

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2003 ~ 2008
 課題番号：15083201
 研究課題名（和文） 分子シミュレーションによる膜タンパク質の構造変化と物質輸送機構の解明
 研究課題名（英文） Molecular dynamics simulations on membrane transporting proteins

研究代表者
 杉田 有治（SUGITA YUJI）
 独立行政法人理化学研究所・杉田理論生物化学研究室・准主任研究員
 研究者番号：80311190

研究成果の概要

生体膜を隔てたイオンやタンパク質の物質輸送を行う膜輸送タンパク質の立体構造を用いた分子動力学計算を行うことにより膜タンパク質の構造変化と物質輸送機構の関係を明らかにした。ターゲットとして、カルシウムイオンポンプ、その機能を制御するフォスフォランバン、タンパク質輸送を行う Sec トランスロコンを選び、脂質二重膜と溶媒を露わに含む全原子分子動力学計算を実施することにより、膜インターフェイスにおける Soft な相互作用がこれらのタンパク質の機能に果たす役割を明らかにすることができた。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|------|------------|
| 2003 年度 | 8,500,000 | 0 | 8,500,000 |
| 2004 年度 | 17,000,000 | 0 | 17,000,000 |
| 2005 年度 | 15,600,000 | 0 | 15,600,000 |
| 2006 年度 | 15,500,000 | 0 | 15,500,000 |
| 2007 年度 | 16,100,000 | 0 | 16,100,000 |
| 2008 年度 | 16,100,000 | 0 | 16,100,000 |
| 総計 | 88,800,000 | 0 | 88,800,000 |

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生物物理

キーワード：膜蛋白質・分子動力学計算・イオンポンプ・トランスロコン

1. 研究開始当初の背景

この研究を開始した当初、生体膜を露わに含む全原子モデルを用いた膜タンパク質の分子動力学計算を実行することは計算機の演算能力やソフトウェアの問題などにより困難であった。また、膜タンパク質の立体構造

の数も限定されており、計算が可能な膜タンパク質も非常に少なかった。

(1) 筋小胞体カルシウムポンプ

2003 年には、カルシウム結合型と非結合型の立体構造が解かれたただけであった。また、非

結合状態に関する立体構造の解像度は低く、計算に適したものではなかった。

(2) フォスフォランバン

フォスフォランバンとカルシウムポンプの複合体の立体構造を、東大豊島教授らと共にモデリングした。しかし、リン酸化による制御機構は明らかに絞っていなかった。

(3) Sec トランスロコン

研究開始当初は、Sec トランスロコンに関しては1つの構造（閉構造）しか解かれていなかった。この研究は2007年から開始した。

2. 研究の目的

膜タンパク質の構造変化と物質輸送の関係を理論的に明らかにするのが本研究の目的である。そのために、脂質二重膜を含む全原子モデルを用いた分子動力学計算を実行する。膜タンパク質の構造変化を制御しているのは膜インターフェイスにおける Soft な相互作用と考えられるため、その概念を理解し、拡張していく。

(1) カルシウムポンプ

筋小胞体カルシウムポンプは、イオン濃度勾配に逆らった輸送（能動輸送）を行う ATPase である。カルシウム輸送サイクル中で、ATP 加水分解によるエネルギーを用いて、カルシウムポンプの立体構造を変化させ、イオンの輸送を行っている。この全貌を明らかにすることが目的であるが、本研究期間内にはカルシウム輸送と対抗するプロトン輸送の分子機構の解明に取り組んだ。

(2) フォスフォランバン

フォスフォランバンは 52 残基の膜タンパク質であり、心筋でカルシウムポンプの機能を制御している。このタンパク質は Ser16 あるいは Thr17 のリン酸化によって、カルシウムポンプの機能制御を行わなくなることが知られていた。しかし、実験からはリン酸化による変化として2つの異なるモデルが提案されていた。本研究ではこの問題を明らかにする。

(3) Sec トランスロコン

リボソームで合成されたタンパク質は、Sec トランスロコンと呼ばれる膜タンパク質を通して、輸送される。このタンパク質輸送に関して、従来は生化学的な解析のみが行われていたが、特に近年、X 線結晶構造解析を用いて立体構造が明らかになり、その分子機構の解明が飛躍的に進みつつある。我々は、Pre-open 構造から Close 構造への構造変化の分子機構を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

