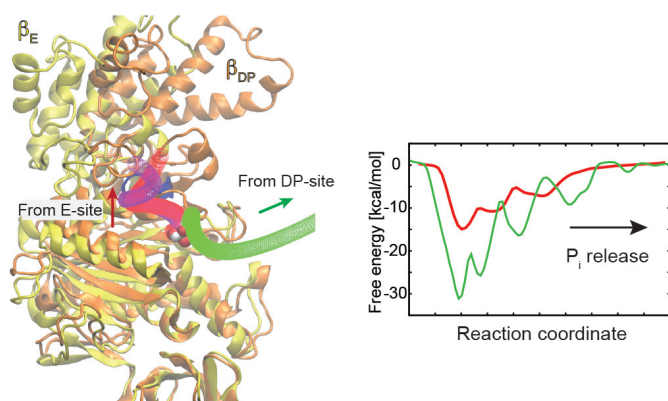


図2 DPサイト、Eサイトからのリン酸解離の経路と自由エネルギープロファイルをそれぞれ緑色、赤色で示す。

### Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体のイオン輸送メカニズムと輸送速度制御

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体は、ナトリウムイオンとプロトンを生体膜の内外で交換するトランスポーターである。ヒトにおいてはNHEと呼ばれていて心不全や自閉症などの発症に関与しており、植物においては塩耐性に関わっている。基本的な仕組みとしては、一方のイオンの濃度勾配を使ってそのイオンを勾配に沿って輸送する過程に共役させて、他方のイオンを勾配に逆らって輸送する(図3A)。このような特殊なポンプであるNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体のヒトや植物由来のもの立体構造はよくわかっていないが、古細菌由来のもの(PaNhaP)の結合サイトが内側に開いた構造は結晶構造解析により2014年に得られた。しかしながら、1つの静的な構造のみではその基質輸送サイクルの全体像はわからない。我々は、全原子MDシミュレーションを用いて基質イオン輸送メカニズムの解明を目指した<sup>[6]</sup>。

トランスポーターは、結合サイトが膜の内側・外側に交互に露出するように構造を変化させながら基質輸送して

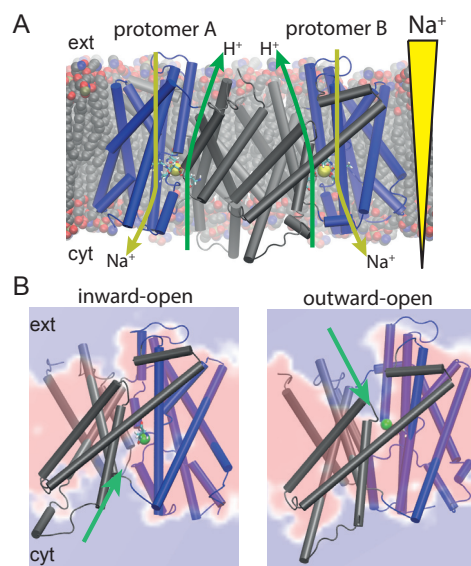


図3 (A) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体PaNhaPのダイマー構造。(B) 内向き開構造と外向き開構造。矢印は、イオン結合サイトを示している。

いること（交互アクセスモデル）が一般的に知られている。PaNhaPに関しては、結晶構造で内向き開構造は得られていたため、外向き開構造を知る必要がある。そこで、別の古細菌由来のホモログNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体で得られていた外向き開状態の低解像度（6 Å程度）クライオ電子顕微鏡マップを参照した構造モデリングと長時間MDシミュレーションにより、安定な外向き開構造を得た。これにより、PaNhaPの交互アクセスは、トランスポータードメインがダイマー化ドメインに対して動くことで実現されていることが分かった（図3A, Bでそれぞれのドメインを青色・灰色で表示）。

交互アクセスを実現する内向き開・外向き開構造が分かったが、それだけではイオンが輸送される前後のことしか分からない。秒の時間オーダーで（分子スケールでは）稀に起こるイオン輸送の瞬間を原子レベルで直接的にシミュレーションするのはとてもコストが高く現実的でない。ここでは、遷移パスサンプリング（Transition path sampling）という重要な動きが起こる瞬間だけを切り出してシミュレーションを行う技術を応用することで、イオン輸送が起こる瞬間のシミュレーションを行った。この遷移パスサンプリングにより、結合サイト上下に存在する疎水性残基ペアが、水分子やイオンのアクセスを制御するゲートとして

