

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700299

研究課題名(和文) シミュレーションによる混合膜中の膜タンパク質間相互作用機構の解明

研究課題名(英文) Interaction between membrane protein and lipids in the raft

研究代表者

宮下 尚之(Naoyuki, Miyashita)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：20452162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜は細胞内外を隔てるインターフェースで、膜タンパク質や様々な脂質分子で作られている。また、コレステロールやスフィンゴ脂質などを多く含むナノ領域(ラフト)をつくる事が知られている。アルツハイマー病関連タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)の機能はこの生体膜環境に大きく影響を受ける。そこで本研究では、粗視化モデルシミュレーションを用いて、膜タンパク質(APP)-脂質間相互作用について調べ、さらにラフト環境が膜タンパク質(APP)間相互作用に与える影響について調べた。その結果、ラフト中のコレステロールはAPPにまわりつき、膜タンパク質(APP)の凝集を補助する事がわかった。

研究成果の概要(英文)：Bio-membrane consists of membrane proteins and a various variety of lipids. Nano-domains that are called "Raft" are created in such heterogeneous system. The raft contains a lot of cholesterol and Sphingo-lipids. The functions of Amyloid Precursor Proteins (APP), are related to the Alzheimer disease, are affected by the raft. We have investigated the interaction between lipid and APP, and the interaction of membrane proteins in the raft. Our results suggested that the cholesterol are collected around the APP, especially Gly-xxx-Gly motif, and the cholesterol assist the association of APP.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学、生体生命情報学

キーワード：ラフト アミロイド前駆体タンパク質 膜タンパク質 粗視化モデル レプリカ交換分子動力学法 MD シミュレーション 脂質分子 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

生体膜は細胞や細胞小器官内外を隔て、細胞形成や細胞活動には必須である。生体膜は主にグリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールなどの複数種類の脂質分子や膜タンパク質からできている。このような混合脂質系ではスフィンゴ脂質やコレステロールを多く含むナノドメインが形成される事が知られており、『ラフト』と呼ばれている。

膜タンパク質は膜内外のインターフェースとして機能するが、近年、生体膜の組成(ラフトなど)が膜タンパク質の機能に影響する事がわかってきた。例えば、アルツハイマー病の原因タンパク質の一つと考えられているアミロイド前駆体タンパク質(APP)は、ラフト内外で酵素との結合活性や構造安定性が異なると考えられる。

申請者は当初、混合膜の成分の違いが膜タンパク質の揺らぎやダイナミクスを変え、単一膜の実験で得られた立体構造とは異なる構造や安定性をもたらすと考えた。そして、ラフト内では脂質分子とタンパク質間相互作用が強くなり、それが構造や膜タンパク質間相互作用に不安定さをもたらすのであり、それを証明する為に本研究の提案をした。

また、その研究を実施するにあたっての方法を考慮する必要があった。研究開始当時、混合膜を非常に良く記述する粗視化モデルである、MARTINI modelが発表され、注目を集めつつあった。このモデルにはタンパク質の力場もあったが、その記述の信頼性はまだはっきりしていなかった。一方、高い精度が期待できる混合脂質の全原子モデルシミュレーションは、現実的に混合脂質の十分な平衡化が難しい事から、生体膜と混合膜の複合系の良いモデル構築が難しかった。

そこで MARTINI 粗視化モデルを利用して、全原子モデルを構築するプロトコルの開発を行なう事とした。当時の背景として、全原子モデルから粗視化モデルへの変換方法は既にあった。また、粗視化モデルから United Atom モデル(GROMOS 力場)という、全原子モデルの一步手前のモデルまでの変換ツールはあったが、全原子モデルまでの変換ツールはなかった。

2. 研究の目的

(1) 混合脂質膜と膜タンパク質の複合系のモデル構築方法の開発と提案をおこなう。具体的には全原子モデルから MARTINI 粗視化モデルに変換し、脂質分子のサンプリングを実施した後、全原子モデルを構築するプロトコルを開発する。United Atom モデルから全原子モデルへの変換 script を作成し、既存方法と接続する。また、アプリケーションの為の研究手法として当初、多次元レプリカ交

