

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05594

研究課題名(和文)多量体型イオンチャネルのゲーティング原理の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the ion channel gating

研究代表者

森 貴治 (MORI, Takaharu)

国立研究開発法人理化学研究所・杉田理論分子科学研究室・研究員

研究者番号：90402445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,500,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質は一般的に巨大な生体分子であるため、チャネルの開閉のような大きな構造変化を調べるためには通常分子動力学計算法では難しく、効率の良い手法の開発が必要である。本研究では、1. 多次元表面張力レプリカ交換法、2. 膜環境を模倣した新規連続体近似モデル、3. クライオ電顕フィッティング計算の高速計算アルゴリズムの開発を行った。これら手法を用いて3量体型イオンチャネル P2X4 受容体のシミュレーションを行い、その開閉機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Since membrane proteins are large biomolecular systems, it is difficult to simulate their large conformational changes like gating of ion channel proteins by using conventional methods. To solve such problems, we developed new methods such as the multi-dimensional replica-exchange method, implicit solvent model, and parallel computing algorithm for cryo-EM flexible fitting. By using these methods, we simulated the P2X4 receptor, and elucidated the molecular mechanisms of the channel gating.

研究分野：生物物理

キーワード：分子動力学 膜タンパク質 イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

細胞の外側を取り囲む細胞膜には、チャネルやポンプ、トランスポーターなどの膜タンパク質が存在し、これらのタンパク質は細胞膜を隔てた物質輸送やシグナル伝達などの重要な役割を担っている。遺伝情報の約30%が膜タンパク質であり、また、膜タンパク質は創薬の重要なターゲットでもあるため、その立体構造と機能メカニズムの解明が盛んに行われている。近年、X線結晶構造解析や核磁気共鳴分光法、電子顕微鏡などの構造解析技術の発展により、膜タンパク質のような結晶化が困難な生体分子に対しても高解像度の立体構造情報が得られるようになってきた。しかしながら、これらの実験手法から得られる構造はあくまでタンパク質の静止像であり、反応サイクルにおけるタンパク質のダイナミックな構造変化と機能発現の相関を調べることは未だ難しい。

2. 研究の目的

膜を隔ててイオンを受動輸送する膜タンパク質はイオンチャネルと呼ばれており、これまでに様々な種類のチャネルタンパク質の立体構造が解かれてきた。その中でも、多量体から構成されるイオンチャネルがいくつか報告されており、例えば、P2X₄、NaK、MscL チャネルは、それぞれ3、4、5量体から構成され、リガンド結合や外部刺激に応答して膜貫通ヘリックスが傾くことで、チャネルの開閉を実現している。多量体型イオンチャネルは、アミノ酸配列に相同性が無いにもかかわらず、いずれもモノマーが対称的に構造変化、すなわち膜貫通ヘリックスが傾き、ポアサイズを変化させることでイオンの選択的透過性を制御している。同様の構造変化を起こすという共通性があるため、多量体構造そのものに機能発現に関する基本原理があると考えられる。本研究では、多量体型イオンチャネルの構造変化を、分子シミュレーションにより解析し、イオンチャネル開閉のメカニズムを解明することを目指す。

3. 研究の方法

膜タンパク質は一般的に巨大な生体分子であるため、チャネルの開閉のような大きな構造変化や自由エネルギーを調べるためには通常の分子動力学計算法では難しく、効率の良い手法の開発が必要である。本研究では、①多次元表面張力レプリカ交換法、②膜環境を模倣した新規連続体近似モデル、③クライオ電顕フィッティング計算の高速計算アルゴリズムの開発を行い、これらの手法を用いて多量体型イオンチャネルの開閉シミュレーションを行った。

①多次元表面張力レプリカ交換法

細胞膜は膜タンパク質やリン脂質、糖脂質、コレステロールなど様々な生体分子から構成される多成分系である。複雑かつランダム

な構造を有する細胞膜の動的性質を調べる方法として分子動力学シミュレーションが広く用いられているが、従来の手法では、シミュレーション中に系が自由エネルギー地形の局所ミニマム状態に陥りやすく、初期構造付近の状態ばかりをサンプリングしてしまう問題がある。

本研究では、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(REMD)に基づき新規手法を開発した。REMD法とは、対象とする系のレプリカを複数用意し、並列に計算しながらシミュレーションのある時間ステップ毎にレプリカ間で温度などのパラメータを交換する方法である。我々は、生体膜系に適用できる手法として表面張力REMD法を開発した。これは、膜界面にかかる表面張力をレプリカ間で交換する方法である。表面張力は膜の表面積を小さくしようとする力であるため、シミュレーション中で表面張力を交換することで、膜を平面方向に対して自由に変形できる。本研究では温度と表面張力を2次的に交換できる手法を新たに開発した(図1)。

