

第 V 部 総合結論

1. Tom20-シグナル配列複合体の MD 計算の総括

1.1 REMD 法によるマイクロ秒スケールの計算時間による解析

溶液中の Tom20-シグナル配列複合体に対するマイクロ秒の全原子 REMD 計算を実行した。その結果、Tom20 がシグナル配列と相互作用する様子を分子レベルで解析することに成功した。統計的な手法を用いることで室温における自由エネルギー地形を求め、そこから複合体の安定性と各結合モードの存在割合を算出した。

通常の MD 計算やアンブレラサンプリング法、Targeted MD 法も実行し、Tom20 に対するシグナル配列の配向の自由エネルギー地形について REMD 計算と比較した。結果的に REMD 計算がシグナル配列の構造空間のサンプリングを最もよく示しており、結果の信頼性が検証された。これまで、REMD

計算はタンパク質のフォールディングやタンパク質自身の構造変化の研究に対して用いられることが多かったが、本研究のようなタンパク質と基質一分子の相互作用解析にも有用であることを示した。

1.2 REMD 計算によって得られた結果

以下に本研究によって得られた Tom20-シグナル配列複合体の REMD 計算の計算結果を示す。

- i. 自由エネルギー地形の安定領域は、A-pose, Y-pose の結合様式に対応していることから、この 2 つの複合体は溶液中で安定に存在することが明らかになった。一方、M-pose は準安定状態であった。
- ii. 結合様式の存在割合から、A-pose (クラスター III = 80.0 %) がメジャーであり、Y-pose (クラスター

-I + クラスターII = 9.89 %) はマイナーな複合体である。すなわち A-pose がシグナル配列の認識において最も重要な結合様式である。

iii. A-pose と Y-pose の自由エネルギー差は 1.8 kcal/mol, 自由エネルギー障壁は 2-3 kcal/mol 以下であった。この大きさは、室温での熱揺らぎと同程度である。よって溶液中では、シグナル配列が熱揺らぎを利用して複数の結合様式を遷移するダイナミックな認識機構が実現している。

1.3 熱雑音環境下での Tom20 によるシグナル配列の認識機構

シグナル配列は熱揺らぎの中で Tom20 と緩く相互作用し配向を変化させながら結合している。Tom20 の認識部位は狭く、シグナル配列の 3 つの疎水性アミノ酸を同時に全て認識することができない。この点に起因する構造的なフラストレーションが Tom20 とシグナル配列の緩い結合を実現している。Tom20 は細胞質で合成されたミトコンド

リアタンパク質を速やかに次の輸送段階へ受け渡す必要がある。さもないとタンパク質輸送が最初の段階で滞る。従って Tom20 による認識では、シグナル配列との結合と解離の両方が本質的に重要である。本研究は、Tom20-シグナル配列複合体が溶液中で実現しているダイナミックな認識機構を初めて定量的に明らかにした。本成果は、受容体タンパク質による基質一分子の認識に対し自由エネルギーに基づく描像を与えた点新しい。これまで、緩く結合するタンパク質と基質の複合体を捉えることは両者の解離定数が大きく技術的に困難であったが、近年の実験手法の発展に伴い、ようやく結晶構造が得られるようになってきた。本研究で明らかになった基質のダイナミクスが主役となる認識の一般性の議論は知見が少なく難しいが、輸送タンパク質と Tom20 のような細胞小器官の標的膜上の受容体との相互作用では、広く受け入れられると考えている。

2. 筋小胞体カルシウムポンプの MD 計算の総括

2.1 多リン酸分子力場の改良

脂質二重膜に埋め込まれた ATP と ADP それぞれの結合状態の筋小胞体カルシウムポンプの全原子 MD 計算を実行した。ATP の標準的な分子力場である CHARMM はこれまで多くの ATP 結合タンパク質の MD 計算に用いられて来たが、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ータをより高精度に改良した。改良された力場パラメータを ATP 結合状態のカルシ

ウムポンプだけでなく、他の ATP 結合タンパク質の MD 計算に適用して検証を行った。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 REMD 計算を行った。カルシウムポンプの場合では、従来の力場を用いると ATP の構造が大きく崩れてしまう結果に対し、改良された力場では ATP の構造は安定に保持した。他の 4 種類の ATP 結合タンパク質を用いた場合でも同様な結果が得られた。また溶液中 ATP の REMD 計算を

