

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

生体分子機械の誘電アロステリーと
水和水の物理特性

Dielectric allostery of biomolecular machine
and physical property of hydration water

申請者

佐藤 昂人

Takato SATO

物理学及应用物理学専攻 理論生物物理学研究

2017年3月

本論文は、タンパク質と水和水の誘電体的性質と関連づけることで明らかとなった、新しいアロステリーの分子機構を呈示し、分子機械の動作機構に対し新たな視点を与えるものである。

タンパク質分子機械は、アロステリーと呼ばれる調節機能により生体内でうまく機能する。アロステリーとは、タンパク質へのあるリガンド結合が、空間的に離れた他の部位への別のリガンドの結合により影響を受けることである。その分子機構は、教科書的には、リガンド結合がタンパク質の固い構造要素（ α ヘリックスやドメインなど）を動かし、その組み替えの伝播によってアロステリック部位を構造変化（立体特異性の変化）させる、と説明される。しかし近年、そのようなドメインスケールの構造変化を伴わないアロステリー（ゆらぎの変化）が明らかにされた。代表的な分子機械であるミオシンは筋収縮や細胞内の物質輸送を担い、ATPを加水分解しながらアクチン繊維上を一方向に運動する。アクトミオシンの超沈殿実験で見られるように、ミオシンはATP結合によりアクチン繊維から急速に解離し、その後のATP加水分解の進行に伴ってアクチンへ再結合する。この再結合過程で力発生を行う。ミオシンへのATP結合はアクチン結合クレフトをアロステリックに開口させ、その結果アクチンとの接触面積を減少させると考えられており、すなわちミオシンの解離は疎水相互作用の弱化によると考えられている。しかしミオシン-アクチン間では静電相互作用も大きな寄与をなす。ミオシンの結合界面には正電荷アミノ酸に富むdisorderしたアクチン結合ループ（ループ2）が存在し、アクチン結合親和性に対し静電的に大きく寄与する。また申請者らは先行研究において、ミオシンの疎水的なアクチン結合を示唆するアクチン結合親和性の温度依存性が実は誘電率の温度依存性により説明でき、静電的なアクチン結合が根拠をなすことを示した。さらにATPが大きな負電荷を持つことは、ミオシン解離という、ATP結合により誘起されるアロステリック応答における、ミオシンとATP間の静電相互作用の重要性をも示唆する。ミオシンは分子表面のみならず内部にも多数の電荷・双極子を持つことから、これらの結果・示唆は、ミオシンがATP結合に対し誘電応答する可能性を提起する。すなわち、ドメインスケールの大きな構造変化なしに、ミオシン表面における誘電分極がアクチンとの相互作用を変えるのではないか？しかしミオシンに限らずタンパク質のアロステリーを誘電応答の視点から捉えた例は皆無であった。それゆえ、ミオシンのアロステリーをその誘電体的性質に注目して精査することは、ミオシンのアクチン解離機構の理解だけでなく、タンパク質分子機械の動作機構における新たな動作基盤の解明にもつながると期待される。

第一章では研究の背景、目的、および本論文の概要を述べる。

第二章では、本研究での実験手法と解析方法を述べる。本研究では分子動力学（MD）計算により、実溶媒中のscallop横紋筋ミオシンIIのATP結合に対する応答を、タンパク質、周囲の溶媒（水）の双方から精査した。

