

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07037

研究課題名(和文) 計算科学シミュレーションによる膜電位依存性チャネルVSOPの動作機構研究

研究課題名(英文) A Simulation Study on the Mechanism of Membrane Voltage Depended Protein VSOP

研究代表者

米澤 康滋 (Yonezawa, Yasushige)

近畿大学・先端技術総合研究所・教授

研究者番号：40248753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜間物質輸送の分子機構を解明する為に、VSOPの系を全原子モデルでMD計算しVSOPのopen構造とclosed構造を構築し解析した。その結果、open構造ではS4ヘリックスに特有なARG残基が様々なコンフォメーションでS3及びS1のGLU残基と塩橋対をなしてプロトン移動パスを構成することを示唆する結果を得る事ができた。これに加えて、closed構造では実験で報告された塩橋ペアとは異なるARGとGLUの塩橋対で構造を安定化して全く水分子を透過させない構造を得る事ができた。VSOPの電位依存的ゲーティング分子機構についての検証研究をこの結果を基に進めてゆく予定である。

研究成果の概要(英文)： Voltage Sensor Only Protein (VSOP) having simple and small structure would be a superior model system than the Kv-channel protein to elucidate a material transport molecular mechanism across bio-membrane.

We studied the mechanism of VSOP using molecular dynamics simulation method. We then focused the voltage-dependent proton conduction mechanism. On the basis of the hypothesis where for activation, S4 helix vertically moves against membrane, we constructed a lots of VSOP structures with different S4 configurations by molecular modeling and long-time molecular dynamics simulations. We then obtained several important structures. An open structure candidate of VSOP which shows proton conduction pass along with typical salt-bridges between Arginine and Glutamine, also a structure candidate of closed VSOP which indicates completely inhibition of water transporting. Those structures should be useful to investigate the intrinsic transporting mechanism of membrane proteins.

研究分野：生物物理

キーワード：生体膜間物質輸送 分子動力学シミュレーション プロトン透過

## 1. 研究開始当初の背景

大阪大学の岡村グループによって、電位センサーが酵素活性を制御する新たな電位センサー蛋白質である Voltage Sensor Only Protein (VSOP) が発見され、大阪大学の中川グループによってその静止状態のX線構造が解かれて静止状態を安定化する亜鉛イオンとヒスチジンの関連などの原子レベルの詳細が世界に先駆けて明らかにされた (Takeshita, et al, Nature Struc. Mol. Bio. 2014)。

筋収縮・神経伝達や心臓拍動などの生命現象に重要な役割を果たす細胞膜の電位依存性イオンチャネルは、これまで電位センサー部分と小孔部分から成る複雑な構造を持って機能していると考えられていたが、VSOP は今まで知られている最小のイオンチャネルで Kv チャネルの 1/10 サイズで、かつシンプルな構造を持ち (図 1)、未だに謎が多いイオンチャネルの基本機能であるイオン選択性及びゲーティング機構の解明に理想的な日本発のモデル蛋白質として注目されその研究進展が大いに期待されている。

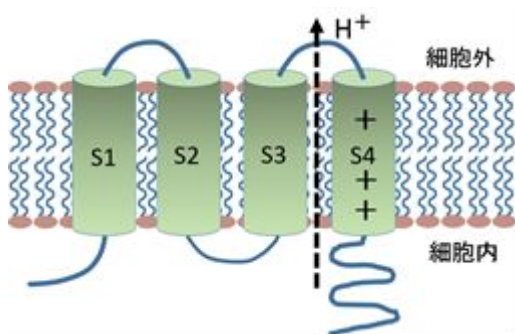


図 1 VSOP の分子構造

すなわち、これまで標準として取り扱われてきた Kv チャネルは様々な分子シミュレーション手法を適用するには巨大かつ複雑な構造を持ち、電位依存性イオンチャネルの精密な全原子分子シミュレーション研究は今まで殆ど行われてこなかった。一方、VSOP は Kv チャネルに比べて小規模な分子トポロジーで小孔を持たないシンプルな構造を持つ故に、精密で高速な全原子分子シミュレーション計算が十分実施可能であるとの判断に至った。

計算科学は複雑なイオンチャネル分子機能解明に適した研究手法の一つである。本研究申請者米澤は 25 年度から VSOP の発見者岡村、X 線結晶構造を決定した中川・竹下及び計算化学研究者鷹野と共同で電位依存性

イオンチャネル VSOP の機能を解明する分子シミュレーション研究に着手していた経緯がある。そして、本研究開始までに分子モデリングによる VSOP 欠損部位の補完及びその補完された VSOP 構造を脂質 2 重膜構造に組み込む計算プログラムツール群を独自に開発するなどの研究準備を進め、全原子を精密に取り扱う VSOP (変異体を含む) の分子動力学シミュレーションを簡易に実現する研究基盤を構築して、本研究申請時までは予備的な計算シミュレーションを開始していた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、膜タンパク質や超分子複合体の構造解析で豊富な実績で世界をリードする中川研究室と、研究代表者の分子シミュレーションを活用した計算科学の密接な協力によってこれまで明らかでなかった新規膜タンパク質 VSOP の膜間物質輸送機能の解明を目指した。

