

TSUBAME 共同利用 平成 26 年度 学術利用 成果報告書

ATP加水分解によって惹き起こされるミオシン分子モーターの偏った揺らぎ運動に関する  
分子動力学シミュレーション

Molecular dynamics simulations of biased fluctuations of myosin molecular motor  
due to the ATP hydrolysis

川久保 達之

Tatsuyuki KAWAKUBO

桐蔭横浜大学

Toin University of Yokohama

tatsu@toin.ac.jp

筋肉の収縮はそれを構成するミオシンフィラメントとアクチンフィラメント間の相対的滑り込み運動によるものであり、それを惹き起こすミオシン頭部の方向性のあるゆらぎ運動がアデノシン三リン酸(ATP)の加水分解によって誘発されていることが知られているが、そのプロセスは分かっていない。本研究では、ATP加水分解の放出するエネルギーがミオシン頭部の各原子の熱振動にどのような変調を惹き起こすか、100ns の分子動力学シミュレーションを行った結果、頭部は本来的に一体となって尾部との接合領域を蝶番とする偏角振動をしていること、さらにATPの加水分解による摂動はその偏角振動の平均角度の方角をシフトさせる傾向があることがわかった。

Muscle contraction is caused by unidirectional relative movement between myosin head and actin filament. This movement is triggered by ATP hydrolysis within the myosin head, but its mechanism remains unknown. We carried out 100 ns all-atom molecular dynamics simulations at three temperatures to investigate the effect of ATP hydrolysis upon thermal vibrations of atoms in the myosin head. The results suggested that pivoting vibrations of the myosin head are biased in one direction by the perturbation of ATP hydrolysis.

*Keywords:* Muscle contraction, Myosin, ATP hydrolysis, Biased thermal vibration

## 1. 背景と目的

本研究はT S U B A M E 共同利用の平成24年度学術利用に採択された「ATP加水分解によって惹き起こされるミオシン分子モーターの変形運動に関する分子動力学シミュレーション」において計算を実施し、一応の成果が得られたものであるが、計算終了後、対象に用いたタンパク質であるミオシンの分子構造の欠損部分を補綴する段階で、主鎖の一部が元々の構造と若干異なる構造になっていたことに気づき、公開論文をまとめるために修正した初期構造を使つてのシミュレーションを再度行い、完璧を期したものである。

前回と多少重複するが、研究の背景と目的は次のようなことである。生物が活着している証しの一つである“自ら動く”という現象のメカニズムは化学的

エネルギーを機械的エネルギーに変換する熱機関とは異なっている。熱機関の場合、作業物質は高温の気体分子であつて、その速度分布は本来当方的であるが、それを閉じ込めているシリンダーの内壁やピストンに気体分子を衝突させることによって方向性のある力を発現させている。

それに引き換え、生体運動を司る筋肉は図1に示すような階層構造をもつていて、その収縮は、生体系に共通なエネルギー供給物質であるアデノシン三リン酸(ATP)の加水分解によって駆動される筋肉中のミオシンフィラメントとアクチンフィラメント間の相対的な滑り込み運動によるものであることが1957年 Huxley によって明らかにされた。アクチンフィラメントは2本の数珠玉状分子の鎖を振

