

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K18365

研究課題名（和文）膜貫通ヘリックス会合体の分子動力学計算を指標とした新規チャンネルペプチドの創製

研究課題名（英文）Folding-mechanism-based design of self-assembling channel peptides aided by molecular dynamics simulations

研究代表者

新津 藍 (Niitsu, Ai)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・基礎科学特別研究員

研究者番号：10791064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膜蛋白質の折り畳みにおいて最も基礎的な現象である膜貫通ヘリックスの会合メカニズムに焦点を当て、脂質二重膜中における人工設計ヘリックスペプチドの会合過程を構造モデリングおよび分子動力学計算によって解析した。さらに計算結果に基づいてアミノ酸配列を再設計したペプチドを合成し、構造・機能解析を行う実験条件の最適化を実施した。これにより、天然では見られない安定性を持つ人工設計ペプチド会合体の脂質二重膜との相互作用について新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた人工設計ヘリックスペプチド会合体と脂質二重膜の相互作用に関する新たな知見は、タンパク質の折り畳みを理解することに加えて未だ黎明期にある人工膜タンパク質の実現に寄与する。また新たに設計したペプチドは新規生体分子材料として利用可能であり、工学的応用を通して研究成果を社会に還元できると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study focuses on the association mechanism of transmembrane α -helices, the most fundamental phenomenon in membrane protein folding. The assembling process of rationally designed α -helix peptides in lipid bilayers was analysed by using structural modelling and molecular dynamics simulations. Based on the simulation results, peptides with redesigned amino acid sequences were synthesised, and their experimental conditions for structural and functional analyses were optimised. The obtained results provide new insights into the interaction of the highly stable designed peptide assemblies with lipid bilayers.

研究分野：生物物理学

キーワード：膜ペプチド 分子動力学 膜タンパク質設計

1. 研究開始当初の背景

細胞の脂質二重膜中に存在する膜タンパク質は細胞内外の物質移動や細胞間コミュニケーションで重要な役割を担う。タンパク質の機能はその立体構造によって決定される。したがって、タンパク質がアミノ酸の直鎖上配列から立体的に折りたたまれ、機能を発現するに至る、折り畳み機構を知ることがタンパク質機能の理解に重要である。しかしながら、水溶性タンパク質に比べ、膜タンパク質は高分解能(原子レベル)の構造情報が格段に少ないために、折り畳み機構の理解は未だ進んでいない。

そのような状況を打破する一つの方法が、人工タンパク質の設計である[1]。ここで人工タンパク質の設計とは、目的の立体構造(=機能)に折り畳まれるようにアミノ酸の一次配列を設計することを指す。タンパク質の設計には折り畳み機構の理解が不可欠であり、また設計したタンパク質の構造分析を通して折り畳み機構のさらなる理解を深めることができる。さらに望みの立体構造を持つような設計タンパク質は、新たな生体材料として利用可能であり、タンパク質の設計研究は幅広い工学的応用も射程に入れることができる。

そこで本研究では、膜タンパク質の折り畳みにおいてもっとも基礎的な現象である α ヘリックスの会合に焦点を当て、脂質二重膜中で自己会合する α ヘリックスペプチドの設計とその会合過程の解明を目指す。これに関し、我々はこれまでに、人工脂質二重膜に貫通し自己会合して中心に非選択的にイオンを伝導するチャネルを持つ筒型構造を形成する、 α ヘリックスペプチド(cWza ペプチド)を開発した[2]。cWza ペプチドは、従来報告されてきたチャネルを形成するペプチドには例を見ない、非常に安定な筒型 8 量体を形成することがこれまでの電気化学実験(一分子チャネル電流測定法)および分光分析(円偏光二色性スペクトル、分析超遠心等)から明らかとなっている。しかしながらその 8 量体の詳細な形成機構に関しては、電気化学実験の結果をもとにしたモデルを提唱するにとどまっている。本研究においては、実験的に観測が難しい動的な cWza ペプチドの会合過程を、分子動力学法により明らかにする。さらに得られた計算結果をもとにして、より単純化・最小化された次世代 cWza ペプチドを設計する。これにより、cWza ペプチドの会合に必要な不可欠なアミノ酸残基の種類と数を明らかにする。

先行研究において、チャネルを形成する膜貫通 α ヘリックスペプチドを対象とした実験による構造解析と分子動力学法による会合機構の分析は報告があるものの、対象の会合体自身の安定性が極めて低いために十分な情報を得ることは難しかった。これに対し本研究で標的とする cWza ペプチドの会合体は非常に高い安定性を持つ。したがって本研究は、従来では得られなかった膜タンパク質の折り畳み機構、特に α ヘリックスの脂質二重膜中での会合に関する新たな知見を与えると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、脂質二重膜に貫通して自己会合する人工 α ヘリックスペプチドの分子動力学計算による会合過程の分析とペプチド配列の再設計を通し、膜内 α ヘリックス会合機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、理論計算と実験を相補的に用いて、人工設計 α ヘリックスペプチドの会合機構の分析と、ペプチドの再設計を以下のように行う。

