

## Go++ で Go Go

### — ミオシンモータードメインの構造緩和シミュレーション

JST CREST(ソフトナノ柳田グループ), 阪大サイバー 高城 史子  
fumiko@cp.cmc.osaka-u.ac.jp

ミオシンは、ATPを加水分解(ATP → ADP+Pi)することによってアクチンフィラメント上を一方方向運動するモータータンパク質である。ミオシンモータードメインの構造はヌクレオチド<sup>1</sup>の状態によって変化することが知られており、この構造の変化はアクトミオシン系の運動機構に大きく関わっていると考えられている。構造変化と運動機構との関係については、これまでに数多くの実験が行なわれており、いくつかの説が挙げられてはいるが、未だ結論は出していない。近年、1分子測定技術は非常に進歩してきているが、運動過程における分子内の詳細な構造変化をリアルタイムで見ることが(現時点では)できない。そこで、分子動力学シミュレーション(MD)を用いてアクトミオシン系の運動機構を理解したい、というのが本研究の(大きな)目標である。とはいうものの、ミオシンはモータードメインだけで約800残基、アクチンフィラメントは1分子が約400残基のアクチン分子が重合したものである。それらを全て含めてシミュレーションするのは現在の計算機の能力では難しいし、まるごと全原子シミュレーションができたとしても、滑り運動が再現できるかという疑問である(おそらくできない)。というわけで、まずはミオシンのモータードメインに着目して、その構造変化のダイナミクスの理解を目標とする。

MDを用いてタンパク質の構造変化を調べようという試みは、これまでもなされている。その多くは、1つの結晶構造のまわりでのMDを行ない、ノーマルモード解析等によって各サブドメインの運動方向を予想するというもので、構造変化全体を追うものではなかった。これは、大きな構造変化が見られるほど長時間のシミュレーションができない全原子MDはもちろん、ネットワークモデル等、粗視化モデルの場合でも同様である。しかし最近、タンパク質



図 1: アクチンフィラメント上のミオシン (PDBcode:1O1G).

<sup>1</sup>ATP, ADP 等のこと。

フォールディングに用いられる「Goモデル」を用いて大きな構造変化を直接シミュレーションしようという試みが、いくつかでてきている(古賀等(F1-ATPase), 寺田等(acto-myosin)).

Goモデルでは, エネルギー関数を天然構造が最安定となるようにきめる. 天然構造で近傍にあるアミノ酸対(native-contact ペア)には天然構造でのペア間の距離が最安定となるような引力ポテンシャル—いわゆる Go ポテンシャル—がはたらくとし, 天然構造で近傍にないアミノ酸対には斥力(排除体積効果)のみを仮定するのである(他にボンド長, ボンド角等のペプチド鎖に沿った局所構造も, 天然状態での構造が安定となるようなポテンシャルを用いる). また多くの場合, タンパク質は粗視化(「アミノ酸1残基 = 1つの球」程度の)して扱われる. Goモデルを用いたタンパク質フォールディングの研究は数多く行なわれており, 基本的な性質をよく再現するとされている. このフォールディングシミュレーションに用いられるエネルギー関数をそのまま利用して, 「構造変化後の構造を“天然”構造とし, 構造変化前の構造を初期状態として与えて“天然”構造へ緩和させる」というのが Goモデルを用いた構造変化シミュレーションである. これならばある程度大きいタンパク質についても, 大きい構造変化の過程を追うことができる.

ところが, このGoモデルを用いた構造変化シミュレーションは, 問題が生じることがある. フォールディングの場合には, 初期状態は通常ランダムコイルであり, 天然構造よりひろがった構造である. つまり, ある native-contact ペア,  $i-j$  の初期状態での距離  $r_{ij}^{\text{init}}$  は天然構造での距離  $r_{ij}^{\text{final}}$  より(ほとんどの場合)大きい( $r_{ij}^{\text{init}} > r_{ij}^{\text{final}}$ ). これに対して構造変化の場合には, 初期状態も折り畳まれたコンパクトな構造である. したがって,  $r_{ij}^{\text{init}} < r_{ij}^{\text{final}}$  となるペアも少なからずある. その結果, 初期状態は大抵の場合, エネルギーが非常に高い, 不安定なものになってしまうのである. 本来, ある構造(A)から別の構造(B)への構造変化(緩和)を考える場合, Aは, Bよりエネルギーが高いかもしれないが, それなりに安定な状態を考えているのではないか. そうだとすると, 非常にエネルギーの高い状態からのダウンヒル的な緩和というのは, 構造変化の描像としてはふさわしくないように思われる.