じり合わせたような構造をしており、一方のミオシ

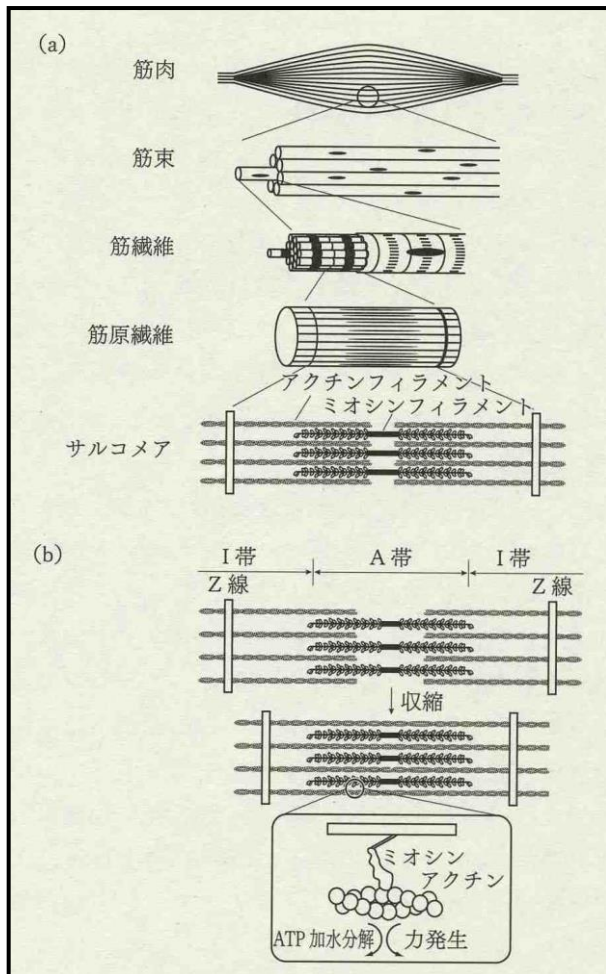


図 1(a)筋肉の階層構造 (b)ATPの加水分解によるミオシンとアクチンの相対運動の結果起こる筋収縮 柳田敏雄著「生物分子モーター」より

ンフィラメントは頭部と尾部からなる沢山の分子を尻尾の部分で束ねたような構造をしていて、両者の滑り込み運動はミオシン頭部がその中に取り込んだ ATPの加水分解をトリガーとして、ボートのオールが水を掻くように振れてアクチンを引き込み、筋肉全体の収縮を惹き起こすことが分かったが、その詳細なメカニズムは謎のままであった。

1990年代の後半になり、阪大の柳田敏雄博士のグループが蛍光顕微鏡を使って、ATPの水溶液中で、ガラスに固定した1個のミオシン分子がそれと接触するアクチンフィラメントを運動させる様子や、逆に屈曲可能な細い針状結晶の先に付けたミオ

シン分子がガラスに固定したアクチンフィラメントに接触させることによってフィラメントに沿って運動する様子を直接観測することに成功した。それによって、ミオシン分子とアクチンフィラメントの相対的な運動は1回のATP加水分解によって一定の距離だけ進むのではなく、常に小刻みにランダムな運動をしながら、ときおり確率的に一方向に進み、ときには後戻りすることが明らかになった。

柳田グループはその実験結果から、アクチンフィラメントを突きうごかしているのはミオシン頭部の熱運動のエネルギーであってその運動はランダムであるが、相対運動に対して確率的にせよ方向を与えているのがATPの加水分解であるとしている。しかしミオシン分子内の各原子の熱振動を直接観測する実験的手段はない。そこでわれわれは数年前から、分子動力学シミュレーション専用のPCを使って1回のATP加水分解が放出するエネルギーがミオシン頭部の各原子の熱振動にどのような変調をもたらすかについての計算機シミュレーションを行ってきた。その結果、ATP加水分解による摂動が各原子の熱振動にある方向に偏った非対称性をもたらすことが分かったが、全体の run time が10ns と短く、X線解析から予想される構造変化とつぎ合わせるには不十分であった。

本プロジェクトでは、run time を100ns まで伸ばし、計算の対象をミオシンの頭部だけでなく軽鎖を含む尾部の一部まで広げ、さらに環境温度を250K、300K、350Kに選んだ場合の違い、非線形系のランダム運動で考慮する必要がある初期値の違いによる効果などの検討も行った。その結果、各原子はそれぞれ熱振動をしているが、頭部は全体としてそれに繋がる頭部(あるいは尾部)との接合部分を蝶番とする偏角振動(首振り運動)をしており、ATPの加水分解による摂動はその偏角振動の平均角の方向をシフトさせる傾向のあることが分かった。

