細菌べん毛軸回転メカニズムの解明と回転阻害物質探索

Investigating rotation mechanisms of bacterial flagellar rod and developing inhibitors

(日本生物物理学会推薦)

代表研究者 東京工業大学 北尾 彰朗 Tokyo Institute of Technology Akio KITAO 協同研究者 東京工業大学 Tran Phuoc Duy Tokyo Institute of Technology Duy Phuoc TRAN

About half of infant deaths in the world are caused by infectious diseases, which are still a major problem in developing countries. If the function of the bacterial flagellum, which is responsible for bacterial motility, can be clarified, it will lead to countermeasures against infectious diseases in the future and contribute to human health. This study aims to clarify the mechanisms by which the flagellar rod transmits torque supported by the flagellar bushing, allowing rotation at low energy cost, and to search for compounds that inhibit the rotation of the rod with large molecular dynamics simulations. 40 nanosecond molecular dynamics simulations were performed from the initial states of 140 different rotation angles of rod-hook complex. The free-energy landscape of the rotation and the time required for the rotation were calculated by the Markov state model. As a result, it was found that the rod-hook complex can rotate at ~ 1900 Hz, which is consistent with the time obtained experimentally so far. We are currently analyzing the interactions between the rod-hook complex and the LP ring that enables rotation at low energy cost.

研究目的

世界の乳幼児死亡原因の約半分はウィルスや細菌 が引き起こす感染症によるものであり、特に発展途 上国では未だに大きな問題である。細菌の運動性に かかわる細菌べん毛の機能が分子レベルからマクロ レベルにいたる範囲で明らかになれば、細菌の増殖 を抑え病原性に対処することに繋がる科学技術の発 展が期待される。そして将来的に感染症へのより効 果的対策に繋がり、人類の健康に寄与する可能性が ある。細菌べん毛は多くの病原性細菌、例えば大腸 菌やサルモネラ菌などが移動するために用いる巨大 な分子機械である。また30種類以上のタンパク質が 3 万分子程度集合することで構築され、その長さは 10マイクロメートルにも及ぶ。べん毛をもった細菌 には、一般によく耳にするものに限っても、上記以 外に赤痢菌・コレラ菌・ビブリオ菌・ピロリ菌など がある。これらの細菌は、輸送装置を用いて巨大な 分子構造体を構築し、イオン勾配エネルギーを回転 力へと変換し、自在継手として働くフックを介して 回転力を伝達し、スクリューであるべん毛繊維を回 転させて細胞運動を行う。更に、走化性シグナルに よって回転を制御し、べん毛繊維のらせん性を変化 させることで細胞運動を制御している。

構造生物学と分子シミュレーションの連携は、2 1世紀に入って原子解像度・分子レベルでの生命現象解明を急速に進展させてきており、構造生物学的に決定されたべん毛の部分構造に基づいて、大規模な分子シミュレーションを実行し、その機能を研究することが可能になってきた。これらの細菌の運動性にかかわるべん毛の機能が分子レベルからマクロレベルにいたる範囲で基礎科学的に明らかになることが期待される。本研究では、べん毛の回転を大規模な分子シミュレーションによって観察することで、べん毛の軸受けが軸を保持しつつ、低エネルギーコストで回転を許してトルク伝達と構造変化を連携するメカニズムを明らかにし、将来的に軸の回転を阻害する化合物探索を目指している。

研究経過

このような研究には、大規模な分子シミュレーションの実行が必須である。そこで我々は 2020 年、2021年に世界最速を達成したスーパーコンピュータ「富岳」の利用を申請し、2021年度の利用を認められた。

計算には全原子モデルに基づいた分子動力学シミ ュレーション (MD) を用いた。計算対象としたタン パク質複合体は、細菌べん毛の軸に当たるロッドと 軸受け (ベアリング) に当たる LP リングなどからな る。これらの巨大な複合体の立体構造は山口らによ って近年解明された [T. Yamaguchi et al., Nat. *Commun.* (2021)]。ロッドは、タンパク質 FliG とタン パク質 FliF からなるらせん構造体であり、11 本の素 繊維がらせん状に束になった構造をしている。この 計算では、FliG の 24 量体と FliF の 5 量体でロッド を形成した。ロッドの外側には、スクリューに当た る細菌べん毛繊維とロッドをつなぎ、トルクを様々 な方向に伝達する自在継手であるフックがある。し かしべん毛繊維を計算に加えると計算量が膨大にな るので、本計算ではフックタンパク質 FliE の 22 量 体をモデルに含めたロッド・フック複合体が低エネ ルギーコストで回転するメカニズムを調べることに した。また LP リングはタンパク質 FlgH の 26 量体 からなる L リングと、タンパク質 FlgI の 26 量体か らなる P リングが上下に積み重なった構造体である。 この 26 回の回転対称性により、360 度/26=約 13.8 度が回転の基本単位となる。そこで回転による自由 エネルギー変化を約13.8度の範囲で調べることにし た。これらのロッド・フックと LP リングは合計約 44 万原子からなる (Fig. 1)。