そこで, 我々は拡張したGoモデル—“Go++”モデル(あるいは dual Go model)—を導入した. “Go++”モデルでは, native-contact ペア,  $i-j$  間に働く Go ポテンシャルを, 初期構造

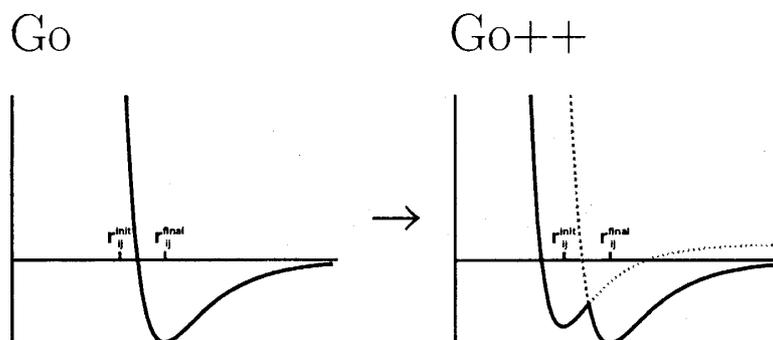


図 2: Go ポテンシャル: 通常の Go モデルと “Go++” モデル.  $r_{ij}^{\text{init}}$ ,  $r_{ij}^{\text{final}}$  は, それぞれ初期構造, 最終構造での  $i-j$  ペアの距離.

(構造変化前)での距離  $r_{ij}^{\text{init}}$ , 最終構造 (構造変化後)での距離  $r_{ij}^{\text{final}}$  の両方で極小となるようにした (図2). ボンド長, ボンド角, 二面角についても同様に, 構造変化前と後の両方の構造に対応する長さ, 角度で極小値をとるとする. 「初期構造も安定であってほしいなら, そのようなエネルギー関数にすればよい」という単純な発想である. 局所相互作用 (ボンド長, ボンド角, 二面角) については, 2つの構造は同等として扱い, 非局所相互作用 (Go ポテンシャル) については, 最終構造に対応するほうのポテンシャルの谷をやや深くすることによって, 最終構造のほうが安定になるようにした.

エネルギー関数に2つの構造を埋めこもうと思ったとき, それぞれのポテンシャル (Go ポテンシャルや局所相互作用ポテンシャル) が2つの谷を持つようにするという描像が正しいかどうかはわからない. しかし個人的には, ある残基にとって “居心地のいい” 場所は, そもそもいくつかあって, それが, 例えば ATP 結合部位付近の位置関係が変わることによって, “居心地のよさ” の順位が変わってしまう, という描像を持っているので, それを表現するモデルとして, “Go++” モデルは悪くないと考えている.

シミュレーションの具体的な条件は以下のとおりである.

実験により, ATP の加水分解後, rigor 状態 (アクチンと強結合した状態) に至る過程で, 一方向運動, 力発生が生じることが明らかになっているので, これに対応する過程として, 初期構造に pre-stroke 構造 (PDBcode:1VOM, ATP 加水分解過程の transition-state analog が結合), 最終構造に near-rigor 構造 (PDBcode:1Q5G, ヌクレオチドなし) を用いることにした. 共に *Dictyostelium discoideum* myosin II のモータードメインの結晶構造である. 最終構造としては rigor 状態での構造を用いたいところではあるが, アクチンフィラメントと強く結合したこの状態の結晶構造は得られていないので, 現在得られている構造の中で, 最も rigor 状態での構造に近いと思われる構造を用いることにした.

