

分子動力学計算を用いた F₁-ATPase の回転機構の研究

Research of rotational mechanism of F₁-ATPase by molecular dynamics calculation

物理学専攻 本橋 昌大

Department of Physics, Masahiro Motohashi

1. 研究背景と目的

F₀F₁-ATP 合成酵素の可溶性部分である F₁-ATPase (F₁) は, ATP 合成/加水分解と共役し, 回転運動を行なう分子モーターである. 六量体リング $\alpha_3\beta_3$ に回転子 γ サブユニットが突き刺さった構造をしており (図 1), ATP の加水分解反応に伴い, γ サブユニットが細胞膜側から見て反時計回りに回転する機構をもつ[1]. 回転は, ATP 1 分子の加水分解あたり 120° で, F₁ がもつ 3 つの β サブユニットが順々に加水分解することで 1 回転する. 多くの生物種では, この 120° の回転ステップがいくつかのサブステップで構成され, その 1 つである好熱菌 *Bacillus PS3* 由来の F₁ (TF₁) は, 120° ステップが 80° と 40° の 2 つのサブステップからなる[2]. 各サブステップ前のポーズは, それぞれ ATP 結合待ち状態, ATP 加水分解待ち状態と呼ばれる. そして, このサブステップは, 4 つの ATP 加水分解の反応素過程 (ATP の結合, ATP の加水分解, 生成物 ADP または無機リン酸 P_i の解離) に伴う $\alpha\beta$ サブユニットの構造変化によって駆動されることが知られている[3-5].

ステップ回転に関するこれらのメカニズムは, 一分子回転計測を用いた研究で明らかとなった. そしてこれまで様々な工夫を施した一分子回転計測により, F₁ の回転機構について多くのことが解明されている. しかし, 実験では F₁ の詳細な動的構造変化を扱うのは困難であり, サブステップ中に起こる構造変化や反応素過程と回転の詳細な関係については未だ理解が不完全である. 近年, クライオ電子顕微鏡法による構造解析により, TF₁ の ATP 結合待ち状態と ATP 加水分解待ち状態の構造が明らかとなった[6]. そこで本研究では, これら 2 つの構造を用いた分子動力学計算を実行し, ATP 結合待ち状態から加水分解待ち状態へ至る 80° サブステップの詳細な回転機構を明らかにすることを目指す.

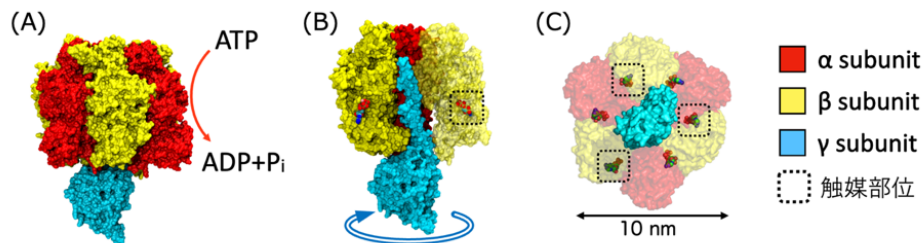


図 1. F₁ の構造

(A) 細胞膜に平行な向きからみた構造 (B) 紙面手前の 3 つのサブユニットを取り除いた構造. 青矢印は加水分解反応時の γ サブユニットの回転方向 (C) 内膜側から見た構造.

