

トピックス

分子動力学シミュレーションとNMR法で迫る
べん毛モーターの回転制御機構宮ノ入洋平^{1,2}, 土方敦司³, 本間道夫^{2,4}¹大阪大学蛋白質研究所²名古屋大学大学院理学研究科附属構造生物学研究センター³長浜バイオ大学バイオサイエンス学部⁴名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

1. はじめに

生体高分子の機能を詳細に解明するためには、その立体構造を動的な観点から理解することが必要となる。特に、蛋白質が有する“揺らぎ”は、生命機能の発現と密接に関連することが示唆されており、盛んに研究されている。蛋白質の動態構造を原子分解能で明らかにする手法は、クライオ電子顕微鏡、X線結晶構造解析等が挙げられるが、その中でも核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonances: NMR) 法は、幅広い時間域の動態を捉えることができるユニークな手法である。近年では、**立体整列同位体標識** (stereo array isotope labeling: SAIL) 法をはじめ、高度な安定同位体標識技術が確立され、40 kDa 以上の高分子量蛋白質においても精密な立体構造解析が可能となった。また、アミノ酸残基側鎖が関与する交換運動を定量的に捉える手法も開発されている¹⁾。現在、1.2 GHz 超高磁場 NMR 装置の稼働が見据えられており、今後、様々な蛋白質の構造動態研究が展開されることが予想される。特に、分子間相互作用に伴う動態変化は、蛋白質の分子認識機構の解明のみならず、創薬研究においても、新たな知見を与えることが期待される。このような背景から、実験により得られた構造動態を、精密かつ妥当性の高い描像として表現することが重要となる。近年、分子動力学 (molecular dynamics: MD) シミュレーションを用いた動態モデルの解析と NMR 法の活用により、様々な生命現象が明らかにされている²⁾。本稿では、細菌の運動装置であるべん毛の回転メカニズムの解明に向けた NMR 法と MD シミュレーションを用いた研究について紹介する。

2. 細菌のべん毛

大腸菌やサルモネラ菌などの運動性細菌は、べん毛と呼ばれる独自の運動器官を用いて、自身の運動を精密に制御している。べん毛は体長の数倍にも及ぶらせん状の繊維部分と、細胞表面に埋め込まれたモーター部分で構成されている。モーター部分は、50 nm 程度の小さな器官であるが、秒速 300 回転以上の速さで回転し、かつ、回転方向を瞬時に変換することができる、極めて高い性能を有している。べん毛モーターの回転制御機構の解明は、細菌の生命活動や病原性細菌による感染経路の解明といった、生物学や医学的な観点のみならず、生体ナノマシンへの応用といった工学的側面からも注目されている。べん毛モーターは、約 20 種の蛋白質によって構成され、各々が動的な相互作用をすることで、上述のような優れたモーター特性を生み出している。特に、回転力を生み出すモーターの主要部分は、固定子や回転子の役割を担う蛋白質複合体が集合した超分子構造体である。この超分子モーターを介した H⁺ や Na⁺ の流入が、細胞内外での電気化学的ポテンシャル差を力学エネルギーに変換し、べん毛モーターを回転することになる³⁾。これまで多くの研究者が、様々な細菌を対象に、べん毛モーター全体の構造解析や各種構成因子の機能解析を進めてきた。我々は、海洋性ビブリオ菌のべん毛モーターを対象に、回転子リング構造の一つである C リングに注目してきた。C リングは FliG、FliM および FliN 蛋白質によって構成され、互いが相互作用することで、回転運動を制御することが示唆されてきた。特に、FliG は FliM や固定子との相互作用を介して、回転方向の切り替え (スイッチング) を制御していると考えられ

Dynamic Structure of C-terminal Domain of FliG Revealed by NMR and MD Simulation Analysis

Yohei MIYANOIRI^{1,2}, Atsushi HIJIKATA³ and Michio HOMMA^{2,4}¹Institute for Protein Research, Osaka University²Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University³Department of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology⁴Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University