第三章では、ミオシンの ATP 結合に伴うアロステリック部位での誘電応答が、アクトミオシンの力発生に深く関与する状態遷移をもたらすことを述べる。ATP 結合状態および ATP なし状態のミオシンをそれぞれ長時間（計 50μ 秒以上）緩和させ、両者を比較した。まず MD 計算により得られた構造アンサンブルをもとに静電ポテンシャル $\langle\Phi\rangle$ の空間分布を求めた。その結果、ATP 結合に伴いミオシン表面および内部の $\langle\Phi\rangle$ が非一様に全体にわたって変化していた。特に ATP 結合部位周辺において顕著な正の $\langle\Phi\rangle$ の変化 $\Delta\langle\Phi\rangle$ が見られた。ミオシン内部の $\Delta\langle\Phi\rangle$ は内部の電荷分布の変化とよく相関していたことから、ミオシン内部の電荷・双極子が ATP の負電荷に誘電応答したことがわかる。アクチン解離をもたらすアクチン結合界面でも顕著な $\Delta\langle\Phi\rangle$ が見られた。同時に、そこに隣接するループ 2 の変位も見られ、 $\Delta\langle\Phi\rangle$ がこの変位を誘起したとみられる。この変位はループ 2 をアクトミオシン複合体中のアクチンから遠ざける。ループ 2 はミオシンのアクチン結合界面の負電荷領域と負電荷に富むアクチンの N 末端を橋渡ししてアクトミオシン複合体を静電的に安定化するとみられることから、この変位はアクチン結合親和性を下げると考えられる。加えて、従来考えられているアクチン結合クレフトの開口も実際に観測されたが、それは大きく揺らいでおり、ATP 結合状態と 1 対 1 に対応していないことがわかった。ミオシン内部では ATP 結合部位からこれら表面部位にかけての塩橋・水素結合（静電結合, EB）の組み替えの伝播が確認され、このアロステリック経路には、結晶構造解析等の先行研究によって示唆されるクレフト開口に伴う静電結合の切断・形成が含まれていた。これらの結果は、新たなアロステリーの分子機構として「誘電アロステリー」を提示し、ミオシンがそれを利用していることを示唆する。またミオシンは ATP 結合に伴ってスイングしたレバーアームを元に戻す構造変化（リカバリーストロック）も誘起すると考えられている。そこで次に、レバーアーム付け根のコンバータードメイン（CD）の応答に注目したところ、ATP 結合に伴ってミオシンのモータードメインの CD との接触界面（コンバーター界面）でも $\Delta\langle\Phi\rangle$ が生じていた。併せてリカバリーストロックを示唆する CD の構造変化（回転）も実際に観測され、また CD 表面-モータードメイン表面間の静電相互作用エネルギー解析から、界面での誘電応答がリカバリーストロックを誘起したとみられる。先と同様、ATP 結合部位からコンバーター界面へ至る EB の組み替え経路が認められたことから、リカバリーストロックも誘電アロステリーによるものであることが示唆された。これら観測された誘電応答はミオシン内部の双極子の再配向（EB の組み替え）によるものであり、この双極子の「揺らぎ」が入力（ATP の作る電場）に対する応答（誘電応答）をもたらした。統計力学により、双極子の配向揺らぎは誘電率と結ばれる。そこで最後に、ミオシン内部の局所誘電率分布を求め上述のアロステリック経路と比較し、ミオシンの誘電アロステリーを誘電体の視点から考察した。

第四章では、ミオシンを取り囲む水和水の物理特性について調べ、その結果を

もとに静電アロステリーとの関係を論じる。誘電アロステリーはミオシン表面の静電ポテンシャルを変化させるが、一方で周囲の水の誘電分極による弱化が容易に想像できる。しかし水和水の物理特性は分子表面の物性に大きく依存する。最近、実験的に疎水表面付近の水は誘電率が低下しており、静電相互作用を強めることが示された。加えて、そもそもミオシンの詳細な水和水状態（誘電環境）は明らかでない。そこで申請者は、まず水和水の物理（誘電）特性の分子描像を明らかにすべく、分子表面近傍の水に注目し、MD 計算により疎水粒子の誘電環境を調査した。その結果、疎水粒子付近では確かに誘電率が低下していたが、水和水の教科書的な“静的な振る舞い（クラスレート形成）”に反する“動的な振る舞い（クラスレートの形成と破壊の繰り返し）”が観測された。水和水のこの気体様な振る舞いが誘電率を低下させたとみられる。また、一過的ではあるもののクラスレートが形成されるため、表面付近の誘電率は異方性を示し、誘電率の表面法線成分が顕著に低下していた。そこで疎水表面によって法線方向の静電相互作用が強化されることを、疎水平板に対し荷電粒子対を垂直に配置した系の MD 計算により、実際に確かめた。これらの結果は疎水表面付近の水の誘電率低下の分子描像を明らかにしただけでなく、親水領域（特に荷電残基）と疎水領域が混在するタンパク質表面間の静電相互作用は、バルク水の誘電率（約 80）から予想されるよりも強くはたらくことを示唆する。次にミオシンの誘電環境を調べたところ、確かにミオシン近傍では水が誘電分極していたものの、そこでの誘電率はバルクに比べて低下していた。ATP 結合に伴って誘電環境は変化するものの、ATP 結合後もミオシン近傍は依然としてバルクに比べ低誘電率であった。したがって、ミオシンの誘電アロステリーを誘起する表面の静電ポテンシャル変化は、バルク水の高い誘電率が示すよりも強く、遠方にまで及ぶ可能性、すなわち誘電アロステリーがミオシン-アクチン間相互作用変化を十分大きく変化させることを示唆する。

