

第 IV 部 筋小胞体カルシウムポンプの 分子動力学計算

1. 筋小胞体カルシウムポンプの機能

筋小胞体カルシウムポンプ (sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA1a) は P 型の ATPase であり, 筋小胞体膜中に存在し, 筋肉の収縮弛緩を司る膜タンパク質である. カルシウムポンプは 1 個の ATP を加水分解し 2 個の Ca^{2+} を細胞質から小胞体内腔へ 10000 倍もの濃度勾配に逆らって能動輸送する¹. このとき 2 つあるいは 3 つのプロトン を逆方向に輸送する (プロトン対抗輸送). Ca^{2+} 結合部位は膜貫通部位に存在している. P 型 ATPase の反応機構は古くから調べられており, 古典的な E1/E2 反応モデル²⁻⁴が有名である (図 4-2-1-1). E1 状態では Ca^{2+} 結合部位は Ca^{2+} と親和性が高く, 細胞質側からアクセス可能な状態であり, E2 状態では Ca^{2+} 結合部位は Ca^{2+} と親和性が低く, 細胞質側に露出した状態である. このモデルは輸送サイク

ル中でカルシウムポンプ自身が大きく構造変化することを予見しているが, これまでの生化学実験によってその予測が正しいことが示された^{1,5-6}. X 線結晶構造解析はヌクレオチド結合部位が P ドメインと N ドメインの界面に存在することを示し, そこに結合した ATP のコンフォメーションも明らかにした⁷⁻⁸. ヌクレオチド結合部位では, 結合した ATP が加水分解され, γ リン酸基がリン酸化残基である Asp351 に転移しカルシウムポンプ自体がリン酸化される. しかし ATP 加水分解によって得られた自由エネルギーはどのようにして小胞体内腔への Ca^{2+} 輸送の力学的エネルギーに変換されているのか, 未だ明らかになっていない. Ca^{2+} 結合部位はヌクレオチド結合部位から 50 Å も離れた膜貫通領域に存在していることを考えると, エネルギー

一変換の分子機構は実に巧みに実現されているはずである⁹⁻¹⁴。解明の手がかりは、カルシウムポンプの構造解析だけでなく熱揺らぎのダイナミクス

にもあると考えられている。

2. ATP/ADP 結合状態の筋小胞体カルシウムポンプの X 線結晶構造

2.1 カルシウムポンプの立体構造と構造変化

これまで X 線結晶構造解析によって、カルシウムポンプの反応サイクルに含まれる複数の反応中間体の立体構造が決定された。原子分解能のレベルで最も初期に解かれたのは、2000 年の膜貫通部位に 2 つの Ca^{2+} が結合した $\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$ ¹⁵ であり、P 型イオンポンプとして初めての立体構造であった。これまで約 50 個程度の結晶構造が解かれており、図 4-2-1-1 に示した反応サイクル中で ADP が脱離した後の E1P 状態の構造を除いて全ての状態が明らかになった。

位の基質を除くとほぼ同じ構造であり⁷⁻⁸、E2 状態では、E2P からの構造変化が最も大きかった¹⁶⁻¹⁹。4 つの立体構造において、A (Actuator) ドメイン、N (Nucleotide-binding) ドメイン、P (Phosphorylation) ドメインと呼ばれる 3 つの細胞質ドメイン自体の構造変化は小さく、ドメイン同士の相対配置が大きく変化していた。膜貫通ドメインは M1-M10 の 10 本の膜貫通ヘリックスから構成される。このうち、M7-M10 のヘリックスの構造と配置は反応サイクル中でほとんど同一であった。一方、M1-M6 の 6 本のヘリックスは 4 つの立体構造において大きく異なっていた。 Ca^{2+} 結合部位は、M4-M6 と M8 の 4 本のヘリックスを含む領域に形成されている¹⁵。M5 は小胞体内腔から P ドメイン上端まで貫通する長さ 60 Å のヘリックスであり、膜貫通ドメインと細胞質ドメインの運動を連動させている。すなわち、カルシウムポンプでは 3 つの細胞質ドメインの相対的な配置替えが膜貫通ドメインの M1-M6 ヘリックスの構造変化を誘起し、これが Ca^{2+} の侵入と排出の経路を形成することでイオン輸送を実現している。

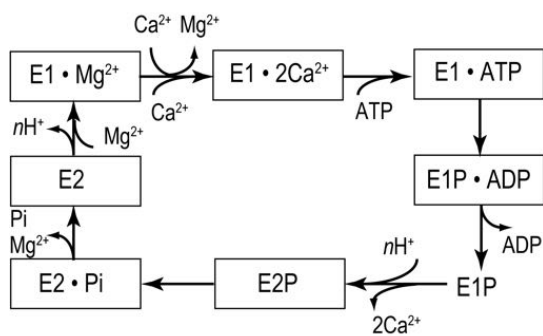


図 4-2-1-1 E1/E2 反応モデルに基づく筋小胞体カルシウムポンプの酵素反応サイクルと X 線結晶構造

E1 とは Ca^{2+} 結合部位が Ca^{2+} に対して強い親和性を持ち、細胞質側からアクセス可能な状態。E2 とは Ca^{2+} と親和性が低く、 Ca^{2+} 結合部位が小胞体側に露出した状態である。P 型 ATPase では ATP が加水分解したあと γ リン酸基が酵素に転移し、自己リン酸化する。四角で囲んだ 7 つの反応中間体の X 線結晶構造は既に得られている。

反応サイクル中の構造変化は、 $\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$ 、E1P、E2P、E2 の 4 つの立体構造を代表構造として説明される (図 4-2-1-2)。E1.ATP と E1P.ADP の構造は反応部

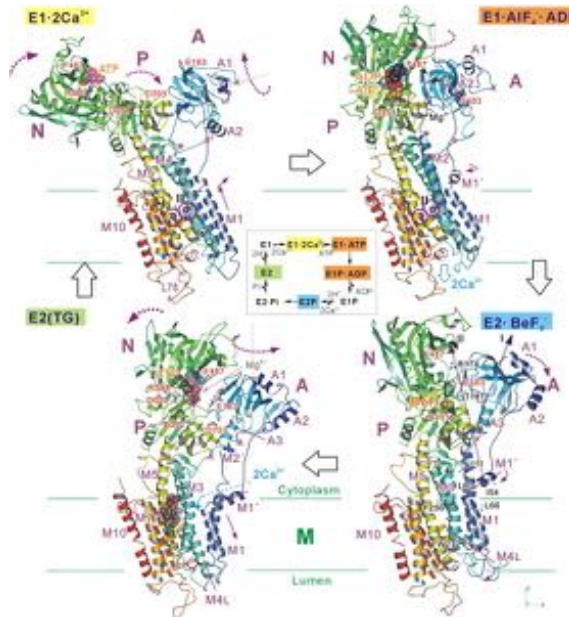


図 4-2-1-2 筋小胞体カルシウムポンプの結晶構造¹²

カルシウムポンプは 10 本の膜貫通ヘリックスと 3 つの細胞質ドメインを持ち、994 残基、分子量 11 万の膜タンパク質である。膜貫通ドメインにあるに結合した Ca^{2+} は紫色の円で囲んで示してある。カルシウムポンプの酵素反応サイクル中の 4 つの代表構造は、左下の基底状態である E2 から矢印の順に、E1.2Ca²⁺, E1.ATP, E2.Pi の各状態に対応する X 線結晶構造である。¹² 改変。

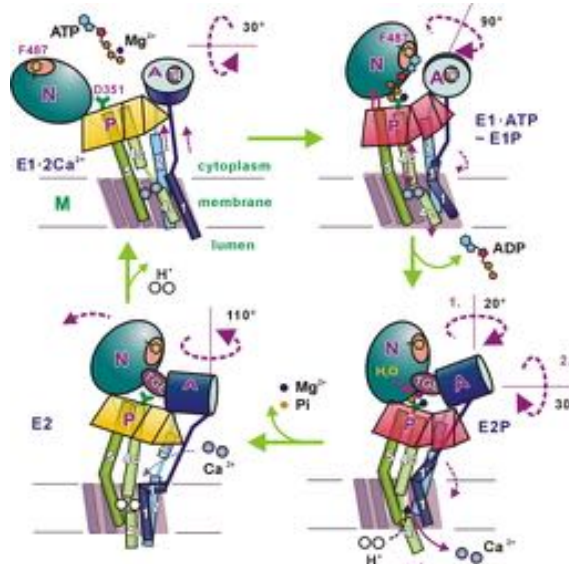


図 4-2-1-3 筋小胞体カルシウムポンプの構造変化の模式図¹²

図 4-2-1-2 に示した結晶構造を模式化した図を示している。左上の E1.2Ca²⁺ から矢印の順に、E1.ATP (E1P.ADP), E2P, E2 の各状態に対応している。E1.2Ca²⁺ 状態では、細胞質中の 2 個の Ca^{2+} がカルシウムポンプ膜貫通部位の Ca^{2+} 結合部位に侵入し結合する。E1.ATP 状態から E1P.ADP 状態に掛け、N ドメインと P ドメインの界面に結合した ATP が加水分解され、 γ リン酸基がカルシウムポンプの Asp351 に転移し自己リン酸化する。E2P 状態では、A ドメインが相対的に大きく配置を変え、膜貫通ドメインのヘリックスの構造変化を誘起し、2 個の Ca^{2+} が小胞体内腔へ放出される。E2 状態では、Asp351 に転移していたリン酸基が加水分解され基底状態となる。TGE ループは A ドメインにある重要なアミノ酸配列 (Thr-Gly-Glu) であり、このループがリン酸化した Asp351 に接近し加水分解によって脱リン酸化を実現する¹²。¹² 改変。

2.2 ATP または ADP の結合状態のカルシウムポンプ

X 線結晶構造解析で得られた立体構造は、基質を模倣した阻害剤によって状態が固定されているため、全てを信頼できない。図 4-2-2-1 に ATP 結合状態と ADP 結合状態のカルシウムポンプのヌクレオチド結合部位を示した。結晶構造で得られた E1.ATP では ATP アナログとして AMPPCP が用いられ、E1P.ADP ではリン酸基アナログとして AlF_4^- が結合している。両者はほぼ同一の立体構造であったが、本来この 2 つは生理的状态が異なるため生体環境では構造が異なるはずである。加えて、

生理的環境下で ATP に配位するイオンは Mg^{2+} であるが、E1.ATP は Ca^{2+} 高濃度下で結晶化されたため Mg^{2+} が Ca^{2+} に置き換わり配位していた。また E1.ATP では 1 つの Ca^{2+} が ATP に配位していたが、E1P.ADP では 2 つの Mg^{2+} が ADP に配位していた。反応サイクルでは、細胞質中に存在する MgATP (ATP に 1 個の Mg^{2+} が配位した基質分子) が N ドメインに結合し E1.ATP 状態となって加水分解され、カルシウムポンプがリン酸化される。ATP に配位した Mg^{2+} はこの化学反応の安定化に寄与していると考えられるが、E1P.ADP 状態に存在していた 2 個目の Mg^{2+} は反応サイクルに含まれておらず、その生理的な機能は不明であった。

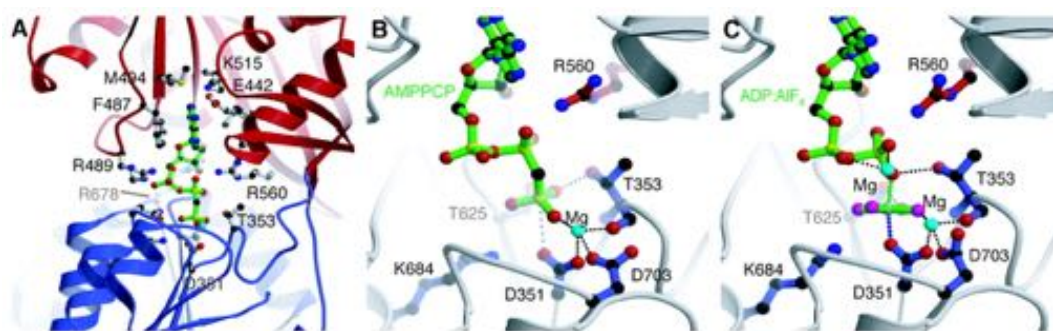


図 4-2-2-1 Mg^{2+} が触媒するリン酸化転移反応が起こるカルシウムポンプのヌクレオチド結合部位の結晶構造⁸

(A) ヌクレオチド結合部位の全体像。N ドメイン (赤)、P ドメイン (青)、AMPPCP (緑)。AMPPCP の zigzag 構造はスティック表示した周辺の残基によって安定化されている。(B) ATP 結合状態のヌクレオチド結合部位。 Mg^{2+} を介して ATP γ リン酸基とリン酸化残基 Asp351 が一直線上に配置し接近している。AMPPCP の結合安定化に重要な残基を示した。(C) ADP 結合状態のヌクレオチド結合部位。リン酸基転移の遷移状態が $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$ によって模倣されている。 Mg^{2+} は Asp351 と AlF_4^- に配位している。 AlF_4^- は、 β リン酸基と Asp351 と配位を形成している (緑と青の太い破線)。

3. ATP/ADP 結合状態のカルシウムポンプの MD 計算

3.1 本研究の目的

X 線結晶構造解析で明らかになった反応サイクル中の大規模な構造変化は、本来生体膜中でランダムに熱揺らぎしているカルシウムポンプを制御し、 Ca^{2+} を一方向に輸送する (Ca^{2+} の逆流を防ぐ) ために必要であると考えられている。カルシウムポンプの機能を真に理解するためには、生理的環

境下での本来の安定構造を求め、ATP 加水分解とリン酸化反応がカルシウムポンプのイオン輸送とどのように相関しているのか明らかにする必要がある。

本研究では、ヌクレオチド結合部位の ATP や ADP が生体環境において熱雑音を受けながらカルシウムポンプとどのように相互作用し、重要な基

質としての機能を果たしているのか明らかにする。ATP は細胞中において欠かすことの出来ないエネルギー源である。筋肉の収縮弛緩やイオンの能動輸送などの多様な生体現象において、タンパク質は ATP 加水分解で得られた自由エネルギーを力学的エネルギーに変換し大規模にコンフォメーションを変化させることで生体機能を実現している。特に ATP や ADP が化学反応の前後においてカルシウムポンプとどのように結合し、物理化学的な相互作用をしているのか、その知見を得ることは ATPase の理解にとって本質的に重要である。

カルシウムポンプの構造機能相関を MD 計算によって解析するには、溶液中やタンパク質に結合する ATP や ADP を十分に信頼できる分子力場で記述する必要がある。本研究では、メチル三リン酸 (MTP) を用いた高精度な量子化学計算を実行し、従来の多リン酸分子の力場パラメタを改良した。改良した力場を用いて ATP と 2 個の Ca^{2+} が結合した E1.ATP 状態、ATP が加水分解し Asp351 がリン酸化され ADP と 2 個の Ca^{2+} が結合した E1P.ADP 状態の MD 計算を行った。

3.2 カルシウムポンプの MD 計算の先行研究

これまでのカルシウムポンプの MD 計算では、そのほとんどが Ca^{2+} 結合部位や異なる反応中間体の間の構造遷移に焦点が当てられてきた。 Ca^{2+} 結合部位の全原子 MD 計算では、 Ca^{2+} の結合安定性²⁰ や輸送経路²¹、結合部位のプロトン化状態²²⁻²⁴ が調べられた。構造遷移の MD 計算では、全原子モデルで E1.2 Ca^{2+} から E1.ATP までの大規模な構造変化が²⁵、粗視化モデルでは E1.2 Ca^{2+} から E1.ATP²⁶ と E1.2 Ca^{2+} から E2²⁷⁻²⁸ までの構造変化が調べられた。基準振動解析によってカルシウムポンプの 3 つの

細胞質ドメインの運動が解析された²⁹⁻³¹。ヌクレオチド結合部位の ATP や ADP とカルシウムポンプがどのように相互作用しているのか未だ詳細に解析されていない。

3.3 CHARMM 力場の多リン酸分子パラメタの改良

3.3.1 多リン酸分子の力場パラメタの改良

ATP はアデニン、リボース、3 つのリン酸基が連なって構成される多リン酸分子である。ATP は三リン酸のもつ大きな負電荷によってカルシウムポンプの N ドメインと P ドメインの界面に強い静电相互作用で結合する。ATP の標準的な分子力場はこれまで多くの ATP 結合タンパク質の MD 計算に用いられ整合性のある結果が得られていたが³²⁻⁴⁶、3.6.1 項に示すように ATP 結合状態のカルシウムポンプのモデリングには不適當であることが分かった。従って本研究では、多リン酸分子の力場パラメタを高精度な量子化学計算によって修正した。改良された力場パラメタを ATP 結合状態のカルシウムポンプだけでなく、一般的な ATP 結合タンパク質の MD 計算にも適用し、力場の信頼性を検証した。また、ATP の取り得るコンフォメーションの多様性の比較のため、改良した力場とオリジナルの力場を用いて溶液中 ATP のレプリカ交換 MD 計算⁴⁷ を行った。最後に本研究で開発された新しい多リン酸分子力場が ATP を含むタンパク質のモデリングに一般的に適用できるか議論した⁴⁸。

3.3.2 モデル化合物

CHARMM27 で提供されているオリジナルの多リン酸分子の力場 (これを C27(ATP) と表記する)⁴⁹ を標準的な CHARMM 力場作成プロトコルに従って修正した。モデル化合物として、CHARMM27

のパラメタ作成で用いられたメチル二リン酸 (methyl diphosphate, MDP)⁴⁹ の代わりにメチル三リン酸 (methyl triphosphate, MTP) を用いた (図 4-3-3-1)。MDP (全電荷-3 e, e は素電荷) と比べ MTP (全電荷-4 e) は多リン酸部分の化学構造と全電荷が ATP (全電荷-4 e) と同一であり, より ATP の性質を再現している。但し, MTP の方が量子化学計算に要する計算コストは大きくなる。MTP の原子名, 原子タイプ, 原子電荷を表 4-3-3-1 に示した。

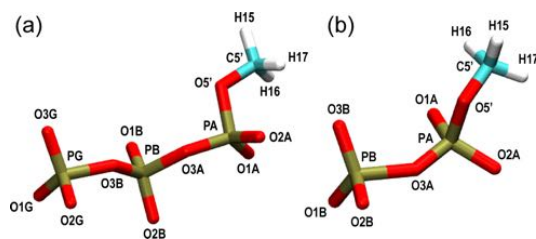


図 4-3-3-1 モデル化合物の構造

(a) 本研究の多リン酸分子の力場改良で用いた MTP⁴⁸. (b) CHARMM27 の多リン酸分子の力場作成で用いられた MDP⁴⁹. 本研究は多リン酸部分の力場改良であり, ATP のリボース部分とアデニン部分はいない。各原子の原子名を記した。(a), (b)ともに量子化学計算 (MP2/6-31+G*) によって得られた最適化構造である。

表 4-3-3-1 モデル化合物 MTP の原子名, 原子タイプ, 原子電荷

MTP		
原子名	原子タイプ	原子電荷 (e)
O1G	ON3	-0.90
O2G	ON3	-0.90
O3G	ON3	-0.90
PG	P2	1.10
O1B	ON3	-0.82
O2B	ON3	-0.82
O3B	ON2	-0.86
PB	P2	1.50
O1A	ON3	-0.82
O2A	ON3	-0.82
O3A	ON2	-0.74
PA	P	1.50
O5'	ON2	-0.62
C5'	CN9	-0.17
H15	HN9	0.09
H16	HN9	0.09
H17	HN9	0.09

3.3.3 量子化学計算の精度

ATP(C27)で用いられた量子化学計算精度は HF/6-31+G*であるが、本研究では MP2/6-31+G*を適用しより高精度な量子化学計算を行った。全ての量子化学計算は Gaussian09⁵⁰を用いて実行した。

3.3.4 改良したエネルギー関数

本研究では、既存の CHARMM 力場で定義されているタンパク質との相互作用の整合性を保つため、bond angle と dihedral angle のみを修正した。nonbond のパラメータは修正していない。

3.3.4.1 Bond angles

MTP の bond angle においては、force constants

(K_θ) と equilibrium values (θ_0) を経験的に修正し、P-O-P angle の Urey-Bradley (UB) term は除いた (表 4-3-3-2)。オリジナルの CHARMM 力場で用いられている負の force constant を持った UB term は P-O-P angle の *ab initio* 計算で得られた振動数を再現するために特別に導入されたものである。しかし実際上の問題として、分子の平衡構造と振動数を同時に精度よく再現する力場パラメータの作成は困難である。そこで本研究では、振動数よりも分子の安定な幾何構造の再現を優先する方針で力場の修正を行った。本研究で改良された多リン酸分子の力場パラメータを mod-C27(ATP)と表記する。

表 4-3-3-2 改良された多リン酸分子の bond angle パラメータ (mod-C27(ATP))

Bond angles	K_θ	θ_0	K_{UB}	s_0
P2-ON2-P	25.37 (15.0)	150.0 (140.0)	0 (-40.0)	0 (2.80)
P2-ON2-P2	25.37 (15.0)	150.0 (140.0)	0 (-40.0)	0 (2.80)
ON2-P-ON2	90.0 (80.0)	102.6 (104.3)	-	-
ON2-P2-ON2	90.0 (80.0)	102.6 (104.3)	-	-
ON2-P2-ON3	100.0 (88.9)	108.23 (111.6)	-	-

オリジナルの CHARMM27 力場パラメータ (C27(ATP)) は括弧内に記した。

3.3.4.2 Dihedral angles

MTP の dihedral angle の force constants, multiplicity, phase は MP2/6-31+G*の精度で得られた dihedral angle の量子化学計算による *ab initio* ポテンシャルエネルギー曲線を再現するように決定した (表 4-3-3-3)。ポテンシャルエネルギー曲線は、dihedral angle を 15°間隔で正方向と逆方向に一周 360°回転させて計算し、よりエネルギーの低い値を用いて作成した。改良した dihedral angle のパラメータは、*ab initio* ポテンシャルエネルギーと 360°全体のフィッティング誤差が最小になるように調整し

た⁵¹。但し、MTP の構造最適化と dihedral angle のポテンシャルエネルギー計算は気相環境で行ったため、メチル基とリン酸基の間に分子内水素結合が形成された。生理的環境では溶液中のカウンターイオンの配位によって形成されない分子内水素結合を阻止するため、C5'-O5'-PA-O3A を 180°に固定しメチル基とリン酸基との分子内水素結合を阻止して量子化学計算を行った⁵²。結果的に mod-C27(ATP)を用いた dihedral angle のポテンシャルエネルギー曲線は、高精度な量子化学計算 (MP2/6-31+G*) によって得られた結果をより良く

再現した(図 4-3-3-2). 表 4-3-3-4 には 7 つの dihedral angle に対して, C27(ATP), mod-C27(ATP) と *ab initio* 計算結果との root-mean-square errors (RMSE) を示した. C27(ATP) と比べて, mod-C27(ATP) の RMSE は 2 倍の精度で改善された.

