

プロジェクト名(タイトル):

分子動力学計算と構造生物物理実験の協奏によるタンパク質構造ダイナミクスの理解

利用者氏名:

○新津 藍(1)、本橋 昌大(1)、若林 大貴(1)、渡邊 一樹(1)

理研における所属研究室名:

(1)理化学研究所 開拓研究本部 杉田理論分子科学研究室

F₁-ATPase における α , β サブユニットの構造変化に伴う γ サブユニットの回転応答の解析 (担当:本橋)

1. 本プロジェクトの研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

F₁-ATPase (F₁) は ATP 加水分解に伴って回転子 γ サブユニットが回転する ATP 駆動の分子モーターである(図 1(a))。実験で広く用いられる好熱菌 *Bacillus PS3* 由来の F₁ (TF₁) は、 γ サブユニットが 80° と 40° のサブステップで構成された 120° のステップ回転を行うことが単一分子回転計測で明らかにされている[K.Shimabukuro, et al., PNAS (2003)] (図 1(b))。また、この 2 つのサブステップに介在する回転中間体の構造状態は cryo-EM 法を用いた構造解析によって同定されている[M.Sobti, Nat. Commun. (2021); A.Nakano, Nat. Commun. (2023)]。しかし、固定子 $\alpha_3\beta_3$ サブユニットの大規模な構造変化がどのように γ サブユニットのサブステップ回転を駆動するかは不明瞭である。我々は、TF₁ の回転触媒機構の解明を目指し、全原子 MD 計算による 80° サブステップの動態解析を行なっている。主な計算は令和 5 年度 HPCI システム利用研究課題 (ID: hp230111) にて実施し、本プロジェクトの計算資源は、予備計算に利用した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

結合滞留構造 (PDBID: 7L1Q) から触媒滞留構造 (PDBID:7L1R) に向けて Targeted MD (TMD) で α , β サブユニットを構造変化させ、 γ サブユニットの回転応答を解析した。80° サブステップは、固定子リングが有する 3 つの触媒 α - β 界面のうちの 1 つに ATP が結合し、別の α - β 界面から ADP が解離することで回転するとされている[Adachi, et al., Cell (2007)]。Targeted MD による構造変化の誘起は、これら 2 つの反応素過程に伴う 2 箇所の固定子リングの運動に対して実行した。ATP の結合が 80° サブステップ回転開始のトリガーであることが示唆されているが、2 つの運動

が逐次的なのか同期して生じるかは明らかでない。本プロジェクトでは、2 つの運動に対して 3 通りの構造変化経路を考慮した TMD を 3 本ずつ実行した。

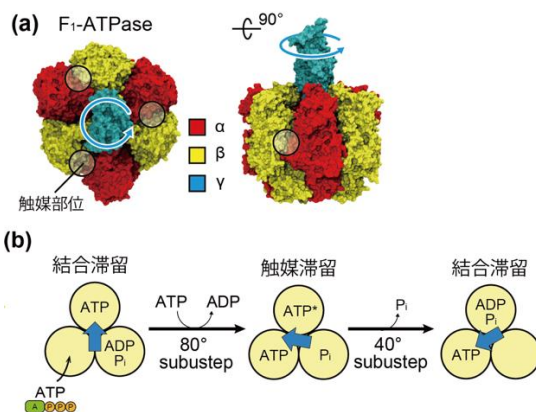


図 1. F₁-ATPase ($\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体) の立体構造と 120° 回転の反応スキーム (a) F₁-ATPase を外膜側から見た図(左)と横から見た図(右)。 (b) β サブユニットを黄色の円で表し、触媒部位の占有状態を明記した概略図。青色矢印は γ サブユニットを表す。

3. 結果

3 通りの構造変化経路のうち、ATP 結合に伴う β サブユニットの運動後に ADP 解離に伴う α , β サブユニットの運動が生じる逐次的な構造変化の時のみ、 γ サブユニットは 80° サブステップに一致する 80° 回転を示した。他の構造変化経路についても一方向的な回転を示したが、80° に達することはなかった。