(1) これまでの実験から得られたペプチド会合体の静的構造情報をもとにして、計算機を用いて分子動力学法によりペプチド会合体形成の動的構造解析を実施する。

(2) 計算結果を利用した次世代ペプチドの再設計とペプチドの合成、構造・機能分析を行い、計算結果を検証する。

4. 研究成果

(1) 分子動力学計算による cWza ペプチドの会合過程の解析

本課題では、①膜内で会合したモデル構造、②ペプチドが水層から脂質二重膜に結合する過程、に注目して計算を行った。①について、cWza の設計の基礎である Wza タンパク質の結晶構造を基にしたペプチド筒型 8 量体の構造モデルを作製し、脂質二重膜中での分子動力学計算を実施した(図 1)。200ns の計算でペプチド会合体の構造が平衡化し、安定にその構造を保つことを確認した。また先の研究において実施した計算結果との比較から、構造モデルの安定性が計算に使用する力場に大きく依存することが明らかとなった。②について、ペプチドの膜結合は通常的全

原子分子動力学計算では観測されなかったため、ペプチドおよび脂質のダイナミクスを加速できる計算方法の検討を行った。その結果、短い脂質と有機溶媒を組み合わせることで脂質の拡散が加速される膜モデルが最も効率的な方法であるという結論に達した。そこでこの計算方法を用いて α ヘリックスペプチドが膜に対して異なる配置となるように4種の初期構造を準備し、各200ns計12本の独立した計算を実施した。計算結果の解析から膜に接触する際に鍵となるペプチド部位が示唆され、また膜表面結合時の安定構造が得られた。今後①および②で得られた構造を初期構造として利用することで、2状態を繋ぐ計算としてペプチドが膜に挿入し会合体を形成する過程の分子動力学計算を実施することができる。これによりcWzaペプチドの会合過程の全容が明らかとなり、これまでに得られた新たな知見と合わせてタンパク質の折り畳みを理解し、未だ黎明期にある人工膜タンパク質の実現に寄与すると期待される。

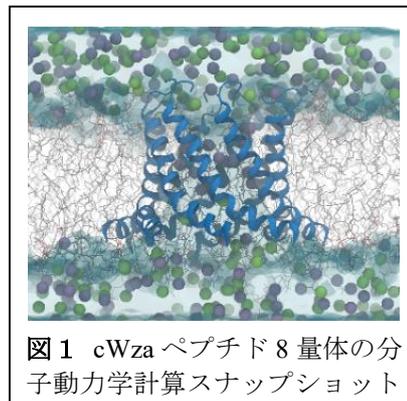


図1 cWza ペプチド 8 量体の分子動力学計算スナップショット

(2) cWza ペプチドの再設計と構造・機能解析

1で実施した計算結果をもとにcWzaペプチドを最小化・単純化したペプチドを設計し、化学合成したペプチドの脂質二重膜中における構造・機能解析の実験条件の検討を行った。二次構造解析として円偏光二色性スペクトル、機能解析として一分子チャンネル電流測定を用いた。リポソームを用いた二次構造解析から、ペプチドの二次構造は試料調製方法に依存することが明らかとなり、さらなる試料調製方法の検討が必要と考えられた。今後実験条件の検討を完了し、構造・機能解析と計算結果との比較を行うことで、cWzaペプチドの会合に寄与の大きいアミノ酸配列部位が明らかになると期待される。

(3) 人工設計ペプチドチャンネルのモデル構造最適化

上記の課題と平行して、新たに人工設計した膜貫通ペプチドチャンネルについて構造モデルの最適化およびチャンネルの水分子透過性の検証を分子動力学計算により実施した。計算による検証はこれまでの実験研究を支持する結果となった。これらの成果を日本生物物理学会、日本化学会の年會にて発表した。