3.3.5 改良された力場パラメタの適用対象

mod-C27(ATP) は, ヌクレオシド三リン酸 (ATP, GTP, CTP, UTP) やヌクレオシド二リン酸 (ADP, GDP, CDP, UDP) などの多リン酸分子にも適用で

きる. mod-C27(ATP) には, bond angle ON2-P-ON2 が含まれており, これは DNA や RNA の phosphodiester bond にも使用されている. オリジナルの CHARMM 力場では, ATP/ADP と DNA/RNA に含まれる ON2-P-ON2 に対し同じ力場パラメタを割り当てているが^{49, 53-54}, 本研究では改良された ON2-P-ON2 の力場パラメタを DNA/RNA の MD 計算に適用することは意図していない.

表 4-3-3-3 改良された多リン酸分子の dihedral angle パラメタ (mod-C27(ATP))

Dihedral angles	K_{ϕ}	n	δ
P2-ON2-P-ON2	0.4485	1	0
	(0.03)	(2)	(0)
	(0.03)	(3)	(0)
P-ON2-P2-ON2	0.4485	1	0
	(0.03)	(2)	(0)
	(0.03)	(3)	(0)
P2-ON2-P2-ON2	0.4485	1	0
	(0.03)	(2)	(0)
	(0.03)	(3)	(0)
P-ON2-P2-ON3	-0.7090	2	0
	(0.10)	(2)	(0)
	(0.03)	(3)	(0)

オリジナルの CHARMM27 力場パラメタ(C27(ATP))は括弧内に記した.

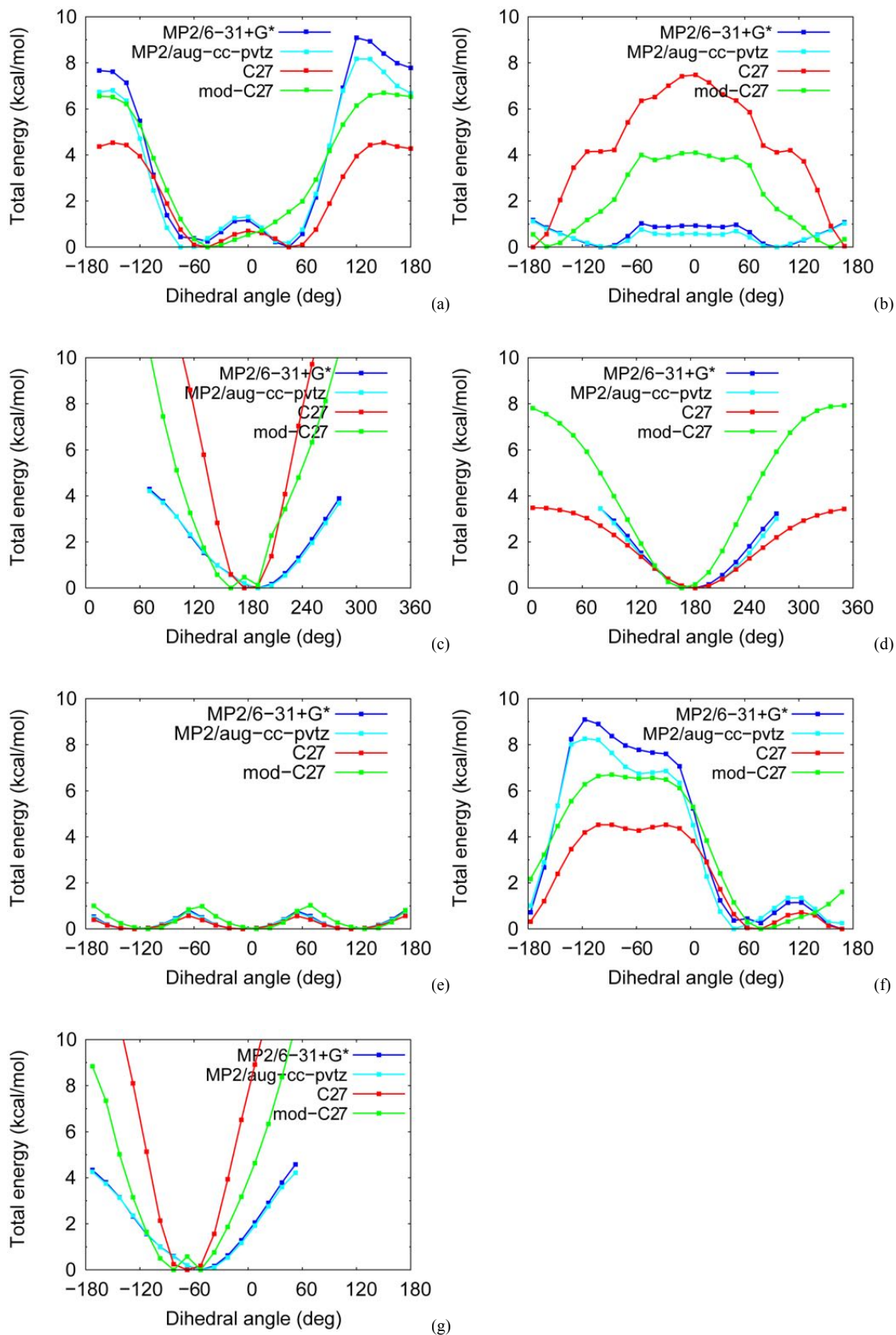


図 4-3-3-2 MTP の dihedral angle の量子化学計算と改良された力場パラメタによるポテンシャルエネルギー曲線

(a) C5'-O5'-PA-O3A, (b) O5'-PA-O3A-PB, (c) PA-O3A-PB-O3B, (d) O3A-PB-O3B-PG, (e) PB-O3B-PG-O1G, (f) C5'-O5'-PA-O1A, (g) PA-O3A-PB-O1B, 改良された力場 ATP(mod-C27) (緑), オリジナルの CHARMM27 力場 ATP(C27) (赤), MP2/6-31+G* (青), MP2/aug-cc-pVTZ//MP2/6-31+G* (シアン), 基底関数を 6-31+G*より大きくした aug-cc-pVTZ の場合でもポテンシャルエネルギー曲線が変わらなかったことから, MP2/6-31+G*の計算精度は十分高精度であることを確かめた. 量子化学計算中は対象とした dihedral angle 以外の全ての分子内自由度を許した.

表 4-3-3-4 C27(ATP)と mod-C27(ATP)を用いた dihedral angle のポテンシャルエネルギーと量子化学計算によって得られた *ab initio* ポテンシャルエネルギーとの RMSE (kcal/mol)

Dihedral angles	RMSE (C27(ATP)) kcal/mol	RMSE (mod-C27(ATP)) kcal/mol
C5'-O5'-PA-O3A	2.43	1.22
O5'-PA-O3A-PB	4.41	2.12
PA-O3A-PB-O3B	6.93	3.30
O3A-PB-O3B-PG	0.48	1.35
PB-O3B-PG-O1G	0.11	0.24
C5'-O5'-PA-O1A	2.48	1.30
PA-O3A-PB-O1B	6.94	2.72
<i>average</i>	<i>3.40</i>	<i>1.75</i>

3.4 MD 計算の詳細

3.4.1 MD 計算の系のまとめ

本研究で行った MD 計算の系をまとめる. 多リン酸力場の改良の過程で行ったカルシウムポンプの MD 計算のうち, C27(ATP)を用いた系を MD(sim1)と表記し, mod-C27(ATP)を用いた系を MD(sim2)と表記する. mod-C27(ATP)の検証のために行った 4 種類の ATP 結合タンパク質の MD 計算をそれぞれ MD(sim3_a), MD(sim3_b), MD(sim3_c), MD(sim3_d)と表記する. 以後のカルシウムポンプの MD 本計算では, 全ての系で mod-C27(ATP)を用いた. ATP 結合状態のカルシウムポンプの MD 計算のうち, 1 個の Mg^{2+} が結合した系を MD(sim4), 2 個の Mg^{2+} が結合した系を MD(sim5)と表記する. 同様に ADP 結合状態のカルシウムポンプの MD 計算のうち, 1 個の Mg^{2+} が結合した系を MD(sim6), 2 個の Mg^{2+} が結合した系を MD(sim7)と表記する.

これらの MD 計算の系を表 4-3-4-1 にまとめた.

3.4.2 カルシウムポンプの MD 計算のセットアップ

カルシウムポンプの MD 計算の初期構造は, ATP 結合状態では E1.ATP の X 線結晶構造 (PDB entry: 1VFP⁷) を用い, ADP 結合状態では E1P.ADP の X 線結晶構造 (PDB entry: 2ZBD¹⁶)を用いた. E1.ATP の結晶構造を用いた場合は, ヌクレオチド結合部位のアナログ分子である AMPPCP と Ca^{2+} をそれぞれ, ATP と Mg^{2+} に置換した. E1P.ADP の結晶構造を用いた場合は, アナログ分子である AlF_4 をリン酸基に置換し Asp351 をリン酸化した.

以後のセットアップ手順は MD(sim1), MD(sim2), MD(sim4)-MD(sim7)で共通である. E1.2Ca²⁺では P ドメインに 1 個の K^+ が結合していたが, E1.ATP, E1P.ADP では検出されていなかったため, 同じ位置に 1 個の K^+ を配位させた⁵⁵. 先行研究で調べら

れた解離基をもつアミノ酸の pK_a 値に従い, Ca^{2+} 結合部位の Glu908 をプロトン化した²². 水素原子は VMD1.9.1⁵⁶ を用いて結晶構造に付加した. DOWSER⁵⁷ によってカルシウムポンプ内部に水分子を挿入した. カルシウムポンプの結晶構造は平衡化した dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) 脂質二重膜に埋め込んだ. カルシウムポンプは DOPC 脂質二重膜に存在する場合に最大の活性が得られることが実験的に調べられており, 本研究ではこの脂質分子を用いた⁵⁸. CHARMM-GUI⁵⁹⁻⁶¹ を用いて DOPC 脂質二重膜の初期構造を作成し, 水和させて通常の MD 計算 (NPT アンサンブル) を行って平衡化した. カルシウムポンプの脂質二重膜に対する配向は, CHARMM⁶² に実装されている Generalized Born Molecular Volume (GBMV) モデルを用いて膜貫通領域の溶媒和自由エネルギーが最小になるように挿入した. カルシウムポンプと脂質二重膜の複合体全体を水和し, 系が中性となるようカウンターイオンを配置した. 系が 150 mM の KCl 溶液となるよう K^+ , Cl^- を配置した (図 4-3-4-1). MD(sim4)-MD(sim7) では, DOPC 脂質分子の個数を減らし, 脂質二重膜の表面積を小さくした. さらに脂質二重膜に対して垂直な方向 (Z 軸方向) の Water box の水分子の個数を減らし, water box のサイズを小さくした. 系の詳細を表 4-3-4-2a, b, c, d, e に示す.

3.4.3 水溶性 ATP 結合タンパク質の MD 計算のセットアップ

mod-C27(ATP)の信頼性の評価のため, 4 種類の水溶性 ATP 結合タンパク質の MD 計算 (MD(sim3a-sim3d)) を行った. 本研究では, X 線結晶構造の解像度が 1.5 Å 以下の高解像度で決定さ

れている以下の 4 つの水溶性タンパク質を用いた. MD(sim3_a): Histidine permease (PDB entry: 1b0u), MD(sim3_b): RNA editing ligase MP52 (PDB entry: 1xdn), MD(sim3_c): Phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase (PDB entry: 1obd), MD(sim3_d): α -skeletal muscle Actin (PDB entry: 2fxu). カルシウムポンプと同様のセットアップ手順に従い系を作成した (表 4-3-4-2f).

3.4.3 溶液中 ATP のレプリカ交換法 MD のセットアップ

C27(ATP)と mod-C27(ATP)の力場の下で取り得る安定なコンフォメーションの比較のため, 溶液中 ATP のレプリカ交換 MD 計算を行った. ATP の初期構造は E1.ATP 状態のカルシウムポンプの MD 計算によって平衡化された構造を用いた. 系が中性となるよう K^+ , Cl^- を配置した. 系は 150 mM の KCl 溶液となるようカウンターイオンを配置した. 系の詳細を表 4-3-4-2g に示す.

表 4-3-4-1 本研究で行った計算の系のまとめ

計算の系	PDB (解像度)	X線結晶構造の状態	ヌクレオチド結合部位	計算の目的と 計算時間	ATP の力場
MD(sim1)	1VFP (2.9 Å)	E1.ATP	AMPPCP を ATP に置換 Ca ²⁺ を Mg ²⁺ に置換	C27(ATP) 力場の検証 (20 ns)	C27(ATP)
MD(sim2)	1VFP (2.9 Å)	E1.ATP	AMPPCP を ATP に置換 Ca ²⁺ を Mg ²⁺ に置換	mod-C27(ATP) 力場の検証 (20 ns)	mod-C27(ATP)
MD(sim3_a)	1B0U (1.50 Å)	ATP 結合タンパク質	-	mod-C27(ATP) 力場の検証 (5 ns)	C27(ATP) mod-C27(ATP)
MD(sim3_b)	1XDN (1.20 Å)	ATP 結合タンパク質	-	mod-C27(ATP) 力場の検証 (5 ns)	C27(ATP) mod-C27(ATP)
MD(sim3_c)	1OBD (1.40 Å)	ATP 結合タンパク質	-	mod-C27(ATP) 力場の検証 (5 ns)	C27(ATP) mod-C27(ATP)
MD(sim3_d)	2FXU (1.35 Å)	ATP 結合タンパク質	-	mod-C27(ATP) 力場の検証 (5 ns)	C27(ATP) mod-C27(ATP)
MD(sim4)	1VFP (2.9 Å)	E1.ATP	AMPPCP を ATP に置換 Ca ²⁺ を Mg ²⁺ に置換 Mg ²⁺ の個数は 1 つ	MD 本計算 (200 ns)	mod-C27(ATP)
MD(sim5)	1VFP (2.9 Å)	E1.ATP	AMPPCP を ATP に置換 Ca ²⁺ を Mg ²⁺ に置換 Mg ²⁺ を付加 Mg ²⁺ の個数は 2 つ	MD 本計算 (200 ns)	mod-C27(ATP)
MD(sim6)	2ZBD (2.4 Å)	E1P.ADP	AlF ₄ をリン酸基に置換 Asp351 をリン酸化 1 個の Mg ²⁺ を削除 Mg ²⁺ の個数は 1 つ	MD 本計算 (200 ns)	mod-C27(ATP)
MD(sim7)	2ZBD (2.4 Å)	E1P.ADP	AlF ₄ をリン酸基に置換 Asp351 をリン酸化 Mg ²⁺ の個数は 2 つ	MD 本計算 (200 ns)	mod-C27(ATP)
REMD(ATP)	1VFP の ATP のみ用いた	-	-	レプリカ交換 MD 計算を用いた mod-C27(ATP) 力場の検証 (20ns×24 replica = 480 ns)	C27(ATP) mod-C27(ATP)

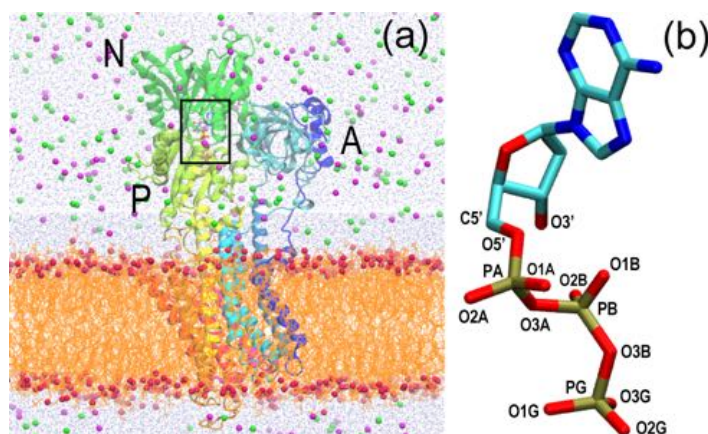


図 4-3-4-1 ATP 結合状態のカルシウムポンプの MD 計算の初期構造とヌクレオチド結合部位の ATP の拡大図

(a) 脂質二重膜（赤：リン原子，オレンジ：炭化水素鎖）に埋め込まれ，水分子とカウンターイオンの配置によって生体環境を再現した E1.ATP 状態のカルシウムポンプの系．細胞質ドメイン A, N, P ドメインとヌクレオチド結合部位（黒四角）を示した，Water box 全体からカルシウムポンプ近傍を切り抜いて表示した，(b) E1.ATP 状態のカルシウムポンプ (PDB entry: 1VFP) に結合している AMPPCP を ATP で置換した，zigzag 構造を形成している ATP の拡大図に原子名を記した．

表 4-3-4-2 本研究行った計算の系の詳細

(a) 多リン酸力場の改良のために行った ATP 結合状態のカルシウムポンプの系の詳細：MD(sim1), MD(sim2)

Number of atoms	378177
Number of water molecules	96099
Number of lipid molecules	535
Number of counter ions	295K ⁺ / 272Cl ⁻
Nucleotide-binding site	1ATP + 1Mg ²⁺
Ca ²⁺ binding site	2Ca ²⁺
P-domain	1K ⁺
Box size (Å ³)	140 × 140 × 200

MD(sim1)と MD(sim2)では，ATP の力場に C27(ATP), mod-C27(ATP)をそれぞれ適用した．

(b) ATP 結合状態カルシウムポンプの本計算の系の詳細：MD(sim4)

Number of atoms	301846
Number of water molecules	73688
Number of lipid molecules	470
Number of counter ions	231K ⁺ / 208Cl ⁻
Nucleotide-binding site	1ATP + 1Mg ²⁺
Ca ²⁺ binding site	2Ca ²⁺
P-domain	1K ⁺
Box size (Å ³)	134 × 134 × 168

(c) ATP 結合状態カルシウムポンプの本計算の系の詳細：MD(sim5)

Number of atoms	301713
Number of water molecules	73644
Number of lipid molecules	470
Number of counter ions	229K ⁺ / 208Cl ⁻
Nucleotide-binding site	1ATP + 2Mg ²⁺
Ca ²⁺ binding site	2Ca ²⁺
P-domain	1K ⁺
Box size (Å ³)	134 × 134 × 168

(d) ADP 結合状態カルシウムポンプの本計算の系の詳細：MD(sim6)

Number of atoms	301639
Number of water molecules	73619
Number of lipid molecules	470
Number of counter ions	231K ⁺ / 208Cl ⁻
Nucleotide-binding site	1ADP + 1Mg ²⁺
Ca ²⁺ binding site	2Ca ²⁺
P-domain	1K ⁺
Box size (Å ³)	134 × 134 × 168

(e) ADP 結合状態カルシウムポンプの本計算の系の詳細：MD(sim7)

Number of atoms	301494
Number of water molecules	73571
Number of lipid molecules	470
Number of counter ions	229K ⁺ / 208Cl ⁻
Nucleotide-binding site	1ADP + 2Mg ²⁺
Ca ²⁺ binding site	2Ca ²⁺
P-domain	1K ⁺
Box size (Å ³)	134 × 134 × 168

(f) 4つの水溶性 ATP 結合タンパク質の系の詳細: MD(sim3_a)-MD(sim3_d)		
	MD(sim3_a): Histidine permease	MD(sim3_b): RNA editing ligase MP52
Number of atoms	42410	41793
Number of protein atoms	4106	4232
Number of nucleotides	1ATP	1ATP
Number of water molecules	12727	12480
Number of ions	41K ⁺ , 39Cl ⁻	42K ⁺ , 35Cl ⁻ , 1Mg ²⁺
Box size (Å ³)	70 × 83 × 79	79 × 70 × 81
	MD(sim3_c): Phosphoribosylamidoimidazole- succinocarboxamide synthase	MD(sim3_d): α-skeletal muscle Actin
Number of atoms	53229	63642
Number of protein atoms	4795	5617
Number of nucleotides	1ATP, 1AMP	1ATP
Number of water molecules	16086	19287
Number of counter ions	51K ⁺ , 45Cl ⁻ , 2Mg ²⁺	63K ⁺ , 54Cl ⁻ , 4Ca ²⁺
Box size (Å ³)	91 × 77 × 81	73 × 94 × 99