4. まとめ

以上の結果から、ATP 結合と ADP 解離に伴う構造変化が逐次的に生じることが 80° サブステップの回転に合理的と考えられる。令和 5 年度 HPCI システム利用研究課題 (ID: hp230111) では、80° 回転した構造変化経路の 1 つに対して string method with mean force を実行し、より物理的に出

現確率が高い経路を取得した。また、umbrella sampling を行い、potential mean force を計算した。これらの結果と本プロジェクトの結果と合わせて、80° サブステップの前半約 40° は ATP 結合に伴う β サブユニットの構造変化のみで回転可能であり、後半の回転には ADP 解離に伴う α, β サブユニットの構造変化が必要であることが分かった。また 80° サブステップ中に ADP 解離待ちの休止が存在することが推察された。

5. 今後の計画・展望

これまでに実行した計算では、基質結合・解離等の触媒サイトの結合状態変化を直接的に扱っていない。ATP 結合前と ADP 解離後の構造状態で umbrella sampling を実行して PMF を取得し、原子レベルでのメカニズム理解を目指す。

グルタミン酸脱水素酵素における補酵素結合経路の解明 (担当:若林)

1. 本プロジェクトの研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

グルタミン酸脱水素酵素(GDH)は、同一構造のサブユニットによって六量体を形成している(図 2A)。各サブユニットは、六量体形成に寄与するドメイン、補酵素結合に関わるドメインの二つのドメインから構成される。二ドメイン間には触媒機能発現に関わる裂け目構造(活性クレフト)が存在する(図 2B)。GDH は活性クレフトへ、補酵素のニコチンアミド腺ニンジヌクレオチドリン酸(NADP)と基質のグルタミン酸を取り込むことによって、グルタミン酸を 2-オキソグルタル酸へ変換する酸化的脱アミノ化反応を触媒する。これまで、超高度好熱菌由来 GDH について、クライオ電子顕微鏡観察により、準安定な GDH-NADP 複合体の構造が複数観察された。これらは NADP 分子が活性クレフト内へアクセスする過程で生じる結合モードであると予想されている。しかし、クライオ電子顕微鏡観察のみでは、各準安定結合状態間の遷移を確認できない。そこで、本研究では、GDH と NADP の準安定結合状態の出現順序や状態間の遷移確率、遷移の時間スケールを、適切な力場を用いた分子動力学シミュレーションを用いて明らかにするとともに、GDH に対する補酵素の結合経路の解明を目指す。

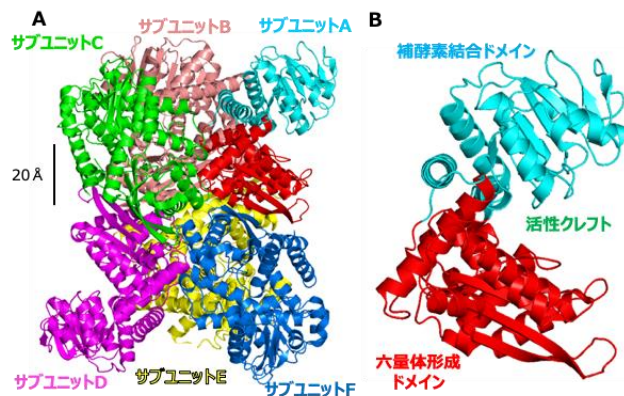


図 2. 超高度好熱菌由来 GDH の全体 (PDB ID: 1EUZ)(A)とサブユニット(B)の構造

2. 具体的な利用内容、計算方法

最終的に実行を予定している GDH と NADP の結合過程のシミュレーションの前段階として、NADP 分子に適用する力場の評価を行った。具体的には、水溶液中の NADP 分子について、レプリカ数 20 で GAFF2 力場を用いて行った 1 マイクロ秒のレプリカ交換分子動力学計算で得られたトラジェクトリーを解析し、二面角(図 3)や最大分子長、特定の原子間距離、および、それらの出現頻度や平均力ポテンシャルを計算した。計算結果は、本研究において初期構造として用いる予定の GDH-NADP 準安定複合体や PDB 中の複合体に含まれる NADP 分子の立体構造と比較した。