ている。そこで、FliG の構造動態を解析し、スイッチング機構の解明に迫った⁴⁾。

3. | FliG の NMR 解析

FliG は N 末側より、N 末端ドメイン、中間ドメイン、C 末端ドメインから構成されている。これまでの研究から、各ドメイン間の相互作用が回転方向の変換制御やトルク発生に関与していることが示唆されているが、C 末端ドメイン (FliGc) は固定子蛋白質との相互作用など、特に重要な役割を担っていると考えられている。実際、FliGc 中の一部アミノ酸を置換すると、回転方向に異常を示す表現型が確認された⁵⁾。野生型では、べん毛モーターの回転方向を、時計回り (CW) と反時計回り (CCW) に変換することが可能であるが、282 番目のアラニン残基をスレオニン残基に置換した A282T 変異体では、回転方向が CW に固定されてしまうことが明らかとなった。そこで、FliGc および FliGcA282T について NMR 測定を行い、両者の動態構造を比較した。

¹³C, ¹⁵N で安定同位体標識した FliGc および FliGcA282T 変異体を調製し、NMR 信号の帰属を行った。各原子の化学シフトの解析から、FliGc の 253 番目のメチオニン残基 (M253) から C 末端の Leu 残基 (L351) までの領域に、6 本の α ヘリックスが存在することが分かった (図 1; $\alpha 1$: F256-V260, $\alpha 2$: D264-R272, $\alpha 3$: Q276-L283, $\alpha 4$: D288-K296, $\alpha 5$: K300-E311, $\alpha 6$: V318-D337)。これは、他の細菌由来の FliG 結晶構造⁶⁾

の結果とよく一致していた。一方、A282T 変異体の NMR スペクトルは、野生型と比較して大きく変化していることが分かった。両者の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを比較すると、アミノ酸変異が施された A282 付近 ($\alpha 3$ の C 末端) だけでなく、 $\alpha 1$, $\alpha 5$ および $\alpha 6$ においても NMR 信号の変化が観測された (図 1)。特に $\alpha 1$ に由来する NMR 信号は、A282T 変異体では感度の大幅な低下、線幅の広幅化が顕著となり、帰属することができなかった。さらに、両者についてアミド基 ¹⁵N 窒素に対して、横緩和速度定数の解析を行った。その結果、野生型と比較して A282T 変異体では、変異箇所に対応する $\alpha 3$ - $\alpha 4$ 領域で、ミリ秒オーダーの遅い交換運動が存在することが示唆された。これらの結果から、A282T 変異に伴い、特に $\alpha 1$ 領域を中心に FliGc に構造変化が起こり、 $\alpha 3$ - $\alpha 4$ 領域で、新たに遅い揺らぎが生じることが示唆された。

4. | FliG の MD シミュレーション解析

NMR 解析より、FliGc と FliGcA282T 変異体の間で、構造動態に違いがみられることが示唆された。そこで、両者についての MD シミュレーションを行い、動的構造の違いについて解析した。

ビブリオ菌 FliG の立体構造はまだ実験的に決定されていないため、まず *T. maritima* FliG の結晶構造⁶⁾ をテンプレートとして、ビブリオ菌 FliG の G214-L351 領域を対象に MODELLER を用いて立体構造モデルを構築した。両者のアミノ酸配列は、独自の手法である