2. 方法

分子動力学 (Molecular Dynamics, MD) 計算は、蛋白質や生体膜といった分子集団の振る舞いをコンピュータ上で再現する手法である。分子集団を構成する全ての原子に対して運動方程式を解き、直接原子の軌跡 (トラジェクトリー) を追跡することで、生体分子の原子レベルでの動態解析が可能となる。Targeted MD (TMD) は、指定した計算時間で強制的に構造変化を強制的に誘起することができる計算手法である。この手法により、通常の MD (conventional MD, cMD) の実行可能な計算時間で観察が困難な大規模な構造変化を再現できる。

TF₁ の 80°サブステップのトルク発生に寄与するとされる ATP 反応素過程は、ATP の結合と基質の解離である[7]。そして回転前後の構造状態から ATP 結合は $\beta_{HC}(TP)$ が $\beta_C(TP)$ となる「閉じる」構造変化、基質の解離は $\alpha_{HO}(DP+P_i)$ が $\alpha_{\beta O}(DP)$ となる $\alpha\beta$ 界面を「開く」構造変化を引き起こすと考えられる[6] (図2)。そこで、TMD で「閉じる」構造変化と「開く」構造変化を誘起し、その過程で起こる γ サブユニットの運動を解析した。MD 計算には分子動力学ソフトウェア GENESIS[8, 9]を利用した。また計算機にはスーパーコンピュータ富岳と HOKUSAI を使用した。分子力場は CHRAMM36m[10]である。

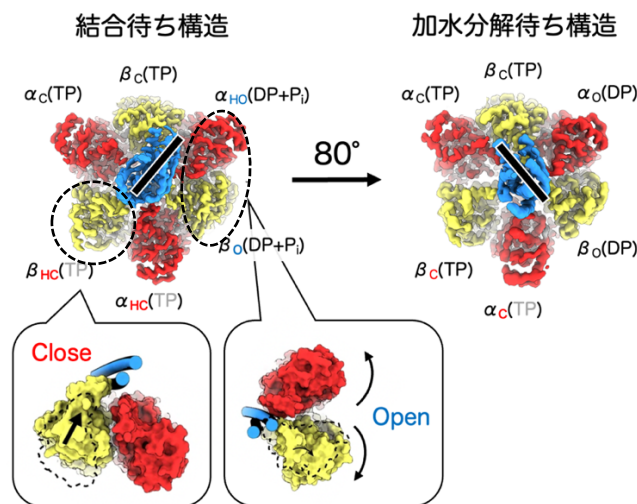


図2. 80°サブステップの構造変化

各サブユニットの横にサブユニットの状態を表す文字を表記した。下付き文字は、サブユニットの構造状態、カッコは基質結合状態を表す。黒色の棒は γ サブユニットの向き。([6]より引用、一部改変。)

構造状態 : C...Closed, HC...Half-Closed, O...Open, HO...Half-Open.

結合状態 : TP...ATP, DP...ADP, Pi...無機リン酸.

3. 結果

TMD 160 ns とその後に実施した cMD 50 ns での得られた γ サブユニットの回転角度の時間変化を図 3 に示す。2通りの $\alpha\beta$ サブユニットの構造変化経路を探索し、 γ サブユニットの回転角を比較した。「閉じる」構造変化を誘起する TMD を 80 ns で実行したのち、「開く」構造変化を誘起する TMD を 80 ns で実行した構造経路では、3つの小さなステップを経て γ サブユニットが加水分解方向に約 80° 回転した (図 3 (A))。これは、実験でみられる 80° サブステップ後の到達角度と一致している。一方、「閉じる」構造変化と「開く」構造変化を同時に実行した 160 ns の TMD では、 γ サブユニットの回転角度は約 60° にとどまった (図 3 (B))。小さなステップは 4 つ観察された。