3. 結果

様々な複合体形成中に水素結合を形成する O2N-N7N 分子間距離の平均力ポテンシャルについては、水素結合距離付近に局所的なエネルギーの谷が観察された。また、クライオ電子顕微鏡で観察された立体状態とも矛盾しない結果が得られた。対して、最大分子長さ、NADP 分子中の主要な 10 個の二面角については、実験で得られた複合体中の立体状態と整合しない結果であった。

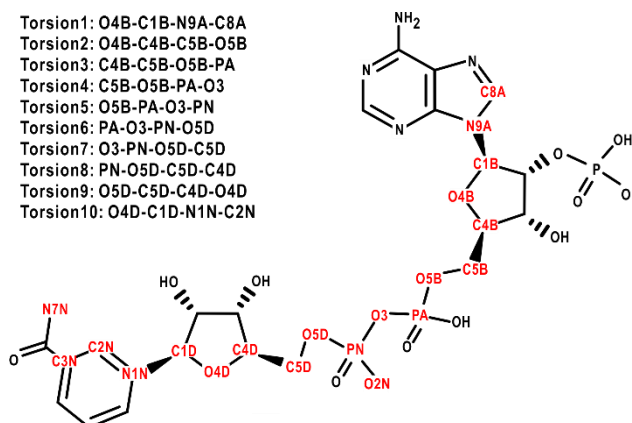


図 3. NADP の構造式および立体構造に関わる主要な二面角

4. まとめ

目的の GDH と NADP の結合過程のシミュレーションを行う準備として、NADP に適用する力場の検証を行った。十分な構造をサンプリングするために、レプリカ交換分子動力学法を適用し、それから得られたトラジェクトリーを解析したところ、水溶液中の NADP の振る舞いが、PDB エントリーをはじめとする実験で観察された NADP 構造と整合しない結果が得られた。PDB 上から取得された NADP 分子は、様々な蛋白質側鎖と強弱様々な相互作用をした状態であるため、力場をより適切に判断するためには、水溶液中の NADP の物性についての実験データを参照し、さらなる検証を進める必要がある。

5. 今後の計画・展望

現在までに得られているトラジェクトリーをもとに、蛋白質と相互作用が少ない、もしくはない状態の NADP について、NMR 法やラマン分光法などを用いた構造情報をもとにさらに検証を進める。また、この検証で用いた力場が適切であると判断された場合には、GDH-NADP 準安定複合体の全原子分子動力学シミュレーションに着手する。もし、力場が不適当であった場合には、より適切な力場を探索、または構築する。

実験情報に基づく Full-length Lid を有する HDM2 N 末端ドメインの構造ダイナミクスの解析 (担当: 渡邊)

1. 本プロジェクトの研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

HDM2 はがん抑制遺伝子 p53 の働きを制御し、細胞内環境保持に重要な役割を担うタンパク質である。p53 に対する HDM2 の制御は HDM2 N 末端ドメイン-p53 複合体形成を契機に進行することが知られており、HDM2 N 末端ドメインは N 末端側に位置する天然変性領域の Lid と p53 結合サイトを含む Core の二つの領域からなる。これらの二つの領域の相対的な位置関係の変化に伴って、HDM2 は p53 結合サイトが Lid で閉塞された”Closed state”と結合サイトが開放された”Open state”の二状態間で構造平衡を取ることが先行研究から示唆されている (図 4、Showalter *et al.*, *JACS*, 2008)。しかしながら、この先行研究では Lid の一部 (残基番号:1-15) を切除した truncate 体を用いており、全長の Lid を用いた場合には Lid-Core 間の相互作用や Lid 自体の二次構造に変化が見られる可能性がある。我々は

HDM2 の真のダイナミクスを明らかにするために、全長の Lid を含む HDM2 の構造ダイナミクスの解析を NMR 実験と全原子 MD 計算を用いて行った。主な計算は 2023 年度東京大学情報基盤センター 若手・女性利用採択課題にて実施し、本プロジェクトの計算資源は予備計算に利用した。