実行して、三リン酸部分の取り得るコンフォメーションの広さを従来の力場と比較した。従来の力場を用いた場合には ATP の三リン酸部分が伸びきった構造のみ出現したが、改良された力場ではこの構造も含むより広範囲なコンフォメーションを実現していた。改良された力場で得られた三リン酸構造の分布は、PDB に収容されているタンパク質に結合した ATP の構造との重なり合いが見られた。以下にオリジナルの C27(ATP) に対する mod-C27(ATP) の変更点をまとめる。

- i. C27(ATP) ではモデル化合物として MDP を用いたが、mod-C27(ATP) では MTP を用いた。MTP は三リン酸分子であるので、MDP よりも分子構造や電荷が ATP を再現している。
- ii. C27(ATP) では量子化学計算精度として HF/6-31+G* を用いていたが、mod-C27(ATP) ではより高精度な MP2/6-31+G* を採用し電子相関を考慮した。
- iii. C27(ATP) では多リン酸分子の 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。この結果カルシウムポンプの MD 計算中では bond angle P-O-P は平衡角を安定に保ったが、*ab initio* 振動数の再現性は C27(ATP) よりも低くなった。

分子の全ての特性を既存の古典力場で再現することは難しく、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るため、本研究では平衡角の再現を優先した。従って mod-C27(ATP) は生体分子のダイナミクスの研究に適しており、カルシウムポンプや一般のタンパク質の MD 計算における ATP の熱運動の解析に有用であることを示した。

2.2 活性中心における ATP と ADP の熱運動

ATP 結合状態の MD(sim4), MD(sim5) の計算から、リン酸化反応の触媒として機能する $Mg^{2+}(I)$ のみでは ATP を固定させることができず、 $Mg^{2+}(II)$ の配位によって ATP の結合が安定化し、ATP γ リン酸基が転移する構造を形成すると考えられる。ADP 結合状態の MD(sim6), MD(sim7) の計算から、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 状態へ誘起されることが示唆された。

カルシウムポンプの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 の両者を安定に近接させるには 2 個の Mg^{2+} が必要であると考えられる。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。実際カルシウムポンプは 1 個の Mg^{2+} が配位した状態でも酵素反応は可能だが、ATP の熱揺らぎが大きく不安定である。最大活性を得るには $Mg^{2+}ATP$ ともう 1 つの Mg^{2+} が ATP に配位し、熱雑音を受けた ATP を安定化させる必要があると考えられる。

3. 本研究の総合結論と今後の展望

3.1 本研究の総合結論

タンパク質と基質の相互作用を解析するには、X線結晶構造解析だけでは不十分であり、static な描像で生体现象を記述するには限界がある。そこで MD 計算によって生理的環境を再現した系におけるタンパク質と基質の熱運動を解析する必要がある。これによって物理化学的相互作用に言及でき、生命現象を担うタンパク質の機能を論じることが可能となる。

3.2 今後の展望

さらなる MD 計算の発展には、サンプリングの時間スケール問題に対しては、パスサンプリング法が有効であり、分子の古典力場の問題に対しては、QM/MM 法が有効である。

パスサンプリング (ストリング) 法¹⁻¹⁶は、系の多数のコピーを並列に MD 計算し、自由エネルギーの低い構造変化経路を効率よく探索する方法である。本研究で行った温度 REMD 計算では、高い温度を持つレプリカが起伏の激しい自由エネルギー地形の障壁を乗り越えて他の自由エネルギー安定状態を探索し、それが低い温度 (室温 300 K) のレプリカと交換され、室温での安定構造が求まる。このため、未知の安定構造を探索するには有力な方法であるが、安定構造間を繋ぐ遷移経路を途中の遷移状態も含めて探索することには適していない。ストリング法は、系の多数のコピーを遷移経路上に初期配置して、遷移経路を 1 つのストリングとして表現し、系の自由エネルギー勾配を評価しながらストリングを動かし、遷移状態も含めた遷移経路を自由エネルギーの下で最適化する。