(g) 溶液中 ATP の系の詳細: REMD(ATP)	
	ATP in solution
Number of atoms	3404
Number of nucleotides	1ATP
Number of water molecules	1117
Number of counter ions	7K ⁺ , 3Cl ⁻
Box size (Å ³)	34 × 34 × 39

3.5 MD 計算の条件

3.5.1 カルシウムポンプの MD 計算の詳細

ATP 結合状態と ADP 結合状態のカルシウムポンプを DOCP 脂質二重膜に埋め込み、全原子 MD 計算を実行した。3.6 節の改良した多リン酸力場の評価では、NAMD⁶³を用いて MD(sim1), MD(sim2)を実行した。タンパク質には CHARMM27 力場⁶⁴⁻⁶⁵を用い、脂質分子には CHARMM36 力場⁶⁶⁻⁶⁸を用

いた。MD(sim1), MD(sim2)の開始当時は、CHARMM 力場の最新版である CHARMM36 が脂質分子版のみ発表され、タンパク質版が未発表であった。Mg²⁺には Villa らのモデル⁶⁹, Ca²⁺には Åqvist らのモデル⁷⁰を用いた。ATP には、C27(ATP)を用いた MD(sim1)と mod-C27(ATP)を用いた MD(sim2)の計算を実行し結果を比較した。3.7 節のカルシウムポンプの本計算では、GENESIS

(Generalized-ensemble simulation system)⁷¹を用いて MD(sim4)-MD(sim7)を実行した。タンパク質と脂質分子の力場には CHARMM36 力場⁶⁶⁻⁶⁸を用い、ATP と ADP には mod-C27(ATP)を用いた。Mg²⁺, Ca²⁺にはともに Merz らのモデル⁷²を用いた。すべての計算において水分子には TIP3P モデル⁷³を用いた。タンパク質に含まれる全ての水素原子は SHAKE⁷⁴によって拘束され、水分子は SETTLE⁷⁵によって剛体として扱われる。Newton の運動方程式は時間刻み 2 fs として NAMD では velocity-verlet 法、GENESIS では LEAP 法を用いて数値積分を行った。長距離の静電相互作用は particle-mesh Ewald 法⁷⁶で計算した。Lennard-Jones 相互作用は 10 Å から switching function が有効となって徐々に減衰し、12 Å で打ち切られる。NPT アンサンブルの温度圧力制御方法は NAMD では、Langevin dynamics (with a damping coefficient 5 ps⁻¹)を用いて温度制御 (300 K) を行い、Langevin piston Nosé-Hoover 法⁷⁷⁻⁷⁸によって圧力制御 (1 atm) を行った。GENESIS では、Langevin thermostat⁷⁹ と Langevin barostat⁸⁰を用いて温度圧力制御 (300 K, 1 atm) を行った。

系は conjugate gradient 法 (NAMD), また steepest descent 法 (GENESIS) を用いて、最初の 1000 ステップはタンパク質、脂質分子、ATP の重原子を固定し、次の 9000 ステップは調和ポテンシャルで拘束を掛けて (タンパク質、脂質分子、ATP の重原子は force constant = 10.0 kcal/mol·Å², 結合部位のイオン (Mg²⁺, Ca²⁺) には force constant = 1.0 kcal/mol·Å²) エネルギー最小化を行った。次に同じ調和ポテンシャルで拘束を掛けたまま NVT アンサンブルで系を 200 ps 平衡化した。さらに調和ポテンシャル (タンパク質と ATP の重原子、結合部位のイオンは force constant = 1.0 kcal/mol·Å², 脂質分

子の重原子は脂質二重膜の面に垂直な z 軸方向にのみ force constant = 10.0 kcal/mol·Å²) を課し NPT アンサンブルで 400 ps 平衡化した。この 400 ps の間に徐々にタンパク質と ATP に課した調和ポテンシャルの force constant を弱めていき最後は 0 とした。以降の MD 計算では拘束を課していない。最終的に MD(sim1), MD(sim2)では、20 ns の MD 計算 (NPT アンサンブル) を実行し、MD(sim4)から MD(sim7)では、200 ns の MD 計算 (NPT アンサンブル) を実行した。

3.5.2 水溶性 ATP 結合タンパク質の MD 計算の詳細

力場や計算条件、平衡化計算は MD(sim1), MD(sim2)と同一にした。4 種類の ATP 結合タンパク質に対し、C27(ATP)と mod-C27(ATP)をそれぞれ適用し、5 ns の MD 計算 (NPT アンサンブル) を実行して比較した。

3.5.3 溶液中 ATP のレプリカ交換法 MD の詳細

力場や計算条件、平衡化計算は MD(sim1), MD(sim2)と同一にした。ATP には、C27(ATP)と mod-C27(ATP)のそれぞれを適用して結果を比較した。REIN (Replica-Exchange Interface)⁸¹を用いてレプリカ交換法を実行し、各レプリカの MD 計算は NAMD⁶³によって実行した。温度範囲は 300 K-400 K としレプリカ数は 24 個とした。レプリカ数は Temperature generator for REMD-simulations⁸²によって見積もった。はじめに各レプリカの温度で 200 ps の MD 計算 (NVT アンサンブル) によって系を平衡化した。その後レプリカ交換 MD 計算 (NVT アンサンブル) では、1000 ステップ毎に温度を交換し、合計 480 ns (=各レプリカあたり 20 ns × 24 レプリカ) 実行した。

3.6 改良した多リン酸分子力場の検証結果

はじめに

ATP 状態のカルシウムポンプでは、ATP が N ドメインと P ドメインの hinge 部分に結合し両者を結びつけるリンカーの働きをする。そのため、細胞質ドメインは全体的にコンパクトな形状を取る^{9, 12-13, 83}。結晶構造中の ATP の三リン酸部分は zigzag 構造を取っており、 β リン酸基の酸素原子がリボースの方を向いている⁷⁻⁸ (図 4-3-6-1a)。Phe487 は ATP のアデニン環と π - π stacking 相互作用を形成している^{15, 84-85}。Arg489 と Arg560 はそれぞれ、 α リン酸基 β リン酸基と塩橋を形成している^{7-8, 86-88}。 γ リン酸基は、Asp351 のカルボキシ基、Thr353 と Thr625 のヒドロキシ基、Thr353 と Gly626 のアミド基、Thr353 のカルボキシ基、 Mg^{2+} と相互作用し安定化している⁷。いずれのアミノ酸においても置換実験を行うと ATPase の機能が影響を受けることが知られている⁸⁹⁻⁹¹。N ドメインの Arg560 は ATP β リン酸基を介して P ドメインの Asp627 と塩橋を形成することで、N ドメインと P ドメインを接近させている⁹²⁻⁹⁴。

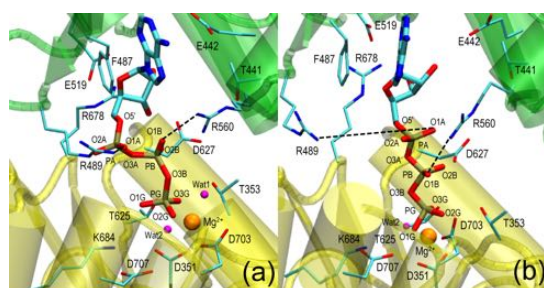


図 4-3-6-1 ATP 結合状態のカルシウムポンプのヌクレオチド結合部位

(a) X 線結晶構造. (b) C27(ATP)を用いた MD(sim1)の 5 ns 後のスナップショット. 点線 (黒) は以下の 2 つの塩橋を示す: ATP α リン酸基-Arg489, ATP β リン酸基-Arg560. N ドメイン (緑), P ドメイン (黄), 結晶水分子 (マゼンタ). (b)では図をわかりやすくするため溶媒の水分子は除いて表示した.

3.6.1 C27(ATP)を用いた MD(sim1)の計算結果

C27(ATP)を用いた MD(sim1)の 5 ns 後の ATP のコンフォメーションと X 線結晶構造を比較すると、三リン酸部分が zigzag 構造から extended 構造へ急激に変化していることが分かった (図 4-3-6-1). 図 4-3-6-2a は、ATP α リン酸基-Arg489 と ATP β リン酸基-Arg560 の 2 つの塩橋の結合長の時間変化を示す。カルシウムポンプだけでなく Na^+, K^+ -ATPase 等も含んだ P 型 ATPase の生化学実験によって、これらの塩橋はタンパク質と ATP の複合体を安定化していることが示されている⁹²⁻⁹⁴。しかし、C27(ATP)を用いた MD 計算では、 α , β , γ リン酸をつなぐ P-O-P の bond angle が急激に減少することで塩橋が切断された (図 4-3-6-2c)。Bond angles PA-O3A-PB と PB-O3B-PG の MD 計算中の平均値は 104° , 111° であり、これは結晶構造での角度と比較するとそれぞれ 28° , 12° も減少している (表 4-3-6-1)。但し、PB-O3B-PG の O3B は結晶構造において ATP のアナログ分子である AMPPCP の炭素原子に対応している。この bond angle P-O-P の減少によって α , β , γ リン酸の酸素原子が互いに接近し、静電相互作用による反発力を最小にするように三リン酸部分の dihedral angle が変化した (図 4-3-6-2d)。

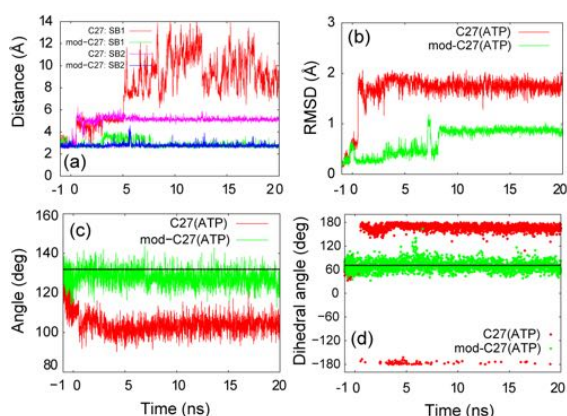


図 4-3-6-2 MD(sim1)と MD(sim2)のヌクレオチド結合部位の構造特性の時間変化

(a) 2つの塩橋を SB1 と SB2 とした結合長の時間変化。SB1=ATP α リン酸基-Arg489 (赤: C27(ATP), 緑: mod-C27(ATP)), SB2=ATP β リン酸基-Arg560 (ピンク: C27(ATP), 青: mod-C27(ATP))。 (b) 三リン酸部分の RMSD の時間変化。三リン酸中の PA, PB, PG の 3 原子でフィッティングを行った。 (c) Bond angle PA-O3A-PB の角度の時間変化。 (d) Dihedral angle O5'-PA-O3A-PB の角度の時間変化。 (b)-(d)では、赤: C27(ATP), 緑: mod-C27(ATP)。 (c), (d)では黒の実線が X 線結晶構造の値を示す。

3.6.2 mod-C27(ATP)を用いた MD(sim2)の計算結果

図 4-3-6-2b は三リン酸部分の初期構造からの

RMSD を示している。MD(sim1)と比較すると、MD(sim2)では、X 線結晶構造の zigzag 構造を保持している。Bond angle P-O-P の時間変化では X 線結晶構造の値の周りで揺らいでいた (図 4-3-6-2c)。MD(sim2)中の bond angle PA-O3A-PB, PB-O3B-PG の平均値はそれぞれ 128°, 133°であり X 線結晶構造のそれと近かった (表 4-3-6-2)。MD(sim2)の dihedral angle O5'-PA-O3A-PB の平均値は 70.2°であり、これは X 線結晶構造の値とほぼ同一であった (70.9°, 表 4-3-6-2)。図 4-3-6-2c と 4-3-6-2d では、双方とも 20 ns の MD(sim2)に渡り X 線結晶構造の角度を安定に再現していた。2つの重要な塩橋も 20 ns 間に安定に形成していた (図 4-3-6-2a)。表 4-3-6-3 には、MD(sim2)中で観測された ATP とカルシウムポンプや、カルシウムポンプ内で形成されている塩橋と水素結合の距離を示した。

表 4-3-6-2 MD(sim1)と MD(sim2)で観測された bond angle と dihedral angle の平均値と対応する X 線結晶構造の値

角度		MD(sim1) (°)	MD(sim2) (°)	X 線結晶構造 (°)
Bond angle	PA-O3A-PB	104 (4.4)	128 (4.5)	132
Bond angle	PB-O3B-PG	111 (5.9)	133 (4.8)	123
Dihedral angle	O5'-PA-O3A-PB	164 (19)	70.2 (13)	70.9

括弧中には標準偏差を記した。

表 4-3-6-3 MD(sim1)と MD(sim2)で観測されたヌクレオチド結合部位の相互作用距離

相互作用の種類	MD(sim1) (Å)	MD(sim2) (Å)	X 線結晶構造 (Å)
ATP (O3')-R678 (NH2)	4.93	2.96	3.10
ATP (O1G)-G626 (N)	4.15	2.95	2.82
ATP (O3G)-T353 (OG1)	4.09	2.59	2.57
D627 (OD1)-R678 (NH2)	8.80	4.74	3.86
R560 (NH1)-D627 (OD2)	5.31	2.74	2.83
結晶構造からの偏差の平均	2.42	0.16	-

これらの相互作用は ATP 結合によって誘起される N-P ドメインのバックギングに重要である。X 線結晶構造からの偏差は MD(sim1) の 2.42 Å から MD(sim2) の 0.16 Å へと大幅に減少した。MD(sim2) の 20 ns 後の ATP 結合部位のスナップショットを図 4-3-6-3 に示した。X 線結晶構造の ATP の結合様式を精度よく再現している。以上のことから、mod-C27(ATP) は C27(ATP) に比べ、X 線結晶構造を精度よく再現し、カルシウムポンプの安定な MD 計算を実現していることが示された。

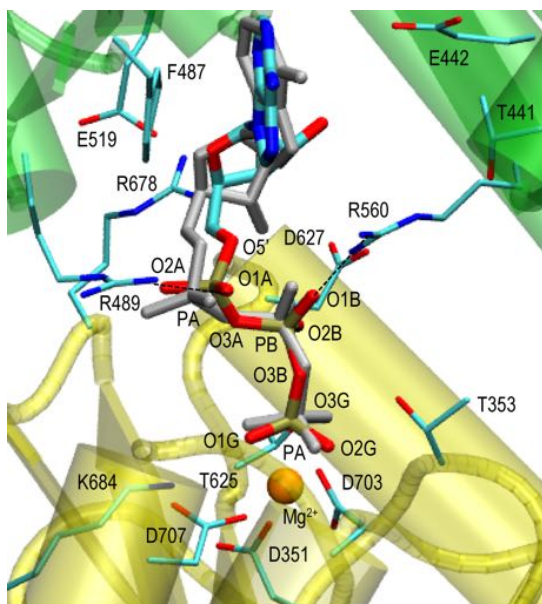


図 4-3-6-3 MD(sim2) の 20 ns 後のヌクレオチド結合部位のスナップショット

比較のため X 線結晶構造の ATP (グレー) を示した。N ドメイン (緑) と P ドメイン (黄色) を表示した。P ドメインでフィッティングを行ってから結晶構造と重ね合わせた。図をわかりやすくするため溶媒の水分子は除いて表示した。

3.6.3 水溶性 ATP 結合タンパク質の MD 計算

一般の水溶性 ATP 結合タンパク質を用いて mod-C27(ATP) の検証を行った。本研究では、PDB で発表されている構造の中から最も解像度の高い

4 つの ATP 結合タンパク質を選択し MD 計算を行った。MD(sim3_a): Histidine permease, MD(sim3_b): RNA editing ligase MP52, MD(sim3_c): Phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase, MD(sim3_d): α -skeletal muscle Actin. これらのタンパク質の全体像とヌクレオチド結合部位の拡大図を図 4-3-6-4 に示した。図 4-3-6-5 には、C27(ATP) と mod-C27(ATP) を用いた場合を比較するため、ATP 三リン酸部分の X 線結晶構造からの RMSD を示した。

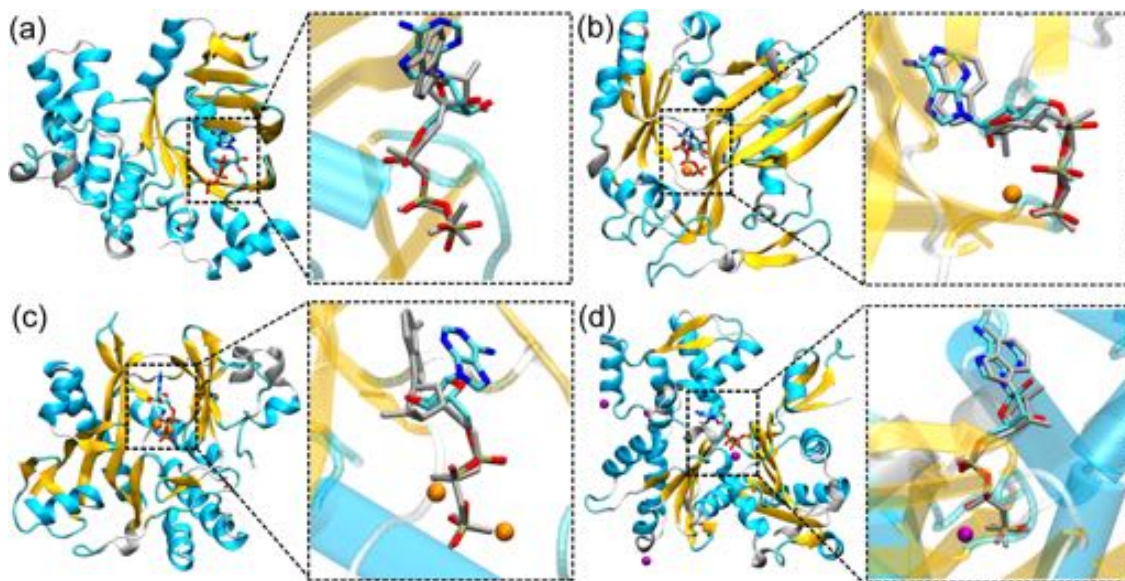


図 4-3-6-4 高解像度の水溶性 ATP 結合タンパク質の MD(sim3)の 5 ns 後ののスナップショットと X 線結晶構造

(a) MD(sim3_a): Histidine permease. (b) MD(sim3_b): RNA editing ligase MP52, (c) MD(sim3_c): Phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase, (d) MD(sim3_d): α -skeletal muscle Actin. グレーの ATP は X 線結晶構造、各々の系においてタンパク質全体でフィッティングしてから ATP の結晶構造を重ね合わせた。Mg²⁺ (オレンジの球)、Ca²⁺ (紫の球) で示した。図をわかりやすくするため溶媒の水分子は除いて表示した。

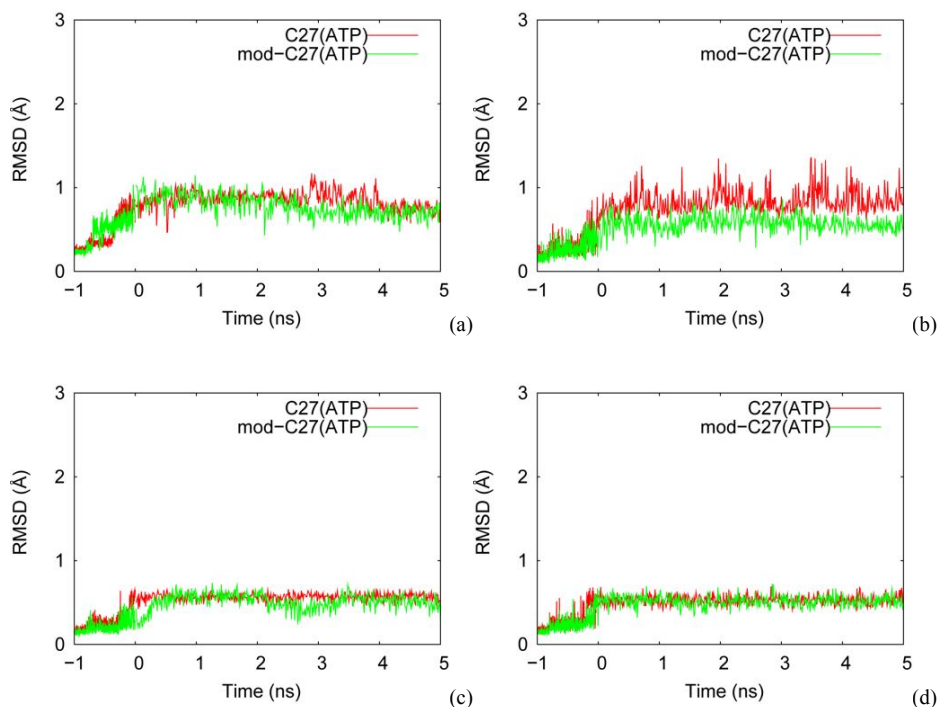


図 4-3-6-5 水溶性 ATP 結合タンパク質の MD(sim3)の ATP 三リン酸部分の RMSD の時間変化

(a) MD(sim3_a): Histidine permease. (b) MD(sim3_b): RNA editing ligase MP52, (c) MD(sim3_c): Phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase, (d) MD(sim3_d): α -skeletal muscle Actin. RMSD は、C27(ATP) (赤)、mod-C27(ATP) (緑) で示した。

MD(sim3)では、mod-C27(ATP)を用いた場合、いずれの ATP 結合タンパク質も X 線結晶構造から ATP の構造はほとんど変化せず、RMSD の揺らぎも小さかった。特に図 4-3-6-4b の RNA editing ligase MP52 の場合、C27(ATP)と比較して、mod-C27(ATP)は RMSD が小さくより安定なコンフォメーションを実現していた。従って、mod-C27(ATP)はカルシウムポンプ以外の一般的なタンパク質の場合でも溶液中においてタンパク質と ATP の安定な相互作用を実現していることが示された。