## 2. 概要

具体的には、図2に示すようなホタテガイのミオシン分子S1(モーター部位、軽鎖および軽鎖結合部位の全原子を含む)の構造解析データ(PDB;1kk7)を

用いた。計算を実施するx、y、zの座標は図2に直線で示した直交座標であり、x座標は軽鎖(赤と白)に取り巻かれた尾部に沿ってとり、y軸はミオシンが筋原繊維内にあるときのアクチンフィラメントの軸に平行にとった。

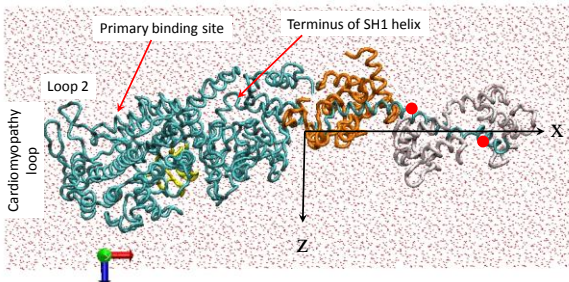
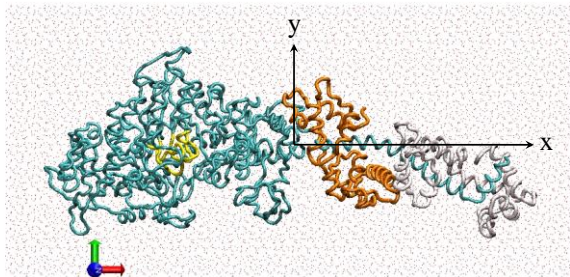


図2 ホタテガイのミオシン分子S1の構造

青い鎖が主鎖であり、その一部黄色い部分はATPの加水分解によって放出されたエネルギーを各原子に運動エネルギーとして分配した部分

ミオシン分子全体を多数の水分子からなる直方体の箱に浸けて、総数約18万個の原子の集団とし、先ず、50 ns かけて300 K の温度で熱平衡化する。計算は周期的境界条件法により、ソフトはAMBER 11 の GPU 版 pmemd モジュールを用い、時間刻みは 2 fs とした。熱平衡化した後、次の二つの条件でシミュレーションを行った。

I) 何も摂動を加えず温度も300K に保ったまま、さ

らに100 ns の間、各原子の軌道計算を続ける。

II) ATP分子1個が加水分解によって放出するエネルギー  $8.60 \times 10^{-20}$  J をATPがミオシンに結合する際の  $\gamma$ リン酸の位置から半径10 Å 以内にある80個の主鎖原子(図2において黄色で示した部分)に運動エネルギーとして分配する。分配の仕方は熱平衡の状態である時点を選び、その時点で各原子が持っている速度に比例する大きさの付加速度をそれぞれの原子に与える方法をとった。このようにして摂動を与えた時点からさらに100 ns の間各原子の軌道計算を行う。

I) と II)によって得られた各原子の軌道の違いがATP加水分解の効果である。この効果が実際のアクチン系ではどんな運動を惹き起こすことになるかを知るためには主鎖のうちでミオシンを束ねる端に近い複数の原子の位置を ATP がない場合の位置に重なるように他の全原子の時々刻々の位置を交換すればよい。こうして得られた結果から、ATP加水分解によってミオシン頭部が全体としてどんな動きをするか、またアクチンとの接触の可能性のある部分で、どこがどのように変形するかを明らかにすることができる。