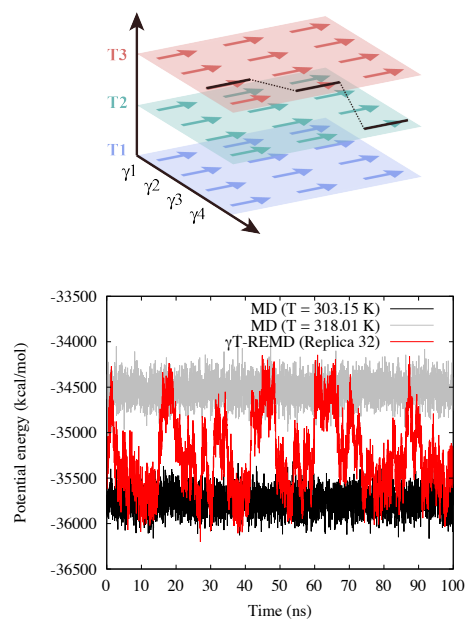


図1 2次元表面張力レプリカ交換法

②膜模倣環境の連続体近似モデル

膜タンパク質は主に脂質二重膜中で機能を発現するが、構造解析などの実験では界面活性剤を用いて構造を安定化させる。界面活性剤は水中で球状のミセルを形成し、疎水部分を膜タンパク質に向けて膜貫通ドメインを取り囲むことから膜環境を模倣していると考えられている。一方、これまでのNMR構造解析研究において、ミセル中と脂質二重膜中で膜タンパク質の構造が大きく異なるケースが多く報告されており、ミセル環境は必ずしも膜環境を模倣するとは言えない。従って、構造解析において、このような膜環境

のアーキファクトを知ることは、細胞膜中での構造と機能の関係を理解する上で必要不可欠である。

膜タンパク質の二重膜中とミセル中での構造の相違を調べる上で、MDシミュレーションが有効である。しかしながら、全原子モデルを用いた計算では、ミセル形成や平衡化に時間がかかり、計算コストも大きい。計算コストを削減する方法として、陰的溶媒モデルがよく用いられる。これは、真空中の溶質のエネルギー関数に溶媒和自由エネルギー項を加えて計算を実行する方法である。これまでに平面膜モデルは考案されているが、ミセルを表現するようなモデルは無かった。そこで、本研究では、陰的溶媒モデルとしてミセルモデルを新たに考案した。

③クライオ電顕フィッティングの高速計算

近年、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法によるタンパク質の立体構造解析が大きな注目を集めている。クライオ電子顕微鏡とは、精製したタンパク質を含む溶液を極低温にまで冷却し、電子線を照射することにより、タンパク質の溶液中での2次元画像を観察する方法である。得られた画像には、タンパク質がランダムな配向で写っているため、これらの2次元像を分類、重ね合わせをすることにより、最終的に3次元密度マップを得る。単粒子解析法は、タンパク質試料の結晶化を必要としないため、従来、X線結晶構造解析で解くことが困難であったリボソームなどの巨大な生体分子や膜タンパク質複合体の構造を、近原子分解能で決定することができる。

電子顕微鏡により得られた近原子分解能の3次元密度マップからタンパク質の原子構造をモデリングするためには、既知のX線結晶構造やNMR構造を密度マップに合理的にフィッティングする方法が有効である。このとき、分子動力学計算を用いた方法がよく用いられ、エネルギー関数に、密度マップを再現するようなバイアスポテンシャルを加えてMD計算を実行する。バイアスポテンシャルには、実験により得られた密度マップと原子座標から理論的に計算される密度マップとの相関係数がよく用いられ、理論密度マップは各原子にガウス関数を置き、各ボクセル内ですべての原子からの寄与を積算することで求められる。しかしながら、この方法では、全ボクセル内の密度を計算しなければならないため、計算コストが膨大になる。本研究では、このような問題を解決することを目的として、電顕像フィッティングの新しい並列計算法を提案した(図2)。

