ミオシン頭部 S1 の運動機能評価のための分子構造解析*

仲 町 英 治^{*1}, 山 田 哲 也^{*2}Molecular Structure Analysis of Myosin Subfragment 1
for Evaluation of Kinetic Function

Eiji NAKAMACHI and Tetsuya YAMADA

In this study, the molecular structure analysis of myosin subfragment 1 (S1) is carried out using the molecular mechanics code "AMBER," to characterize the structural morphology and the kinetic function. Using 3-D molecular structure data, which were determined by X-ray analyses executed by Rayment [*Science*, **261** (1993), 50-58], the minimum-energy conformations of S1 and S1 with ATP were obtained by molecular mechanics analyses. Differences in atom coordinates and potential energy distributions indicate local packing and heterogeneous characteristics of S1 structure. The normal mode and molecular dynamics analyses reveal the active sites of S1 · ATP, and its kinetic function.

Key Words: Myosin S1, Molecular Mechanics Analysis, Minimum-Energy Conformation, ATP, Normal Mode Analysis, r. m. s. Fluctuation, Compressibility

1. 緒言

筋収縮は、ミオシンが ATP の加水分解で得た化学的エネルギーを力学的エネルギーに変換して、アクチンフィラメント上を滑走して起きる。このミオシン分子は別名“モータタンパク質”と呼ばれており、サブフラグメント 1 と呼ばれる頭の部分(ミオシン頭部 S1)に、ATPase 活性能とアクチンフィラメント結合能という筋収縮における重要な機能が納められている。しかし、このタンパク質分子モータの機能発現時におけるエネルギー変換および運動機構は完全に明らかにされていない。そこで、構造の不均質性と運動機能発現を可能とする構造のゆらぎを解明するために、ミオシン頭部 S1(以下、S1)およびミオシン頭部 S1·ATP 複合体(以下、S1·ATP)の分子構造解析および機能評価を行う。

本研究では、1993 年に Rayment らにより発表されたミオシン頭部 S1 の三次元座標データ⁽¹⁾を初期座標として分子力学計算を行い、配座エネルギー極小構造を決定する。S1·

ATP についても同様に配座エネルギー極小構造を決定する。これらの配座エネルギー極小構造に対して、それぞれ基準振動解析を行い、S1 および S1·ATP を構成する各原子のゆらぎの振幅の二乗平均を得る。また、体積、比容、および、圧縮率を求め、S1 および S1·ATP の静的構造特性および運動機能について比較検討する。

2. 分子構造解析法⁽²⁾

2.1. 分子力学計算法 分子力学計算では、Kollman らが開発した AMBER⁽³⁾⁽⁴⁾を用いる。AMBER での全配座エネルギー E_{total} は、以下に示すエネルギー項の和で表される。

$$E_{\text{total}} = \sum_{\text{bonds}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right] + \sum_{\text{H-bonds}} \left[\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right] \quad (1)$$

ここで右辺の 1~3 項は共有結合に伴うエネルギーであり、4~5 項は非共有結合に伴うエネルギーである。

タンパク質分子の配座を列ベクトル $\mathbf{x}$ で表示すると、配座

* 原稿受付 1996 年 7 月 18 日。

^{*1} 正員, 大阪工業大学工学部 (〒535 大阪市旭区大宮 5-16-1)。^{*2} 学生員, 大阪工業大学大学院。

エネルギー $E(\mathbf{x})$ の極小化は初期構造 $\mathbf{x}_0$ が与えられると,

$$\mathbf{x}^{k+1} = \mathbf{x}^k + \alpha \mathbf{d}^k \quad (2)$$

$$\nabla E(\mathbf{x})|_{\mathbf{x}=\mathbf{x}^*} = 0 \quad (3)$$

を満足する収束点列 $\{\mathbf{x}^0, \mathbf{x}^1, \dots, \mathbf{x}^*\}$ を求めることである。AMBER では、極小化の当初は最急降下法を用い、その後極小点に達するまで共役勾配法を用いる。

2・2. 基準振動解析 分子内振動の自由度 n に対応した座標をベクトル $\mathbf{q}$ で表すと、運動方程式は

$$\sum_{j=1}^n H_{ij} \ddot{q}_j + \sum_{j=1}^n F_{ij} (q_j - q_j^0) = 0 \quad (4)$$