X 線結晶構造解析で解かれた VSOP の構造を基に分子動力学 (Molecular Dynamics : MD) シミュレーションを実施して静止状態の構造特徴を計算結果から抽出し、疎水性クラスターによるプロトン障壁の役割や亜鉛イオンの S4 セグメントへの影響を定量的に明らかにする以下の具体的な研究項目を目的とした。

- 1) 静止状態 VSOP でプロトン透過を遮断する分子機構の解明、寄与するアミノ酸残基の同定
- 2) 亜鉛イオンとヒスチジン残基の相互作用による静止状態安定化機構の解明
- 3) S4 セグメントのシフトによる静止状態から活性状態の分子構造変化過程の解明、及び S4 セグメントのシフトをもたらすトリガー機構の解明 (\*構造探索バイアス駆動型分子動力学シミュレーションを活用する。)
- 4) VSOP 活性状態構造の予測と、予測に基づく活性化状態構造モデルの構築
- 5) 活性状態におけるプロトン通過分子機構、及びプロトン通過経路の推定

本研究の特色は、電位依存性イオンチャネルの実験・計算モデル系として今まで標準モデルとされていた Kv チャネルよりもモデル系として格段に優れている「純粋に日本発の電位依存性チャネル VSOP」を研究対象として、これまで不明だった電位依存性イオンチャネルの基本機能を日本の最先端計算科学技術を持って解明し広く世界に発信する事にある。

VSOP を研究対象とすることでこれまで明らかにされていなかったイオン選択・透過機構及びイオンゲート開閉機構の理解が大き

く進展することが期待される。本申請研究の成果によって電気生理学やその周辺研究分野へ及ぼされる波及効果は非常に大きいと予想される。

### 3. 研究の方法

得られた静止状態の特徴を基にして、分子モデリングと構造情報を使って活性状態の構造モデルを推定し平衡 MD シミュレーションで構築した。構築された活性状態モデルの MD シミュレーションを実施して計算結果から、活性状態の構造特徴を抽出した。

構造データにはセグメント間に X 線では観測できなかった欠損部位があるが、欠損部位は modeller プログラムを用いて補完し、脂質 2 重膜への挿入も自動的に行うツールプログラムを開発する等、VSOP の分子シミュレーション研究基盤を新たに拡充して整備した。

長時間 MD シミュレーションデータの解析から、S4 セグメントの構造安定性及び静止状態を安定化していると考えられている保存されたヒスチジン残基と亜鉛イオンの相互作用機構について解析を行った。この解析から亜鉛イオンとヒスチジン残基の相互作用ネットワークが S4 位置を安定させてプロトン移動経路の疎水性障壁を構成する分子機構が明らかにできると考えている。加えてこの解析から S4 セグメントに関する大規模集団運動を主成分解析法などで同定して、S4 セグメントの大きな移動によると考えられている静止状態から活性状態への構造遷移の手がかりを同定した。

VSOP の活性化状態構造は、電位センサーである S4 セグメントが膜に対して膜上下にシフトすることで実現されると考えられているが、その証明は実験的にも理論的にも未だ成されていない。本研究では、静止状態の MD シミュレーションの知見を活用してこの活性状態構造を理論的にモデリングした。

分子シミュレーションの計算効率を向上させるために多くの初状態（構造・速度）を生成して並行に MD シミュレーションを走らせて、その中で最も活性化状態に接近した数個から十数個の構造を選択して、活性状態に収束するまで MD シミュレーションを繰り返す拘束シミュレーションの手法を用いた。この一連の計算から複数のゲーティング経路の予測及びプロトン透過機構の解明のための数理解析を実施した。

研究遂行に必要な計算資源は、近畿大学高圧力蛋白質研究センター所有の PC クラスタと学部共有の Fujitsu-FX10 を使用するが、さらに研究費で計算機を購入して計算能力

を増強した。準備および予備計算を行う計算環境やプログラムツールなどはこれまでの研究から豊富に蓄積され、計算結果の解析に関しても、今まで蓄積した解析ツールが豊富でこれを活用した。

MD シミュレーションデータ解析から得られた結果やその解釈に対して、連携研究者の中川と竹下は構造生命科学者の視点から評価及び意見・助言を頂き、電気生理学的・機能的な視点からは連携研究者の岡村に意見及び助言を頂いた。