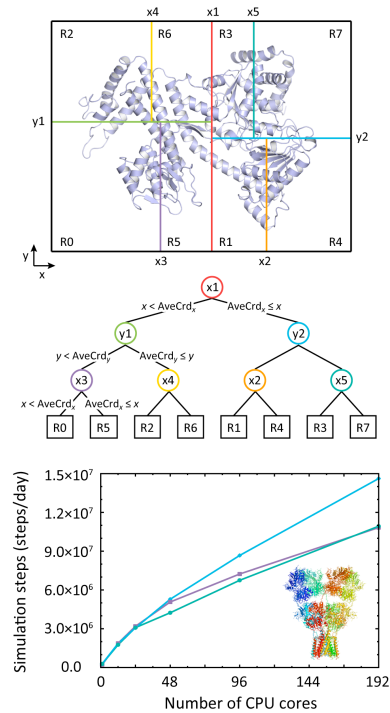


図2 クライオ電顕フィッティングの高速計算アルゴリズムの概要とベンチマーク結果

4. 研究成果

開発した手法を用いて、P2X₄受容体を対象にクライオ電子顕微鏡像フレキシブルフィッティング法によるイオンチャネルの開閉シミュレーションを行った。P2X₄レセプターとは、シナプス伝達に重要な役割を果たしている膜タンパク質で、水溶性ドメインにATPが結合することによって膜貫通ドメインが開閉し、ナトリウムやカリウム、カルシウムイオンなどを透過させる3量体型のイオンチャネルである。チャネルが開閉する際、膜貫通ヘリックスは傾きながら外側に3オングストローム程度シフトする。本研究では、閉じた構造から出発し、開いた状態のクライオ電子顕微鏡像をターゲットとして、水と脂質分子を露に含んだ全原子モデルによるクライオ電顕フィッティングシミュレーションを行った。その結果、X線結晶構造に見られるようにヘリックスは外側にシフトし、チャネルがもっとも狭い部分の半径は0.3オングストロームから3.2オングストロームまで拡大し、膜貫通領域内において水分子がチャネルを形成する様子が見られた。各サブユニットの膜貫通ヘリックスはほぼ同時に開いていた。また、チャネルが形成する際、膜貫通領域には真空のような状態はなく、水分子は開くと同時に瞬間的に膜の内側と外側を接続することが分かった。また、得られた構造をX線結晶構造と比較すると、RMSDはわずか1.1オングストロームであり、X線結晶構造は水分子を透過させる開状態であることも実証した。

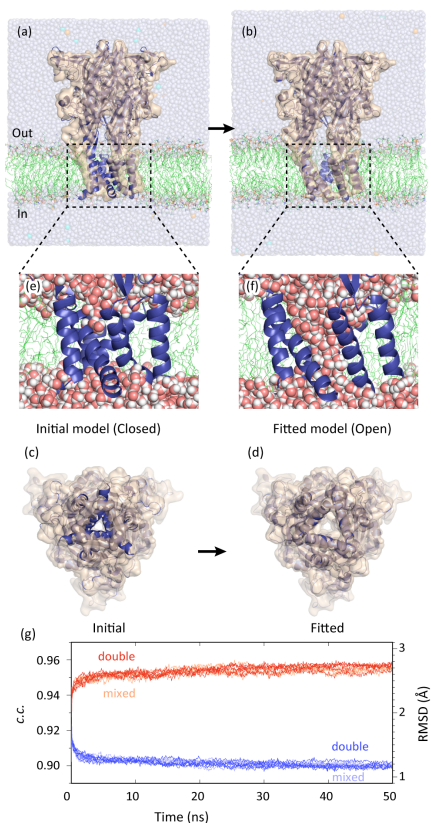


図3 クライオ電顕フィッティング計算による P2X₄ 受容体の開閉シミュレーション

従来の X 線結晶構造解析では、イオンチャネルの閉じた状態が多く解かれ、不安定な開状態の構造はほとんど解かれてこなかった。近年、クライオ電顕を用いた単粒子解析法により、タンパク質の近原子分解能の構造が解かれるようになり、イオンチャネルの開状態が解かれ始めた。本研究により、フィッティングシミュレーションと全原子モデルを用いてチャネルの開閉運動を再現できた。膜タンパク質のクライオ電顕実験では、膜環境としてミセルを用いる場合が多い。本研究において開発した手法を組み合わせることで様々な膜タンパク質系の構造モデリングやそれに基づく機能の解析が今後期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. Chigusa Kobayashi, Jaewoon Jung, Yasuhiro Matsunaga, Takaharu Mori, Tadashi Ando, Koichi Tamura, Motoshi Kamiya, and Yuji Sugita, “GENESIS 1.1: a hybrid-parallel molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms on multiple computational platforms”, *J. Comput. Chem.*, 38, 2193-2206 (2017). 査読有り

2. Arata Furukawa, Kunihito Yoshikaie, Takaharu Mori, Hiroyuki Mori, Yusuke V. Morimoto, Yasunori Sugano, Shigehiro Iwaki, Tohru Minamino, Yuji Sugita, Yoshiki Tanaka, and Tomoya Tsukazaki, “Tunnel formation inferred from the I-form structures of the proton-driven protein secretion motor SecDF”, *Cell Reports*, 19, 895-901 (2017). 査読有り