CHARMM 力場を用いた古典的分子動力学計算を行う。生体膜を含む全原子モデルを用いた膜タンパク質の系は多くの分子を含むので、並列 PC クラスタを用いて効率的な分子動力学計算を行った。

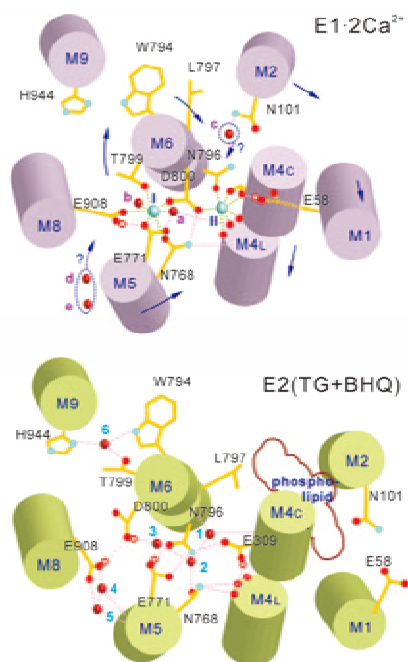
誘電体理論に基づく静電エネルギー計算を行うことにより荷電アミノ酸残基の pKa の溶液状態との変化を見積もることができる。そのために、MEAD ソフトウェアパッケージを用いた。

また、リン酸化などの大きな構造変化を調べるために、これまでタンパク質の折れ畳み問題に用いられていた拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換分子動力学法を用いることにより、広い構造空間を探索し、自由エネルギー地形を求めた。

4. 研究成果

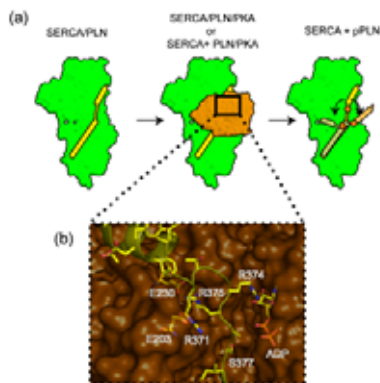
(1) カルシウムポンプ

カルシウム結合型と非結合型に関する誘電体理論に基づく静電エネルギー計算を行うことにより、結合型では E58 と E908 が、非結合型では、E309, E771, D800, E908 がプロトン化されていると予測された。これらの残基をプロトン化したモデルとそうでないモデルを用いて分子動力学計算を実行した結果、静電エネルギー計算の結果と良く一致した。これらの残基はカルシウム結合に直接関わるアミノ酸残基であり、プロトン結合がカルシウム結合と対抗して生じること、カルシウムイオンの脱離後に立体構造を安定化するために、プロトン化は必須であることを立体構造を用いて初めて明らかにできた。



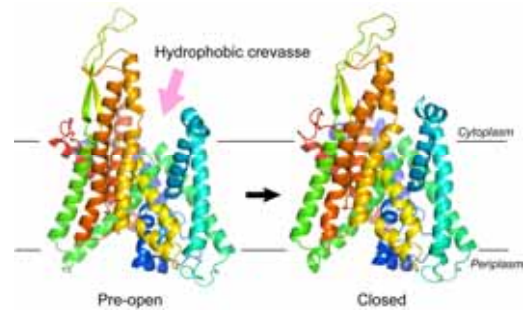
(2) フォスフォランパン

フォスフォランパンの細胞質ドメイン (Ser16 と Thr17 を含む) に関するレプリカ交換分子動力学計算を実施した。用いたレプリカの総数は 60 であり、溶媒は露に取り込んだ。その結果、リン酸化される前には、NMR で測定されているように細胞質ヘリックスは安定に存在していたが、リン酸化後には不安定になることが明らかになった。この変化はリン酸化によって生じた負電荷と近傍の Arg の間の静電相互作用によるものであった。しかし、ヘリックス構造が不安定になった状態では構造はむしろコンパクトな構造をしており、FRET による実験結果を再現した。すなわち、フォスフォランパンはリン酸化によってコンパクトな不安定状態をとることにより、カルシウムポンプとの結合が弱まりその機能を抑制することができなくなるという可能性が示唆された。