これをさらに周期境界条件の下で直方体型の箱の中に水分子と約 0.14M の NaCl からなる水溶液の中に配置したところ、初期状態で箱のサイズは 293 × 293 × 383 Å3 となり原子数はおよそ 293 万原子となった。実際の細菌において LP リングはペプチドグリカン層に固定されていると考えられている。しかし、LP リングとペプチドグリカン層の相互作用はどのようになっているのか十分解明されていないので、LP リングのうちペプチドグリカン層と相互作用していると考えられるアミノ酸残基に弱い位置拘束力を加えることで LP リングの動きを抑制することにした。タンパク質の分子力場には Amber ff14SB、水分子には SPC/Eb モデルを用いた。初期構造の生成

と最初の平衡化には GPU を用いて研究室内の PC を 用いたが、その後は「富岳」を用いて、すべてのシミ ュレーションを行った。

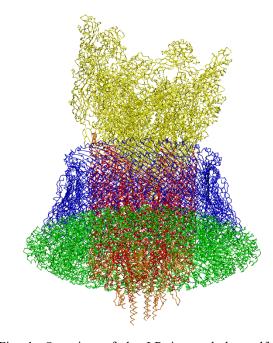


Fig. 1. Overview of the LP-ring and the rod/hook complex. The rod region: FliG (red), FliF (orange). Hook: FliE (yellow), L-ring: FlgH (blue), P-ring: FlgI (green). Solvent molecules included in the simulation were not shown for better visuality.

当初の予定では、まず平衡化の後、Parallel cascade selection molecular dynamics (PaCS-MD) 法 [R. Harada, and A. Kitao, J. Chem. Phys. (2013)]を用いて、 ロッド・フック複合体を LP リングの内部で回転さ せる予定であった。しかし、試行計算の結果、ロッ ド・フック複合体の回転拡散が予想より遅いため、 PaCS-MD は期待したほど計算効率がよくないこと がわかった。そこで、方針を変更し、まず参照構造 のロッドを 0.5 度ずつ回転させ、シミュレーション 中に位置拘束力を加えることで回転させることにし た。 実際にこの方法を用いると 100 ピコ秒以内に 0.5 度回転させられることがわかった。このことはロッ ド・フック複合体の回転のエネルギーコストが低い ことを示している。そこで時計回り・反時計回りに それぞれ 5 ナノ秒の MD ごとにロッドを 0.5 度回転 させ、最終的に±35 度回転させた。合計の角度変化 70 度は回転単位である 13.8 度のおよそ 5 倍にあた る。これによって異なるロッドの回転角をもつ 140 種類の立体構造を得た。またこれらの140の立体構

造を初期構造として、独立に 40 ナノ秒の MD シミュレーションを実行し、これをマルコフ状態モデル (MSM) で解析した。MSM 解析にはソフトウエア pyEMMA [M. K. Scherer et al., J. Chem. Theory Comput. (2015)]を用い、研究室の PC で実行した。この際、26 回の回転対称性を持つことを用い、回転 1 ステップを 100 個の微視的状態に分割した。

この結果から、ロッド・フック複合体が LP リング 内で回転する際に自由エネルギーがどのように変化 するかを示すエネルギー地形を計算した (Fig. 2)。ここでは通常の回転方向である反時計回りをプラス軸 方向として、回転単位 2 ステップ分の地形を示している。回転の自由エネルギーの障壁は回転の 1 ステップのほぼ中間にあたる 7 度付近にあり、巨大なロッド・フック複合体が回転するにもかかわらず、障壁の高さは 3.4 kcal/mol 程度と低いことが明らかになった。時計回り、反時計回りのそれぞれに関して、完全ではないが自由エネルギー地形は回転に関してほぼ対象であることも示された。

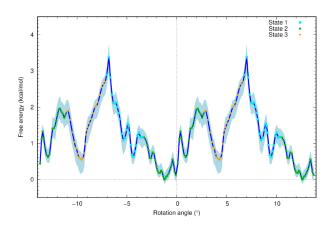
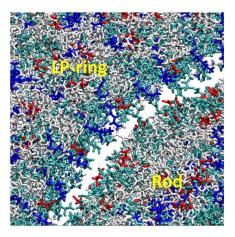


Fig. 2. Free energy landscape of the rod/hook rotation within the LP-ring. The landscape for the two rotational units (±13.8°) are shown. States 1, 2 and 3 indicate the regions of three macrostates assigned to 100 microstates in MSM analysis.