上に述べたように, 今回用いる初期構造には ヌクレオチド (ADP·Pi アナログ) が結合しており, 最終構造には ATP も ADP も付いていない. ということは, 構造変化の途中には ヌクレオチドが解離する過程が含まれるはずである. 従来, 粗視化モデルを用いたタンパク質のシミュレーションでは, ヌクレオチド等のリガンドの付いた結晶構造を用いる場合でも, タンパク質のみを扱い, リガンドは直接扱わない (その結晶構造を用いるということでリガンドの影響は取り入れられているとする) 場合がほとんどである. 粗視化モデルでは, 例えば加水分解等の化学反応については扱えないから, という理由からだろうか. しかし, タンパク質の構造変化に関するリガンドの影響は, もっと大雑把な, リガンドが結合部位に「ある」のか「ない」のかというレベルで, あると考えられるので, 我々は, ヌクレオチドも粗視化した (タンパク質とは別の) 短い鎖として扱うことにした. これにより, その解離とモータードメインの構造変化との関連を見ることができるようである.

ヌクレオチドが結合している初期状態からの緩和の一例を, 図3に示す. ヌクレオチドが解離 ( $Q_{\text{nucl.}} \sim 1 \rightarrow 0$ ) すると同時に, (最終構造との) dRMSD が緩和している. dRMSD の変化を, 20本のトラジェクトリについてみると, 初期構造 (dRMSD ~ 4) から緩和してきた dRMSD ~ 2.5 付近に一旦留まり, ヌクレオチドが解離した後に最終構造に緩和していること

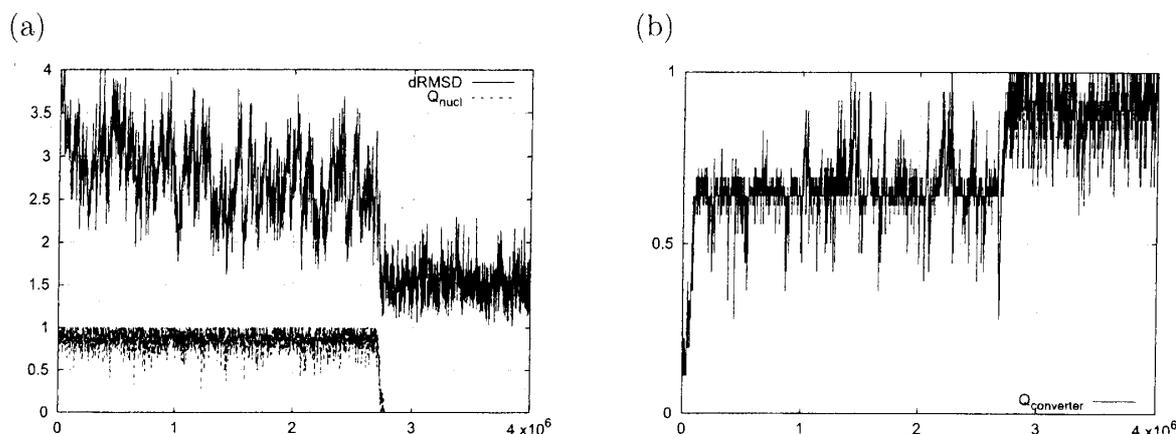


図 3: あるサンプルについての時系列データ. (a) 最終構造からの dRMSD と, タンパク質とヌクレオチドとの結合を表す指標  $Q_{\text{nucl.}}$  ( $Q_{\text{nucl.}} = 0$  で解離). (b) コンバータ部に着目した指標.  $Q_{\text{converter}} = 1$  のとき, 「コンバータ部の他の部位に対する相対的な位置」が最終構造と同じになる.

がわかる. この「一旦留まる」傾向は, コンバータ部<sup>2</sup>に着目するとより明確であり, 緩和の途中で中間状態が存在することがみてとれる. 実験により, ミオシンによる ATP 加水分解反応過程には, いくつかの中間状態があることが知られている. この中間状態の構造は明らかになってはいないが, FRET による実験で, 結晶構造にはない中間構造の存在が示唆されており, (W. M. Shih et al (2000)). 今回シミュレーションで得られた中間状態は, この FRET 実験の結果と無矛盾である.

中間状態から最終構造 (near-rigor 構造) への緩和に着目してみると, この緩和はヌクレオチドが結合しているかぎり起こらないようである. つまり, near-rigor 構造に緩和するためには, ヌクレオチドが解離する必要があるということが示唆されるのだが, このことは, 実はヌクレオチドを陽に扱わなくとも示すことができる. 「初期構造においてヌクレオチドとコンタクトしている残基同士も native-contact ペアとみなし, 引力ポテンシャルがはたらく」という形でヌクレオチドの効果を導入し, 緩和シミュレーションを行なう<sup>3</sup>と, 解離シミュレーションにおける中間状態, つまり, ヌクレオチドが解離する前の状態とほぼ同じ構造で緩和がとまってしまい, 最終構造まで到達しない.