となる。ここで F_{ij} と H_{ij} は $\mathbf{q}$ の 2 次の導関数を表す。式(4)の一般解 q_j は次式で得られる。

$$q_j = q_j^0 + \sum_{k=1}^n A_{jk} Q_k \quad (5)$$

固有振動数 ω_k と重ね合せの係数 A_{ij} を式(5)に代入するとタンパク質の分子内振動を示す原子運動が完全にシミュレートされる。しかし、S1 を構成する各原子の運動について、すべての原子を影響範囲として考慮した場合、計算量が膨大となる。したがって、仲町らが提案した方法⁶⁾を用いて、ある原子の運動は一定の距離 ($R=10 \times 10^{-10}\text{m}$) 以内にある原子集団のみの基準振動の和として表すとし、その影響範囲外の原子集団による寄与は考慮に入れないものとする。

原子運動のゆらぎの振幅の時間に関する二乗平均 (r.m.s. Fluctuation) は、次式で表される。

$$\sqrt{\langle (\Delta q_i)^2 \rangle} = \sqrt{\sum_k A_{ik}^2 \frac{k_B T}{\omega_k^2}} \quad (6)$$

ただし、 k_B と T はそれぞれボルツマン定数、絶対温度である。

2・3. タンパク質分子の体積・断熱圧縮率 ここで、タンパク質分子の体積 V を回転半径 r_g を用いて次式で見積もることとした。

$$V = \frac{4}{3} \pi r_g^3 \quad (7)$$

$$r_g = \sqrt{\frac{\sum (r_i - r_c)^2}{n}} \quad (8)$$

巨視的には、タンパク質の等温圧縮率 (Isothermal Compressibility) β_T を体積ゆらぎを用いて求めるとつぎのようになる。

$$\beta_T = \frac{\langle (\Delta V)^2 \rangle}{k_B T V} \quad (9)$$

ここで、体積ゆらぎの二乗平均 $\sqrt{\langle (\Delta V)^2 \rangle}$ は次式で与えられる。

$$\sqrt{\langle (\Delta V)^2 \rangle} = 4\pi r_g^2 \sqrt{\langle (\Delta r_g)^2 \rangle} \quad (10)$$

$$\sqrt{\langle (\Delta r_g)^2 \rangle} = \sqrt{\frac{\sum \left(r_i + \sqrt{\langle (\Delta r_i)^2 \rangle} - r_c \right)^2}{n}} - \sqrt{\frac{\sum (r_i - r_c)^2}{n}} \quad (11)$$

$\sqrt{\langle (\Delta r_i)^2 \rangle}$ は各原子のゆらぎの振幅の二乗平均であり、基準振動解析によって式(6)から求められる。

タンパク質における圧縮率の関係は Gekko ら⁶⁾によって体系的研究がなされている。断熱圧縮率 (Adiabatic Compressibility) β_s は、 β_T から次式で見積もることができる。

$$\beta_s = \beta_T - \alpha^2 \frac{T v_0}{C_p} \quad (12)$$

$$\alpha = \frac{1}{v_0} \frac{\partial v_0}{\partial T} \quad (13)$$

ここで、 α 、 v_0 はそれぞれタンパク質の熱膨張率、比容である。定圧熱容量 $C_p = 1.34 \times 10^3 [\text{J/kg} \cdot \text{K}]$ 、 $(\partial v_0 / \partial T) = 3.7 \times 10^{-7} [\text{m}^3 / \text{kg} \cdot \text{K}]$ がタンパク質の種類によらず十分に適用できる平均値⁶⁾であるとし、これを用いる。

3. 分子構造解析結果

3・1. ミオシン頭部 S1 のエネルギー極小構造 S1 の三次元座標データは、Protein Data Bank (PDB) に登録されているデータ (図 1) を用いた。ただし、S1 の 2 本の軽鎖 (ELC, RLC) を除いて重鎖のみを解析対象とする。座標情報が欠落した原子については座標を補間した。総自由度および計算パラメータの数を減らすために、原子団 CH_n を単一の原子として取り扱うユナイテッドアトムモデルを用い、全原子数を 8387 原子 (843 残基) とした。また、ATP (35 原子) を含んだ S1 の三次元座標データについては、S1 と同様に ATPase 活性を持つアデニル酸キナーゼに着目し、ATP 結合部位のトポロジ類似性から、S1 の ATP 結合部位を決定した Yount らの方法⁶⁾を採用して初期座標を決定した。この場合、S1・ATP の全原子数は 8422 原子 (844 残基) となった。これらのデータを初期値として分子力学計算を行い、S1 および S1・ATP の配座エネルギー極小構造をそれぞれ決定した。ここでは、初期座標を X 線結晶構造解析による実験結果を用いることにより、分子力学計算によって得られた極小点は、大域的な極小点、つまり最小点の近傍に収束したものと考えた。S1 および S1・ATP の配座エネルギー極小構造をそれぞれ、図 2、図 3 に示す。