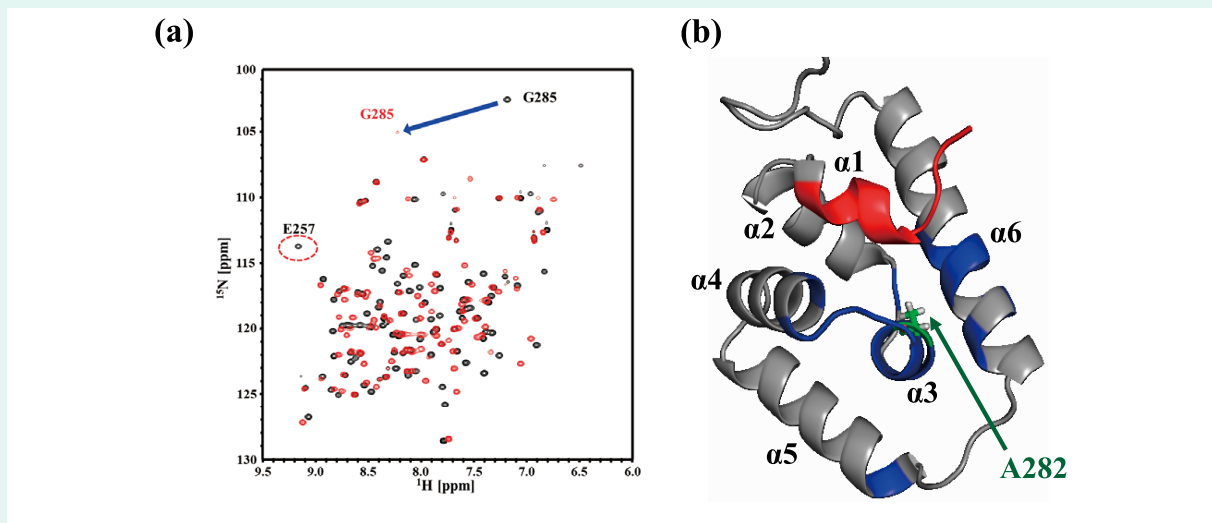


図 1 FliG および FliGcA282T の NMR 解析。(a) FliGc [黒], FliGcA282T [赤] の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの重ね合わせ図。変異に伴い化学シフトの変化 [矢印] やシグナルの消失 [破線部] がみられる。(b) A282T 変異に伴い大きな化学シフトした領域を青色、シグナルが消失した領域を赤色で構造モデル上にマップした。

ALAdeGAP を用いてアラインメントした⁷⁾. 得られたモデル構造は、テンプレート構造や NMR スペクトルの解析でみられたように、M253-L351 の領域は 6 つの α ヘリックス構造をとり、また G214-L252 の領域は、ARMC と呼ばれる armadillo 様構造をとる (図 2). FliGcA282T 変異体の構造モデルについては、FliGc の構造モデルをもとに構築した. FliGc および FliGcA282T の立体構造モデルを GROMACS に供し、MD シミュレーション (各 500 ナノ秒 \times 3 回) を行った結果、両者間で興味深い差異が見いだされた. まず、MD トrajェクトリ中の FliGc 構造のクラスター解析をすると、少なくとも 3 つのコンフォメーションが存在していることが明らかとなった. 一方、FliGcA282T においては、主に単一のコンフォメーションをとっており、構造変化が制限されていることが示唆された (図 2). 両者の構造分布の違いが、立体構造のどの領域に起因するかについてシミュレーションデータを解析したところ、 $\alpha 1$ 領域と $\alpha 4$ 領域の

相対配置が異なっていることが明らかとなった. FliGc においては、両者間の距離が 9.5-10.4 Å であるのに対し、FliGcA282T はそれよりも大きく約 11 Å にピークを持っていた. この差異は、 $\alpha 1$ に存在する F256 と $\alpha 3$ 末端の A282 との間にある疎水性相互作用が、T282 への置換によって立体障害を受けることに起因すると考えられた. この MD の解析結果は、NMR 解析においてみられた $\alpha 1$ 領域の構造変化と対応していると考えられる. 先行研究において、F256 が存在する “MEXF モチーフ” は FliGc の相対配置を制御することが示唆されており⁸⁾、今回の解析結果より得られた相互作用をサポートするものと考えられる. さらに、FliGcA282T のシミュレーションにおいては、アミノ酸変異箇所である 282 番目のスレオニン残基 (T282) の側鎖 OH 基が、近接する $\alpha 3$ に存在する V278 の主鎖カルボニル基と新たに水素結合を形成していた. この水素結合の形成が、 $\alpha 3$ - $\alpha 4$ 領域の構造動態に影響を与えていると考えられる. 先述の NMR