次に、回転に要する時間を求めるために、mean first passage time (MFPT)を計算した。そのために、100の微視的状態を3つの巨視的状態 (Step 1-3)に分割した。Step2 は最も自由エネルギーが低く存在確率が高い状態である。従って、阻害剤を結合させるにはこの状態の立体構造をターゲットとするのが最も適していると考えられる。またエネルギーより高い

State 1 と 2 は、既にエネルギー地形の大まかな回転 対称性で観たようにほぼ同じような自由エネルギー の値を持っていた。MFPT として得られた反時計回 りの回転 State 2 から 3 への遷移時間は 13.3 マイク 口秒、State 2 から 1 への遷移時間は 6.6 マイクロ秒、 State 1 から 2 へは 0.5 マイクロ秒を要し、1 ステップ 当たりの時間は 21.4 ± 0.6 マイクロ秒であった。一 方、時計回りはそれぞれ 3.4, 14.1, 2.7 マイクロ秒を 要し、1ステップ当たりでは、20.3±0.6マイクロ秒 であった。このことからも反時計回りと時計回りの 回転に要する自由拡散はどちらの回転方向にもほぼ 対象であることが示された。また、ロッド・フック 複合体が1回転(360度)するには単純計算で26倍 の 520 マイクロ秒程度要することが予測される。こ の値は 1900Hz の回転に相当する。これまでの実験 では、モーター固定子がない状態での回転は最大で 6000Hz、ピークで 1000Hz 程度と考えらえれている ことから、今回 MSM で得られた回転速度の結果も 妥当だと考えられる。

それでは実際にべん毛の軸受け(LPリング)がどのように軸(ロッド)を保持しているのであろうか。これについてはまだ解析中であるが、LPリングとロッドの間には直接の相互作用は少なく、ほとんどが水を介して相互作用している。このことがロッドのスムーズな回転を可能にするカギだと考えられる。



Blue: Basic Red: Acidic Cyan: Polar

Fig. 3. A close-up view of the interface between the LP-ring and rod/hook complex. Indirect water-mediated interactions mainly maintain the whole structure. Blue, red and cyan shows basic, acidic and polar residues, respectively.

考察

このように妥当と思われる自由エネルギー地形と 遷移時間が得られたので、現在はこのような巨大な システムがスムーズに回転することを可能にする分 子的なメカニズムの解明を進めている。具体的には LPリングとその内部を貫通するロッド・フック複合 体の界面で、アミノ酸残基や溶媒の相互作用が回転 によってどのように変化するかを調べることで、低 エネルギーコストの回転を可能にする機構を調べて いる。さらに得られた情報に基づいて、逆に軸の回 転を阻害する最も効果的な方法を考案する。特に LP リングとロッドの周辺のどこが最も阻害部位として 適しているかを検討し、これに基づいて軸の回転を 阻害する化合物探索を進める。

研究の発表

口頭発表

- インシリコシミュレーションで探るタンパク質 複合体の結合親和性とキネティックス. 北尾彰 朗, 構造活性フォーラム 2021「次期スーパーコ ンピュータ「富岳」時代の計算創薬」, オンライ ン発表, 2021/6/4.
- 2. Simulated dissociation/association dynamics between proteins and other molecules. Akio Kitao, TSRC Virtual Workshop on Protein Dynamics, オンライン 発表, 2021/7/13.
- PaCS-MD/MSM to investigate protein motions and association/dissociation of protein complexes. Akio

- Kitao, Symposium on Computer Simulations and Cryo-ET/EM of Complex Biomolecular Systems, オンライン発表, 2021/11/19.
- 4. 蛋白質結合解離ダイナミクスの分子動画. 北尾 彰朗, 第 59 回日本生物物理学会年会シンポジウ ム, 1 原子レベルの動的構造解析が拓く生体分子 機能の理解, 2021/11/25.
- 5. 柔らかな分子の複合体形成と解離. 北尾彰朗, シンポジウム「柔らかな分子系研究の発展」,名 古屋工業大学,2022/6/2.
- Conformational Change and Dissociation/ Association of Biological Macromolecules Investigated by Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics and Markov State Model. Akio Kitao, ABA, APPA &TBS Joint Congress, online, 2022/6/24.
- 7. 高速分子動画を補完する構造変化の自由エネルギー地形と経路・流量の解析,北尾彰朗,-新学術領域「高速分子動画」シンポジウム,オンライン発表、2022/11/22.
- 8. LP リング中のロッドの回転シミュレーション, 北尾彰朗, 2022 年度べん毛研究交流会, 2023/3/10.

ポスター発表

1. 細菌べん毛回転メカニズムの解明と回転阻害による新規抗菌物質開発. 北尾彰朗, 第9回 HPCI システム利用研究課題成果報告会, オンライン発表, 2021/10/28.