3・2. 極小構造の検討 求めた S1 と S1・ATP の極小構造間の座標の相違を各原子について示したものが図 4 である。図 4 において、原子位置の変化が大きい ($12 \times 10^{-10}\text{m}$ 以上) 部位を持つ残基は、Ala1, Ser2, Lys19, Ser644 であった。特に Ser644 は、アクチン結合部位にあるループ構造 (Gly627~Phe646) に含まれている。この近傍は X 線結晶構造解析像では座標決定が困難な箇所であり、非常に柔軟な構造を持つことが分かっている¹⁾。S1 は ATP を結合するこ

とにより, ATP 結合ポケット部分とその近傍および, アクチン結合部位部分において, 構造が大きく変化することが示された. また, トリプシン分解 50-kDa セグメント中央のクレフト部分においてもその間隔が大きくなっていることが分かった. ただし, ミオシン頭部のドメイン間で折れ曲がるという構造変化が実験により報告されているが⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾, 本解析においてはその変化は見られなかった. しかし, Sugimoto らが提出したモデル⁽¹⁰⁾にあるように, 触媒ドメインにおける構造変化部位は本解析における部位とはほぼ一致し, 中央のクレフト部分が同様に開く様子が確認できた.

さらに, 図 5 および図 6 に S1 および S1・ATP の極小構造における各残基ごとの全配座エネルギーを示す. これらのエネルギー分布図から, S1 および S1・ATP の構造には, 局在的に著しく大きな配座エネルギー値をとる部位があることが分かる. これらの部位におけるエネルギー局在化は, 構造的に無

理なパッキング(充填)を生じたためと考えられ, それらは構造的に不安定な部位であるといえる. 図 7 に, これらの部位と ATP 加水分解時に構造変化を起こす部位⁽¹¹⁾および, トリプシン分解 25, 50, 20-kDa セグメントの位置関係を比較して示す. 図 7 から, エネルギー局在部位の位置は, トリプシン分解セグメント間の境界および, 50-kDa セグメントのドメイン間の境界にある. 特に, Phe470~Phe472 は近傍の空間が疎であるにもかかわらず, 密にパッキングされている. また, ATP 結合ポケット⁽¹²⁾近傍ドメインの境界部位である Phe458, Ile459, および, ATP 加水分解時に構造変化する部位近傍の Phe711, Phe766 残基が, ATP 結合時に大きいエネルギー変化を示していることが分かる. このことから, S1 は ATP を結合した, つまり機能発現時において, その構造が局所的に極端なパッキング状態を呈することが分かる.

Fig. 1 X-ray Structure of Myosin S1

Fig. 2 Minimum-Energy Conformation of Myosin S1

Fig. 3 Minimum-Energy Conformation of Myosin S1-ATP complex

Fig. 4 Coordinate Difference between S1 and S1-ATP complex

3・3. ミオシン頭部 S1 の各原子のゆらぎ S1 の各原子のゆらぎの振幅の二乗平均を基準振動解析によって求めた結果を図 8 に示す。図 8 から、原子のゆらぎの振幅の二乗平均が $4 \times 10^{-10} \text{m}$ 以上を示す部位は、Tyr143, Asn410, Asp450, Leu664, Arg696 であることが分かった。S1・ATP の各原子のゆらぎの振幅の二乗平均を図 9 に示す。図 9 から、原子のゆらぎの振幅の二乗平均が $4 \times 10^{-10} \text{m}$ 以上を示す部位は、Hip42, Glu89, Ser420, Arg725 であることが分かった。これらの解析から、動的特性の不均質性、つまりゆらぎ部位の局在化が確認された。さらに、S1 および S1・ATP のゆらぎの比較からそれぞれのゆらぎの大きい残基、あるいは、ATP 結合前後でゆらぎ状態の相違が顕著である残基は、それぞれが筋収縮において活性化するとされる部位近傍、あるいは、ATP 加水分解時に構造変化を起こす部位近傍に位置していることが分かった。特に、ATP およびアクチンと