分子動力学シミュレーションと呼ばれるこの計算では温度が重要な役割をもっているので、常温の300 K だけでなく、250K と350K の場合についてもシミュレーションを行いその違いを調べた。また、原子の熱運動という確率現象では時々刻々の原子の位置ではなく、長時間にわたるその分布に意味があり、しかも同じ温度で同じ摂動を与えるならば、その分布の変化が摂動を与える寸前の初期条件によらずに常に同じ傾向をもたなければ生体としての機能をもつことにならない。そこで、まず250K, 300K, 350 K の各温度に対して50 ns かけて熱平衡化した後、時間をずらして各原子が違う位置と速度を持つ3つの時点での状態を初期状態として、3つの初期条件から出発して、ATPの摂動なし、ATPの摂動ありの場合について、それぞれ100 ns の間計算するシミュレーションを行い、両者の比較を行った。

さらに、実際の筋原繊維ではミオシンフィラメントの幹の部分は動かずに頭部が揺れ動くことによってアクチンと相互作用することが分かっている。そこで計算結果の解析では、対象としたミオシン分子中でフィラメントである幹に近い部位にある残基番号806～831の25個の原子について、ATP がない場合の各原子の位置に ATP の効果を入れた場合の位置がなるべく重なるようにする(superimpose)。具体的には位置の差の二乗平均が最小になるように25個の原子のATPありの場合の位置を決め、それに準じて他のすべての原子位置を変換して、その時間変化がどうなるかを調べた。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 ATP 加水分解によって惹き起こされる各原子の変位

MDシミュレーションの対象としたホタテガイのミオシン分子の構造(PDB:1kk7) は主鎖として1135個の $\alpha$ 炭素を含むが、このうち残基番号が350～440と515～600の Actin-binding sites (図3 下部に表示した赤色の領域) にはそれぞれ Cardiomyopathy loop、Primary binding site と呼ばれ、ミオシン頭部の先端近くにあつて、実際の筋肉中ではアクチンフィラメントに接触する部位があり、これらの熱運動が ATP の加水分解によってどんな変調を受けるかを知ることが重要である。

X線溶液散乱法によるミオシンの構造変化の解析によると、頭部は尾部との接合部を蝶番とする横揺れ(z方向)運動をする傾向のあることが知られている。そこで、本報告ではシミュレーションで得られた膨大なデータの中から 1135 個の $\alpha$ 炭素原子の5ns毎のz座標の値について、ATP 加水分解の摂動がある場合の値と ATP の摂動がない場合の値の差

$\Delta z = z(\text{ATP の摂動あり}) - z(\text{ATP の摂動なし})$  を求め、それを縦軸に、 $\alpha$ 炭素原子の残基番号を横軸にとったグラフを5 ns 毎に並べる図を掲載する。図3がその図で、上から 250K, 300K, 350K の場合である。各温度とも、ATP 加水分解の摂動を与える寸前の初期条件として 3 つの条件から出発して計算を実施したが、ここに示したものは、各温度について

それぞれ一つずつ例を示した。図中、ATP ありの場合の z の値が ATP なしの場合の z の値より大きい場合は赤色、逆の場合は青色で表示してある。この図の場合、どの温度でも、ATP 加水分解の影響として、ミオシン頭部の原子を  $-z$  方向へずらす傾向(青が多い)が見られるが、他の初期条件では+z方向にシフトする場合も多く見られる。

