

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05246

研究課題名(和文) ファネル気体モデルによる細胞内混み合い環境下でのタンパク質複合体形成

研究課題名(英文) Funnel-gas model for studying protein complex formations under crowded environment

研究代表者

菊池 誠 (Kikuchi, Macoto)

大阪大学・サイバーメディアセンター・教授

研究者番号：50195210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：分子混雑条件下でのタンパク質折れたたみと複合体形成を計算するための新しい粗視化モデルとして、タンパク質をファネル的エネルギー構造を持つ粒子として扱う「ファネル気体モデル」を提案した。理論面では、混雑粒子の排除体積効果だけを取り入れるとその効果はタンパク質の有効自由エネルギーに厳密に繰り込まれた。この理論をモデルタンパク質に適用し、混雑粒子が体積の大きな変性状態を抑制し、天然構造が安定化されることを明らかにした。また、天然変性タンパク質 シヌクレインの繊維形成が分子混雑で促進されることを示した。さらに、構造ネットワークモデルを提案し、変異に頑健なファネル構造を持つ天然構造は少ないことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は複雑な分子であるため、熱平衡状態の計算は現在の計算機をもってしても難しい。特に繊維形成などタンパク質が複合体を形成する機構を調べるためには、計算量が少ない粗視化モデルが必要である。本課題ではタンパク質をひとつの粒子として扱いつつ、その特徴である「ファネル的エネルギー構造」を取り入れたモデルを提案した。このモデルでは現実の細胞環境で重要となる分子混雑の効果がタンパク質の有効自由エネルギーに繰り込まれるため、少ない計算量で複合体形成をシミュレーションでき、様々な応用が期待できる。その一例として、天然変性タンパク質の繊維形成機構を調べ、実験結果の解釈への示唆を行ったのは重要な結果である。

研究成果の概要(英文)：As a new coarse-grained protein model for investigating the folding and complex formations under the crowded environment, we proposed "funnel-gas model", in which proteins are treated as particles having funnel-like energy structures.

Firstly, we found theoretically that the excluded-volume effect of the crowded molecules can be taken into account rigorously in the effective free energy of proteins. Applying this theory to two model proteins, we showed that the crowded molecules suppress the extended conformations among the denatured states and as a result the native conformations are stabilized. Secondly, using the model, we showed that the fibril formation of alpha-synuclein is enhanced by the molecular crowding effect. Finally, we proposed a random structural network model for describing the protein folding, and showed that the native states which have mutationally robust funnel-like energy structures are very rare.

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質折れたたみ 天然変性タンパク質 ファネル描像 シヌクレイン 分子混雑 繊維形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の折れたたみを説明する理論として、1990年代に「ファネル描像」が提唱された。これは大きな成功を収め、基本的に正しいものと考えられている。本課題の大前提となったのがこのファネル描像であった。

単体の折れたたみだけが問題ではなかった。多くのタンパク質が生体内で機能を果たすためにタンパク質複合体を形成する。中でも天然変性タンパク質の複合体形成は興味を引いていた。また、多数のタンパク質が繊維状に重合するものの中にはアミロイド病の原因と見られるタンパク質もあり、複合体や繊維形成のメカニズムに関心が持たれていた。また、細胞内の環境は多くの生体高分子で混み合っており、これがタンパク質の折れたたみや結合に影響すると考えられていた。したがって、特に細胞内でのタンパク質複合体形成を考える際にはこの混み合いの効果を考慮する必要があった。

いっぽう、第一原理的な分子動力学計算によって多数のタンパク質と混み合い分子とを含む系を計算することは計算量の観点から今も絶望的である。そこで、タンパク質を単純化した粗視化モデルが必要となる。特に多数のタンパク質を含む系で混み合い効果まで考慮するには、非常に単純化したモデルが求められていた。タンパク質を点で表す格子気体モデルを使った研究もあったが、我々は格子モデルに内部自由度としてファネル的なエネルギー構造を取り入れることが重要だと考えた。

### 2. 研究の目的

本課題の目的は「ファネル気体」と名付けた新しい粗視化モデルを提案し、それを用いて混雑環境下でのタンパク質の折れたたみや複合体形成を議論することである。このモデルではタンパク質全体をひとつまたは数個の球にまで単純化し、更に、各球に内部自由度としてファネル的なエネルギー構造を与える。このモデルの理論的な構築が第一の目的である。次に、このモデルを用いて単体のタンパク質折れたたみに対する分子混雑効果を議論する。また、アミロイド繊維を形成する天然変性タンパク質の代表として、パーキンソン病の関連タンパクである $\alpha$ シヌクレインを取り上げ、その繊維形成に対する分子混雑の効果を議論する。さらに、当初目的にはなかったことであるが、研究を進める中でファネル構造を取りやすい天然構造とその変異に対する頑健性とは関係することに気づき、変異に対して頑健な構造の探求も目的に加えることとした。