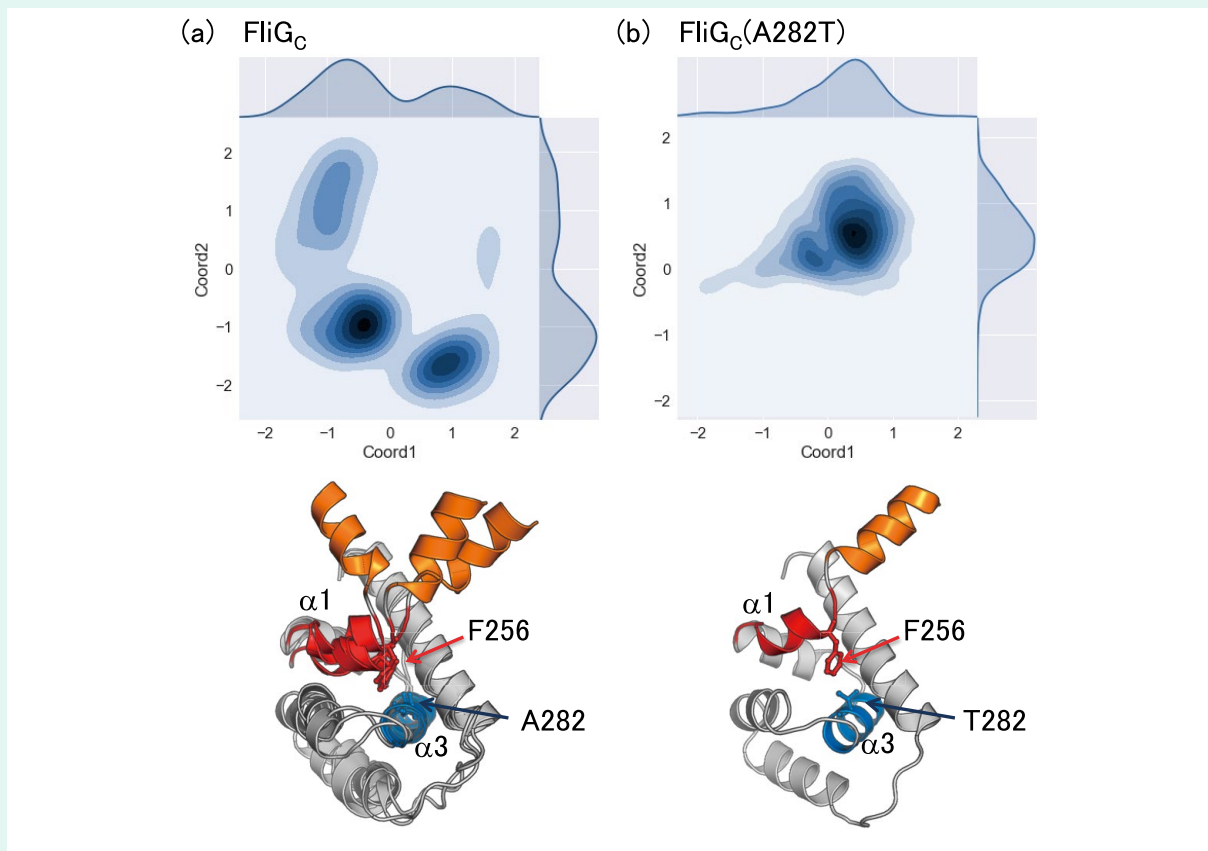


図 2 FliGc および FliGcA282T のシミュレーション解析. (a) FliGc ではサブマイクロ秒オーダーで 3 つのコンフォメーションが存在しており、MEXF- $\alpha 1$ 領域 (赤色) および ARMC 領域 (茶色:一部表示) が大きく変動している. (b) FliGcA282T では、主に単一のコンフォメーションをとる. F256 と T282 の側鎖が立体障害となるため、コンフォメーションが限定されることが示唆された.