3.6.4 溶液中 ATP の REMD 計算

ここでは、溶液中での ATP 自身の熱揺らぎは C27(ATP)と mod-C27(ATP)の場合でどのように異なるのかを明らかにする。この目的のため、C27(ATP)と mod-C27(ATP)を用いた溶液中 ATP の REMD 計算 (REMD(ATP)) を実行した。得られた結果から 300 K のトラジェクトリを用いて、ATP 三リン酸部分のコンフォメーションを解析し 2 つの力場を比較した。

REMD 計算のチェック

はじめに REMD 計算が適切に行われているか確認した。レプリカ空間、温度空間、ポテンシャルエネルギー空間のそれぞれのランダムウォークの時間変化を図 4-3-6-6 に示す。全温度範囲に渡る交換率は、C27(ATP)の場合が 51.7%、mod-C27(ATP)を用いた場合が 50.7%であった。以上の結果から、REMD(ATP)はいずれの力場パラメータを用いた場合でも適切に実行されている。

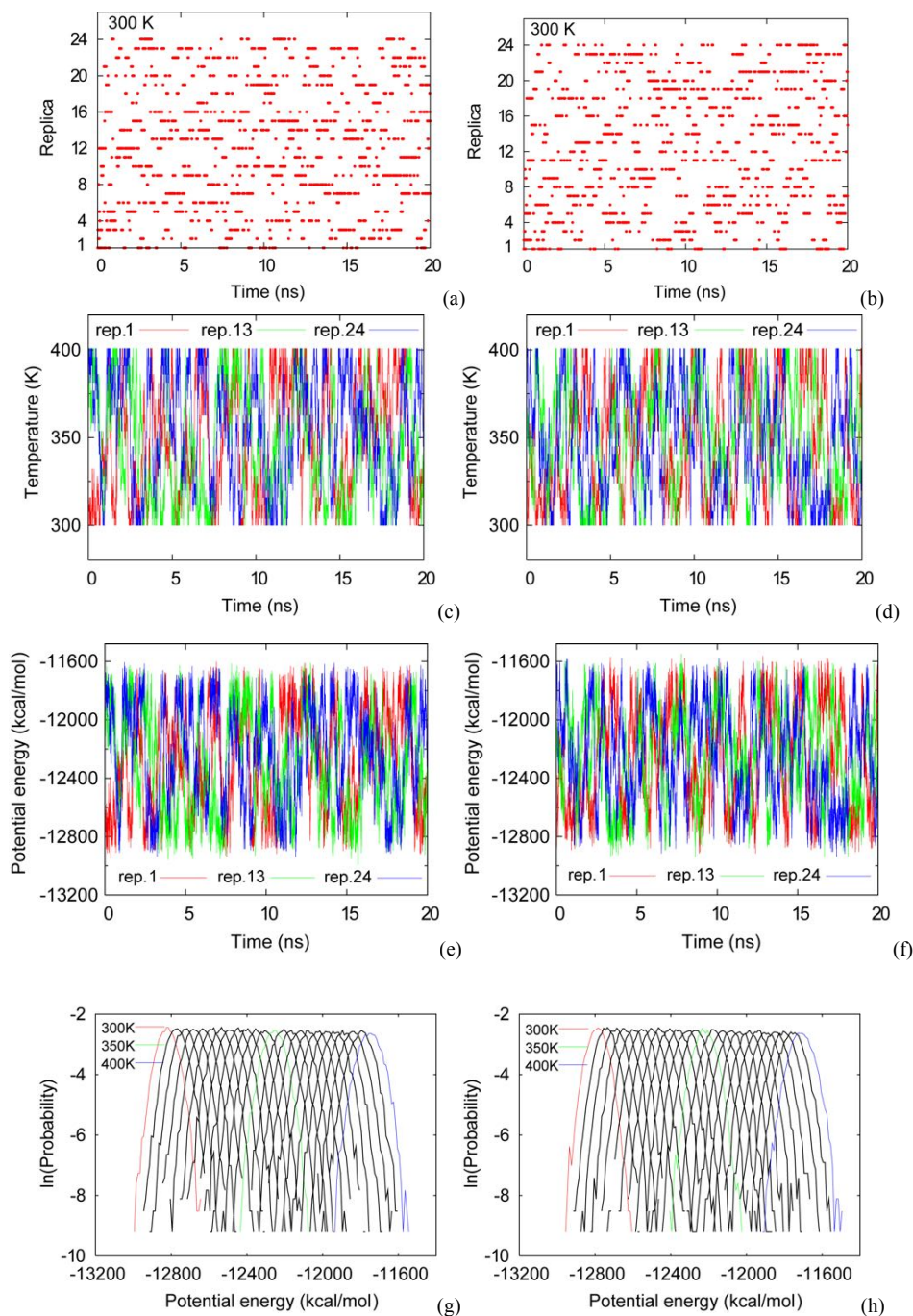


図 4-3-6-6 溶液中 ATP の REMD(ATP)の詳細

(a)(b): 300 K におけるレプリカ空間のランダムウォークの時間変化, (a) C27(ATP), (b) mod-C27(ATP).
 (c)(d): レプリカ 1(赤), レプリカ 13(緑), レプリカ 24(青)の温度空間ランダムウォーク. (c) C27(ATP), (d) mod-C27(ATP).
 (e)(f): レプリカ 1(赤), レプリカ 13(緑), レプリカ 24(青)のポテンシャルエネルギー空間のランダムウォーク. (e) C27(ATP), (f) mod-C27(ATP).
 (g)(h): 全 24 レプリカ (300K : 赤, 350K : 緑, 400K : 青) の系の全ポテンシャルエネルギーの確率分布. (g) C27(ATP), (h) mod-C27(ATP).

解析結果

ATP 三リン酸部分の 2 つの bond angle, PA-O3A-PB (**ang1**) と PB-O3B-PG (**ang2**) の 300 K における自由エネルギー面を図 4-3-6-7 に示した. 比較のため, 高解像度の 59 個の ATP 結合タンパク質結晶構造の ATP の bond angle を同じ自由エネルギー面にプロットした. 自由エネルギーのミニマムは, C27(ATP)を用いた場合の (**ang1**, **ang2**) =

(100°, 120°) から mod-C27(ATP) を用いた場合の (**ang1**, **ang2**) = (120°, 130°) へとシフトした. MD(sim2)計算でも同様の傾向が見られた (表 4-3-6-2). その結果, mod-C27(ATP)の自由エネルギーのミニマムと結晶構造の分布が重なり, bond angle の安定性が改善された. MD(sim2)で得られた PMF 地形のミニマムは, (**ang1**, **ang2**) = (128°, 127°) であった(data not shown).

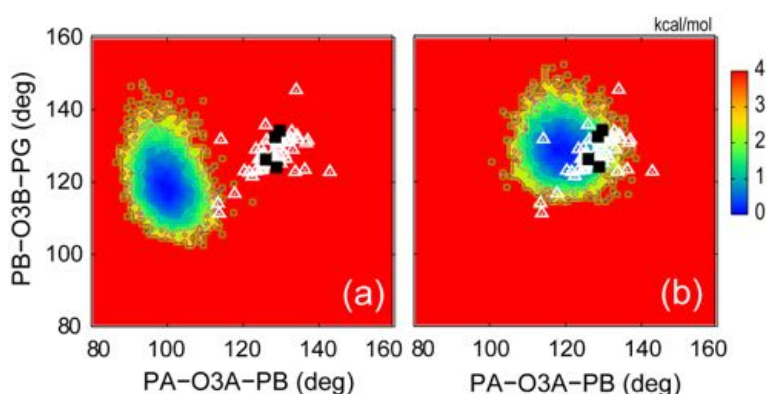


図 4-3-6-7 溶液中 ATP の REMD(ATP)によって得られた bond angle の 300 K の自由エネルギー地形

(a) REMD(ATP)で C27(ATP)を用いた場合, (b) REMD(ATP)で mod-C27(ATP)を用いた場合. PA-O3A-PB (**ang1**)と PB-O3B-PG (**ang2**)の 2 つの bond angle を用いて自由エネルギー地形を求めた. ATP 結合タンパク質の X 線結晶構造中の ATP の **ang1**, **ang2** を自由エネルギー面にプロットした. 解像度は 1.5 Å 以下 (黒四角 4 個), 2.0 Å 以下 (白三角 55 個).

ATP 三リン酸部分の 2 つの dihedral angle, O5'-PA-O3A-PB (**dih1**), PA-O3A-PB-O3B (**dih2**) の 300K における自由エネルギー面を図 4-3-6-8 に示した. 5 ns 毎に同じ自由エネルギー面を描き, 1 レプリカあたり 20 ns の計算時間で構造空間のサンプリングが十分収束していることを確かめた (図 4-3-6-9). C27(ATP)を用いた場合では, (**dih1**, **dih2**) = (180°, 180°) 近傍にのみ単一の自由エネルギーミニマムが観測された一方で, mod-C27(ATP)を用いた場合では, **dih2** = 60°から 300°に渡る幅広い領域で自由エネルギーミニマムが観測された. この自由エネルギー地形を **dih2** の値に沿って 4 つの領域 (I-IV) に分割すると, C27(ATP)の場合は領域 II, III

のみサンプルしている結果に対し, mod-C27(ATP)を用いた場合では領域 I-IV をサンプルしていた (表 4-3-6-4). MD(sim2)では, (**dih1**, **dih2**) = (70.9°, 95.5°)近傍に自由エネルギーのミニマムが存在し, この位置は領域 I-IV から外れていた. ATP の **dih1** と **dih2** は α リン酸基と β リン酸基に属しており, カルシウムポンプのこの 2 つのリン酸基は, それぞれ Arg489 と Arg560 と塩橋を形成している. そのため 2 つのリン酸基は特異的な配向で安定化し, 溶液中 ATP の **dih1**, **dih2** とは異なった結果が得られた. REMD(ATP)では, C27(ATP), mod-C27(ATP)のいずれの場合でも領域 II, III が最も存在割合が大きかった.

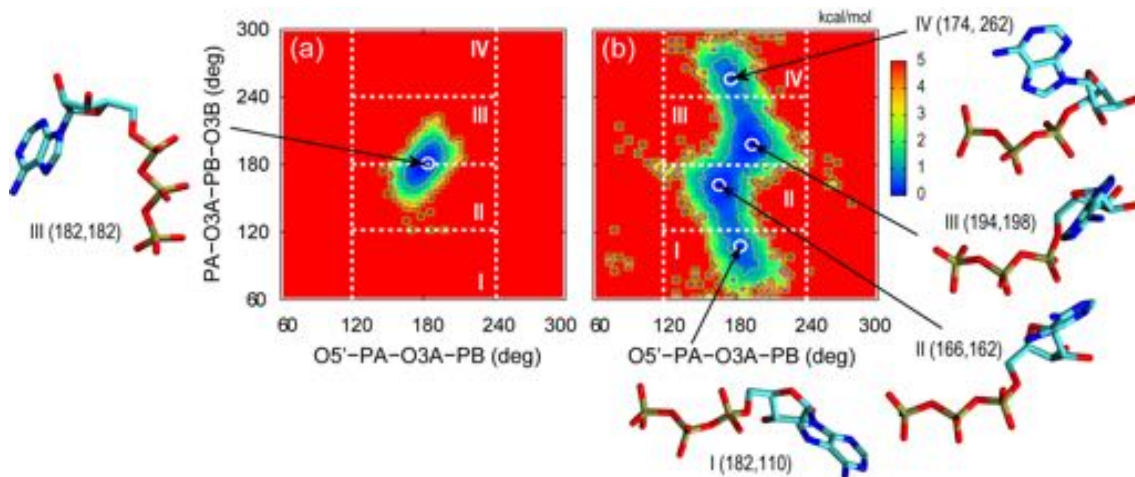


図 4-3-6-8 溶液中 ATP の REMD(ATP)によって得られた dihedral angle の 300 K における自由エネルギー地形

(a) REMD(ATP)で C27(ATP)を用いた場合, (b) REMD(ATP)で mod-C27(ATP)を用いた場合, O5'-PA-O3A-PB ($dih1$)と PA-O3A-PB-O3B ($dih2$)の 2つの dihedral angle を用いて自由エネルギー地形を求めた. 白い点線は ATP 三リン酸のコンフォメーション解析のために分割した境界を示す. 領域 I ($60^\circ \leq dih2 < 120^\circ$), 領域 II ($120^\circ \leq dih2 < 180^\circ$), 領域 III ($180^\circ \leq dih2 < 240^\circ$), 領域 IV ($240^\circ \leq dih2 < 300^\circ$). すべての領域において $120^\circ \leq dih1 < 240^\circ$. 各領域の自由エネルギーミニマムに存在する構造とその位置の($dih1$, $dih2$)を示した.

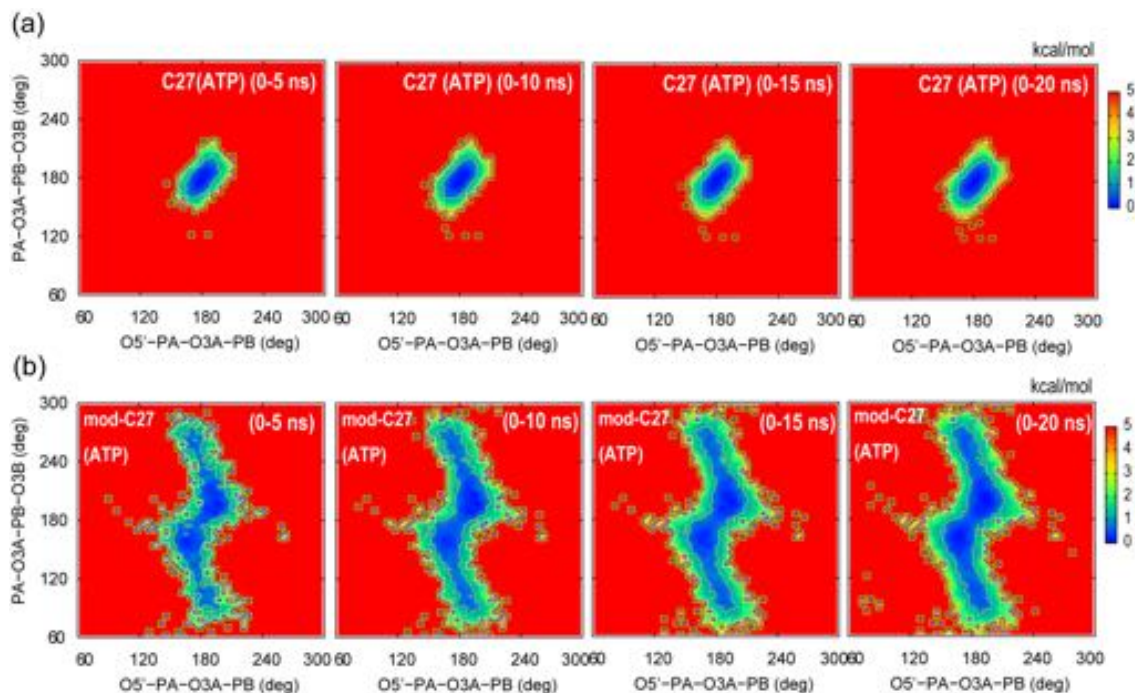


図 4-3-6-9 REMD(ATP)の自由エネルギー地形の収束判定

(a) REMD(ATP)で C27(ATP)を用いた場合の dihedral angle の自由エネルギー地形の収束の様子. (b) REMD(ATP)で mod-C27(ATP)を用いた場合の dihedral angle の自由エネルギー地形の収束の様子. それぞれ 5ns 毎の累積値を示した.

表 4-3-6-4 溶液中 ATP の REMD 計算によって得られた 三リン酸部分のコンフォメーションの相対割合

領域	C27(ATP) (%)	mod-C27(ATP) (%)
I	0.0	14.8 (0.4)
II	49.8	34.5 (0.1)
III	50.2	36.9 (0.0)
IV	0.0	13.3 (0.4)

括弧中には、図 4-3-6-8 における各領域の構造間の自由エネルギー差(kcal/mol)を示した。

さらに 3 つ目の dihedral angle O3A-PB-O3B-PG (**dih3**) を採用し、all-trans 型 ($150^\circ \leq \mathbf{dih1}$, $\mathbf{dih2}$, $\mathbf{dih3} \leq 210^\circ$) を定義すると、REMD(ATP)でこの構造を取る割合は、C27(ATP)を用いた場合が 76.4%、mod-C27(ATP) を用いた場合が 31.2%であった。また 59 個の ATP 結合タンパク質の X 線結晶構造中の ATP 三リン酸は、溶液中 ATP の REMD 計算で得られた **dih1**, **dih2** のコンフォメーション空間よりも幅広い構造を取っている (図 4-3-6-10a, b)。解像度が 1.5 Å 以下の結晶構造では、RNA editing ligase MP52 (274°, 174°) と phosphoribosylamidoimidazole- succinocarboxamide synthase (86.6°, 123°) が溶液中 ATP の分布から外れている。これはタンパク質に結合した ATP の場合、周囲のアミノ酸残基との相互作用によって三リン酸部分は溶液中よりも折れ曲がった構造を取りやすいことに依る。解像度が 1.5 Å 以下の ATP 結合タンパク質の MD 計算で得られた **dih1**, **dih2** の分布を図 4-3-6-8 の自由エネルギー地形上に射影した (図 4-3-6-10c, d)。結論として、溶液中 ATP またはタンパク質に結合した ATP のいずれの系でも mod-C27(ATP) を用いた場合、三リン酸部分の柔軟性は C27(ATP) で観測されたような単一の自由エネルギーミニマムに陥ることなく、カルシウムポンプで見られたような zigzag 構造も含む幅広

い構造空間のコンフォメーションを実現していた。

3.6.4 C27(ATP)と mod-C27(ATP)の比較のまとめ

C27(ATP)と mod-C27(ATP)の違いをまとめる。第 1 に、モデル化合物として C27(ATP)では MDP を用いたが、mod-C27(ATP)では MTP を用いて力場パラメタを作成した。MTP は三リン酸分子であるので、MDP と比べて分子構造や電荷がより ATP と近くなっている。第 2 に、*ab initio* のエネルギー曲線を得るための量子化学計算精度が異なる。C27(ATP)では HF/6-31+G* が用いられていたが、mod-C27(ATP)では MP2/6-31+G*を採用し電子相関を考慮した。一般的に電子相関を考慮すると dihedral angle に沿ったエネルギー障壁が低くなる。このことは、mod-C27(ATP)を用いた ATP 三リン酸の dihedral angle の自由エネルギー地形が C27(ATP)の場合よりも幅広くなっていることで確認できる (図 4-3-6-8)。第三に、bond angle P2-ON2-P と P2-ON2-P2 に対する UB 項の扱いが異なる。C27(ATP) では bond angle P-O-P の *ab initio* 振動数の再現のため UB 項に対し負の force constant を用いていたが、mod-C27(ATP) ではこの項を除いた。この影響を解析するため、MDP に含まれる bond angle P-O-P の振動数計算を行った。分子力場の振動数は CHARMM の MOLVIB⁹⁵ を実行して求めた。*ab initio* の振動数は Gaussian09 を用いた量子化学計算によって求めた。C27(ATP) を用いた場合は 95.5 cm⁻¹ (対応する *ab initio* 振動数は 86.8 cm⁻¹, HF/6-31+G*) であり⁴⁹, mod-C27(ATP)を用いた場合は 86.6 cm⁻¹ (対応する *ab initio* 振動数は 128.6 cm⁻¹, MP2/6-31+G*) となり、mod-C27(ATP) の方が振動数の精度は低下した。

古典力学に基づいた力場では、分子の物理的・化学的特性を再現するために複数の項の和で構成

されている。しかし、一般に分子の全ての特性を既存の力場パラメタで再現することは難しく、理想的には対象とする系ごとに調整を行う必要がある。生体機能の研究において、ATP は溶液中やタンパク質に結合した状態での平衡構造の再現が最

も重要であり、本研究では振動数の再現より優先した。従って、mod-C27(ATP) は溶液中の生体機能の研究に適しており、カルシウムポンプや他のタンパク質の MD 計算における ATP の熱運動の解析に有用である。