(3) Sec トランスロコン

SecYE の pre-open 状態では、lateral-gate 領域で疎水残基がむき出しになっている。Fab 非存在下で MD 計算を行ったところ、この溝が閉じる様子が観測された。また、この構造が、cross-link の実験結果とよく一致したことから、シミュレーション結果は closed 構造に近いと考えられる。系 B: 一方、closed 構造の SecYEβ は 100 ns 中で open になる傾向は見られず、チャンネルパートナー非存在下では closed 状態で安定であることが示された。系 C: Fab-SecYE 複合体の 100ns MD 計算では、closed 構造に近づいたものの、Fab 非存在下と比べて、ヘリックスが倒れ込みにくかったことから、Fab 結合により pre-open 状態へと構造が誘起されていることが示された。また、SecYE が pre-open 構造から closed 構造へ遷移する過程を詳細に解析したところ、タンパク質-脂質相互作用が大きく変化する様子が見られ、このような相互作用が SecYE の細胞質側のゲートの開閉に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 25 件)

1. N. Miyashita, J. E. Straub, D. Thirumalai and Y. Sugita: Transmembrane Structures of Amyloid Precursor Protein Dimer Predicted by Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations, *J. Am. Chem. Soc.* 131(10), 3438-3439 (2009), 査読有
2. R. Ishitani, Y. Sugita, N. Dohmae, N. Furuya, M. Hattori and O. Nureki: Mg²⁺-sensing mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE probed by molecular dynamics study, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105(40), 15393-15398 (2008), 査読有
3. T. Tsukazaki, H. Mori, S. Fukai, R. Ishitani, T. Mori, N. Dohmae, A. Perederina, Y. Sugita, D.G. Vassylyev, K. Ito and O. Nureki: Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures, *Nature*, 455, 988-992 (2008), 査読有
4. Y. Sugita, A. Mitsutake and Y. Okamoto: Generalized-Ensemble Algorithms for Protein Folding Simulations, *Lecture Notes in Physics*, 736, 369-407 (2008), 査読有
5. 杉田 有治: 生体分子の構造探索の理論, *化学と工業*, 61-6, 582-584 (2008), 査読有
6. 杉田 有治: カルシウムポンプの機能制御機構, *生化学*, 80, 917-924 (2008), 査読有
7. 杉田 有治: ぞくぞくとわかってきた膜を隔てたイオン輸送装置構造, *生物物理*, 48(6), 330-332 (2008), 査読有
8. Y. Sugita: Free energy landscapes of proteins in solution by generalized-ensemble simulations, *Frontiers in Bioscience*, 14, 1292-1303 (2009), 査読有