解析の結果でも、 $\alpha 3$ - $\alpha 4$ の領域はFliGcとFliGcA282Tとを比較した際に、化学シフト変化がみられていた。同時に、FliGcA282Tにおいては、同領域で、ミリ秒オーダーの遅い運動が存在することが示唆されており、MDシミュレーションの結果は、これらの実験結果と矛盾しないと考えられる。

以上の解析より、FliGcにおいては、MFXFモチーフを含む $\alpha 1$ 領域を蝶番として、 α ヘリックス間の分子内相互作用が回転方向のスイッチングに関与していることが示唆された⁴⁾。

5. | おわりに

NMR法による主鎖アミド基の化学シフト変化ならびに横緩和速度定数の解析とMDシミュレーションを活用することで、FliGcの構造動態解明に迫った。FliGcでは $\alpha 1$ 領域を介した分子内相互作用により構造変換が引き起こされており、このことが回転方向のスイッチングに寄与していると考えられた。今後は、FliGとFliMの間の相互作用やCリング構造を対象としたNMR解析ならびにMDシミュレーションを進め、モーター構成蛋白質の局所的な構造動態が、べん毛超分子モーターならびに細菌の運動を如何にして制御しているのか明らかにしていきたい。

文 献

- Miyanoiri, Y. *et al.* (2018) *Mod. Magn. Res.* **2**, 1-18. DOI: 10.1007/978-3-319-28275-6_48-1.
- Nygaard, R. *et al.* (2013) *Cell* **152**, 532-542. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.008.
- Li, N. *et al.* (2011) *Genes Cells* **16**, 985-999. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01545.x.
- Miyanoiri, Y. *et al.* (2017) *Structure* **25**, 1540-1548.e3. DOI: 10.1016/j.str.2017.08.010.
- Kojima, S. *et al.* (2011) *J. Mol. Biol.* **414**, 62-74. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.09.0919.
- Brown, P. N. *et al.* (2002) *EMBO J.* **21**, 3225-3234. DOI: 10.1093/emboj/cdf332.
- Hijikata, A. *et al.* (2011) *Proteins* **79**, 1868-1877. DOI: 10.1002/prot.23011.
- Lee, L. K. *et al.* (2010) *Nature* **466**, 996-1000. DOI: 10.1038/nature09300.



宮ノ入洋平

宮ノ入洋平 (みやのいり ようへい)

大阪大学蛋白質研究所准教授

2004年日本学術振興会特別研究員, 05年横浜国立大学大学院環境情報学府修了(博士(工学)), 06年香港科技大学化学科博士研究員, 08年名古屋大学大学院理学研究科博士研究員, 11年同・特任助教を経て, 17年より現職。

研究内容: NMR法を用いた蛋白質の動態解析

連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

E-mail: y-miyanoiri@protein.osaka-u.ac.jp

URL: <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/apc/nmr/>



土方教司

土方教司 (ひじかた あつし)

長浜バイオ大学バイオサイエンス学部特任講師

2002年日本学術振興会特別研究員, 04年名古屋大学大学院理学研究科単位取得退学(13年博士(理学)), 04年理化学研究所リサーチアソシエイトを経て, 12年11月より現職。

研究内容: 構造バイオインフォマティクスを用いたゲノム変異解析

連絡先: 〒526-0829 滋賀県長浜市田村町 1266

E-mail: a_hijikata@nagahama-i-bio.ac.jp



本間道夫

本間道夫 (ほんま みちお)

名古屋大学大学院理学研究科教授

1985年東京大学大学院理学研究科博士課程修了。理学博士。85年米国エール大学分子生物物理生化学科博士研究員, 88年名古屋大学付属病態制御研究施設講師, 92年名古屋大学大学院理学研究科助教授, 97年より現職。

研究内容: 細菌べん毛超分子回転モーターのエネルギー変換機構の解明

連絡先: 〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

E-mail: g44416a@cc.nagoya-u.ac.jp

URL: <http://133.6.129.176/~bunshi4/fourth.html>