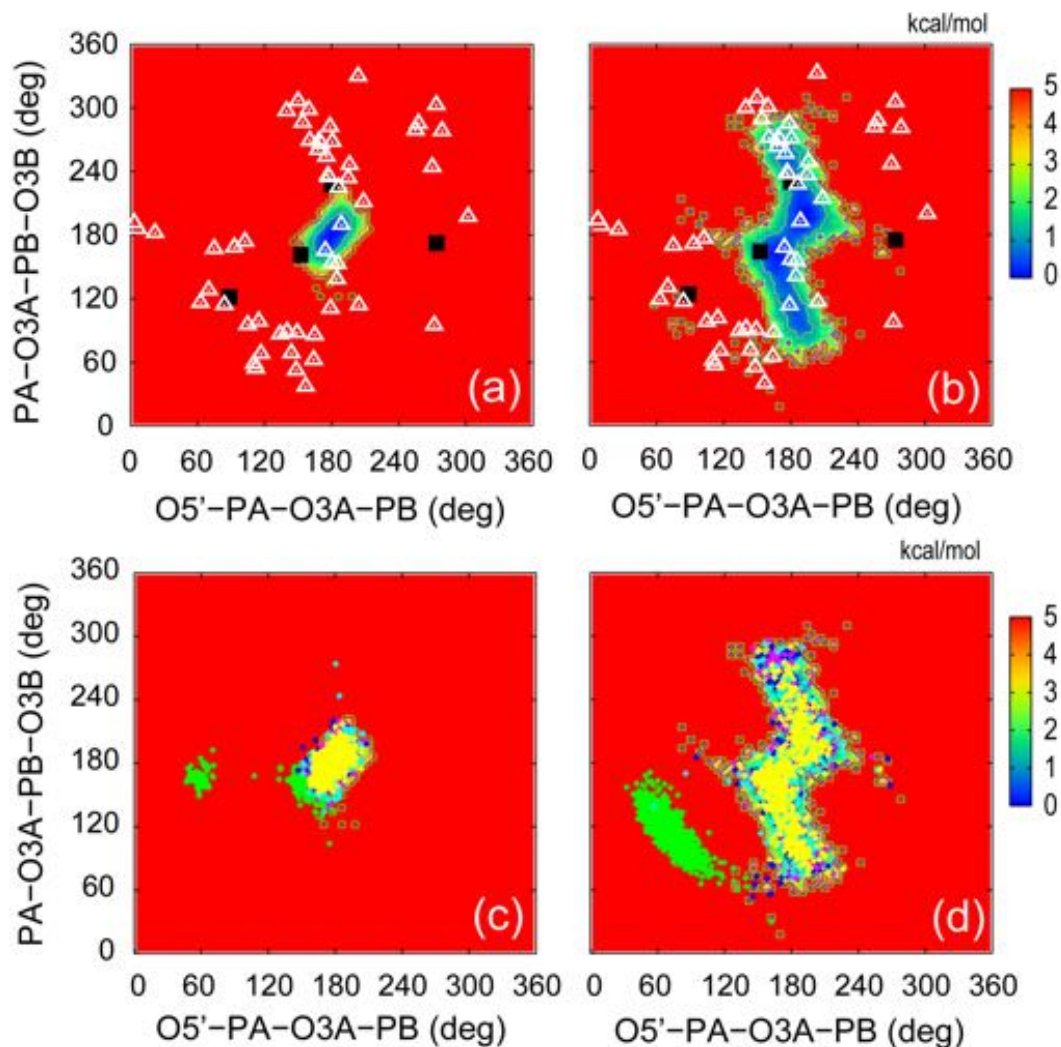


図 4-3-6-12 溶液中 ATP の REMD(ATP) と ATP 結合タンパク質の MD(sim3) の結果と X 線結晶構造との比較

溶液中 ATP の REMD(ATP) 計算で得られた O5'-PA-O3A-PB (**dih1**) と PA-O3A-PB-O3B (**dih2**) の自由エネルギー地形。(a) と (c) は C27(ATP) を用いた場合、(b) と (d) は mod-C27(ATP) を用いた場合。(a) と (b) には 59 個の ATP 結合タンパク質の X 線結晶構造の **dih1**, **dih2** の分布をプロットした。解像度が 1.5 Å 以下 (黒四角 4 個) と 2.0 Å 以下 (白三角 55 個) の場合を区別して示した。(c) と (d) には、ATP 結合タンパク質の MD 計算で観測された ATP の **dih1**, **dih2** の分布をプロットした。Histidine permease (青), RNA editing ligase MP52 (マゼンタ), Phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase (シアン), α -skeletal muscle Actin (黄色)。またカルシウムポンプの MD(sim1), MD(sim2) 計算で観測された ATP の **dih1**, **dih2** の分布 (緑) も示した。

3.7 ヌクレオチド結合部位と ATP/ADP との相互作用

3.7.1 活性中心における ATP/ADP の熱運動

2章で詳述したように ATP 結合状態のヌクレオチド結合部位では、ATP 加水分解と Asp351 のリン酸化が起こる。しかし ATP 結合状態の結晶構造では、ATP の代わりに、加水分解を停止させるアナログ分子である AMPPCP を用いて結晶化されたため⁷⁻⁸、ヌクレオチド結合部位の構造を全て信頼できない。そこで生体環境におけるヌクレオチド結合部位の安定構造を求め、活性中心における ATP や ADP の振る舞いを明らかにする必要がある。本研究では、生理的環境を再現した系においてカルシウムポンプの長時間 MD 計算を行い、溶液環境からの熱雑音を受けた ATP や ADP がどのように熱運動し周囲の残基と相互作用して化学反応を担う基質としての機能を果たしているのか解析する。また、ヌクレオチド結合部位に配位する Mg^{2+} の個数とその Mg^{2+} の機能は明らかになっていない。そこで本研究では、ヌクレオチド結合部位において ATP と 1 個の Mg^{2+} が結合した MD(sim4)、ATP と 2 個の Mg^{2+} が結合した MD(sim5)、ADP と 1 個の Mg^{2+} が結合した MD(sim6)、ADP と 2 個の Mg^{2+} が結合した MD(sim7) を実行した。MD(sim5) の 2 個目の Mg^{2+} の位置は、ADP 結合状態の結晶構造で観測された 2 個目の Mg^{2+} の座標を用いた。全ての MD 計算で mod-C27(ATP) を用いた。以後、ATP 結合状態の結晶構造中の ATP γ リン酸基と Asp351 の間に配位する Mg^{2+} を $Mg^{2+}(I)$ と表記する。ADP 結合状態の結晶構造中の ATP β リン酸基と ATP γ リン酸基の間に配位する Mg^{2+} を $Mg^{2+}(II)$ と表記する。

3.7.2 ATP 結合状態の MD(sim4), MD(sim5) の結果

(a) ヌクレオチド結合部位の解析結果

MD(sim4), MD(sim5) を 200 ns 実行した。ヌクレオチド結合部位のスナップショットを図 4-3-7-1 に示す。ATP と塩橋を形成する残基との距離の時間変化と ATP の RMSD を図 4-3-7-2 に示す。ATP 結合状態の結晶構造では、 $Mg^{2+}(I)$ を介して ATP γ リン酸基と Asp351 が直線上に並び、 γ リン酸基が Asp351 の酸素原子に転移する直前の構造を形成している。しかし MD(sim3) (図 4-3-7-1a) を開始すると、ATP 三リン酸部分が徐々に結晶構造からずれ始め、50 ns 付近で $Mg^{2+}(I)$ が ATP の β リン酸基と γ リン酸基、さらに Asp351 の 2 つの酸素原子の間に配位する。この影響で ATP の安定な結合に重要な ATP β リン酸基と Arg560 との塩橋が切断し、ATP β リン酸基が約 180° 回転し γ リン酸基も Asp351 の酸素原子から向きを変えた (図 4-3-7-1b)。図 4-3-7-1b の構造は 50 ns からその後 200 ns まで安定に形成していた。一方、MD(sim5) (図 4-3-7-1c) では、ATP 三リン酸部分は結晶構造からほとんど変化せず、ATP と周辺の残基との塩橋も結晶構造を 200 ns の間安定に保持していた (図 4-3-7-1d)。 $Mg^{2+}(I)$ は ATP γ リン酸基と Asp351 の間に配位し、 $Mg^{2+}(II)$ は ATP 三リン酸の中間に結合し $\alpha\beta\gamma$ リン酸基と配位を形成していた (図 4-3-7-1d)。また MD(sim5) において、 $Mg^{2+}(II)$ の挿入位置を変えて ATP α リン酸基と γ リン酸基の間に配位させた系の 20 ns の計算も実行した。この場合は平衡化計算中に $Mg^{2+}(II)$ が MD(sim5) の初期の $Mg^{2+}(II)$ 挿入位置である ATP α , β , γ リン酸基の間に移動し、20ns の本計算中も同じ位置に安定に配位した (data not shown)。ATP のコンフォメーションも 20 ns 間に渡り結晶構造を安定に保持していた。従って

MD(sim5)のヌクレオチド結合部位の安定性は、 Mg^{2+} (II)の初期位置に依らないことが分かった。

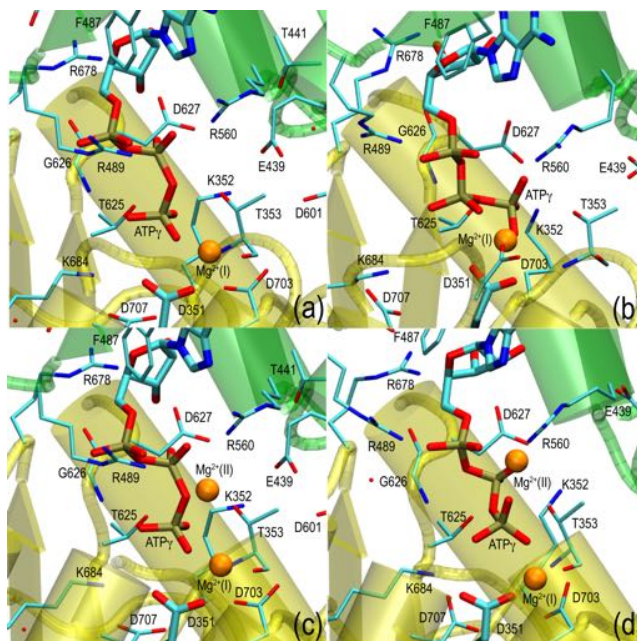


図 4-3-7-1 ATP 結合状態のカルシウムポンプの MD(sim4), MD(sim5)のヌクレオチド結合部位のスナップショット

(a) MD(sim4)の初期構造, (b) MD(sim4)の 200 ns 後の構造, (c) MD(sim5)の初期構造, (d) MD(sim5)の 200 ns 後の構造, ATP 結合状態の結晶構造で存在した ATP γ リン酸基と Asp351 の間に配位する Mg^{2+} を Mg^{2+} (I) と表記した, ATP β リン酸基と ATP γ リン酸基の間に挿入した Mg^{2+} を Mg^{2+} (II) と表記した, 見やすくするため水分子は除いて表示した。

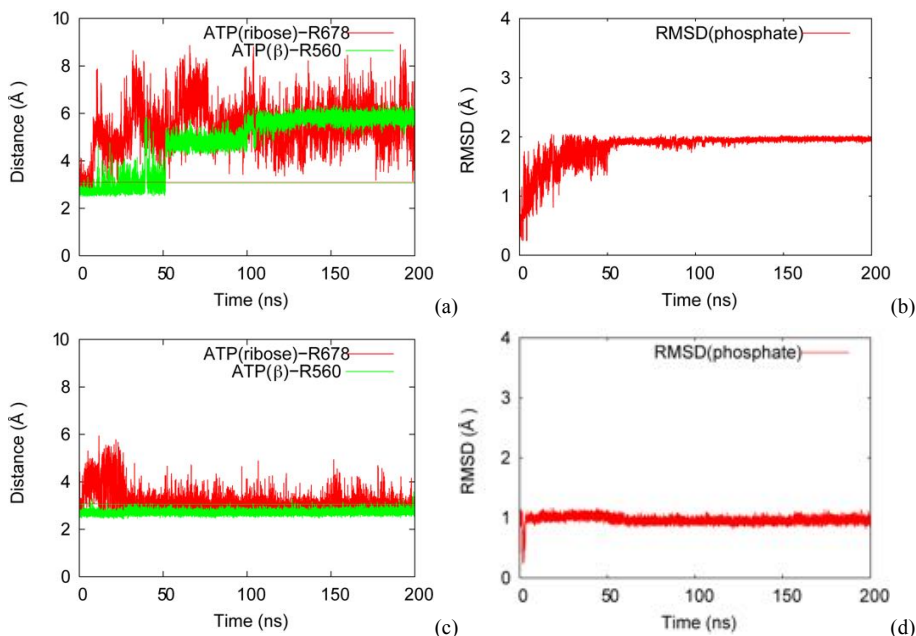


図 4-3-7-2 MD(sim4)と MD(sim5)における ATP と周辺残基との塩橋と ATP の RMSD の時間変化

(a) MD(sim4)の ATP と salt bridge を形成する残基との距離の時間変化, ATP (リボース) -Arg678 (赤), ATP β リン酸基 -R560 (緑), 直線は X 線結晶構造の距離 (赤: 3.10 Å, 緑: 3.06 Å) を示す, (b) MD(sim4)の ATP 三リン酸部分の RMSD の時間変化, (c) MD(sim5)の ATP と salt bridge を形成する残基との距離の時間変化, ATP (リボース) -Arg678 (赤), ATP β リン酸基-R560 (緑), 直線は X 線結晶構造の距離を示す, (d) MD(sim5)の ATP 三リン酸部分の RMSD の時間変化。

(b) 細胞質ドメインの解析結果

MD(sim4), MD(sim5)の 200 ns 後の細胞質ドメイン (A, N, P ドメイン) の構造と結晶構造との比較を図 4-3-7-3 に示す (P ドメインでフィッティングを行った). 図 4-3-7-4 には P ドメインでフィッティングを行ったときの A, N ドメインの RMSD の時間変化を示す. MD(sim4)の場合, 細胞質ドメイン全体が寄り集まったコンパクトな形状の結晶構造から A, N ドメインが互いに離れ, 全体的に外に広がるように構造変化した (図 4-3-7-3a). A, N ドメ

インの RMSD も徐々に増大し, 200 ns 後には結晶構造からおよそ 4-5 Å 程度連続的に変化した. (図 4-3-7-4a, b). 一方 MD(sim5)の場合も A, N ドメインが互いに離れるが, MD(sim4)の場合よりも変化は小さい (図 4-3-7-3b). A, N ドメインの RMSD は 200 ns 間で 2 Å 付近で揺らいでいた (図 4-3-7-4a, b). MD(sim4), MD(sim5)いずれの場合も A, N, P ドメイン自体の構造変化は小さく RMSD は 1-2 Å であった.

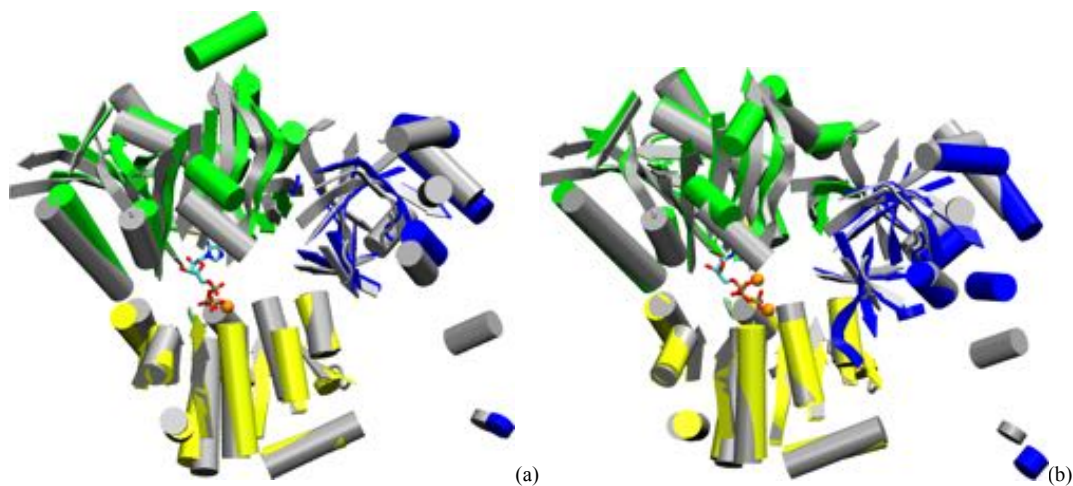


図 4-3-7-3 MD(sim4)と MD(sim5)の 200 ns 後の細胞質ドメインの構造と結晶構造との比較

(a) MD(sim4)の 200 ns 後の A (青), N (緑), P (黄) ドメインと結晶構造 (グレー) の比較. N ドメインと P ドメインの界面に ATP と $Mg^{2+}(I)$ が結合している. (b) MD(sim5)の 200 ns 後の A (青), N (緑), P (黄) ドメインと結晶構造 (グレー) の比較. N ドメインと P ドメインの界面に ATP と $Mg^{2+}(I)$, $Mg^{2+}(II)$ が結合している. ともに P ドメインでフィッティングを行った.

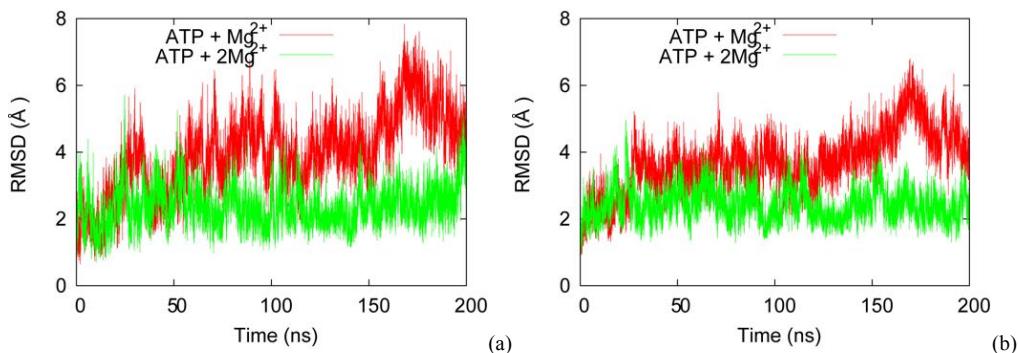


図 4-3-7-4 MD(sim4)と MD(sim5)の 200 ns 間の細胞質ドメインの RMSD の時間変化

(a) A ドメインの RMSD. (b) N ドメインの RMSD. MD(sim4) (赤), MD(sim5) (緑) を示した. ともに P ドメインでフィッティングを行った.

3.7.3 ADP 結合状態の MD(sim6), MD(sim7)の結果

(a) ヌクレオチド結合部位の解析結果

MD(sim6), MD(sim7)を 200 ns 実行した. ヌクレオチド結合部位のスナップショットを図 4-3-7-5 に示す. ADP と塩橋を形成する残基との距離の時間変化を図 4-3-7-6 に示す. ADP 結合状態の結晶構造 (図 4-3-7-5c) では, $Mg^{2+}(I)$ はリン酸化した Asp351 (P-Asp351) 付近に配位し, $Mg^{2+}(II)$ は ADP β リン酸基付近に配位している. リン酸転移反応直後の遷移状態であるため, ADP β リン酸基の酸素原子と P-Asp351 のリン酸基が一直線上に並んでいる. MD(sim6) (図 4-3-7-5a) を開始すると 50 ns 付近で ADP α リン酸基-R489 と ADP β リン酸基-R560 の 2

つの塩橋が切断され (図 4-3-7-6a), ADP がヌクレオチド結合部位から解離した (図 4-3-7-5b). $Mg^{2+}(I)$ は P-Asp351 に付近に安定に配位していた (図 4-3-7-5b). 一方 MD(sim7) (図 4-3-7-5c) では, 20 ns 付近で ADP α リン酸基-R489 の相互作用が不安定になるが, 40-200 ns では再度安定な塩橋を形成する (図 4-3-7-6b). ADP β リン酸基-R560 の塩橋は, 70 ns 付近で不安定になるが, その後 200 ns まで再度安定に形成する (図 4-3-7-6b). $Mg^{2+}(I)$ は P-Asp351 に付近に安定に配位し, $Mg^{2+}(II)$ は ADP α リン酸基と β リン酸基の間に安定に配位していた (図 4-3-7-5d). MD(sim6)と MD(sim7)ともに ADP の二リン酸部分はランダムに熱ゆらぎをしていた.

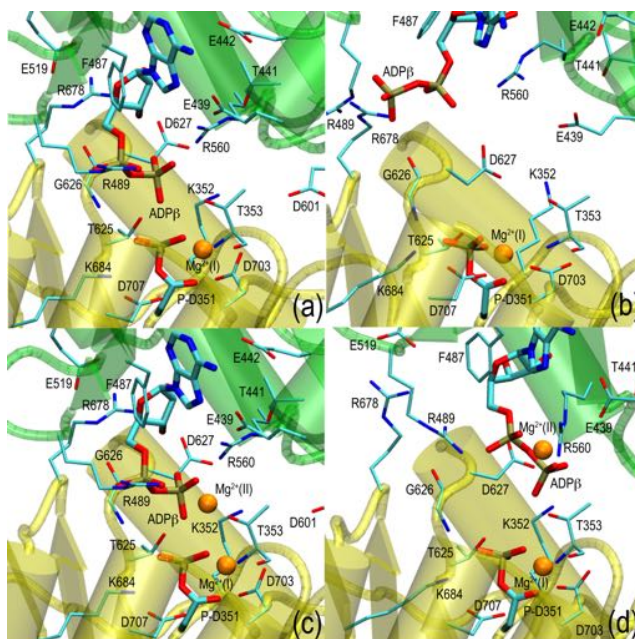


図 4-3-7-5 ADP 結合状態のカルシウムポンプの MD(sim6), MD(sim7)のヌクレオチド結合部位のスナップショット

(a) MD(sim6)の初期構造, (b) MD(sim6)の 200 ns 後の構造, (c) MD(sim7)の初期構造, (d) MD(sim7)の 200 ns 後の構造. ADP 結合状態の結晶構造で存在した ATP γ リン酸基と Asp351 の間に配位する Mg^{2+} を $Mg^{2+}(I)$, ATP β リン酸基と ATP γ リン酸基の間に配位した Mg^{2+} を $Mg^{2+}(II)$ と表記した. 見やすくするため水分子は除いて表示した.