### 4. 研究成果

VSOP の分子シミュレーション研究基盤を整備すると共に、多数の始状態から出発して多くの中間状態から終状態を目指すトラジェクトリーを選択して距離行列の情報を用いて MD シミュレーションによる構造変化を誘起する一連の並列・並行 MD シミュレーションを実行するシェルプログラムを開発した。このプログラムを用いて MD シミュレーションを多数並列及び並行して実行した。

その結果、open 構造では S4 ヘリックスに特有な ARG 残基が様々なコンフォメーションで S3 や S1 の GLU 残基と塩橋対をなしてプロトン移動パスを構成することを示唆するシミュレーション結果を得る事ができた。

これに加えて、closed 構造では実験で報告された塩橋ペアとは異なる ARG と GLU の対で構造を安定化して全く水分子を透過させない構造を得る事ができた。

VSOP の電位依存的ゲーティングについては、S4 のみが膜に対して動くという説と、周囲の電場を形成する構造（S1-S3）との相対的な位置関係の変化により S4 の電荷移動が生じるという説が提唱されており、今後はその検証研究をこの結果を基に進めてゆく予定である。

### 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 3 件)

Naoyuki Miyashita and Yasushige Yonezawa

“On-the-fly analysis of molecular dynamics simulation trajectories of proteins using the Bayesian inference method”

The Journal of Chemical Physics 147, 124108, 2017

DOI: 10.1063/1.4997099

Yasushige Yonezawa,  
“ A Method for Predicting Protein Conformational Pathways by Using Molecular Dynamics Simulations Guided by Difference Distance Matrices ”  
Journal of Computational Chemistry, Vol. 37, Issue 13, p1139-1146, 2016  
DOI: 10.1002/jcc.24296

Hiroko Okuda, Yasushige Yonezawa, Yu Takano, Yasushi Okamura, and Yuichiro Fujiwara,  
“ Direct Interaction between the Voltage Sensors Produces Cooperative Sustained Deactivation in Voltage-gated H Channel Dimers ”  
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 291, NO. 11, pp. 5935-5947, January 11, 2016  
DOI: 10.1074/jbc.M115.666834

〔学会発表〕(計 7 件)

岩城雅代, 神取秀樹, 近藤寛子, 米澤康滋, 鷹野優, 岡村康司, 有馬大貴, 中川敦史,  
「電位依存性プロトンチャネルの機能・構造解析」  
CREST 領域会議、東京、両国、12月20-22日、2017

近藤寛子, 米澤康滋, 宮下尚之, 岩城雅代, 竹下浩平, 藤原祐一郎, 城田松之, 木下賢吾, 岡村康司, 中川敦史, 神取秀樹, 鷹野優,  
「電位依存性プロトンチャネル VSOP/Hv1 の電場中での動態の解析」  
第 55 回生物物理学会年会、熊本、熊本大学、9月19日、2017年

近藤寛子, 米澤康滋, 木下賢吾, 鷹野優  
「脂質二重膜における PI(4,5)P2 の安定性の解析」  
第 30 回分子シミュレーション討論会 2016、大阪、大阪大学豊中、11月30日、2016年

近藤寛子・岩城雅代・兼松佑典・城田松之・米澤康滋・木下賢吾・神取秀樹・鷹野優  
「A detailed analysis of the binding mode of a zinc ion to the voltage-gated proton channel VSOP/Hv1」  
第 54 回日本生物物理学会年会、茨城県、つくば市、11月25-27日、2016年

米澤康滋  
「差分距離行列情報による蛋白質構造変化探索の手法」  
第 19 回理論化学討論会、東京都、早稲田大学、5月24日、2016年

近藤寛子・城田松之・米澤康滋・鷹野優・木下賢吾  
「電位依存性プロトンチャネル VSOP における亜鉛イオンの影響」  
第 29 回分子シミュレーション討論会  
新潟、朱鷺メッセ、11月30日、2015年

近藤寛子・城田松之・米澤康滋・鷹野優・木下賢吾  
「Molecular dynamics simulations of the effect of zinc on the voltage-gated proton channel VSOP」  
第 53 回日本生物物理学会年会シンポジウム  
「膜を介したプロトン透過機構」  
金沢、金沢大学、9月13日、2015年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.waka.kindai.ac.jp/tea/sentan/kyoin-tan.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米澤 康滋 (YONEZAWA, Yasushige)  
近畿大学・先端技術総合研究所・教授  
研究者番号: 40248753

### (2) 研究分担者

鷹野 優 (TAKANO, Yu)  
広島市立大学院・医学情報研究科・教授  
研究者番号: 30403017

### (3) 連携研究者

中川 敦史 (NAKAGAWA, Atushi)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号: 20188890

岡村 康司 (OKAMURA, Yasushi)  
大阪大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 80201987

竹下 浩平 (TAKESITA, Kouhei)  
大阪大学・蛋白質研究所・特任助教  
研究者番号: 80346808

### (4) 研究協力者

なし