### 3. 研究の方法

ファネル気体モデルの理論的基礎づけは統計力学に基づいた計算によって行った。また、実際のタンパク質をもとに具体的なファネル気体モデルを構築するにあたっては、タンパク質の自由エネルギーランドスケープが必要だが、そのためには我々が提唱したMSOE法にもとづくモンテカルロシミュレーションを行った。ファネル気体モデルを用いた多体系の計算にはモンテカルロシミュレーションを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) ファネル気体モデルの構築

まず、細胞内混雑条件下での天然変性タンパク質の構造形成をシミュレーションすることを目的として、新たな粗視化モデルとして、ファネル気体のプロトタイプモデルを構築した。天然変性タンパク質は単体でとりうる構造のすべてが変性状態であり、それが集合して繊維や多

量体を形成するときのみ決まった構造をとると考えられる。これを格子気体モデルで表すため単体では天然変性を反映して数格子点を占め、かつ特定の構造を取らないことを反映して余分の内部エントロピーを持つのにに対し、構造形成時には 1 格子点のみを占め、かつエントロピーを持たないものとした。このような粒子を含む系に混雑分子を導入する。混雑分子が 1 格子点を占め、排除体積効果のみを持つという簡単なモデルを設定して、タンパク質分子は正準集合、混雑分子は大正準集合で扱おうと、混雑分子の化学ポテンシャルが厳密にタンパク質のエントロピーに繰り込まれ、そのような有効エントロピーを持つタンパク質だけからなる系と数学的に等価であることがわかった。これにより、多数の混雑分子と多数の天然変性タンパク質を含む系の熱平衡状態が少ない計算量でシミュレーションできるようになった (J.Chem.Phys. に論文発表済み )。

次に、このようなモデルを一般の折れたたむタンパク質に適用するため、モデルを拡張し自由エネルギー構造を取り入れた格子気体とした。さまざまな体積と自由エネルギーを持つ内部状態があるとして、前と同様にタンパク質の正準集合と混雑分子の大正準集合を組み合わせることにより、混雑分子の効果として排除体積効果のみを考える限り、混雑分子とタンパク質とを含む系が混雑分子を含まない系に厳密に変換できることが示された。この時、混雑分子の効果は各内部状態の自由エネルギーを有効自由エネルギーと置き換えることで完全に取り込める。この有効自由エネルギーは元の自由エネルギーに内部状態の体積と混み合い分子の濃度とで決まる補正項を加えた簡単なものである。

つまり、タンパク質と混雑分子からなる多体系は、体積ごとに異なる補正項を付け加えた有効自由エネルギーを持つタンパク質多体系と等価である。混雑分子を極度に単純化したとはいえ、このような定式化が統計力学的に厳密に行えることを示したのは重要な成果である ( 国際会議で発表済み。論文準備中 )。

## (2) $\alpha$ シヌクレインの繊維形成

天然変性タンパク質である  $\alpha$  シヌクレインはパーキンソン病の関連タンパク質として知られており、 $\alpha$  シヌクレインで作られたアミロイド繊維はパーキンソン病の病態のひとつであるレビー小体の構成要素となっている。いっぽう、 $\alpha$  シヌクレインが生理条件下で安定な 4 量体を作る可能性が実験的に指摘され、アミロイド繊維形成を阻害する可能性があるとして注目されているが、現時点では 4 量体の存在自体が決着していない問題となっている。我々はこの  $\alpha$  シヌクレインの繊維形成メカニズムを明らかにするために、(1) で述べたファネル気体のプロトタイプモデルを用いて、モンテカルロ・シミュレーションを行った。 $\alpha$  シヌクレイン粒子は天然変性状態のほかにアミロイドを形成しうる  $\beta$  ヘアピン状態と 4 量体を形成しうる  $\alpha$  ヘリックス状態に状態変化できるとした。二次元格子上に  $\alpha$  シヌクレイン粒子と混雑分子を多数置いて、その熱平衡状態を調べた結果、以下の 2 点が明らかになった。(i)  $\alpha$  シヌクレインの繊維形成は  $\alpha$  シヌクレインと混み合い分子いずれの濃度を上げても促進される(ii) 4 量体が観測されるかどうかは混み合いの程度によって変わる。特に (ii) は、4 量体が存在するかどうかを実験的に決着していない理由を分子混雑によって説明する重要な成果である (J.Chem.Phys. で論文発表済み )。

## (3) タンパク質折れたたみに対する分子混雑の効果

ファネル気体モデルに対して導出された有効自由エネルギーの式が一般のタンパク質のモデルでも近似的に成り立つものとみなすと、タンパク質の折れたたみ問題に適用できる。つまり、混雑分子がないときのタンパク質の自由エネルギーランドスケープが求められていれば、分子混雑効果を取り入れた時の自由エネルギーランドスケープはファネル気体モデルの式から求め