働いていることが分かった。さらに、最尤法を用いた反応座標解析により、結合サイトの上に存在する外側ゲート（Ile163-Tyr255）の開閉が遷移状態をよく記述するオーダーパラメータで、律速過程であることが分かった（図4）。

さらに、シミュレーションにより明らかにした律速過程に基づいて、イオン輸送速度の制御を目指した。我々は、律速過程であると示された外側ゲート（Ile163-Tyr255）の相互作用を弱めて遷移状態のバリアを下げることで、輸送速度を向上させることができるのではないかと考えた。この考えに基づいて、相互作用を弱める変異（両方をAlaに置換）を施してやって、この変異体のイオン輸送能を実験的に測定した。その結果、野生型よりもイオンを2倍以上速くイオン輸送することが分かり、イオン輸送速度の制御に成功した。重要な部位に変異を施すと機能が低下するのが普通であることを考えると、今回の変異体による機能向上は驚くべき結果である。

#### おわりに

自然は多種多様な生体分子マシンを生み出しており、興味は尽きない。分子研に赴

任して以来、糖鎖を分解しながら進むリニアモーターであるキチナーゼや<sup>[7,8]</sup>、生体膜の変形に関わっている成形マシンPacsin1にも取り組んでいる<sup>[9]</sup>。今後も、生体分子マシンの分子レベルでの仕組みを解き明かしていきたい。

本記事で紹介した研究は、マックスプランク生物物理学研究所のGerhard Hummer教授との共同研究による成果である。また、研究遂行にあたり、日本学術振興会、計算物質科学人材育成コンソーシアムPCoMS、分子科学研究所にご支援頂いた。ここに、深く感謝します。

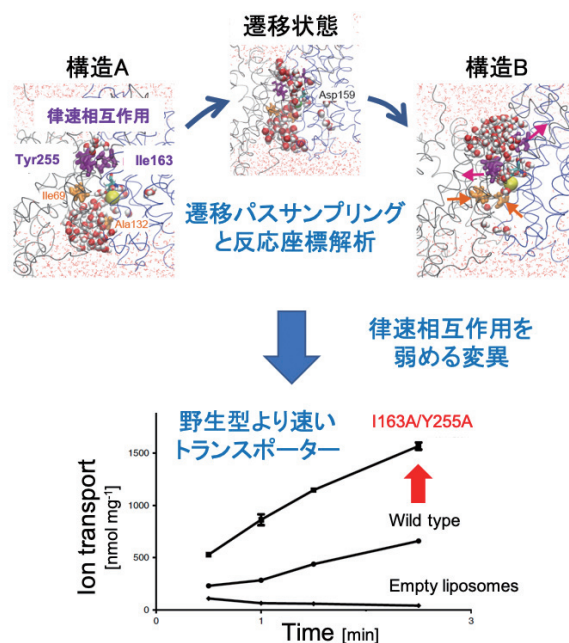


図4 遷移パスサンプリングと反応座標解析による律速相互作用の同定に基づいて、トランスポーターのイオン輸送速度を向上させることに成功した。

#### 参考文献

- [1] 大沢文夫「飄々楽学-新しい学問はこうして生まれつづける」白日社 (2005)
- [2] R. Shimo-Kon *et al.*, *Biophys. J.* **98**(7):1227–1236 (2010)
- [3] R. Watanabe, R. Iino and H. Noji, *Nat. Chem. Biol.* **6**(11):814–820 (2010)
- [4] K. Okazaki and G. Hummer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**(41):16468–16473 (2013)
- [5] K. Okazaki and G. Hummer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**(34):10720–10725 (2015)
- [6] K. Okazaki *et al.*, *Nat. Commun.* **10**:1742 (2019)
- [7] A. Nakamura *et al.*, *Nat. Commun.* **9**:3814 (2018)
- [8] K. Okazaki, A. Nakamura and R. Iino, *J. Phys. Chem. B* **124**(30), 6475–6487 (2020)
- [9] M. I. Mahmood, H. Noguchi and K. Okazaki, *Sci. Rep.* **9**:14557 (2019)