換法を用いる事を考えていた。申請者は既に replica-exchange interface program (REIN) というプログラムを作成していたが、これを用いる予定であった。REIN ソフトウェアを本研究に用いる為に温度-距離の二次元レプリカ交換シミュレーションが CHARMM C36 力場で利用できるように調整した。

(2) アルツハイマー病の原因に関連するタンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の混合脂質 (ラフト) 中での膜タンパク質の二量体機構の安定性に関する研究を実施し、混合脂質膜中のタンパク質間相互作用機構の提案を行う。当初、(1)で作成したプロトコルと REIN を用いる予定であったが、本研究開始直後、粗視化モデルの力場が改良され、非常に精度の高い長時間粗視化モデルシミュレーションができる様になり、かなりの事の理解が期待できた。また、混合脂質膜中での膜タンパク質間相互作用の研究を行う前に、膜タンパク質-脂質間相互作用の研究が必要であることがわかった。

そこで、①ラフトを想定した混合脂質膜中の膜タンパク質とコレステロールとの相互作用に関する研究と、②ラフトを想定した混合脂質膜中の膜タンパク質の association に関する研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 本研究の開始後、MARTINI model の新しい力場である Martini v2.2 および v2.2P (5/12/2012) が公開された。本研究ではこの最新の粗視化モデル力場を利用する事にした。この力場はアミノ酸の力場を改良したものであり、タンパク質の記述が非常によくなっている。

程なく、全原子モデルから粗視化モデルへの変換 script である martinize.py も公開された。そこで、このスクリプトも利用することにした。

システムセットアップ後、粗視化モデルから全原子モデルへ戻す必要があるが、粗視化モデルから United Atom モデルへの変換手順は Gromacs v3.3 を修正したものを利用する事で可能であった。

一方、United Atom モデルから全原子モデルである最新の CHARMM C36 への変換ツールが無かった。そこで、原子名対応 list を参照して原子名を全原子用に変換する、perl script を作成した。これにより全原子モデルから粗視化モデル、粗視化モデルから全原子モデルへの変換を可能とした。

本研究で開発したプロトコルの詳細は4の研究成果に記載する。

(2) APP と混合脂質膜との相互作用に関する研究は近年、非常に注目される様になってきた。出版される論文も増えてきたが、本研

究では1つの実験論文に注目した。それは、C. Sandersら(P. J. Barrette et al, Science 2012)によって、混合脂質膜中のAPPではAPPの二量体化インターフェース部位であるGly-xxx-Gly motifとLoop部分にコレステロールが結合している事をNMRスペクトロスコピーの実験で示した、という論文である。APPとコレステロールとの相互作用に関する論文であり、その脂質-膜タンパク質間相互作用の理解は申請研究の研究目的の理解には不可欠である。

そこで、MARTINI v2.2P という分極モデルを使ってAPPとコレステロール間相互作用に関する研究を実施する事にした。比較対象として、疎水性残基でできたWALP23というモデル膜タンパク質を用いた。

混合脂質膜中に9本の膜タンパク質を入れたシステムを作成した。具体的なモデル作成方法は図1および以下に記載した。

①APPをMARTINI v2.2P力場に変換した。
②APPを中心にし、ランダムにPOPC、コレステロール、スフィンゴ脂質を混ぜた。ラフト環境を想定している。
③その系に水を入れ、boxを作った。
④MDシミュレーションを実施した。
⑤膜タンパク質の横方向に脂質二重膜ができたものを採用。
⑥そのシステムを9倍にした。