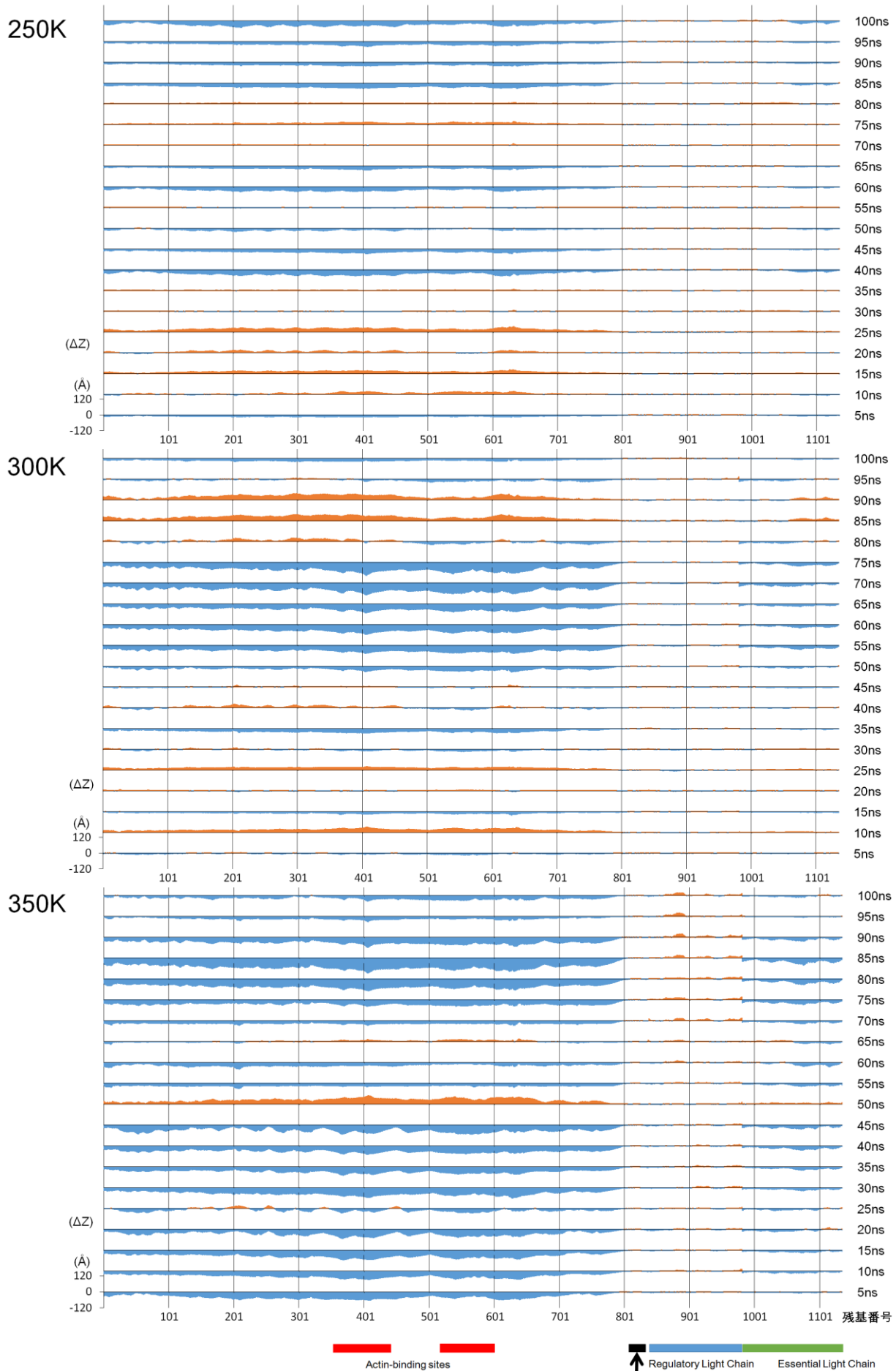
ただ、ここに示していない別の初期条件から出発した場合も含めて共通して云えることは、

- 残基番号800辺りを蝶番として、頭部は全体が同じ時刻では同じ方向へシフトする。残基番号が大きな Essential Light Chain も実際の位置は図2の赤い線で示されているように頭部をと取り巻いていて、頭部と同じ方向へシフトしている。
- ミオシン自体の温度が低い場合に比べて、高い場合の方がATPの摂動効果が大きく出る。
- ATPの摂動効果がもたらす振動分布のシフトは、Actin-binding sites の領域が大きい。などである。