第五章では本研究の結果を踏まえ、アロステリーに対する総合考察を述べる。まずミオシンの力発生機構について、従来提案されている主要な力発生モデルを整理・統合し、そこにミオシンの誘電体的性質の視点を組み入れた、改良した力発生のスキームを提案した。次に誘電アロステリーの一般性について、scallop 横紋筋ミオシン II だけでなく chicken 骨格筋ミオシン II も同様の応答を示すことを挙げ、加えて構造も機能もミオシンとは全く異なる、DNA に正の超らせんを導入するリバーズジャイレースにおいても誘電アロステリーが見られたことを示し、論じた。最後にアロステリーの分子機構について、従来の固い分子機械におけるアロステリーをドメインスケールの構造変化を伴わない柔らかい分子機械におけるアロステリー（誘電アロステリー、ゆらぎの変化）と比較し、視点を入出力変換に広げ、誘電アロステリーのルースカップリング性を論じた。

第六章では本論文を総括し、本研究の今後の展望をまとめた。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 佐藤 昂人 印

(2018年 2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○	<u>Takato Sato</u> , Jun Ohnuki, Mitsunori Takano “Long-range coupling between ATP-binding and lever-arm regions in myosin via dielectric allostery” <i>The Journal of Chemical Physics</i> 147, 215101 (2017年12月)
○	<u>Takato Sato</u> , Jun Ohnuki, Mitsunori Takano “Dielectric allostery of protein: response of myosin to ATP binding” <i>The Journal of Physical Chemistry B</i> 120, 13047-13055 (2016年11月)
	Jun Ohnuki, <u>Takato Sato</u> , Mitsunori Takano “Piezoelectric allostery of protein” <i>Physical Review E</i> 94, 012406 (2016年7月)
	Kei-ichi Okazaki, <u>Takato Sato</u> , Mitsunori Takano “Temperature-enhanced association of proteins due to electrostatic interaction: a coarse-grained simulation of actin-myosin binding” <i>Journal of the American Chemical Society</i> 134, 8918-8925 (2012年5月)
講演	森竹亮太、 <u>佐藤昂人</u> 、高野光則 “分子機械の誘電アロステリー：ATP 結合によるリバースジャイレースの超らせん導入の物理機構” 2018 年生体運動研究合同班会議（東京）2018年1月
	<u>佐藤昂人</u> 、大貫隼、高野光則 “誘電アロステリーによる分子モーターの力発生機構” 第31回分子シミュレーション討論会（金沢）2017年11月
	<u>佐藤昂人</u> 、佐々木徹、大貫隼、梅澤公二、高野光則 “疎水表面による静電相互作用の強化” 日本生物物理学会第55回年会（熊本）2017年9月
	佐々木徹、 <u>佐藤昂人</u> 、大貫隼、高野光則 “疎水表面付近における誘電率低下の分子描像” 第30回分子シミュレーション討論会（豊中）2016年11月
	<u>佐藤昂人</u> 、佐々木徹、大貫隼、高野光則 “ミオシン周囲の局所誘電環境” 日本生物物理学会第54回年会（つくば）2016年11月
	森竹亮太、 <u>佐藤昂人</u> 、鈴木悠太、高野光則 “リバースジャイレースによるバブル DNA 超らせん導入の物理機構” 同上
	鈴木悠太、森竹亮太、 <u>佐藤昂人</u> 、高野光則 “リバースジャイレースによる DNA バブル領域の分子認識と超らせん導入の物理機構” 第5回日本生物物理学会関東支部会（桐生）2016年3月
	<u>Takato Sato</u> , Jun Ohnuki, Mitsunori Takano “Electrostatic and allosteric response of myosin upon ATP binding” <i>Biophysical Society 60th Annual Meeting</i> (Los Angeles, USA) 2016年3月
	<u>佐藤昂人</u> 、大貫隼、梅澤公二、高野光則 “ATP のクーロン力で操られるミオシン” 2015 年生体運動研究合同班会議（東京）2015年1月