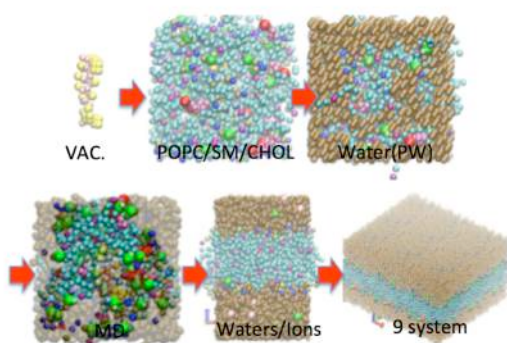


図1: システム構築方法

①の元の全原子モデルの初期構造は、APPに対してはimplicit solvent modelを用いたREMD(レプリカ交換分子動力学法)、WALP23に対してはヘリックスであると仮定しVMDにて作成した。

尚、MARTINIモデルのタンパク質の構造は、その構造が壊れない様に弾性体モデルで束縛をかけている。

①ラフトを想定した混合脂質膜中の膜タンパク質とコレステロールとの相互作用に関する研究: これらの膜タンパク質は二量体を形成しやすい事がわかっていた。膜タンパク質と脂質分子との相互作用に注目するために、二量体を形成させない様に膜タンパク質の位置を固定した。

②ラフトを想定した混合脂質膜中の膜タンパク質のassociationに関する研究: 先の膜タンパク質の位置束縛を外した。

いずれもマイクロ秒スケールのシミュレーションを実施した。結果は4の研究成果に記載する。

4. 研究成果

(1) 本研究によって開発された混合膜システム構築のプロトコルの詳細を報告する(図2)。

- ① 膜タンパク質のTM部分の構造がわかっていない場合、Implicit solvent/membrane modelなどで膜環境を用意し、REMDを用いて構造予測する。
- ② ①で得られた全原子モデルの構造をmartinize.pyを用いて、MARTINI粗視化モデルに変換する。
- ③ 脂質分子と水を配置し、粗視化モデルのMDシミュレーションを実施する。
- ④ よく混ざったらg_fg2cgを用いてUnited Atomモデル(GROMOS力場)へ変換する。
- ⑤ 本研究で作成したGRO2CHMを用いて、United Atom力場から全原子力場へ重原子の名前を変更する。
- ⑥ NAMDのpsfgenというソフトウェアを用いて全原子モデルを完成させる。

この方法により、粗視化モデルにて脂質分子の並進運動を加速させる事ができ、混合脂質膜を有効に構築する事ができる。

本研究ではGRO2CHMという座標ファイル(.gro)の原子名を変換するツールを開発した。予め原子名対応表を作成し、それに従って変換する。水素原子の追加にはpsfgenというフリーソフトウェアを用いる。

本変換プロトコルは、負電荷を持つ脂質膜中にあるAPPの構造に関する研究に用いた(図2)。また、温度-距離の二次元レプリカ交換シミュレーションがCHARMM C36力場で利用できるように調整したREIN version 1.04はISLiMのWebサイトにて更新公開した。

(現在、論文準備中である。)

粗視化→全原子モデルへの変換ツールの研究開発は世界的に注目されていた様で、同時期にMartini modelを開発したMarrinkとTielemanらのグループと競合していた。

残念ながら、彼らの変換ツールの方が先に発表された(T. A. Wassenaar et al., JCTC(2014))。彼らのツールの利点は粗視化モデルから直接全原子モデルへと変換できる点である。変換の際にはgromacsでMDを実行する。また、新しい力場に対応する場合にはトポロジーを理解した上で、変換対応表を作成する必要がある。