〔学会発表〕 (計 18 件)

1. 『タンパク質複合体のクライオ電顕像フィッティングシミュレーションの並列化および高速化』森貴治, Marta Kulik, 宮下治, Jaewoon Jung, Florence Tama, 杉田有治, 日本物理学会 2018 年春季大会 東京理科大学 (千葉県野田市) 2018/3/23
2. 『クライオ電子顕微鏡像フィッティングシミュレーションの新規並列計算法の開発』森貴治, Marta Kulik, 宮下治, Florence Tama, 杉田有治, 第 31 回分子シミュレーション討論会 金沢商工会議所 (石川県金沢市) 2017/12/1
3. 『プロトン透過が関与する膜タンパク質の動作原理の解明』森貴治, 第 4 回 HPCI 成果報告会 コクヨホール (東京都品川区) 2017/11/2
4. 『拡張アンサンブルシミュレーションによる膜輸送体の動作原理の解明』森貴治, 第 4 回 HPCI 成果報告会 コクヨホール (東京都品川区) 2017/11/2
5. 『新規連続体近似モデルを用いた膜タンパク質のシミュレーション』森貴治, 杉田有治, 日本物理学会 2017 年秋季大会 岩手大学 (岩手県盛岡市) 2017/9/22
6. 『クライオ電子顕微鏡像フィッティングのための新規 MD 法の開発と応用』森貴治, 宮下治, Marta Kulik, Florence Tama, 杉田有治, 第 55 回日本生物物理学会 熊本大学 (熊本県熊本市) 2017/9/20
7. “Efficient parallel computation for flexible fitting of cryo-EM density map”, Takaharu Mori, Osamu Miyashita, and Yuji Sugita, *Biophysical Society Thematic Meeting “Conformational Ensembles from Experimental Data and Computer Simulations”*, ドイツ ベルリン, 2017/8/27
8. 『膜模倣環境の膜タンパク質構造への影響を評価する新規シミュレーション法の開発』森貴治, 杉田有治, 第 17 回 日本蛋白質科学会年会 仙台国際センター (宮城県仙台市) 2017/6/22
9. 『ミセル連続体モデルの開発と膜タンパク質のシミュレーション』森貴治, 杉田有治, 日本膜学会第 39 回年会 早稲田大学 (東京都新宿区) 2017/5/26
10. 『新規 Implicit membrane モデルの開発と膜タンパク質系への応用』森貴治, 杉

- 田有治, 日本物理学会第 72 回年次大会
大阪大学 (大阪府豊中市)、2017/3/20
11. 『分子シミュレーションによるプロトン駆動モーター SecDF のプロトン透過経路の探索』森貴治、田中良樹、吉海江国仁、塚崎智也、杉田有治、第 42 回日本生体エネルギー研究会 名古屋工業大学 (愛知県名古屋市)、2016/12/19
 12. 『分子シミュレーションによるタンパク質透過チャネル因子 SecG の構造揺らぎの解析』森貴治、塚崎智也、杉田有治、日本物理学会 2016 年秋季大会 金沢大学 (石川県金沢市)、2016/9/16
 13. 『タンパク質透過チャネル SecYEG における SecG の役割 -分子動力学計算によるアプローチ-』森貴治、塚崎智也、杉田有治、第 16 回日本蛋白質科学会年会 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)、2016/6/7
 14. 『拡張アンサンブル法の混合脂質二重膜系への応用』森貴治、杉田有治、第 29 回分子シミュレーション討論会 朱鷺メッセ (新潟県新潟市) 2015/11/30
 15. “Replica-exchange molecular-dynamics simulations of mixed lipid bilayer systems”, Takaharu Mori and Yuji Sugita, Biophysical Society Thematic Meeting “Biophysics of Proteins at Surfaces: Assembly, Activation, and Signaling”, スペイン マドリッド, 2015/10/14
 16. “Multidimensional surface-tension replica-exchange molecular-dynamics simulations of biological membranes”, Takaharu Mori and Yuji Sugita, Supercomputational Life Science 2015, 東京大学 (東京都文京区), 2015/10/20
 17. 『表面張力レプリカ交換法による生体膜構造の分子ダイナミクス解析』森貴治、第 2 回 「京」を中核とする HPCI システム利用研究課題 成果報告会 日本科学未来館 (東京都江東区)、2015/10/26
 18. 『膜タンパク質-脂質相互作用の定量的解析法の開発と応用』森貴治、杉田有治、第 53 回生物物理学会年会 金沢大学 (石川県金沢市)、2015/9/15

[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]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 貴治 (MORI, Takaharu)

国立研究開発法人理化学研究所・杉田理論

分子科学研究室・研究員

研究者番号 : 90402445