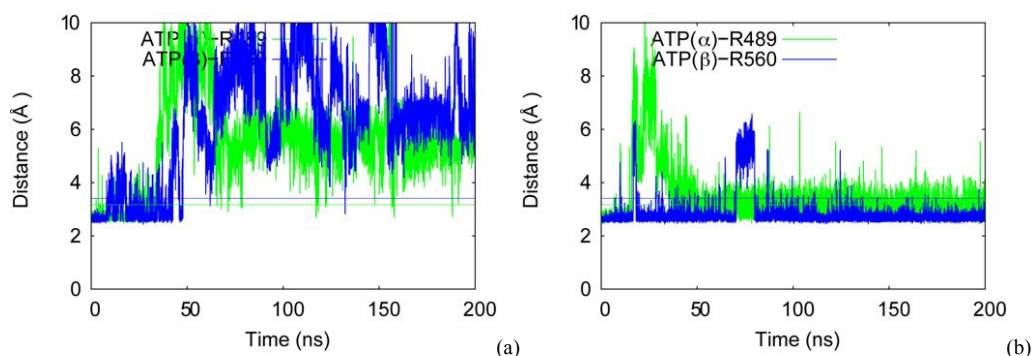


図 4-3-7-6 MD(sim6)と MD(sim7)における ADP と周辺残基との塩橋の時間変化

(a) MD(sim6)の ADP と塩橋を形成する残基との距離の時間変化. (b) MD(sim7)の ADP と塩橋を形成する残基との距離の時間変化. ADP α リン酸基-R489 (緑) ADP β リン酸基-R560 (青). 直線は X 線結晶構造の距離 (緑: 3.17 Å, 青: 3.41 Å) を示す.

(b) 細胞質ドメインの解析結果

MD(sim6)と MD(sim7)の 200 ns 後の細胞質ドメイン (A, N, P ドメイン) の構造と結晶構造との比較を図 4-3-7-7 に示す (P ドメインでフィッティングを行った). 図 4-3-7-8 には P ドメインでフィッティングを行ったときの A, N ドメインの RMSD の時間変化を示す. カルシウムポンプの場合, ADP 結合状態の結晶構造は ATP 結合状態のそれとほぼ同一の立体構造している^{7-8, 16}. MD(sim6)の場合も, 細胞質ドメイン全体が寄り集まったコンパクトな形状の結晶構造から A, N ドメインが互いに離れ, 全体的に外に広がるように構造変化した (図 4-3-7-7a). A ドメインの RMSD は 25 ns 付近では 6 Å まで変化するが, その後減少し 4 Å 付近で揺らいでいた (図 4-3-7-8a). N ドメインの RMSD の変化は大きく, 50 ns 付近まで連続的に増加し, その後 8 Å 付近で揺らいでいた (図 4-3-7-8b). 一方 MD(sim7)の場合も A, N ドメインが互いに離れるが, MD(sim6)の場合よりも変化は小さい (図 4-3-7-7b). A ドメインの RMSD は 200 ns に渡り 2 Å 付近で揺らいでいた (図 4-3-7-8a). N ドメインの RMSD は 200 ns に渡り 4 Å 付近で揺らいでいた (図 4-3-7-8b). MD(sim6)と MD(sim7)のいずれの場合も

A, N, P ドメイン自体の構造変化は小さく RMSD は 1-2 Å であった (data not shown).

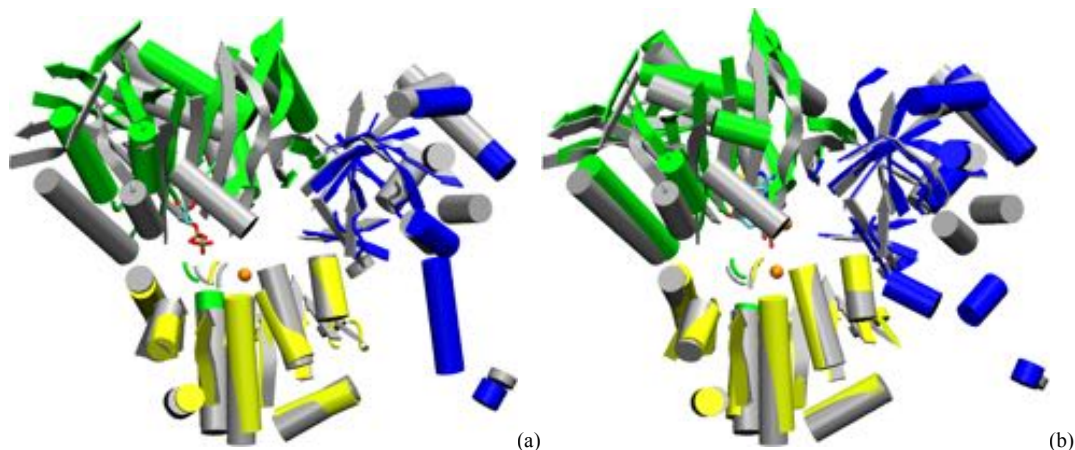


図 4-3-7-7 MD(sim6)と MD(sim7)の 200 ns 後の細胞質ドメインの構造と結晶構造との比較

(a) MD(sim6)の 200 ns 後の A (青), N (緑), P (黄) ドメインと結晶構造 (グレー) の比較. N ドメインと P ドメインの界面に ADP と $Mg^{2+}(I)$ が結合している. (b) MD(sim7)の 200 ns 後の A (青), N (緑), P (黄) ドメインと結晶構造 (グレー) の比較. N ドメインと P ドメインの界面に ADP と $Mg^{2+}(I)$, $Mg^{2+}(II)$ が結合している. とともに P ドメインでフィッティングを行った.

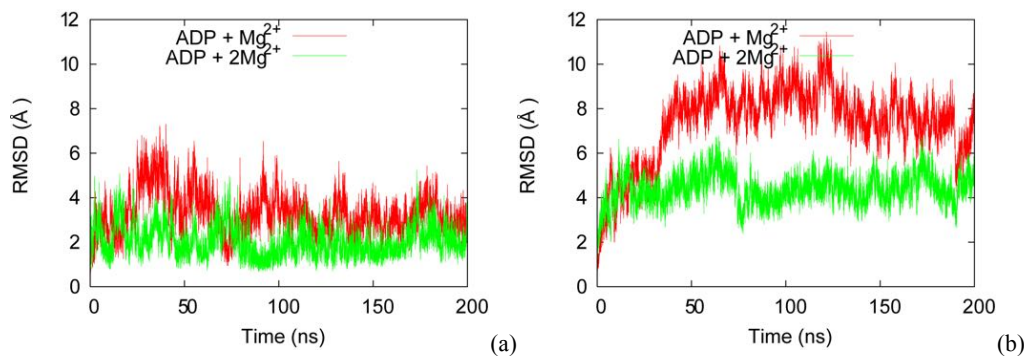


図 4-3-7-8 MD(sim6)と MD(sim7)の 200 ns 間の細胞質ドメインの RMSD の時間変化

(a) A ドメインの RMSD. (b) N ドメインの RMSD. MD(sim6) (赤), MD(sim7) (緑) を示した. とともに P ドメインでフィッティングを行った.

3.7.4 ATP- Mg^{2+} と AMPPCP- Mg^{2+} の相互作用エネルギーの量子化学計算の比較

ATP 結合状態の結晶化では, ATP のアナログ分子として AMPPCP が用いられている. また F 型 ATPase である FoF1-ATPase の結晶化には同じく ATP のアナログ分子である AMPPNP が用いられている⁹⁶. いずれのアナログ分子の場合でも, タンパク質内部では ATP として認識され反応部位に結合するが, ATP の類似体であるため化学反応が進行しない. そのため加水分解やリン酸化の直前の結

晶構造を得ることができ, 活性中心の構造解析が可能となる. これらの分子の構造を図 4-3-7-9 に示す⁹⁷.

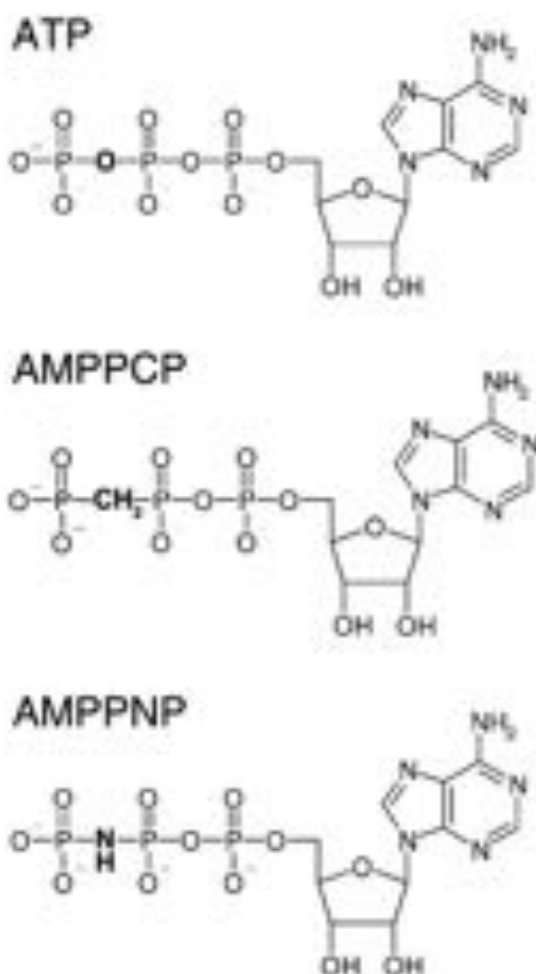


図 4-3-7-9 ATP, AMPPCP, AMPPNP の構造⁹⁷

他の分子と異なる部分を太字で示されている。三リン酸部分の β リン酸基と γ リン酸基の連結部分の構造が異なっている。3 つの分子の全電荷量は分子全体で等しく $-4e$ である (e は素電荷)。AMPPCP や AMPPNP を用いた場合、タンパク質反応部位では ATP として認識されるが、類似体であるため加水分解反応や γ リン酸基の転移は起きない。⁹⁷ 改変。

カルシウムポンプの ATP 結合状態において ATP が AMPPCP に置換された影響を解析するため、ATP-Mg²⁺ と AMPPCP-Mg²⁺ の相互作用エネルギーを比較した。ATP, AMPPCP, Mg²⁺ はいずれも電荷を持ち、電子間の相互作用によって極性が変化するため、電子状態を露わに扱う量子化学計算で相互作用エネルギーを計算した。

初期構造の準備

(a) ATP

ATP のモデル化合物である Methyl triphosphate (MTP) を用いた。MTP の初期構造は、カルシウムポンプ ATP 結合状態の X 線結晶構造の ATP 三リン酸構造をそのまま用いた。

(b-1) AMPPCP

GaussView⁹⁸ を用いて (a) の MTP の β リン酸基と γ リン酸基の間の酸素原子を CH₂ に置換し AMPPCP のモデル化合物 MPPCP を作成した (図 4-3-7-10)。

(b-2) MPPCP の CH₂ の配向の最適化

GaussView では CH₂ の配向は適当に配置されるので、Gaussian09⁵⁰ を用いて気相環境における MPPCP 中の CH₂ の配向の最適化を行った。量子化学計算は、はじめに HF/6-31+G* で最適化し、次に MP2/6-31+G* で最適化を行った。

Mg²⁺(II) の位置

Mg²⁺(I) は ATP 結合状態の X 線結晶構造の Mg²⁺(I) の位置を用いた。Mg²⁺(II) は ADP 結合状態の X 線結晶構造の Mg²⁺(II) の位置を用いた。Mg²⁺(II) については量子化学計算を行って気相中での ATP に対する結合位置の最適化を行ったが、結晶構造で観測された β リン酸基と γ リン酸基の間の配位から大きく位置がずれ、 α リン酸基と β リン酸基の間に配位した。この結果は気相環境による artifact を含んでいる。本研究では、X 線結晶構造の Mg²⁺(II) の配置における MTP と MPPCP との相互作用エネルギーの比較が目的であるため、気相中での量子化学計算による最適化は行わず、結晶構造の Mg²⁺(II) の位置を用いた。

相互作用エネルギーの算出法

本研究では、相互作用エネルギー ΔE を以下のよう

$$\begin{aligned} \Delta E_{MTP} &= \Delta E_{MTP+Mg^{2+}(I)+Mg^{2+}(II)} - \Delta E_{MTP+Mg^{2+}(I)} - \Delta E_{Mg^{2+}(II)} \\ \Delta E_{MPPCP} &= \Delta E_{MPPCP+Mg^{2+}(I)+Mg^{2+}(II)} - \Delta E_{MPPCP+Mg^{2+}(I)} - \Delta E_{Mg^{2+}(II)} \end{aligned} \quad (4.1)$$

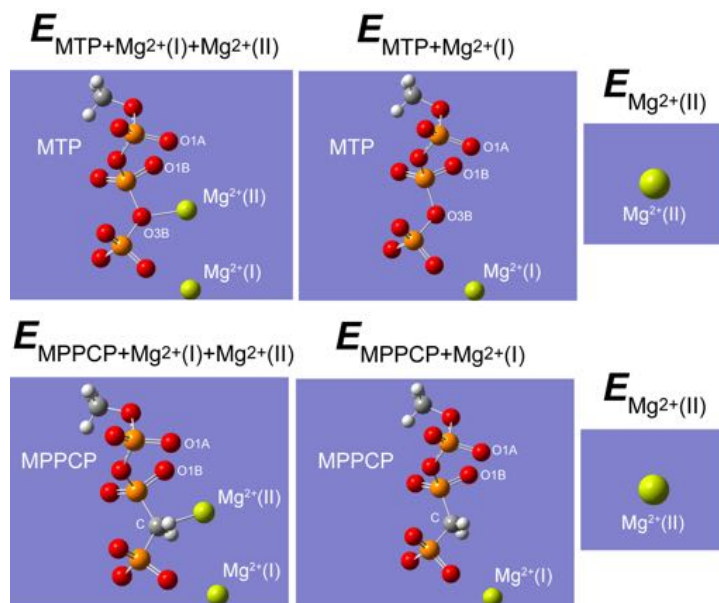


図 4-3-7-10 量子化学計算による MTP-Mg²⁺(II)と MPPCP-Mg²⁺(II)の相互作用エネルギーの算出方法

それぞれのパネルは一つの系を表し single point energy calculation を行って系のエネルギー E を求めた。 $E_{MTP+Mg^{2+}(I)+Mg^{2+}(II)}$, $E_{MPPCP+Mg^{2+}(I)+Mg^{2+}(II)}$ の計算ではそれぞれ MTP(O3B)-Mg²⁺(II), MPPCP(C)-Mg²⁺(II) の距離を変えて系の一点計算を行った。このとき、MTP(O3B)と MPPCP(C)の位置は固定し、Mg²⁺(II)の位置を変えて距離を変化させた。各系のエネルギー E を基に式(4.1)によって相互作用エネルギー ΔE を算出した。

但し、 E の添字はその系に含まれる分子を示す。

$E_{MTP+Mg^{2+}(I)+Mg^{2+}(II)}$, $E_{MPPCP+Mg^{2+}(I)+Mg^{2+}(II)}$ の計算ではそれぞれ MTP(O3B)-Mg²⁺(II), MPPCP(C)-Mg²⁺(II) の距離を変えることで距離に依存した相互作用エネルギーを算出した。

複数の計算モデル

本来、カルシウムポンプのヌクレオチド結合部位での量子化学計算を実行して ATP-Mg²⁺ と AMPPCP-Mg²⁺ の相互作用エネルギーを求めたいが、系に含まれる原子数に依存して計算時間が劇的に増大するため、活性中心をそのまま再現した環境での計算は困難である。実際のヌクレオチド結合部位では、周辺の残基や水分子の影響によって MTP や MPPCP, Mg²⁺ の電子移動が起き、電荷の絶

対値が小さくなるが、気相中ではそのような現象が起きないためクーロン力による相互作用エネルギーを過大評価してしまう。そこで本研究では、ATP 結合状態のヌクレオチド結合部位において ATP と塩橋を形成し、ATP の結合安定性に重要な役割を果たしている Arg489, Arg560 の効果を部分的に再現するため以下の 2 通りのモデリングを行った。

(a) Background charge モデル

Gaussian09 を用いて系の任意の座標に点電荷を置き周辺の電荷環境を構築する background charge モデルを適用した。Arg489, Arg560 の極性を持った N 原子の位置にそれぞれ +1e の点電荷 (e は素電荷) を置いた。この点電荷は系の全電荷には含まない。

量子化学計算は、計算精度と基底関数に B3LYP/6-311+G(2d)を採用し MTP(O3B)-Mg²⁺(II)と MPPCP(C)-Mg²⁺(II)の距離を 0.2 Å ずつ変化させながら、それぞれの座標での single point energy calculation を実行した。MTP(O3B)-Mg²⁺(II)と MPPCP(C)-Mg²⁺(II)の距離が 5 Å の点でそれぞれの相互作用エネルギーが 0 となるよう全体の相互作用エネルギーをシフトした (図 4-3-7-11)。

(b) プロトン化モデル

ATP と Arg489, Arg560 との salt bridge による効果を再現するため、Arg489 と最近接している ATP α リン酸基の O1A と Arg560 と最近接している ATP β リン酸基の O1B に水素原子を付加しプロトン化した。よって MPPCP の電荷は -4e から -2e へと絶対値が小さくなった。量子化学計算は、計算精度と基底関数に B3LYP/6-311+G(2d)を採用し MTP(O3B)-Mg²⁺(II)と MPPCP(C)-Mg²⁺(II)の距離を 0.2 Å ずつ変化させながら、それぞれの座標での single point energy calculation を実行した。MTP(O3B)-Mg²⁺(II)と MPPCP(C)-Mg²⁺(II)の距離が 5 Å の点でそれぞれの相互作用エネルギーが 0 となるよう全体の相互作用エネルギーをシフトした (図 4-3-7-11)。量子化学計算の結果から、MPPCP は MTP と比べて Mg²⁺(II)との相互作用エネルギーが全ての距離において大きく、いずれのモデルでも $\Delta\Delta E$ はおよそ -37.5 kcal/mol であった。 $\Delta E_{\text{MTP}}^{\text{Min}}$ は深く急峻な曲線を描くが、 $\Delta E_{\text{MPPCP}}^{\text{Min}}$ は緩やかな曲線となっていた。 $R_{\text{MPPCP}}^{\text{Min}}$ は $R_{\text{MTP}}^{\text{Min}}$ よりもおよそ 0.5 Å 遠い位置にあった。すなわち、AMPPCP を用いた場合は ATP よりも 2 個目の Mg²⁺が結合しにくいことを示している。

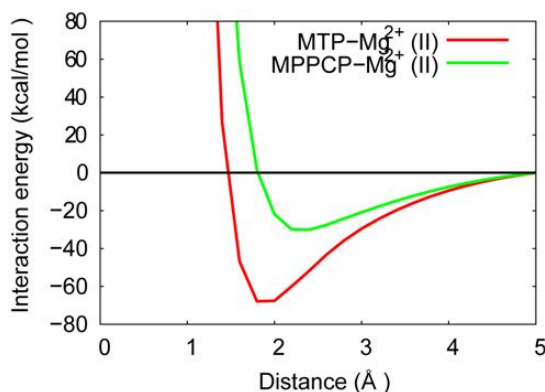


図 4-3-7-11 量子化学計算による MTP-Mg²⁺(II)と MPPCP-Mg²⁺(II)の相互作用エネルギー

MTP-Mg²⁺(II) (赤) と MPPCP-Mg²⁺(II) (緑) の相互作用エネルギーを示した。距離は MTP の場合 MTP(O3B)-Mg²⁺(II), MPPCP の場合 MPPCP(C)-Mg²⁺(II)に対応している。MTP(O3B)-Mg²⁺(II)と MPPCP(C)-Mg²⁺(II)の距離が 5 Å の点でそれぞれの相互作用エネルギーが 0 となるよう全体の相互作用エネルギーをシフトした。

ΔE_{MTP} と ΔE_{MPPCP} の最小値を $\Delta E_{\text{MTP}}^{\text{Min}}$ と $\Delta E_{\text{MPPCP}}^{\text{Min}}$ を定義し、そのときの距離を $R_{\text{MTP}}^{\text{Min}}$, $R_{\text{MPPCP}}^{\text{Min}}$ と定義する。 $\Delta E_{\text{MTP}}^{\text{Min}}$ と $\Delta E_{\text{MPPCP}}^{\text{Min}}$ を比較するため、以下のように $\Delta\Delta E$ を定義する。表 4-3-7-1 に結果をまとめた。

$$\Delta\Delta E = \Delta E_{\text{MTP}}^{\text{Min}} - \Delta E_{\text{MPPCP}}^{\text{Min}}$$

表 4-3-7-1 量子化学計算による MTP-Mg²⁺(II)と MPPCP-Mg²⁺(II)の相互作用エネルギーのまとめ

	モデル 1	モデル 2	Ref.
$\Delta\Delta E$ (kcal/mol)	-37.8	-37.3	-38.8
$R_{\text{MTP}}^{\text{Min}}$ (Å)	1.80	2.00	2.00
$R_{\text{MPPCP}}^{\text{Min}}$ (Å)	2.40	2.40	2.40

モデル 1 は background charge モデルによる B3LYP/6-311+G(2d) 計算, モデル 2 はプロトン化モデルによる B3LYP/6-311+G(2d) 計算, Ref. は単なる B3LYP/6-311+G(2d) 計算を表す。