座標ファイルの原子名のみを変換する我々のツールの利点は、変換対応表の作成や変更が簡便である点である。

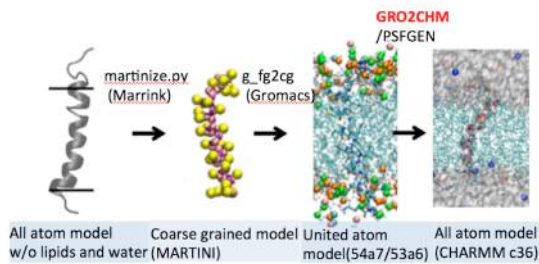


図 2：膜タンパク質・複合脂質分子システムの構築

(2) 混合脂質膜中の膜タンパク質間相互作用の研究

① ラフトを想定した混合脂質膜中の膜タンパク質とコレステロールとの相互作用に関する研究

混合膜中では、APP の近傍にコレステロールが集まり易いことがわかった(図 3)。また、特定の残基 (Gly-xxx-Gly モチーフや Loop 部位など) により結合しやすい事がわかった(図 4)。これは、C. Sandars グループによる実験結果と一致した。興味深い点は、二量体のインターフェースである Gly-xxx-Gly モチーフがコレステロールの結合部位になっている点である。では、どの様にコレステロールは Gly-xxx-Gly モチーフに結合するのであろうか。

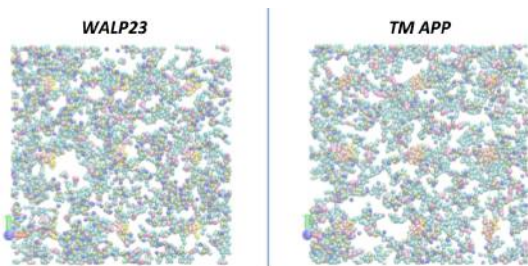


図 3：膜タンパク質まわりのスフィンゴ脂質とコレステロール。ピンク：コレステロール、緑・青：スフィンゴ脂質。POPC は除いて表示している。

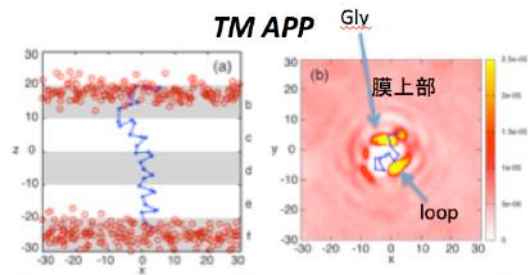


図 4：APP まわりのコレステロールの分布

まず、APP の膜貫通部位の構造は、我々による先行研究(N. Miyashita et al., JACS 2009 APP の構造予測計算)により提案された。APP の膜貫通領域近傍は transmembrane (TM) 領域だけでなく、Extra cellular 側の

Juxtamembrane (JM) 領域に小さな Helix ドメインを持つ。また、TM ドメインは2つのグリシンによるヒンジで膜の厚さにあわせて折れ曲がっている。

2012 年に C. Sandars グループの NMR による実験研究の論文発表により、Micelle 中の APP の構造が同様の立体構造をしている事が示された。また彼らは同じ論文で、混合膜中の APP の chemical shift を計測し、Gly-xxx-Gly と Loop 部位(D28)がコレステロールと強く相互作用している事を示した。

そこで、C. Sandars らは、APP の JM 領域の小さなヘリックスの配置が大きく移動して D28 が Gly-xxx-Gly と同じ方向を向いているだろうと考えた。そして、Gly-xxx-Gly モチーフと D28 にコレステロールががっちりりと結合している静的な結合モデルを提唱した。

しかし、本研究で得られた結果は、複数のコレステロールが APP にアプローチするもので(図 5)、コレステロールががっちり結合したモデルでは無かった。

常温では脂質分子の x y 方向の運動はとも流動的である。コレステロールはより小さいのでより運動しやすい。また、形や電荷の影響により膜タンパク質の特定部位にアプローチしやすい状態になっていると考えられる。APP の同じ場所に長時間結合する静的なモデルより、たくさんのコレステロールが特定部位近傍に集まるという動的モデルの方が現実的ではないだろうか。

本研究にてラフト環境中の膜タンパク質と混合脂質との相互作用は動的である事を提案した。(提案に関して、学会発表にて発表した。さらに、この提案に関する詳細論文は現在執筆中である。)