の結合部位近傍に局在化している。また、ミオシンを構成する各原子のゆらぎの振幅の二乗平均の総和をとり平均すると、S1 は $0.44 \times 10^{-10} \text{m}$ となり、S1・ATP は $0.41 \times 10^{-10} \text{m}$ となった。したがって、S1・ATP は S1 に比べて、構造全体としての運動能力が低い、つまり、より高い剛性を持つものと考えられる。

つぎに、分子動力学(MD)を用いて、S1 および S1・ATP の各原子のゆらぎを求めた結果を示す⁽¹³⁾。60ps 間での構造変化を調べた結果、S1 では S1・ATP に比べて大きく構造が変化し、軽鎖ドメイン(Leu771~Lys843)が触媒ドメイン(Ala1~Gly770)との付け根部分で、より大きなねじれと折れ曲がり運動を示すことが分かった。また、微視的にはゆらぎを生じる部位が局在化しており、S1 ではアクチン結合部位、S1・ATP では ATP 結合ポケットの縁で大きい値を示した。基準振動解析結果と同様に、ATP の有無によりゆらぎが変

Fig. 5 Total Potential Energy of Myosin S1

Fig. 6 Total Potential Energy of Myosin S1・ATP complex

Fig. 7 Energy-Packing Position of Myosin S1

Fig. 8 r.m.s. Fluctuation of Myosin S1

Fig. 9 r.m.s. Fluctuation of Myosin S1·ATP complex

化し、構造変化と機能発現との関連性が推測された。

3.4. ミオシン頭部 S1 の物性値 S1 および S1·ATP の回転半径 r_g 、体積 V 、および、比容 v_0 の計算結果を表 1 に示す。ただし、式(7)は体積を球近似で求めて、S1 のように細長い軽鎖ドメインを持つ場合には、体積値は大きく見積もられることになる。そこで表 1 には、軽鎖ドメインを除いた触媒ドメインで求めた値も記す。表 2 に回転半径および比容の実験測定値⁽⁹⁾⁽¹⁴⁾を示す。回転半径の解析値が実験値よりも著しく低く見積もられているのは、図 1 に示されるような軽鎖ドメインに結合している 2 本の軽鎖を除いたためと考えられる。また、S1 と S1·ATP との差が実験値ほど明確ではないのは、実験で観察されるドメイン間の相互的な大きな構造変化⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾が、本解析では現れていないためと思われる。比容については、前述の体積と同様に S1 重鎖では大きく見積もられているが、軽鎖ドメインの部分を考慮に入れると、触媒ドメインでの比容は、実験値と非常に良い一致を示した。

3.3 節で示したゆらぎの計算結果を基に、式(9)および式(12)を用いることで S1 および S1·ATP の等温圧縮率 β_T および断熱圧縮率 β_S を求めた結果を表 3 に示す。表 3 から、S1·ATP は S1 よりも等温および断熱圧縮率の値が著しく低

Table. 1 Rotational Radius, Volume, Specific Volume

	回転半径 r_g ($\times 10^{-10}\text{m}$)	体積 V^* ($\times 10^{-25}\text{m}^3$)	比容 v_0 ($\times 10^{-3}\text{m}^3/\text{kg}$)
S1	35.57	1.885	1.029
触媒ドメイン	28.67	0.987	0.595
S1·ATP	35.53	1.878	1.021
触媒ドメイン	28.68	0.988	0.592

[*式(7)を用いて算出]

Table. 2 Experimental Value

	r_g ($\times 10^{-10}\text{m}$)	v_0 ($\times 10^{-3}\text{m}^3/\text{kg}$)
S1	47.80	0.713
S1·ATP	45.00	0.710

Table. 3 Isothermal and Adiabatic Compressibility

	β_T ($\times 10^{-11}\text{m}^2/\text{N}$)	β_S ($\times 10^{-11}\text{m}^2/\text{N}$)
S1	10.46	7.386
S1·ATP	4.622	1.529

Table. 4 Adiabatic Compressibility

		β_S ($\times 10^{-11}\text{m}^2/\text{N}$)
実験値 ⁽¹⁴⁾	S1	4.200
	S1·ATP	0.700
MD 結果 ⁽¹³⁾	S1	6.058
	S1·ATP	0.438