3.7.5 活性中心における Mg²⁺の機能の提唱

3.7.5.1 これまでの計算結果のまとめと討論

ATP 結合状態の MD(sim4), MD(sim5)のまとめ

ATP 結合状態の結晶構造は、Mg²⁺(I)を介して

ATP γ リン酸基と Asp351 が直線上に並び、 γ リン酸基が Asp351 の酸素原子に転移する直前の構造を形成していたが、MD(sim4)では、50 ns 付近で $Mg^{2+}(I)$ が ATP の β リン酸基と γ リン酸基、さらに Asp351 の 2 つの酸素原子の間に配位した。その結果、ATP β リン酸基と Arg560 との塩橋が切断し(図 4-3-7-1a) ATP β リン酸基が約 180°回転し γ リン酸基も Asp351 から向きを変え、 γ リン酸基の Asp351 への転移が阻害されたような配置を形成した。(図 4-3-7-1b)。一方、MD(sim5) (図 4-3-7-1c) では、ATP 三リン酸部分の構造や ATP と周辺の残基との塩橋が 200 ns 間に渡って結晶構造を安定に保持した (図 4-3-7-2c, d)。ATP γ リン酸基と Asp351 は $Mg^{2+}(I)$ を介して互いに向き合うように配置し、 $Mg^{2+}(II)$ は ATP α , β , γ リン酸基と配位を形成していた (図 4-3-7-1d)。

細胞質ドメインは MD(sim4)の場合、コンパクトな形状の結晶構造から A, N ドメインが互いに外に広がるように変化し、200 ns 後には P ドメインでフィッティングした時の結晶構造からの RMSD がおよそ 4.5 Å となった。(図 4-3-7-3a, 図 4-3-7-4a, b)。MD(sim5)の場合は A, N ドメインの RMSD は小さく、200 ns 間に渡って 2 Å 付近で揺らいでいた (図 4-3-7-3b, 図 4-3-7-4a, b)。

ADP 結合状態の MD(sim6), MD(sim7)のまとめ

MD(sim6) (図 4-3-7-5a) を開始すると 50 ns 付近で ADP α リン酸基-R489 と ADP β リン酸基-R560 の 2 つの塩橋が切断され (図 4-3-7-6a), ADP がヌクレオチド結合部位から解離した (図 4-3-7-5b)。 $Mg^{2+}(I)$ は P-Asp351 に付近に安定に配位していた (図 4-3-7-5b)。一方 MD(sim7) (図 4-3-7-5c) では、ADP α リン酸基-R489 と ADP β リン酸基-R560 の塩橋は一時不安定になるが再度安定に形成する (図

4-3-7-6b)。 $Mg^{2+}(I)$ は P-Asp351 に付近に安定に配位し、 $Mg^{2+}(II)$ は ADP α リン酸基と β リン酸基の間に安定に配位していた (図 4-3-7-5d)。細胞質ドメインは MD(sim6)の場合、コンパクトな形状の結晶構造から A, N ドメインが互いに外側に離れた (図 4-3-7-7a)。A ドメインの P ドメインでフィッティングした時の結晶構造からの RMSD は 4 Å 付近で揺らいでおり (図 4-3-7-8a), N ドメインの RMSD は 8 Å 付近で揺らいでいた (図 4-3-7-8b)。一方 MD(sim7)の場合は A, N ドメインの RMSD は小さく、A ドメインの RMSD は 2 Å 付近で揺らぎ、N ドメインの RMSD は 4 Å 付近で揺らいでいた (図 4-3-7-8a, b)。

ATP- $Mg^{2+}(II)$ と AMPPCP- $Mg^{2+}(II)$ の相互作用エネルギーの量子化学計算のまとめ

MTP と MPPCP の $Mg^{2+}(II)$ に対する相互作用エネルギーを比較すると、いずれのモデルでも ΔE はおよそ -37.5 kcal/mol であった。 ΔE_{MTP}^{Min} は深く急峻な曲線を描くが、 ΔE_{MPPCP}^{Min} は緩やかな曲線となっていた。 R_{MPPCP}^{Min} は R_{MTP}^{Min} よりもおよそ 0.5 Å 遠い位置にあった。すなわち、AMPPCP を用いた場合は ATP よりも 2 個目の Mg^{2+} が結合しにくいことを示している。

ヌクレオチド結合部位における ATP/ADP と Mg^{2+} の相互作用に関する議論

MD(sim4), MD(sim5)から、ヌクレオチド結合部位において Asp351 に ATP γ リン酸基が転移する配置を安定に保持するには $Mg^{2+}(I)$ のみでは不十分であり、 $Mg^{2+}(II)$ の配位によって ATP と周辺の残基との塩橋が安定化し、リン酸化直前の構造を形成することができる。MD(sim6), MD(sim7)から、 $Mg^{2+}(I)$ と $Mg^{2+}(II)$ がともに配位した状態では、ADP が強く安定化しヌクレオチド結合部位から脱離するこ

とができない。よってリン酸化反応後は $Mg^{2+}(II)$ が先に脱離することで ADP の脱離が可能となり、次の E1P 状態へ進むことができると考えられる。このようにリン酸化反応において $Mg^{2+}(II)$ の配位が必要であるにもかかわらず結晶構造で観測されなかった理由は、E1.ATP の結晶化において ATP のアナログ分子である AMPPCP を用いたことが原因であると考えられる。すなわち、量子化学計算結果から AMPPCP は ATP と比較して2個目の Mg^{2+} との結合安定性が小さく、 $Mg^{2+}(II)$ が AMPPCP には

結合しなかった可能性が示唆される。

ヌクレオチド結合部位の静電ポテンシャル解析による $Mg^{2+}(II)$ の結合可能性

ATP 結合状態のヌクレオチド結合部位への $Mg^{2+}(II)$ の結合可能性を調べるため、静電ポテンシャル計算を行った。ヌクレオチド結合部位の ATP 三リン酸周辺は赤い領域が多く、これは正電荷を持った $Mg^{2+}(II)$ の結合可能性を示唆している (図 4-3-7-12a, b)。

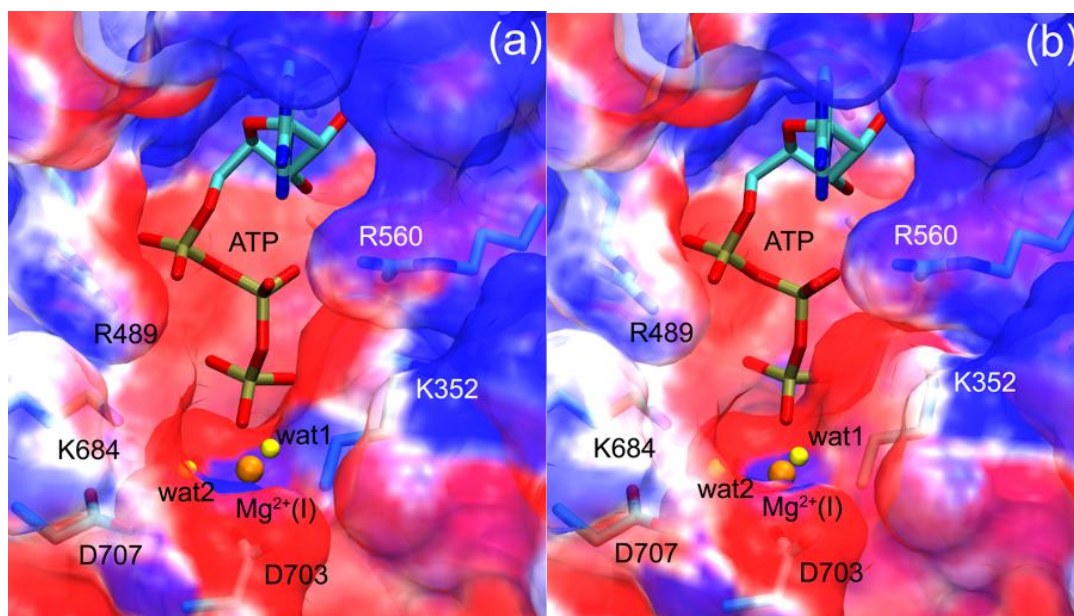


図 4-3-7-12 ATP 結合状態のヌクレオチド結合部位の静電ポテンシャルマップ

(a) ATP 結合状態の X 線結晶構造に水素原子を付加した後の静電ポテンシャルマップ。(b) MD(sim4)のエネルギー最小化計算後の静電ポテンシャルマップ。結晶構造に付加した水素原子の配向を最適化するため、エネルギー最小化計算を行った。ヌクレオチド結合部位が感じている静電ポテンシャルを描画した。赤から青への色の変化は、エネルギーの大きさの変化 ($-8.0 k_B T/e$ から $8.0 k_B T/e$) に対応する。ATP と残基をスティックモデルで表示し、 $Mg^{2+}(I)$ (オレンジ) と2つの結晶水 (黄) を球で示した。

3.7.5.2 一般の ATPase のヌクレオチド結合部位の先行研究

(a) X 線結晶構造と NMR 構造

表 4-3-7-2 にこれまでに得られた ATPase のヌクレオチド結合状態の X 線結晶構造をまとめた。表中では結晶化に使用したヌクレオチドのアナログ

分子で表記し、結合したカチオンの種類ごとに分類した。ヌクレオチド結合部位に1個の Mg^{2+} または Ca^{2+} が結合した ATP 結合状態は、 Ca^{2+} -ATPase (E1.AMPPCP⁷⁻⁸)、 Cu^{2+} -ATPase (AMPPCP⁹⁹)、 H^+ -ATPase (E1.AMPPCP¹⁰⁰)、FoF1-ATPase (AMPPNP⁹⁶) の結晶構造で得られている。2 個の

Mg²⁺が結合した ATP 結合状態は, Ca²⁺-ATPase (E2.AMPPCP^{86, 101}) の結晶構造のみ得られている. 従って多くの ATPase の ATP 結合状態は 1 つの Mg²⁺が配位しているが, 結晶化のため ATP の代わりにアナログ分子 (AMPPCP, AMPPNP) を用いており, この影響で 2 個目の Mg²⁺が結合しなかった可能性がある. 一方, ヌクレオチド結合部位に 1 個の Mg²⁺が結合した ADP 結合状態は, Ca²⁺-ATPase (E2.ADP¹⁰², E2.TNP-ADP⁸⁶), Na⁺,K⁺-ATPase

(E1P.ADP¹⁰³), Cu²⁺-ATPase (ADP⁹⁹), FoF1-ATPase (ADP⁹⁶) の結晶構造で得られている. 2 個の Mg²⁺が結合した ADP 結合状態は, Ca²⁺-ATPase (E1P.ADP^{8, 16}, E2.ADP⁸⁶), Na⁺,K⁺-ATPase (E1P.ADP¹⁰⁴) の結晶構造で得られている. ATPase の ADP 結合状態は 1 個の Mg²⁺と 2 個の Mg²⁺の両方の場合の結晶構造が得られている.

表 4-3-7-3 ATPase のヌクレオチド結合状態の X 線結晶構造のまとめ

ATPase	ATPase の型	ヌクレオチド結合部位に配位したカチオンの種類と個数		
		1Mg ²⁺	1Ca ²⁺	2Mg ²⁺
Ca ²⁺ -ATPase	P 型(III)	E2.AMPPCP ¹⁰⁵	E1.AMPPCP ⁷⁻⁸	E1P.ADP ^{8, 16}
		E2.ADP ¹⁰²		E2.AMPPCP ^{86, 101}
		E2.TNP-ADP ^{@86}		E2.ADP ⁸⁶
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase*	P 型(II)	E1P.ADP ¹⁰³		E1P.ADP ¹⁰⁴
Cu ²⁺ -ATPase	P 型(IB)	AMPPCP ⁵⁹⁹		
		ADP ⁵⁹⁹		
H ⁺ -ATPase	P 型(III)	E1.AMPPCP ¹⁰⁰		
FoF1-ATPase	F 型	AMPPNP ^{#96}		
		ADP ⁹⁶		

*Na⁺,K⁺-ATPase 全体の ATP 結合状態の結晶構造は得られていない. ヌクレオチド結合部位を含む細胞質ドメインの ATP 結合状態の NMR 構造は得られているが, カチオンの結合は観測されなかった⁸⁴. @TNP = Trinitrophenyl, #AMPPNP = adenylyl imidodiphosphate, ATP のアナログ分子 (図 4-3-7-9). P 型 ATPase は E1/E2 反応モデルに基づいて表記した. ⁵Cu²⁺-ATPase はヌクレオチド結合部位を含む細胞質の P, N ドメインの立体構造.

(b) 生化学実験による 2 個の Mg²⁺のヌクレオチド結合部位への配位可能性

Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage 実験によって, 3 種類の ATPase: Ca²⁺-ATPase (Glu439), Na⁺,K⁺-ATPase (Asp443), H⁺,K⁺-ATPase (Asp459) のヌクレオチド結合部位の各残基は 2 個目の Mg²⁺を介して ATP または ADP と相互作用していることが示された (図 4-3-7-13)¹⁰⁶⁻¹¹⁰. 本先行研究は, 3 種

類の ATPase のヌクレオチド結合部位では, ATP または ADP に 2 つの Mg²⁺が配位していることを示している.

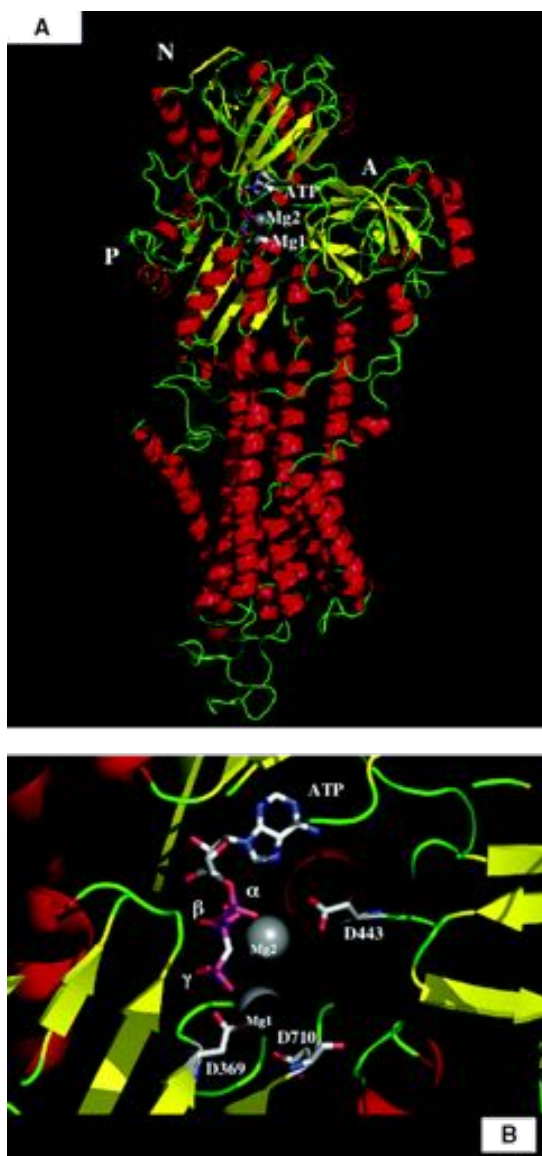


図 4-3-7-13 Na^+, K^+ -ATPase のヌクレオチド結合部位のホモロジーモデリング¹¹⁰

(A) ATP 結合状態のカルシウムポンプ結晶構造. (B) Na^+, K^+ -ATPase の ATP 結合状態における 2 つの Mg^{2+} が結合したヌクレオチド結合部位のホモロジーモデリング. E1.ATP 状態のカルシウムポンプを参照構造とした. Mg1 は E1.ATP 状態の結晶構造の $\text{Mg}^{2+}(\text{I})$ に対応し, Mg2 は E1P.ADP 状態の $\text{Mg}^{2+}(\text{II})$ に対応している. 筆者は Mg1 はリン酸化反応の触媒として機能し, Mg2 は D443 と相互作用しヌクレオチド結合部位の構造安定化に寄与していると主張している¹¹⁰.¹¹⁰ 改変.

(c) MD 計算によるヌクレオチド結合部位への Mg^{2+} の結合

Na^+, K^+ -ATPase の細胞質領域のヌクレオチド結

合ドメインを用いた MD 計算において, 溶液中の 2 つの Mg^{2+} (カウンターイオン) が ATP に配位し, その後も安定に配位し続けた (図 4-3-7-14)¹¹¹.

Na^+, K^+ -ATPase のヌクレオチド結合ドメインの結晶構造は当時決定されていなかったため, カルシウムポンプや Na^+, K^+ -ATPase の NMR 構造⁸⁴ を基にホモロジーモデリングによって作成した. ヌクレオチド結合部位へは NMR 構造⁸⁴ を参照し ATP のみを結合させた. 本先行研究は, ヌクレオチド結合部位の ATP に 2 つの Mg^{2+} が安定に配位する結果を示している. 但し, 溶液中のカウンターイオンとして配置した Mg^{2+} の初期位置は不明である.

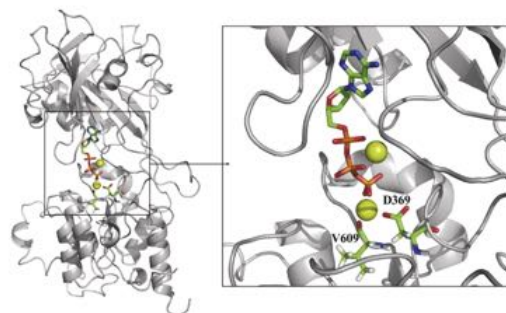


図 4-3-7-14 Na^+, K^+ -ATPase のヌクレオチド結合ドメインの MD 計算のスナップショット

(左) Na^+, K^+ -ATPase のヌクレオチド結合ドメイン. (右) ヌクレオチド結合部位の拡大図. ATP, D369, V609 と 2 つの Mg^{2+} が示されている. 2 つの Mg^{2+} は溶液中のカウンターイオンとして配置されたが, MD 計算中にヌクレオチド結合部位に侵入し ATP に結合した.

(d) 生化学実験による ATPase 活性の Mg^{2+} 濃度依存性

カルシウムポンプの活性は Mg^{2+} と ATP の濃度に大きく依存する¹¹². 図 4-3-7-15 は, カルシウムポンプによる小胞体内への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -accumulation の Mg^{2+} 濃度依存性を示している¹¹³. この実験では, 系の ATP 濃度は 2 mM で一定にし, Mg^{2+} を 0 mM から 10 mM まで上昇させた. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -accumulation

はカルシウムポンプの強力な阻害剤である thapsigargin (TG) の 1 μ M 存在下でも行った。結果は明らかな Mg^{2+} 濃度依存性を示しており、 Mg^{2+} 濃度が 3-5 mM に到達すると plateau 状態となった。5 mM 以上では Mg^{2+} がカルシウムポンプの Ca^{2+} 結合部位への Ca^{2+} 結合を競争的に阻害し¹¹⁴⁻¹¹⁵、 $^{45}Ca^{2+}$ -accumulation が減少した。TG 存在下では $^{45}Ca^{2+}$ -accumulation を強力に阻害した¹¹⁶⁻¹¹⁷。この先行研究によって、ATP が 2mM 存在下で Mg^{2+} 濃度が 3-5 mM のとき、 $^{45}Ca^{2+}$ -accumulation が最大となることが示された。これは、1 個の ATP に対して 1-2 個の Mg^{2+} が存在するとき、カルシウムポンプの $^{45}Ca^{2+}$ -accumulation が最大となることを示している。

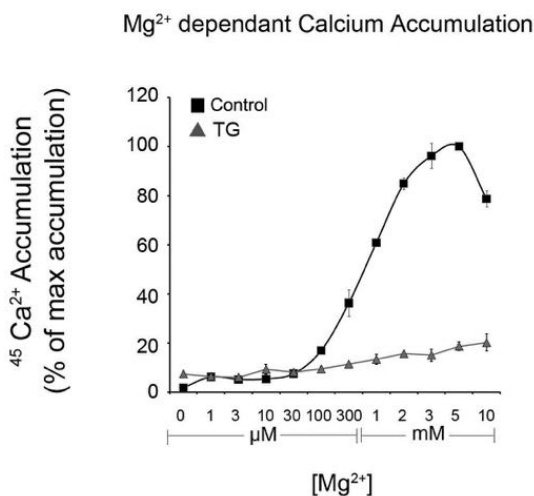


図 4-3-7-15 ラット脳から単離された小胞体カルシウムポンプの $^{45}Ca^{2+}$ -accumulation の Mg^{2+} 濃度依存性¹¹³

ラット脳から単離した小胞体のカルシウムポンプを用いて、pH 7.3, $[Ca^{2+}] = 300$ nM, $[ATP] = 2$ mM の緩衝液における 37°C, 60 分間に進行した $^{45}Ca^{2+}$ -accumulation を liquid scintillation counting によって測定した。3 回の試行による標準誤差を記した。

3.7.5.3 2 個の Mg^{2+} によって安定化されるヌクレオチド結合部位の反応機能の提唱

MD(sim4), MD(sim5)から、リン酸化反応の触媒として機能する Mg^{2+} (I)のみでは ATP の結合を固定させることができず、 Mg^{2+} (II)の配位によって ATP と周辺の残基との塩橋が安定化し、ATP γ リン酸基が転移する構造を形成すると考えられる。MD(sim6), MD(sim7)から、リン酸化反応後は Mg^{2+} (II)がヌクレオチド結合部位から先に脱離することで ADP の脱離が可能となり、次の E1P 状態へ誘起される。 Mg^{2+} (II)は E2.Pi 状態での P-Asp351 の加水分解によって解離したリン酸基とともに脱離すると考えられる¹¹⁸。

F_0F_1 -ATPase の ATP 加水分解では、反応の求核剤は水分子であり、ATP γ リン酸基と水分子を近距離に配置するには 1 個の Mg^{2+} のみで十分かも知れない。一方のカルシウムポンプでは、リン酸化反応の求核剤は Asp351 の酸素原子であり、負電荷を持った ATP γ リン酸基と Asp351 を近距離に安定に配置するには 2 個の Mg^{2+} が必要であると考えられる。ヌクレオチド結合部位の静電ポテンシャル解析によって ATP 結合状態の ATP 三リン酸の周辺に 2 つ目の正電荷イオンの結合可能性が示唆された。よって生体環境では、ATP 結合状態に 2 つの Mg^{2+} (II) が結合し得る。実際カルシウムポンプは 1 個の ATP と 1 個の Mg^{2+} でも反応は進行するが¹¹³、最大活性を得るには Mg^{2+} ATP ともう一つの Mg^{2+} が結合した状態が必要であると考えられる。