次に, ヌクレオチドとタンパク質との結合の強さを変えてシミュレーションを行なった. 結合が強いほど, 解離と構造緩和が同期するようになる傾向が見えている (図 4(a)). 最近, レバーアームの向きによりヌクレオチドの解離定数が変化するという, “ストレインセンサー” 説が浮上ってきている. 今回のシミュレーションの結果は, ヌクレオチドの解離とミオシンモータードメイン全体の緩和が強く関連していることを示しており, “ストレインセンサー” 的な描像に近い結果といえるだろう. ちなみに, この解離と緩和の同期は, 二面角ポテンシャルを考えない (局所構造についての拘束はボンド長とボンド角しか考えない) 場合にはほとんどみられない (4(b)). タンパク質内部の離れた部位の間の相関は, ある程度の “かたさ” がないと

<sup>2</sup>初期構造と最終構造で最も大きく変化する部位

<sup>3</sup>ヌクレオチドが固く結合して, 解離しない状態に対応すると考えられる.

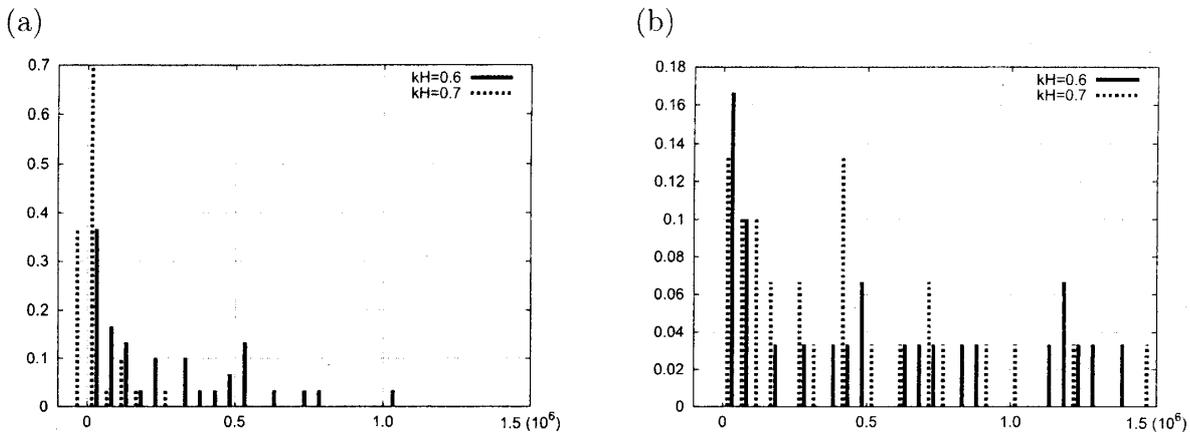


図 4: ヌクレオチドが解離してからミオシンが near-rigor 構造に緩和するまでの時間 (ステップ数)  $t_{diff}$  の分布 (サンプル数: 30).  $kH$  はヌクレオチドとタンパク質の相互作用の強さを決めるパラメータ. (a) 二面角ポテンシャルがある場合. 結合が強い場合には, 解離と緩和が同時に起こる傾向が強くなる.  $kH=0.7$  のとき,  $t_{diff} < 0$  のデータが多数あるが, ヌクレオチドが結合したまま緩和したわけではなく, 実際に時系列を見てみると解離と緩和が同時に起こっている. (b) 二面角ポテンシャルがない場合.  $kH$  に依らず, 構造緩和は解離とは同期していない. (但し, ヌクレオチドが解離しないと緩和しないという点では同じ. )

実現しないということを示唆していると言えるだろう.

以上, まとめると, “Go++” モデルによるミオシンモータードメインの構造緩和シミュレーションにより,

- pre-stroke 構造から near-rigor 構造への緩和には中間状態が存在し, 中間状態から near-rigor 構造へ緩和するにはヌクレオチドの解離が必要である.
- ヌクレオチドが固く結合してる場合には解離と構造緩和が同期する傾向がある. ただし二面角ポテンシャルを考えない場合にはこの同期はみられなくなる.

という結果を得た.