られる。一般に分子混雑はタンパク質の折れたたみを促進すると考えられているが、それを自由エネルギーランドスケープの変化として理解できるわけである。

我々はそれを示す目的で、簡単な格子・郷モデルを用いてモデルタンパク質の自由エネルギーランドスケープを計算した。具体的にはアップダウン・ベータバレルと 4ヘリックス・バンドル構造を取るモデルを対象とし、我々が開発した MSOE 法によって混雑分子がない場合の自由エネルギーランドスケープを求めた。これに上記の体積依存補正を加えることにより、混雑分子存在下での有効自由エネルギーランドスケープを求めた。結果として、混雑分子の濃度が上がるにつれて変性状態の中でも体積が大きな構造が不安定化し、それによって実効的に天然構造が安定化することが示された。この結果は分子混雑がタンパク質折れたたみに与える影響の最も簡単な表現であると考えている（国際会議発表済み。論文準備中）。

#### (4) 変異に対して頑健なファネル構造

ファネル気体モデルの前提となっているのは Wolynes らによるファネル描像である。これはもともとランダムエネルギーモデルをもとに提唱されたが、その議論ではタンパク質の構造は捨象されている。いっぽう、ファネル気体モデルでは各状態の体積と自由エネルギーの関係が重要な役割を果たすことがわかったので、あらためて構造を取り入れた議論が必要と考えられた。そこで、当初の計画には含まれていなかった問題であるが、一般的にファネル的なエネルギー構造を取りやすい天然構造とはどのようなものであるかを考察することにした。

分子動力学の解析では、構造間の遷移をネットワークで表現するマルコフ状態モデルが使われる。それをヒントに、ひとつの天然構造に対して可能な構造の遷移をランダムネットワークで表現し、その各ノードにランダムにエネルギーを割り当てるモデルを構築した。ランダムネットワーク上のランダムエネルギーモデルである。このモデルに対して、平衡統計力学の手法であるマルチカノニカル法を適用し、各天然構造ごとにファネル的なエネルギー構造が実現するエネルギーの割り当て方を数え上げた。すると、ファネル的になりやすい天然構造は非常に稀であることが明らかになった。これはアミノ酸の変異に対して頑健なファネル構造はごく少数であることを示唆する。タンパク質の天然構造の種類はタンパク質そのものの種類に対して圧倒的に少ないことが知られているが、我々の結果から、その理由が変異に対する頑健性であることが考えられる（国際会議発表済み。論文準備中）。

#### (5) 変異に対して頑健なネットワーク構造

(4) の結果から変異に対する頑健性が重要な概念であることが浮かび上がった。そこで、少し問題を変え、タンパク質を介して遺伝子同士が相互作用しあう遺伝子制御ネットワークについても頑健性を検討した。(4) と同様にマルチカノニカル法を用いて、適応度の高いネットワークの出現率を調べたところ、適応度の高いネットワークは極めて稀であり、かつ変異に対して強い頑健性を持つことを示唆する結果が得られている。稀ではあるが変異に対して頑健という点でタンパク質のファネル構造と類似した性質があると考えられ、タンパク質と合わせて研究を進行中である（一部を国際会議で発表済み）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. Nobu C. Shirai and Macoto Kikuchi: “The interplay of intrinsic disorder and macromolecular crowding on  $\alpha$ -synuclein fibril formation”, J.Chem.Phys. Vol.144 (2016)055101, doi:10.1063/1.4941054 (査読あり)

〔学会発表〕（計 7 件）

1. Macoto Kikuchi: “Robustness against Fluctuations and Mutation in Gene Regulatory Network”, APEF2018, 2018
2. Macoto Kikuchi: “Simultaneous Emergence of Cooperative Response and Mutational Robustness in Gene Regulatory Network”, Conference on Complex Systems 2018, 2018
3. Macoto Kikuchi: “Exploring the Fitness Landscape and Emergence of Mutational Robustness in Gene Regulatory Network”, ALIFE2018, 2018
4. Macoto Kikuchi: “Funnel Gas Model for Protein Many-Body Systems under the Crowded Environment”, 62th Biophysical Society Meeting, 2018
5. Macoto Kikuchi: “Finding Protein Folding Funnels in Random Networks”, Conference on Computational Physics 2017, 2017
6. Macoto Kikuchi: “Finding Protein Folding Funnels in Random Networks”, Dynamic Days Asia Pacific 2016, 2016
7. Nobu C. Shirai and Macoto Kikuchi: “ The interplay of intrinsic disorder and macromolecular crowding on  $\alpha$ -synuclein fibril formation”, 60th Biophysical Society Meeting , 2016

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：白井伸宙

ローマ字氏名：(Nobu C. Shirai)

研究協力者氏名：多田吉克

ローマ字氏名：(Yoshikatsu Tada)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。