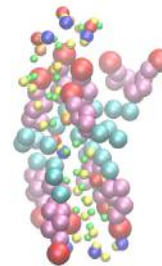


図 5：APP に集まるコレステロール。ピンク・赤：コレステロール。小さな球：APP。

② ラフトを想定した混合脂質膜中の膜タンパク質の association に関する研究

①の研究では、実験ではコレステロールが APP の二量体化インターフェースに結合し、本研究では集まりやすい事を示している。いずれにしても、コレステロールは二量体化と競合していると考えられる。では、コレステロールを含むラフト様の混合脂質環境での膜タンパク質 (APP) の相互作用はどのようなものなのか。

図6には1マイクロ秒後のスナップショットを示した。POPC のみの膜中にある APP の Association は遅く、インターフェース近傍の面がうまく向き合った際に結合が進む。一方、コレステロールを含むラフト様の膜にある APP の Association は早い。コレステロールは APP のまわりにまとわりついており、インターフェースが異なる方向を向いていても、コレステロールが二分子を引き合わせる。

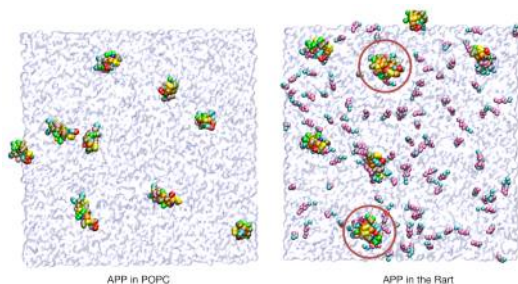


図 6:POPC 中の APP とラフト様環境中の APP。ピンク：コレステロール、オレンジ：グリシン。赤丸は二量体化した分子を表す。

本研究によるシミュレーションで、コレステロールが二つの膜タンパク質を引きつける役割を果たしている事が示された。APP の様な膜タンパク質では、コレステロールが膜タンパク質間相互作用に大きく関わり、二つの膜タンパク質を引き寄せる役割を担っているという提案ができた。

(本提案に関する論文は執筆中である。)

以上、本研究の成果として、当初の目的である、①膜タンパク質と混合脂質の全原子モデル作成プロトコルの提案と REIN の整備、および、最終目的である②混合脂質膜中での膜タンパク質間相互作用に関する提案をクオリティーの高い研究レベルで実施する事ができた。本若手(B)研究目標を達成する事ができたと言える。

得られた成果の国内外における位置づけとして、本研究の元となる実験をおこなっておりこの分野を牽引している研究者である C. Sandars ともディスカッションができ、本提案がインパクトのあるもう一つの提案である事の確認ができた。

また、今後の展望として、その一歩先の研究成果であるラフト中での膜タンパク質間相互作用、特に association にコレステロールが関わっている事を新たに示すことができ、この分野に新たな道すじをつくる事ができた。

開始当初の予定と異なる点は、偶然にも研究開始初期段階で粗視化モデルの力場が改良され、本研究の①で作成した全原子モデルの混合脂質膜環境の構築プロトコルを、②の

研究に対して使う必要がなくなった点である。新しい粗視化モデルパラメータを用いる事で目的を達する事ができた。

反省すべき点は、非常に興味深い結果が数々出てきたので、学会発表はたくさん行えたが、予定より論文執筆が遅れ、本報告書までに、論文を投稿掲載できなかった点である。今後の科研費研究などでは、研究時間配分を考えて、学会発表だけでなく、論文発表が間に合うように研究活動を行う。

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 1 件) 関連論文 (膜タンパク質間相互作用)

- ① Pai-Chi Li, Naoyuki Miyashita, Wonpil Im, Satoshi Ishido, Yuji Sugita, Multidimensional Umbrella Sampling and Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations for Structure Prediction of Transmembrane Helix Dimers, Journal of Computational Chemistry, Vol. 35, Issue 4, pp 300-308, 2013/12/1, 査読あり

[学会発表] (計 15 件)