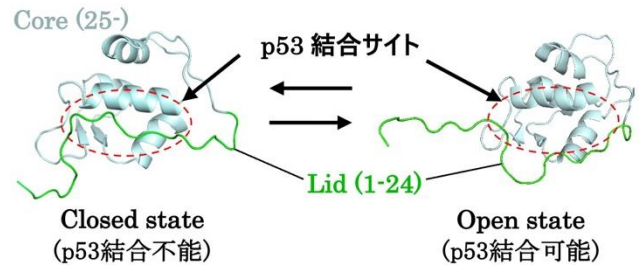


図 4. HDM2 の構造平衡 概念図

2. 具体的な利用内容、計算方法

HDM2 N 末端ドメインの NMR 溶液構造 (PDB ID: 1Z1M, model 2) を初期構造とし、分子動力学ソフトウェア GENESIS を利用した MD 計算を行った。この時、Lid の dynamics を選択的に促進させ、二状態の構造サンプリングを十分量行うために、Lid 領域全体を主な溶質領域とするレプリカ数 4 の gREST 法を用いた simulation を行った。結果の妥当性を判断するために、gREST simulation の結果と自身らで行った NMR 実験の結果との比較を行い、p53 結合制御と関連する HDM2 N 末端ドメインの構造ダイナミクスの解明を試みた。

3. 結果

gREST 法の適用によって、Closed, Open の両 state の十分量の構造サンプリングに成功した。取得した構造群を k-means 法によるクラスター分類ののち、クラスターごとの分類を行ったところ、明確に区別可能な二つの closed state 構造が確認された。これらの構造は NMR 実験の結果からも存在が示唆され、NMR 実験と MD 計算の両手法の組み合わせによってこれまで報告のなかった複数の closed state 及びそれらの構造間での速い構造交換の存在を見出すことに成功した。

4. まとめ

全長の Lid を含む HDM2 N 末端ドメインの構造ダイナミクスを詳細に検討するために、NMR 実験と MD 計算を組み合わせた検討を実施した。その結果、closed state には明確に区別可能な二つの安定状態が存在し、それら間で速

い構造交換が生じていることが明らかとなった。今回明らかとなった closed state 間での構造交換は p53 結合制御への関与が考えられる。今後は今回得られた gREST trajectory のさらなる解析を進めることで、生物学的に重要な HDM2 の構造ダイナミクスの解明を目指す。

5. 今後の計画・展望

これまでに実行した MD 計算は野生型の HDM2 N 末端ドメインを対象に実施したが、HDM2 は生体内でリン酸化等の翻訳後修飾を受けることで構造安定性が変化することが報告されている。今後は Lid 上残基をリン酸化した上での検討や生体内の溶液環境に近い、分子混雑環境下での検討を実施予定である。

De novo 設計膜貫通ペプチドポアの構造変化メカニズム (担当:新津)

6. 利用がなかった理由

本年度は令和 5 年度 HPCI システム利用研究課題 (ID: hp230090) の資源を利用したため HOKUSAI は利用しなかった。

2023 年度 利用研究成果リスト

【ポスター発表】

1. Masahiro Motohashi, Mao Oide, Chigusa Kobayashi, Jaewoon Jung, Eiro Muneyuki, Yuji Sugita, "Conformational change mechanisms driving the rotation of F_1 -ATPase", BioNano8, 2023/6/16 (Kraków, Poland)
2. Masahiro Motohashi, Mao Oide, Chigusa Kobayashi, Jaewoon Jung, Eiro Muneyuki, Yuji Sugita, "Conformational change mechanisms driving the rotation of F_1 -ATPase", CCP2023, 2023/8/5 (Kobe, Japan)
3. 本橋昌大, 大出真央, 小林千草, Jaewoon Jung, 宗行英朗, 杉田有治, "Conformational change mechanisms driving the rotation of F_1 -ATPase", 第 61 回生物物理学会年会, 2023/11/16 (名古屋)
4. Kazuki Watanabe, Ryosuke Iwatsuki, Ryota Fukui, Weitong Ren, Qingci Zhao, Yuji Sugita, Noritaka Nishida "Exploring the conformational dynamics of the disordered Lid region of HDM2 N-terminal domain with MD simulation", The 3rd Meeting of Cross-Scale Biology Transformative Research Area (A), 2023/9/7-8 (Awaji, Japan)