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>佐藤昂人、大貫隼、梅澤公二、高野光則 “ATP 結合で誘起されるミオシンの誘電応答” 日本生物物理学会第52回年会（札幌）2014年9月</p> <p>Takato Sato, Jun Ohnuki, Koji Umezawa, Mitsunori Takano “Density fluctuation of water around myosin” Nagoya Symposium on Depletion Forces: Celebrating the 60th Anniversary of the Asakura-Oosawa Theory（名古屋）2014年3月</p> <p>Takato Sato, Jun Ohnuki, Koji Umezawa, Mitsunori Takano “Electrostatic drives in actomyosin motor elucidated by molecular dynamics simulations” 14th International Alpbach Workshop, Motors, Myosin & Muscle (Alpbach, Austria) 2013年3月</p> <p>Takato Sato, Jun Ohnuki, Koji Umezawa, Mitsunori Takano “Electrostatic network and electro-allostery in myosin: Response of ATP-binding” Symposium on Hydration and ATP Energy（仙台）2013年3月</p> <p>佐藤昂人、大貫隼、梅澤公二、高野光則 “ミオシン周囲の水の密度揺らぎ” 日本生物物理学会第50回年会（名古屋）2012年9月</p> <p>佐藤昂人、大貫隼、梅澤公二、昆野朝陽、高野光則 “アクトミオシン力発生サイクル素過程の分子機構解明に向けた MD 計算” 新学術領域研究合同公開シンポジウム「ゆらぎと水-生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」（大阪）2012年9月</p> <p>佐藤昂人、大貫隼、梅澤公二、岡崎圭一、高野光則 “アクチン-ミオシン結合と力発生の分子描像-水と ATP、構造とエネルギーの観点から” 同上</p> <p>Takato Sato, Jun Ohuki, Mitsunori Takano “ATP-induced allosteric responses of myosin motor domain observed by molecular dynamics simulation” 17th International Biophysical Congress (Beijing, China) 2011年10月</p> <p>佐藤昂人、大貫隼、高野光則 “ATP 駆動のアロステリック応答から類推されるアクチン-ミオシンの解離における静電相互作用の重要な役割” 日本生物物理学会第49回年会（姫路）2011年9月</p> <p>佐藤昂人、大貫隼、岡崎圭一、高野光則 “ミオシン周囲の溶媒のアロステリック応答” 第24回分子シミュレーション討論会（福井）2010年11月</p> <p>佐藤昂人、大貫隼、岡崎圭一、高野光則 “ATP 結合がミオシンの構造・水和状態におよぼす影響についての原子レベル観察” 日本生物物理学会第48回年会（仙台）2010年9月</p> <p>佐藤昂人、大貫隼、高野光則 “全原子 MD 計算によるミオシンの構造・エネルギー・水和状態の解析” 日本物理学会第65回年次大会（岡山）2010年3月</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>佐藤昂人、大貫隼、高野光則 “長時間の全原子分子動力学で探るミオシンモータードメインのアロステリック応答” 第23回分子シミュレーション討論会（名古屋）2009年11月</p> <p>佐藤昂人、大貫隼、高野光則 “分子動力学計算で探るミオシン構造状態の結合ヌクレオチドに対する応答” 日本生物物理学会第47回年会（徳島）2009年10月</p> <p>佐藤昂人、高野光則 “ミオシンの動的構造に対するヌクレオチドの影響” 第9回日本蛋白質科学会年会（熊本）2009年5月</p> <p>佐藤昂人、梅原暢紘、山崎久嗣、高野光則 “分子動力学計算で探るミオシン構造状態と結合ヌクレオチドのカップリング” 日本生物物理学会第46回年会（福岡）2008年12月</p>
その他 (講演)	<p>飯島美来、佐藤昂人、森竹亮太、高野光則 “シトクロム P450 還元酵素の誘電応答が制御する大規模構造変化と電子伝達” 第31回分子シミュレーション討論会（金沢）2017年11月</p> <p>大貫隼、岡村英世、淀川良、佐藤昂人、上田太郎、高野光則 “張力によって誘起されたアクチンの静電的变化：アクチンフィラメントの圧電性” 日本生物物理学会第55回年会（熊本）2017年9月</p> <p>飯島美来、佐藤昂人、森竹亮太、佐々木徹、高野光則 “シトクロム P450 還元酵素における荷電状態変化に応じた物理状態変化” 同上</p> <p>Jun Ohnuki, Takato Sato, Hideyo Okamura, Taro Q. P. Uyeda, Mitsunori Takano “Piezoelectric allostery of an actin filament” <i>IGER International Symposium on “Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage”</i>（名古屋）2016年12月</p> <p>大貫隼、佐藤昂人、岡村英世、上田太郎、高野光則 “アクチンフィラメントの圧電特性 III” 日本生物物理学会第54回年会（つくば）2016年11月</p> <p>Jun Ohnuki, Takato Sato, Mitsunori Takano “Electrostatic and allosteric response of myosin as a mechanosensor” <i>Biophysical Society 60th Annual Meeting (Los Angeles, USA)</i> 2016年3月</p> <p>Jun Ohnuki, Takato Sato, Mitsunori Takano “Piezoelectric allostery of protein” <i>Protein Electrostatics Berlin 2016 (Berlin, Germany)</i> 2016年7月</p> <p>大貫隼、佐藤昂人、上田太郎、高野光則 “アクチンフィラメントの圧電特性 II” 日本生物物理学会第53回年会（金沢）2015年9月</p> <p>佐藤昂人、前谷紘生、パーキン暖、大貫隼、梅澤公二、高野光則 “サチライシンにおける局所的な柔軟性増大のアロステリック効果” 同上</p> <p>その他 23 件</p>