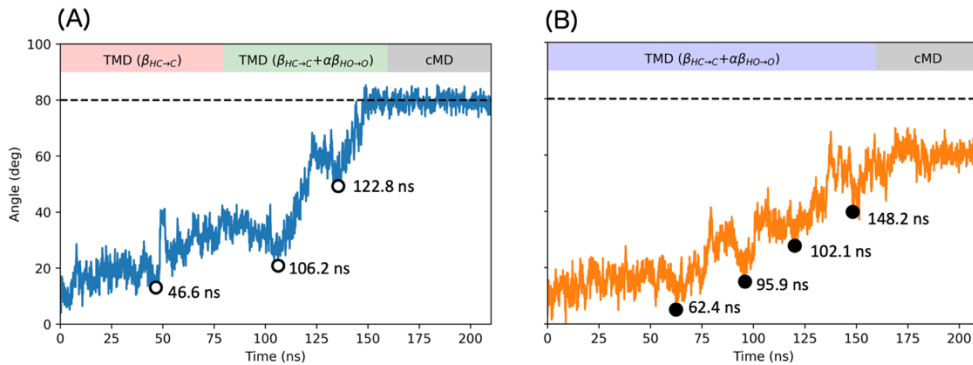


図 3. γ サブユニットの回転角度

TMD と cMD の計 210 ns の結果。結合待ち構造 (PDBID: 7L1Q) の γ サブユニットの方向を 0° とした。点線はサブステップ完了を表す 80° の高さである。(A) 「閉じる」構造変化と「開く」構造変化を連続して誘起した TMD。(B) 「閉じる」構造変化と「開く」構造変化を同時に誘起した TMD。白丸または黒丸は加水分解方向に γ サブユニットが回転する小さなステップ直前の時刻。

さらに、2つの構造変化経路でみられた回転角度の小さなステップ前後の $\alpha\beta$ サブユニットの構造変化を解析し、回転を駆動する $\alpha\beta$ サブユニットの主要の構造変化を調べた。1つ目のステップは、両経路に共通して「閉じる」構造変化による β サブユニットが γ サブユニットを押すタイミングと一致していた。そして、 $\alpha\beta$ 界面が「開く」構造変化は前者の経路の2つ目のステップ、また後者の経路の2,3番目のステップに大きく寄与しているという結果を得た。2つの経路において回転角度に違いがみられた最後のステップでは、 $\alpha\beta$ サブユニットの構造変化はわずかであり、トルクの発生源は特定できなかった。

4. 考察

ATP加水分解反応素過程に伴う「閉じる」構造変化と「開く」構造変化を同時に誘起した経路で、「閉じる」構造変化が最初のステップを駆動したことから、「閉じる」構造変化により β サブユニットが γ サブユニットを押すまで、「開く」構造変化は回転に大きな影響を及ぼさないと考えられる。そして、2つの構造変化を連続して誘起した経路において、加水分解方向への約 80° の回転がみられたことから、 TF_1 の 80° サブステップにはATPの結合と基質の解離による α β サブユニットの逐次的な構造変化が必要であると推察される。

参考文献

1. Noji, H., et al., *Direct observation of the rotation of F1-ATPase*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 299-302.
2. Yasuda, R., et al., *F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps*. Cell, 1998. **93**(7): p. 1117-24.
3. Shimabukuro, K., E. Muneyuki, and M. Yoshida, *An alternative reaction pathway of F1-ATPase suggested by rotation without 80 degrees/40 degrees substeps of a sluggish mutant at low ATP*. Biophys J, 2006. **90**(3): p. 1028-32.
4. Adachi, K., et al., *Coupling of rotation and catalysis in F(1)-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation*. Cell, 2007. **130**(2): p. 309-21.
5. Watanabe, R., R. Iino, and H. Noji, *Phosphate release in F1-ATPase catalytic cycle follows ADP release*. Nature Chemical Biology, 2010. **6**(11): p. 814-820.
6. Sobti, M., et al., *The six steps of the complete F(1)-ATPase rotary catalytic cycle*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 4690.
7. Nishizaka, T., et al., *Chemomechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(2): p. 142-8.
8. Jung, J., et al., *GENESIS: a hybrid-parallel and multi-scale molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms for biomolecular and cellular simulations*. Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci, 2015. **5**(4): p. 310-323.
9. Kobayashi, C., et al., *GENESIS 1.1: A hybrid-parallel molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms on multiple computational platforms*. J Comput Chem, 2017. **38**(25): p. 2193-2206.
10. Komuro, Y., et al., *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**(9): p. 4133-42.