いことが分かる。このことから、S1 は ATP を結合することにより、分子全体が硬くなることがいえる。また、 β_S について、Tamura らによる実験測定値⁽¹⁴⁾および、MD 解析結果⁽¹³⁾を表 4 に示す。表 3 および表 4 から、基準振動解析結果の断熱圧縮率は実験値および、MD 解析結果よりも大きな値を示しているが、その特性推定は可能であると考えられる。

4. 結言

本研究では、Rayment らが公表した S1 の三次元座標データを基に分子力学計算を行い、S1 の配座エネルギー極小構造を決定した。同様に、Yount らの方法を用いて S1·ATP の三次元座標データを作成し、S1·ATP の配座エネルギー極小構造を決定した。ATP の有無の状態におけるそれぞれの分子構造解析結果から、S1 の構造特性に関するいくつかの知見を得た。

S1 は ATP を結合することにより、ATP 結合ポケットお

よびアクチン結合部位近傍が大きく構造変化し、中央のクレフト部分が開くことが分かった。このことから、ATP の結合情報は近傍部位の構造変化を誘起し、さらに ATP 結合部位の正反対にあるアクチン結合部位にまで伝達されるものと思われる。また、S1 および S1・ATP の各残基ごとのエネルギー分布の解析結果から、局在化するパッキング部位を持つことが分かった。さらに、S1・ATP は S1 よりもパッキングされた部位を多く持ち、よりコンパクトな構造をとることが分かった。

つぎに、得られた極小構造を用いて基準振動解析を行い、各原子のゆらぎの振幅の二乗平均を算出した。ゆらぎ解析結果から、S1 の ATP およびアクチンフィラメントと結合する部位近傍は、それぞれ運動能力が高いことが分かった。また、S1 は ATP を結合することにより、全体の剛性が高くなり、活性化部位の局在化が見られた。分子動力学によるゆらぎの解析結果からも、S1・ATP は S1 よりも運動性能が低く、機能部位近傍にゆらぎが局在化していることが分かった。また、S1 および S1・ATP の等温圧縮率および断熱圧縮率の値は実験値と良好な一致を示した。

本解析は水分子を含んでいない系すなわち真空中での分子構造特性を求めたものである。しかし、生体中ではタンパク質分子の周囲には水分子が存在している。そこで、水分子をタンパク分子周辺に配置すると、タンパク質分子表面において解離基間の静電相互作用および疎水基間の相互作用が関与するために、本解析と異なる結果が得られる可能性はあるが、それらの影響を調べることは今後の課題である。

なお、本研究を進めるに当たり有益な助言と助力をいただいたシャープ（株）の友広一郎氏に感謝する。

5. 参考文献

- (1) Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., and Holden, H.M., *Science*, **261** (1993), 50-58.
- (2) 江口至洋, タンパク質工学の物理・化学的基礎, (1991), 共立出版.
- (3) Weiner, S.J., Kollman, P.A., Nguyen, D.T., and Case, D.A., *J. Comput. Chem.*, **7** (1986), 230-252.
- (4) Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Salvatore Profeta, Jr., and Weiner, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **106** (1984), 765-784.
- (5) 仲町英治, 岩本正実, 機論, **61**, A (1995), 487-492.
- (6) Gekko, K., and Noguchi, H., *J. Phys. Chem.*, **83** (1979), 2706-2714.
- (7) Gekko, K., and Hasegawa, Y., *Biochemistry*, **25** (1986), 6563-6571.
- (8) Yount, R.G., Lawson, D., and Rayment, I., *Biophys. J.*, **68** (1995), 44s-49s.
- (9) Wakabayashi, K., Tokunaga, M., Kohno, I., Sugimoto, Y., Hamanaka, T., Takezawa, Y., Wakabayashi, T., and Amemiya, A., *Science*, **258** (1992), 443-447.
- (10) Sugimoto, Y., Tokunaga, M., Takezawa, Y., Ikebe, M., and Wakabayashi, K., *Biophys. J.*, **68** (1995), 29s-34s.
- (11) 平塚寿章, 病態生理, **13** (1994), 731-739.
- (12) 平塚寿章, 生物物理, **35** (1995), 89-94.
- (13) 仲町英治, 友広一郎, 日本機械学会講演論文集, **946-1** (1996), 471-472.
- (14) Tamura, Y., Suzuki, N., and Mihashi, K., *Biophys. J.*, **65** (1993), 1899-1905.