(4) 膜ペプチドと低分子の脂質二重膜中における相互作用解析

膜タンパク質は既知の薬剤の70%が標的としており、膜タンパク質の構造・機能を理解するためには低分子との相互作用メカニズムの解明も重要となる。そこで、事前検討において巨大膜タンパク質である電位依存性ナトリウムチャンネルの膜貫通部位のモデルペプチドを合成し、溶液NMR、固体NMR、スペクトルシミュレーション、レプリカ交換分子動力学計算を組み合わせることで、脂質二重膜中におけるモデルペプチドと膜貫通部位に結合する神経毒ベラトリジンの相互作用を解析した。本課題では、モデルとした膜貫通 α ヘリックスペプチドと脂溶性アルカロイドの固体NMRによる相互作用観測データを詳細に分析し、その結果に基づいて膜タンパク質-低分子のドッキングシミュレーションを行った(図2)。その結果、ベラトリジンがナトリウムチャンネルに作用する過程が2段階であること、ベラトリジンの結合部位がナトリウムチャンネルの脂質面に露出していることを、初めて結合の直接観測により示した。この知見は今後ナトリウムチャンネルを標的とする薬剤分子の開発に貢献すると期待される。この研究成果はBioorganic and Medicinal Chemistry誌に発表した。

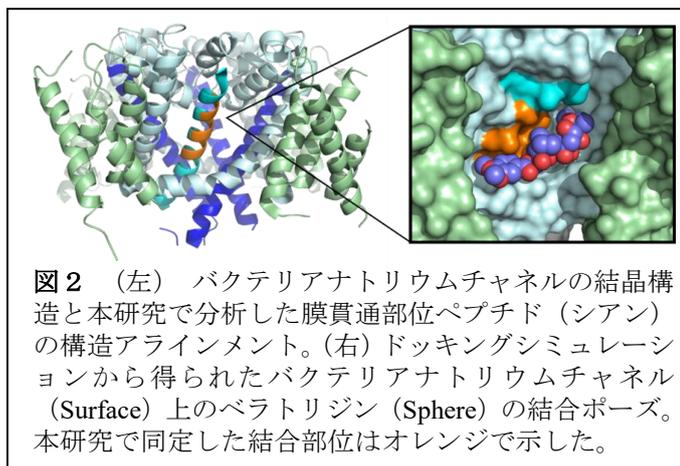


図2 (左) バクテリアナトリウムチャンネルの結晶構造と本研究で分析した膜貫通部位ペプチド(シアン)の構造アラインメント。(右) ドッキングシミュレーションから得られたバクテリアナトリウムチャンネル(Surface)上のベラトリジン(Sphere)の結合ポーズ。本研究で同定した結合部位はオレンジで示した。

引用文献

- ① D.N. Woolfson, G.J. Bartlett, A.J. Burton, J.W. Heal, A. Niitsu, A.R. Thomson, and C.W. Wood *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2015**, *33*, 16–26
- ② K.R. Mahendran, A. Niitsu, L. Kong, R.B. Session, A.R. Thomson, D.N. Woolfson, and H. Bayley *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 411–419

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Niitsu Ai, Egawa Ayako, Ikeda Keisuke, Tachibana Kazuo, Fujiwara Toshimichi	4. 巻 26
2. 論文標題 Veratridine binding to a transmembrane helix of sodium channel Nav1.4 determined by solid-state NMR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 5644 ~ 5653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.10.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 新津 藍	4. 巻 10
2. 論文標題 平面脂質二重膜を用いた単一チャネル電流測定法によるタンパク質・ペプチドポアのキャラクタリゼーション	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 蛋白質科学会アーカイブ	6. 最初と最後の頁 e086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 新津 藍	4. 巻 58
2. 論文標題 筒形膜タンパク質を基盤とした新規ペプチドポア的设计	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Niitsu A., Mahendran K.R., Thomson A. R., Session B.R., Sugita Y. Bayley H. and Woolfson D.N
2. 発表標題 Designing autonomous peptide-based membrane pores
3. 学会等名 Alpbach Workshop coiled-coil, fibrous and repeat proteins (国際学会)
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 Niitsu A., Mahendran K.R., Thomson A. R., Bayley H., Sugita Y. and Woolfson D.N.
2 . 発表標題 Redesign and de novo design of transmembrane alpha-helical peptide barrels
3 . 学会等名 55th annual meeting of the biophysical society of Japan (招待講演)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 A. Niitsu, K.R. Mahendran, A. R. Thomson, H. Bayley, D.N. Woolfson, Y. Sugita
2 . 発表標題 Design and characterization of membrane-spanning alpha-helical peptide pores
3 . 学会等名 17th annual meeting of Protein Science Society of Japan (招待講演)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 A. Niitsu, A.R. Thomson, A.J. Scott, J.T. Sengel, Y. Sugita, M.I. Wallace, H. Bayley, and D.N. Woolfson
2 . 発表標題 Rational design of membrane-spanning alpha-helical peptide barrels
3 . 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 A. Niitsu, A. R. Thomson, A.J. Scott, J.T. Sengel, Y. Sugita, M.I. Wallace, H. Bayley, and D.N. Woolfson
2 . 発表標題 De novo design of transmembrane coiled-coil peptide channels
3 . 学会等名 第101回日本化学会春季年会
4 . 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------