REMD 法と同様にコピー間の通信は粗であるため、大規模な並列計算で有用性を発揮する。この方法をカルシウムポンプに適用すれば、輸送サイクル中の反応中間体の大規模な構造変化を観測でき、両者の自由エネルギー差も計算できる可能性がある。

QM/MM 法¹⁷⁻¹⁹は、量子化学計算 (quantum mechanics) と分子力学 (molecular mechanics) を組み合わせた方法である。タンパク質の活性中心については、量子化学計算によって電子状態を露わに取り扱い、その他の部分については、分子力学計算によって解析する方法である。この方法をカルシウムポンプの活性中心に適用すれば、ATP 加水分解とリン酸化反応の詳細な反応機構を解析することができる。MD 計算による熱運動の解析結果と組み合わせることで、生体環境中のカルシウムポンプの反応機構を解明したい。

4. 引用文献

1. E, W.; Ren, W.; Vanden-Eijnden, E., String method for the study of rare events. *Phys. Rev. B* **2002**, *66*.
2. E, W.; Ren, W.; Vanden-Eijnden, E., Finite Temperature String Method for the Study of Rare Events. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 6688-6693.
3. Peters, B.; Heyden, A.; Bell, A. T.; Chakraborty, A., A growing string method for determining transition states: comparison to the nudged elastic band and string methods. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 7877-7886.
4. Burger, S. K.; Yang, W., Quadratic string method for determining the minimum-energy path based on multiobjective optimization. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 054109.
5. Maragliano, L.; Fischer, A.; Vanden-Eijnden, E.; Ciccotti, G., String method in collective variables: minimum free energy paths and isocommittor surfaces. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 24106.
6. E, W.; Ren, W.; Vanden-Eijnden, E., Simplified and improved string method for computing the minimum energy paths in barrier-crossing events. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 164103.
7. Hummer, G., Water pulls the strings in hydrophobic polymer collapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 14883-14884.
8. Maragliano, L.; Vanden-Eijnden, E., On-the-fly string method for minimum free energy paths calculation. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *446*, 182-190.
9. Gan, W.; Yang, S.; Roux, B., Atomistic view of the conformational activation of Src kinase using the string method with swarms-of-trajectories. *Biophys. J.* **2009**, *97*, L8-L10.
10. Goodrow, A.; Bell, A. T.; Head-Gordon, M., Transition state-finding strategies for use with the growing string method. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 244108.
11. Vanden-Eijnden, E., Some recent techniques for free energy calculations. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 1737-1747.
12. Vanden-Eijnden, E.; Venturoli, M., Revisiting the finite temperature string method for the calculation of reaction tubes and free energies. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 194103.
13. Ovchinnikov, V.; Karplus, M.; Vanden-Eijnden, E., Free energy of conformational transition paths in biomolecules: the string method and its application to myosin VI. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 085103.
14. Matsunaga, Y.; Fujisaki, H.; Terada, T.; Furuta, T.; Moritsugu, K.; Kidera, A., Minimum free energy path of ligand-induced transition in adenylate kinase. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002555.
15. Vashisth, H.; Maragliano, L.; Abrams, C. F., "DFG-flip" in the insulin receptor kinase is facilitated by a helical intermediate state of the activation loop. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 1979-1987.
16. 松永康佑, ストリング法によるタンパク質構造変化の解析. 分子シミュレーション研究会誌「アンサンブル」 **2007**, *9*.
17. Gogonea, V.; Suárez, D.; Vaart, A. v. d.; Merz Jr, K. M., New developments in applying quantum mechanics to proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 217-223.
18. Garcia-Viloca, M.; Gao, J.; Karplus, M.; Truhlar, D. G., How Enzymes Work: Analysis by Modern Rate Theory and Computer Simulations. *Science* **2004**, *303*, 186-195.
19. Hayashi, S.; Ueno, H.; Shaikh, A. R.; Umemura, M.; Kamiya, M.; Ito, Y.; Ikeguchi, M.; Komoriya, Y.; Iino, R.; Noji, H., Molecular mechanism of ATP hydrolysis in F1-ATPase revealed by molecular simulations and single-molecule observations. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8447-8454.