#### 3.2 ATP加水分解によって惹き起こされる構造ゆらぎの全体像

3次元的に配列する原子集団が揺らいでいる状況を2次元の図面で表現するのは難しいので、ミオシン分子の主鎖を一続きの緑色の紐で表わし、その紐が5 ns 毎にどう変形するかを描くことによって構造ゆらぎを表わしたのが図4である。温度は 250K, 300K, 350K で、初期条件は図3の場合とそれぞれ同じ初期条件から出発した例である。見ている方向は各温度とも上段が +z 方向から、中段が  $-x$  方向から、下段が +y 方向からであり、左コラムは“ATPなし”、右コラムは“ATPあり”の図である。図中にある黒い太線は“ATPなし”の平均構造を表わす線で、同じ線に対応する右側の“ATPあり”の図中にも記入して、ATPの加水分解によって本来の構造からどれだけずれるかが分かるようにした。

この図によると、250K ではATPによる摂動を与えた時でも構造ゆらぎの範囲はATPなしの平均構造からそれほどずれていないが、300K では、ATP ありの場合、頭部の分布が尾部との接合部を蝶番に



ATPなしの場合の構造にATPありの場合の構造を合わせた部分  
図3 各残基番号の炭素原子の位置座標 $z$ の ATP がある場合とない場合の差  $\Delta z$  の時間変化

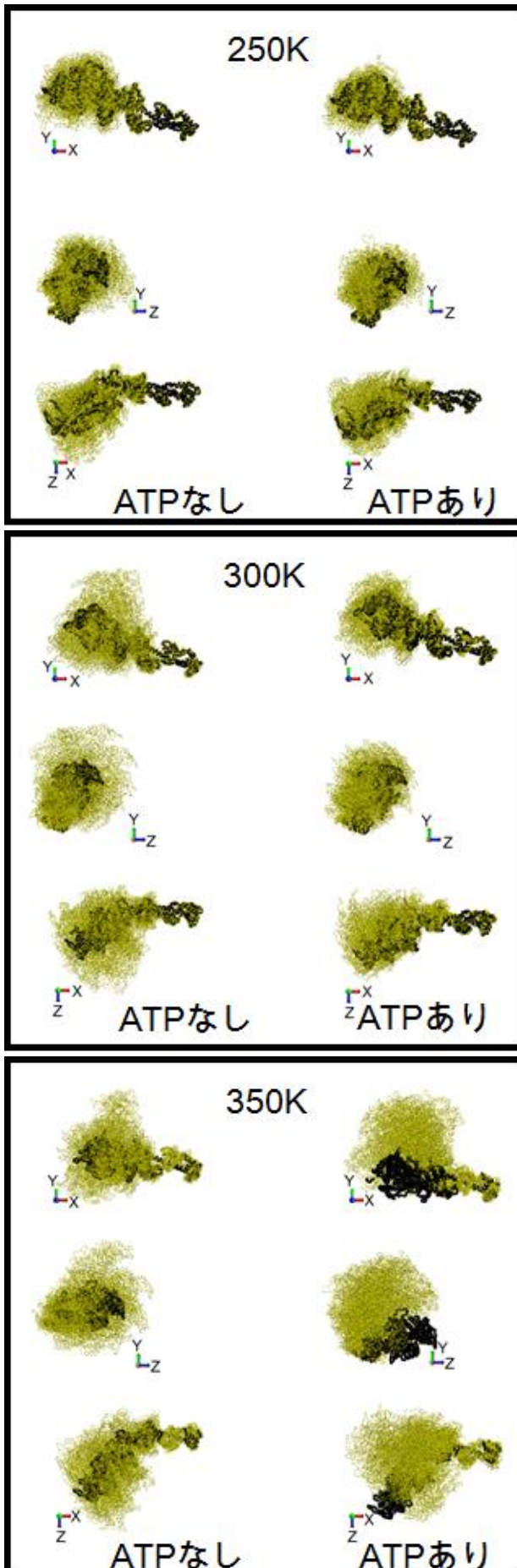


図 4 ミオシン分子の構造の揺らぎ

して  $-z$  方向へ回転する形で見られる。さらに高温の350K では構造揺らぎは  $-z$  および  $+y$  方向へも大きくシフトしATPなしの場合の平均構造からはみでるほどの分布をしている。