9. J. Jung, C.H. Choi, Y. Sugita and S. Ten-no: New implementation of a combined quantum mechanical and molecular mechanical method using modified generalized hybrid orbitals. *J. Chem. Phys.* 127 (2007) 204102. , 査読有
10. Y. Kawashima, Y.C. Sasaki, Y. Sugita, T. Yoda and Y. Okamoto: Replica-exchange molecular dynamics simulations of diffracted X-ray tracking. *Molecular simulation* 33 (2007) 97-102. , 査読有
11. Y. Harano, R. Roth, Y. Sugita, M. Ikeguchi and M. Kinoshita: Physical basis for characterizing native structures of proteins. *Chem. Phys. Lett.* 437 (2007) 112-116. , 査読有
12. Sugita Y, Miyashita N, Yoda T, Ikeguchi M, and Toyoshima C: Structural Changes in the Cytoplasmic Domain of Phospholamban by Phosphorylation at Ser16: A Molecular Dynamics Study. *Biochemistry* 45, 11752-11761 (2006) , 査読有
13. Yoda T, Sugita Y, and Okamoto Y: Cooperative Folding Mechanism of a b-Hairpin Peptide Studied by Using a Multicanonical Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulation. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 66, 846-859 (2007), 査読有
14. 杉田 有治, 池口 満徳: 「膜蛋白質の分子動力学」, 物性研究 50, 1271-1277 (2006), 査読有
15. Sugita Y, Miyashita N, Ikeguchi M, Kidera A, and Toyoshima C: Protonation of the acidic residues in the transmembrane cation-binding sites of the Ca²⁺-pump. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 6150-6151 (2005), 査読有
16. Obara K, Miyashita N, Xu C, Toyoshima I, Sugita Y, Ineshi G and Toyoshima C: Structural role of countertransport revealed in Ca²⁺ pump crystal structure in the absence of Ca²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 14489-14496 (2005) , 査読有
17. 杉田 有治, 豊島 近: カルシウムポンプの構造と機能, 蛋白質・核酸・酵素, 増刊号「生命秩序を担う生体超分子」, 50, 1271-1277(2005) , 査読有
18. Sugita Y, and Okamoto Y: Molecular mechanism for stabilizing a short helical peptide studied by generalized-ensemble simulations with explicit solvent. *Biophysical J.* 88, 3180-3190(2005), 査読有
19. Murata K, Sugita Y, and Okamoto Y: Molecular dynamics simulations of DNA dimers based on replica-exchange umbrella sampling. I. Test of sampling efficiency. *J. Theor. Comp. Chem.* 4, 411-432(2005), 査読有
20. Murata K, Sugita Y, and Okamoto Y: Molecular dynamics simulations of DNA dimers based on replica-exchange umbrella sampling. II. Free energy analysis. *J. Theor. Comp. Chem.* 4, 433-448(2005), 査読有
21. Nishino M, Sugita Y, Yoda T, and Okamoto Y: Structures of a peptide fragment of β_2 -microglobulin studied by replica-exchange molecular dynamics simulations: towards the understanding of the mechanism of amyloid formation. *FEBS Lett.* 579, 5425-5429(2005) , 査読有
22. Kawashima Y, Sugita Y, Yoda T, Okamoto Y: Effects of the Fixed End in Single-Molecular Imaging Techniques: A Replica Exchange Molecular Dynamics Simulation. *Chem. Phys. Lett.* 414, 449-455 (2005) , 査読有
23. T. Yoda, Y. Sugita and Y. Okamoto: Secondary-Structure Preferences of Force Fields for Proteins Evaluated by Generalized-Ensemble Simulations. *Chem. Phys.* 269-283(2004) , 査読有
24. T. Yoda, Y. Sugita and Y. Okamoto: Comparisons of Force Fields for Proteins by Generalized-Ensemble Simulations. *Chem. Phys. Lett.* 386, 460-467(2004) , 査読有
25. K. Murata, Y. Sugita and Y. Okamoto: Free energy calculations for DNA base stacking by replica-exchange umbrella sampling. *Chem. Phys. Lett.* 385, 1-7(2004) , 査読有

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 杉田 有治 「Molecular Dynamics Simulations of Soft Interactions at the Membrane Interface」 International Symposium on Molecular Soft Interactions in Biological Systems (大阪、2009年1月)
2. 杉田 有治 「膜蛋白質の分子動力学計算」 計算科学研究センター・ワークショップ (岡崎、2009年1月)
3. 杉田 有治 「Protein-Lipid Interactions Revealed by Molecular Dynamics Simulations」九州大学次世代研究スーパー・スター養成プログラム公開シンポジウム (博多、2008年12月)
4. 杉田 有治 「Molecular Dynamics simulations of protein dynamics in biological membrane」次世代ナノ情報機能・材料グループ成果報告会 (仙台、2008年12月)

月)

5. Yuji Sugita: Molecular Dynamics Study of Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 (BMB2008) (神戸、2008年12月)

6. Yuji Sugita: Toward a complete understanding of molecular mechanism of ion transport by membrane proteins. 1st Joint Workshop on Computational Science (和光、2008年7月)

7. Yuji Sugita: Molecular mechanism for stabilizing Ca^{2+} at the transmembrane binding sites in Ca^{2+} -pump. 1st CMD International Symposium Chemical Computations (Seoul、2008年5月)

8. 杉田 有治「カルシウムポンプの機能発現機構に関する分子動力学計算」日本物理学会第63回年次大会(東大阪、2008年3月)

9. 杉田 有治「分子シミュレーションからカルシウムポンプの構造柔軟性を考える」日本生物物理学会第45回年会(横浜、2007年12月)