4. 引用文献

1. Møller, J. V.; Juul, B.; le Maire, M., Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1286*, 1-51.
2. Post, R. L.; Hegyvary, C.; Kume, S., Activation by Adenosine Triphosphate in the Phosphorylation Kinetics of Sodium and Potassium Ion Transport Adenosine Triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 6530-6540.
3. Albers, R. W., Biochemical Aspects of Active Transport. *Annu. Rev. Biochem.* **1967**, *36*, 727-756.
4. Meis, L.; Vianna, A. L., Energy Interconversion by the Ca²⁺ Dependent ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 275-292.
5. Inesi, G.; Kurzmack, M.; Lewis, D., [12] Kinetic and equilibrium characterization of an energy-transducing enzyme and its partial reactions. In *Methods Enzymol.*, Sidney Fleischer, B. F., Ed. Academic Press: 1988; Vol. Volume 157, pp 154-190.
6. Danko, S.; Daiho, T.; Yamasaki, K.; Kamidochi, M.; Suzuki, H.; Toyoshima, C., ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase has a compact conformation resistant to proteinase K, V8 protease and trypsin. *FEBS Lett.* **2001**, *489*, 277-282.
7. Toyoshima, C.; Mizutani, T., Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **2004**, *430*, 529-535.
8. Sørensen, T. L.-M.; Møller, J. V.; Nissen, P., Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* **2004**, *304*, 1672-1675.
9. Toyoshima, C.; Inesi, G., Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 269-292.
10. Inesi, G.; Lewis, D.; Ma, H.; Prasad, A.; Toyoshima, C., Concerted Conformational Effects of Ca²⁺ and ATP Are Required for Activation of Sequential Reactions in the Ca²⁺ ATPase (SERCA) Catalytic Cycle. *Biochemistry* **2006**, *45*, 13769-13778.
11. Toyoshima, C., How Ca²⁺-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 941-946.
12. Toyoshima, C., Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *476*, 3-11.
13. Bublitz, M.; Poulsen, H.; Morth, J. P.; Nissen, P., In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 431-439.
14. Bublitz, M.; Morth, J. P.; Nissen, P., P-type ATPases at a glance. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 2515-2519.
15. Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H.; Ogawa, H., Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **2000**, *405*, 647-655.
16. Toyoshima, C.; Nomura, H.; Tsuda, T., Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* **2004**, *432*, 361-368.
17. Toyoshima, C.; Norimatsu, Y.; Iwasawa, S.; Tsuda, T.; Ogawa, H., How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 19831-19836.
18. Olesen, C.; Sorensen, T. L.; Nielsen, R. C.; Moller, J. V.; Nissen, P., Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. *Science* **2004**, *306*, 2251-2255.
19. Olesen, C.; Picard, M.; Winther, A. M.; Gyrop, C.; Morth, J. P.; Oxvig, C.; Moller, J. V.; Nissen, P., The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* **2007**, *450*, 1036-1042.
20. Sugita, Y.; Ikeguchi, M.; Toyoshima, C., Relationship between Ca²⁺-affinity and shielding of bulk water in the Ca²⁺-pump from molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 21465-21469.
21. Musgaard, M.; Thogersen, L.; Schiott, B.; Tajkhorshid, E., Tracing cytoplasmic Ca²⁺ ion and water access points in the Ca²⁺-ATPase. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 268-277.
22. Sugita, Y.; Miyashita, N.; Ikeguchi, M.; Kidera, A.; Toyoshima, C., Protonation of the acidic residues in the transmembrane cation-binding sites of the Ca²⁺ pump. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6150-6151.
23. Musgaard, M.; Thogersen, L.; Schiott, B., Protonation states of important acidic residues in the central Ca²⁺ ion binding sites of the Ca²⁺-ATPase: a molecular modeling study. *Biochemistry* **2011**, *50*, 11109-11120.
24. Lervik, A.; Bresme, F.; Kjelstrup, S., Molecular dynamics simulations of the Ca²⁺-pump: a structural analysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 3543-3553.
25. Espinoza-Fonseca, L. M.; Thomas, D. D., Atomic-level characterization of the activation mechanism of SERCA by calcium. *PLoS One* **2011**, *6*, e26936.
26. Das, A.; Gur, M.; Cheng, M. H.; Jo, S.; Bahar, I.; Roux, B., Exploring the Conformational Transitions of Biomolecular Systems Using a Simple Two-State Anisotropic Network Model. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10*, e1003521.
27. Nagarajan, A.; Andersen, J. P.; Woolf, T. B., Coarse-grained simulations of transitions in the E2-to-E1 conformations for Ca ATPase (SERCA) show entropy-enthalpy compensation. *J. Mol. Biol.* **2012**, *422*, 575-593.
28. Nagarajan, A.; Andersen, J. P.; Woolf, T. B., The role of domain: domain interactions versus domain: water interactions in the coarse-grained simulations of the E1P to E2P transitions in Ca-ATPase (SERCA). *Proteins* **2012**, *80*, 1929-1947.
29. Li, G.; Cui, Q., A Coarse-Grained Normal

- Mode Approach for Macromolecules: An Efficient Implementation and Application to Ca^{2+} -ATPase. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2457-2474.
30. Reuter, N.; Hinsen, K.; Lacapère, J.-J., Transconformations of the SERCA1 Ca-ATPase: A Normal Mode Study. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2186-2197.
31. Li, G.; Cui, Q., Analysis of Functional Motions in Brownian Molecular Machines with an Efficient Block Normal Mode Approach: Myosin-II and Ca^{2+} -ATPase. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 743-763.
32. Wriggers, W.; Schulten, K., Investigating a back door mechanism of actin phosphate release by steered molecular dynamics. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **1999**, *35*, 262-273.
33. Mesentean, S.; Koppole, S.; Smith, J. C.; Fischer, S., The Principal Motions Involved in the Coupling Mechanism of the Recovery Stroke of the Myosin Motor. *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 591-602.
34. Splettstoesser, T.; Noé, F.; Oda, T.; Smith, J. C., Nucleotide-dependence of G-actin conformation from multiple molecular dynamics simulations and observation of a putatively polymerization-competent superclosed state. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2009**, *76*, 353-364.
35. Shi, W.; Inamdar, M. V.; Sastry, A. M.; Lastoskie, C. M., Divalent Cation Adsorption on the Actin Monomer. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 15642-15652.
36. Rennebaum, S.; Caflisch, A., Inhibition of interdomain motion in G-actin by the natural product latrunculin: A molecular dynamics study. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2012**, *80*, 1998-2008.
37. Ng, Y.-W.; Raghunathan, D.; Chan, P. M.; Baskaran, Y.; Smith, D. J.; Lee, C.-H.; Verma, C.; Manser, E., Why an A-Loop Phospho-Mimetic Fails to Activate PAK1: Understanding an Inaccessible Kinase State by Molecular Dynamics Simulations. *Structure* **2010**, *18*, 879-890.
38. Jones, P. M.; George, A. M., Mechanism of ABC transporters: A molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2002**, *99*, 12639-12644.
39. Li, G.; Cui, Q., Mechanochemical Coupling in Myosin: A Theoretical Analysis with Molecular Dynamics and Combined QM/MM Reaction Path Calculations. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 3342-3357.
40. Ito, Y.; Ikeguchi, M., Structural fluctuation and concerted motions in F_1 -ATPase: A molecular dynamics study. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 2175-2185.
41. Ito, Y.; Oroguchi, T.; Ikeguchi, M., Mechanism of the conformational change of the F_1 -ATPase β subunit revealed by free energy simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3372-3380.
42. Ito, Y.; Yoshidome, T.; Matubayasi, N.; Kinoshita, M.; Ikeguchi, M., Molecular Dynamics Simulations of Yeast F_1 -ATPase before and after 16° Rotation of the γ Subunit. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 3298-3307.
43. Yang, W.; Gao, Y. Q.; Cui, Q.; Ma, J.; Karplus, M., The missing link between thermodynamics and structure in F_1 -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 874-879.
44. Gao, Y. Q.; Yang, W.; Karplus, M., A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F_1 -ATPase. *Cell* **2005**, *123*, 195-205.
45. Ma, J.; Flynn, T. C.; Cui, Q.; Leslie, A. G. W.; Walker, J. E.; Karplus, M., A Dynamic Analysis of the Rotation Mechanism for Conformational Change in F_1 -ATPase. *Structure* **2002**, *10*, 921-931.
46. Yang, Y.; Yu, H.; Cui, Q., Extensive conformational transitions are required to turn on ATP hydrolysis in myosin. *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 1407-1420.
47. Sugita, Y.; Okamoto, Y., Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *314*, 141-151.
48. Komuro, Y.; Re, S.; Kobayashi, C.; Muneyuki, E.; Sugita, Y., CHARMM Force-Fields with Modified Polyphosphate Parameters Allow Stable Simulation of the ATP-Bound Structure of Ca^{2+} -ATPase. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 4133-4142.
49. Pavelites, J. J.; Gao, J.; Bash, P. A.; Mackerell, A. D., A molecular mechanics force field for NAD^+ NADH, and the pyrophosphate groups of nucleotides. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 221-239.
50. Frisch, M. J. T.; G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
51. Guvench, O.; MacKerell, A. D., Jr., Automated conformational energy fitting for force-field development. *J. Mol. Model.* **2008**, *14*, 667-679.
52. Meagher, K. L.; Redman, L. T.; Carlson, H. A., Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1016-1025.
53. Foloppe, N.; MacKerell, J., All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 86-104.
54. MacKerell, A. D.; Banavali, N. K., All-atom empirical force field for nucleic acids: II. Application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 105-120.

55. Toyoshima, C.; Nomura, H., Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* **2002**, *418*, 605-611.
56. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K., VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33-38.
57. Gumbart, J.; Trabuco, L. G.; Schreiner, E.; Villa, E.; Schulten, K., Regulation of the protein-conducting channel by a bound ribosome. *Structure* **2009**, *17*, 1453-1464.
58. Lee, A., *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 371-390.
59. Jo, S.; Kim, T.; Im, W., Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. *PLoS One* **2007**, *2*, e880.
60. Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W., CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1859-1865.
61. Jo, S.; Lim, J. B.; Klauda, J. B.; Im, W., CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophys. J.* **2009**, *97*, 50-58.
62. Brooks, B. R.; III, C. L. B.; Jr, A. D. M.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoseck, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M., CHARMM: The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 1545-1614.
63. Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K., Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781-1802.
64. Mackerell, A. D.; Feig, M.; Brooks, C. L., III, Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1400-1415.
65. MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M., All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586-3616.
66. Huang, J.; Mackerell, A. D., Jr., CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **2013**.
67. Pastor, R. W.; MacKerell, A. D., Development of the CHARMM Force Field for Lipids. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 1526-1532.
68. Klauda, J. B.; Venable, R. M.; Freites, J. A.; O'Connor, J. W.; Tobias, D. J.; Mondragon-Ramirez, C.; Vorobyov, I.; MacKerell Jr, A. D.; Pastor, R. W., Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 7830-7843.
69. Allnér, O.; Nilsson, L.; Villa, A., Magnesium Ion-Water Coordination and Exchange in Biomolecular Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 1493-1502.
70. Åqvist, J., Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8021-8024.
71. *Generalized-Ensemble Simulation System (GENESIS)*.
72. Li, P.; Roberts, B. P.; Chakravorty, D. K.; Merz, K. M., Jr., Rational Design of Particle Mesh Ewald Compatible Lennard-Jones Parameters for +2 Metal Cations in Explicit Solvent. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 2733-2748.
73. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L., Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.
74. Ryckaert, J.; Ciccotti, G.; Berendsen, H., Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of *n*-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327-341.
75. Miyamoto, S.; Kollman, P. A., Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 952-962.
76. Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G., A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577-8593.
77. Feller, S. E.; Zhang, Y.; Pastor, R. W.; Brooks, B. R., Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 4613-4621.
78. Hoover, W., Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* **1985**, *31*, 1695-1697.
79. Adelman, S. A., Generalized Langevin equation approach for atom/solid-surface scattering: General formulation for classical scattering off harmonic solids. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2375.
80. Quigley, D.; Probert, M. I., Langevin dynamics in constant pressure extended systems. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 11432-11441.
81. Miyashita, N.; Re, S.; Sugita, Y., REIN: Replica-exchange INTERFACE for simulating protein dynamics and function. *Int. J. Quant. Chem.* **2014**, 1-8.
82. Patriksson, A.; van der Spoel, D., A temperature predictor for parallel tempering simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 2073-2077.
83. Daiho, T.; Yamasaki, K.; Danko, S.; Suzuki, H., Critical role of Glu⁴⁰-Ser⁴⁸ loop linking actuator domain and first transmembrane helix of Ca²⁺-ATPase in Ca²⁺ deocclusion and release from

- ADP-insensitive phosphoenzyme. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 34429-34447.
84. Hilge, M.; Siegal, G.; Vuister, G. W.; Güntert, P.; Gloor, S. M.; Abrahams, J. P., ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na, K-ATPase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 468-474.
85. McIntosh, D. B.; Woolley, D. G.; Vilsen, B.; Andersen, J. P., Mutagenesis of Segment ⁴⁸⁷Phe-Ser-Arg-Asp-Arg-Lys⁴⁹² of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Produces Pumps Defective in ATP Binding. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25778-25789.
86. Toyoshima, C.; Yonekura, S.; Tsueda, J.; Iwasawa, S., Trinitrophenyl derivatives bind differently from parent adenine nucleotides to Ca²⁺-ATPase in the absence of Ca²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2011**, *108*, 1833-1838.
87. Sacchetto, R.; Bertipaglia, I.; Giannetti, S.; Cendron, L.; Mascarello, F.; Damiani, E.; Carafoli, E.; Zanotti, G., Crystal structure of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) from bovine muscle. *J. Struct. Biol.* **2012**, *178*, 38-44.
88. Bublitz, M.; Musgaard, M.; Poulsen, H.; Thogersen, L.; Olesen, C.; Schiott, B.; Morth, J. P.; Møller, J. V.; Nissen, P., Ion pathways in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 10759-10765.
89. Clarke, D. M.; Loo, T. W.; MacLennan, D. H., Functional consequences of alterations to amino acids located in the nucleotide binding domain of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 22223-22227.
90. Maruyama, K.; Clarke, D. M.; Fujii, J.; Inesi, G.; Loo, T. W.; MacLennan, D. H., Functional consequences of alterations to amino acids located in the catalytic center (isoleucine 348 to threonine 357) and nucleotide-binding domain of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13038-13042.
91. McIntosh, D. B.; Woolley, D. G.; MacLennan, D. H.; Vilsen, B.; Andersen, J. P., Interaction of Nucleotides with Asp³⁵¹ and the Conserved Phosphorylation Loop of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25227-25236.
92. Ma, H.; Inesi, G.; Toyoshima, C., Substrate-induced Conformational Fit and Headpiece Closure in the Ca²⁺ATPase (SERCA). *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 28938-28943.
93. Clausen, J. D.; McIntosh, D. B.; Vilsen, B.; Woolley, D. G.; Andersen, J. P., Importance of Conserved N-domain Residues Thr⁴⁴¹, Glu⁴⁴², Lys⁵¹⁵, Arg⁵⁶⁰, and Leu⁵⁶² of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase for MgATP Binding and Subsequent Catalytic Steps: PLASTICITY OF THE NUCLEOTIDE-BINDING SITE. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20245-20258.
94. Jacobsen, M. D.; Pedersen, P. A.; Jørgensen, P. L., Importance of Na,K-ATPase Residue α 1-Arg⁵⁴⁴ in the Segment Arg⁵⁴⁴-Asp⁵⁶⁷ for High-Affinity Binding of ATP, ADP, or MgATP. *Biochemistry* **2002**, *41*, 1451-1456.
95. Kuzcera, K.; Wiorkiewicz-Kuzcera, J.; Karplus, M., *The MOLVIB Module of CHARMM*, version c36b2, Dept. of Chemistry, Harvard University. **1991**.
96. Abrahams, J. P.; Leslie, A. G. W.; Lutter, R.; Walker, J. E., Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **1994**, *370*, 621-628.
97. Krasteva, M.; Barth, A., Structures of the Ca²⁺-ATPase complexes with ATP, AMPPCP and AMPPNP. An FTIR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2007**, *1767*, 114-123.
98. Roy Dennington, T. K., and John Millam *GaussView, Version 5*, Semicem Inc.: Shawnee Mission, KS, 2009.
99. Tsuda, T.; Toyoshima, C., Nucleotide recognition by CopA, a Cu⁺-transporting P-type ATPase. *EMBO J.* **2009**, *28*, 1782-1791.
100. Pedersen, B. P.; Buch-Pedersen, M. J.; Preben Morth, J.; Palmgren, M. G.; Nissen, P., Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* **2007**, *450*, 1111-1114.
101. Sohoel, H.; Jensen, A. M.; Møller, J. V.; Nissen, P.; Denmeade, S. R.; Isaacs, J. T.; Olsen, C. E.; Christensen, S. B., Natural products as starting materials for development of second-generation SERCA inhibitors targeted towards prostate cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2810-2815.
102. Laursen, M.; Bublitz, M.; Moncoq, K.; Olesen, C.; Møller, J. V.; Young, H. S.; Nissen, P.; Morth, J. P., Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13513-13518.
103. Laursen, M.; Yatime, L.; Nissen, P.; Fedosova, N. U., Crystal structure of the high-affinity Na⁺,K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2013**, *110*, 10958-10963.
104. Kanai, R.; Ogawa, H.; Vilsen, B.; Cornelius, F.; Toyoshima, C., Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1P state. *Nature* **2013**, *502*, 201-206.
105. Jensen, A.-M. L.; Sørensen, T. L.-M.; Olesen, C.; Møller, J. V.; Nissen, P., Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. *EMBO J.* **2006**, *25*, 2305-2314.
106. Shin, J. M.; Goldshleger, R.; Munson, K. B.; Sachs, G.; Karlisch, S. J. D., Selective Fe²⁺-catalyzed Oxidative Cleavage of Gastric H⁺, K⁺-ATPase IMPLICATIONS FOR THE ENERGY TRANSDUCTION MECHANISM OF P-TYPE CATION PUMPS. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48440-48450.
107. Patchornik, G.; Munson, K.; Goldshleger, R.; Shainskaya, A.; Sachs, G.; Karlisch, S. J. D., The ATP-Mg²⁺ binding site and cytoplasmic domain interactions of Na⁺, K⁺-ATPase investigated with Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage and molecular modeling. *Biochemistry* **2002**, *41*, 11740-11749.
108. Strugatsky, D.; Gottschalk, K.-E.; Goldshleger, R.; Bibi, E.; Karlisch, S. J. D., Expression of Na⁺, K⁺-ATPase in *Pichia pastoris* analysis of wild type and D369N mutant proteins by Fe²⁺-catalyzed

- oxidative cleavage and molecular modeling. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46064-46073.
109. Montigny, C.; Jaxel, C.; Shainskaya, A.; Vinh, J.; Labas, V.; Möller, J. V.; Karlsh, S. J. D.; le Maire, M., Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavages of Ca²⁺-ATPase reveal novel features of its pumping mechanism. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 43971-43981.
110. Strugatsky, D.; Gottschalk, K.-E.; Goldshleger, R.; Karlsh, S. J. D., D443 of the N domain of Na⁺, K⁺-ATPase interacts with the ATP-Mg²⁺ complex, possibly via a second Mg²⁺ ion. *Biochemistry* **2005**, *44*, 15961-15969.
111. Grycova, L.; Sklenovsky, P.; Lansky, Z.; Janovska, M.; Otyepka, M.; Amler, E.; Teisinger, J.; Kubala, M., ATP and magnesium drive conformational changes of the Na⁺/K⁺-ATPase cytoplasmic headpiece. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 1081-1091.
112. Girardet, J.-L.; Bally, I.; Arlaud, G.; Dupont, Y., Localization of a putative magnesium-binding site within the cytoplasmic domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 225-231.
113. McMullen, D. C.; Kean, W. S.; Verma, A.; Cole, J. T.; Watson, W. D., A microplate technique to simultaneously assay calcium accumulation in endoplasmic reticulum and SERCA release of inorganic phosphate. *Biol. Proced. Online* **2012**, *14*, 1-8.
114. Verma, A.; Hirsch, D. J.; Snyder, S. H., Calcium pools mobilized by calcium or inositol 1, 4, 5-trisphosphate are differentially localized in rat heart and brain. *Mol. Biol. Cell* **1992**, *3*, 621-631.
115. Wimsatt, D. K.; Hohl, C. M.; Brierley, G. P.; Altschuld, R. A., Calcium accumulation and release by the sarcoplasmic reticulum of digitonin-lysed adult mammalian ventricular cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14849-14857.
116. Watson, W. D.; Facchina, S. L.; Grimaldi, M.; Verma, A., Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) inhibitors identify a novel calcium pool in the central nervous system. *J. Neurochem.* **2003**, *87*, 30-43.
117. Lytton, J.; Westlin, M.; Hanley, M. R., Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17067-17071.
118. Clausen, J. D.; Holdensen, A. N.; Andersen, J. P., Critical Roles of Interdomain Interactions for Modulatory ATP Binding to Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 29123-29134.