さらにここには提示していない別の初期条件から出発したシミュレーションによって得られた構造揺らぎの結果も含めて一般に云えることは、ミオシン分子は頭部と尾部の間(図2における座標の原点辺り)に屈曲しやすい部分があり、尾部の端を固定するとその部分が蝶番となり、頭部は一体となって図2におけるx軸にほぼ平行な軸のまわりに首振り運動をする傾向があるが、頭部の中央部にあるATPポケット(図2の黄色い部分)にATP加水分解による僅かなエネルギーを注入すると、その首振り運動の中心軸の向きがシフトすること、さらにそのシフトの大きさは、注入するATPの加水分解エネルギーは同じでも、ミオシン自体の温度(予め与えた運動エネルギーの平均値)が高いほど大きいことが分かった。

### 3.3 考察

一般にタンパク質は数ナノから数10ナノメートルの大きさであり、このサイズでは常に熱ゆらぎにさらされている。そして近年、タンパク質の諸機能の発現はこの揺らぎを排除するのではなく利用することによって発現しているのではないかと考えられるようになったが、そのプロセスは未解決の問題である。

本研究は筋肉の収縮運動を司るミオシン1分子を構成する原子の熱運動がATPの加水分解によってどのように変調されるかをMDシミュレーションによって調べ、ほんの入り口の知見を得たに過ぎないが、それを要約すると次のようになる。

まず、ミオシンの頭部は本来的に尾部との接合部分を蝶番とする偏角振動をしているが、ATPの加水分解による刺激はその偏角振動の平均の方角をシフトさせる傾向があり、それは頭部の先端にあってアクチンと接触する部位で大きいことが分かった。しかもそのシフトの大きさは環境温度(予めミオシンの各原子に与えられた運動エネルギーの平均値)が高いほど大きい。これは複雑な構造をしたミオシン分子を構成する各原子はそれぞれ沢山の山や谷からな

るポテンシャルに支配されて運動しているが、低温では一つの谷に閉じ込められているのが、温度が高いと隣の谷にも移りやすいので、ATPの加水分解による小さな摂動でも振動のモードが変形するのだと考えられる。これは見方を変えると、ミオシンとアクチンの相対運動惹き起こすエネルギー源は熱エネルギーであって、ATPの加水分解は運動を惹き起こすトリガーの役目を果たしているに過ぎないのかもしれない。ただ温度が高すぎるとATP加水分解の制御が効かなくて、カオス的になる可能性がある。

では具体的に頭部の各原子の揺らぎの中心がシフトする方向はどの方向かという点、図3、図4に示した例では $(-z, +y)$ の方向で、これは図1に示したアクチンのねじれた数珠玉に沿う方向ではあるが、初期条件によっては別の方向にシフトする場合もあって今の段階では確かなことは云えない。

しかしシミュレーションによって得られた膨大なデータはいわば“宝の山”であって、解析を工夫することによって、まだまだ新しい詳細な知見が掘りだせると考えている。

#### 4・今後の課題

ここで得られた結果は膨大な計算データに基づくものであるが、それでもまだ1個のミオシン分子の僅か100ナノ秒間の挙動に過ぎない。実際の現象はアクチンとの相互作用を考えなければならないし、蛍光顕微鏡で観測される事象と照らし合わせるには数百ミリ秒の時間スケールを必要とする。その意味では今後はさらに桁違いに大容量の計算が必要となるであろう。前途遼遠ではあるが、実験的にアクセスできない短い時間・小さい空間内でのメカニズムの解明だからこそ、大型計算機によるシミュレーションが今後ますます重要になると考えられる。