10. Yuji Sugita: Molecular Dynamics Simulations on the Conformational Stability of the Ca^{2+} -binding sites in Ca^{2+} -pump. BNL-RIKEN Life Science Workshop (Upton、2007年9月)

11. 杉田 有治「カルシウムポンプによるイオン能動輸送の分子機構」理研シンポジウム「計算機と生物学 in Silico Biology」(和光、2007年6月)

12. 杉田 有治「分子動力学計算による蛋白質原子揺らぎの収束性について」大阪大学蛋白質研セミナー(大阪大学蛋白質研究所、2006年9月28-29日)

13. 杉田 有治「SR Ca^{2+} -ATPaseによる Ca^{2+} 輸送とプロトン対抗輸送の分子機構」第4回特定領域研究「膜インターフェイス」公開シンポジウム(京都大学百周年記念ホール、2006年7月5日)

14. Yuji Sugita: Molecular dynamics simulations of sarcoplasmic reticulum calcium pump in membrane. In Satellite meeting for 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology & 11th FAOBMB Congress on Molecular Mechanism and Regulation in Cation Transport ATPases and Related Genetic Diseases(京都リサーチパーク、2006年6月)

15. 杉田 有治「レプリカ交換法による蛋白質機能解析」第6回蛋白質科学会年会(京都国際会議場、2006年4月26日)

16. 杉田 有治「分子動力学計算によるカルシウムポンプの機能制御機構の解析」大阪大学蛋白質研セミナー(大阪大学蛋白質研究所、2006年3月21-22日)

17. 杉田 有治「カルシウムポンプとその阻

害剤の分子動力学計算」スーパーコンピュータワークショップ(自然科学機構・岡崎共通研究施設・計算科学研究センター、2006年3月6-7日)

18. Yuji Sugita: Theoretical studies on the proton countertransport by sarcoplasmic reticulum calcium pump. In KAIST seminar (KAIST、Korea、2006年2月)

19. 杉田 有治「カルシウムポンプの分子動力学計算：構造から機能の理解へ」京都大学ウイルス研セミナー(京都大学ウイルス研究所、2006年1月)

20. 杉田 有治「筋小胞体 Ca^{2+} -ATPaseの機能に関する分子動力学計算」第28回日本分子生物学会年会(福岡ドーム、2005年12月)

21. Yuji Sugita: Molecular dynamics studies on the biological functions of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. In P-Chem seminar (Boston University、Boston、2005年9月)

22. Yuji Sugita and Chikashi Toyoshima: SR Ca^{2+} -ATPase Atomic Structure and Molecular Dynamics Simulations. In 11th International ATPase Conference and 59th Annual Meeting and Symposium of the Society of General Physiologists (Marine Biological Laboratory、Woods Hole、Massachusetts 2005年9月)

23. 杉田 有治「脂質二重膜中におけるカルシウムポンプの運動と機能」生体分子ダイナミックス研究会(東京大学農学部、2005年7月)

24. Yuji Sugita: Molecular dynamics studies on Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. In Theoretical Biophysics Seminar (Rutgers University、New Jersey、2005年9月)

25. Yuji Sugita and Chikashi Toyoshima: Molecular dynamics simulations SR Ca^{2+} -ATPase in the Ca^{2+} -bound and unbound states. In 2005 FASEB Summer Research Conferences (Vermont Academy、Saxton River、Vermont、USA、2005年7月)

26. Yuji Sugita: Molecular Mechanism of cooperative Ca^{2+} -binding by Ca^{2+} -ATPase, insight from molecular dynamics simulations. In the 2nd symposium of membrane interface (ホテル阪急エキスポパーク、2005年8月)

27. 杉田 有治「脂質二重膜中でのカルシウムポンプの分子動力学」第1回特定領域研究「膜インターフェイス」公開シンポジウム(東京大学山上会館、2004年2月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 有治 (SUGITA YUJI)
独立行政法人理化学研究所・杉田理論生
物化学研究室・准主任研究員
研究者番号 (80311190)

(2) 研究分担者

近藤 洋平 (KONDOU YOUHEI)
東京大学分子細胞生物学研究所・助手
研究者番号 (30436604)
2007年度のみ参加