- ① 宮下尚之, 小串典子, 杉田有治, Simulation study of the interaction between between the transmembrane region of Amyloid precursor protein and Lipids., 新学術領域研究「動的秩序と機能」第2回国際シンポジウム, 2014年1月10-11日, 京都 キャンパスプラザ京都
- ② 宮下尚之, 小串典子, 杉田有治, コレステロールと Amyloid Precursor Protein (APP) の膜貫通部位との相互作用のシミュレーション研究, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3-6日, 神戸国際会議場
- ③ 宮下尚之, 小串典子, 杉田有治, The Simulation Study of the Interaction between Transmembrane Region of Amyloid Precursor Protein and Cholesterol, 第4回 AICS 国際シンポジウム, 2013年12月2-3日, 神戸計算科学研究機構(AICS)
- ④ 宮下尚之, 小串典子, 杉田有治, The Interaction Between Transmembrane Region of Amyloid Precursor Protein (APP) and Cholesterol, ICMS2013 (3rd International Conference on Molecular Simulation), 2013年11月18-20日, 神戸国際会議場
- ⑤ 宮下尚之, 小串典子, 杉田有治, 混合脂質(ラフト)の膜タンパク質の構造・ダ

- イナミクスへの影響, 平成 25 年度「京」を中核とする HPCI システム利用研究課題中間報告会, 2013 年 10 月 2-3 日, 東京タイム 24 ビル
- ⑥ 宮下尚之, 小串典子, 杉田有治, アミロイド前駆体タンパク質とコレステロールとの相互作用, 日本生物物理学会第 51 回年会, 2013 年 10 月 28-30 日, 京都国際会館
 - ⑦ 宮下尚之, 小串典子, 杉田有治, アミロイド前駆体タンパク質 (APP) の膜貫通領域とコレステロールとの相互作用, 日本物理学会 2013 年秋季大会, 2013 年 9 月 25-28 日, 徳島大学
 - ⑧ 宮下尚之, 小串典子, 杉田有治, The Structure of Amyloid Precursor Protein In The Membrane and The Development of Replica-exchange Interface Program (REIN), Membrane Protein Folding (Biophysical Society), 2013 年 5 月 19-22 日, Seoul, South Korea
 - ⑨ 宮下尚之, 混合脂質膜(ラフト)の膜タンパク質の構造・ダイナミクスへの影響, 平成 24 年度「京」を中核とする HPCI システム利用研究課題中間報告会, 2013 年 3 月 14-15 日, 東京イイノカンファレンスセンター
 - ⑩ 宮下尚之, 李秀榮, 杉田有治, レプリカ交換分子動力学インターフェースプログラム, 「グランドチャレンジ・アプリケーションの研究開発」公開シンポジウム, 2013 年 3 月 11 日, 東京大学山上会館
 - ⑪ 宮下尚之, 李秀榮, 杉田有治, Replica-exchange Interface program: REIN, 3rd AICS International Symposium-Computer and Computational Science for exascale, 2013 年 2 月 28 日-3 月 1 日, 神戸 AICS
 - ⑫ 宮下尚之, Replica-exchange interface program: REIN, 文部科学省委託事業「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェア研究開発」, 2013 年 1 月 10-11 日, 東京大学武田ホール
 - ⑬ 宮下尚之, 李秀榮, 杉田有治, レプリカ交換インターフェース (REIN), 第 26 回分子シミュレーション討論会, 2012 年 11 月 26-28 日, 九州大学
 - ⑭ 宮下尚之, 李秀榮, 杉田有治, Replica-exchange interface program (REIN), 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012 年 9 月 22-24 日, 名古屋大学
 - ⑮ 宮下尚之, 李秀榮, 杉田有治, Replica-exchange Interface Program, 日本物理学会 2012 年秋季大会, 2012 年 9 月 18-21 日, 横浜国立大学

[その他]

ホームページ等

- ① 研究報告用の twitter サイト @nym_public
http://twitter.com/nym_public
- ② 成果の一つである GRO2CHM のダウンロードサイト
<http://github.com/yukimya/GRO2CHM>
twitter でも紹介している。
- ③ REIN のダウンロードサイト
http://www.islim.org/islim-dl_j.html
M-2 REIN-K

6. 研究組織

研究代表者

宮下 尚之 (MIYASHITA Naoyuki)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号: 20452162