

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590241

研究課題名（和文）イオンチャネル活性制御などの分子生理学的問題の全原子シミュレーション計算解析

研究課題名（英文）Atomistic molecular dynamics simulation analysis of molecular physiological problems involving ion channel activity regulation

研究代表者

西澤 和久 (NISHIZAWA KAZUHISA)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00260935

研究成果の概要（和文）：分子動力学シミュレーション計算手法を、分子生理学で重要な Kv チャネル開閉ダイナミクスに応用し、Kv チャネルの原子レベルの詳細での構造機能連関に関する情報を得た。また、曲率を有する脂質膜に脂質分子粗視化モデルを応用し、曲率の高い部分に自発曲率の高い脂質分子が集積することを示した。また、コレステロール依存性に形成される脂質ドメインが、膜曲率の影響のもとで形成される過程を示し、膜ドメイン形成と細胞内脂質分子ソーティング機構との関連を提案した。

研究成果の概要（英文）：To gain insight into structure-function relationship of Kv channel and other physiological issues, molecular dynamics (MD) simulations were conducted. Atomistic details regarding Kv channel closing mechanism were revealed. We also applied coarse-grained MD simulations to curved membranes, in particular, hemifusion-mimicking membrane systems. The latter analysis showed that lipids with a high degree of negative spontaneous curvature tend to be enriched at the junction of the bilayers that is highly curved. We also showed that cholesterol-dependent formation of lipid microdomains proceeds under strong influence of membrane curvature. The possibility that such curvature dependent localization of microdomains may contribute to the intracellular lipid sorting was discussed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜・チャネル・トランスポーター・脂質ラフト・計算化学・脂質膜融合・分子動力学

## 1. 研究開始当初の背景

分子生理学で重要なイオンチャネルの開閉ダイナミクスの原子レベルでの詳細は不明の点が多かった。一方、分子動力学計算手法の進展により、計算化学分野と分子生理学分野の融合が期待される状況があった。そして MacKinnon らの研究によって Kv チャネルの構造情報がかなり解明された。しかしながら我が国においては、分子生理学と構造化学の境界領域において不可欠と考えられる分子動力学シミュレーション研究が、とくにタンパク質-脂質膜共存系においてはあまりなされたいないこともあり、イオンチャネルの原子レベルでの作動機序や阻害性薬物の作用機序に未解明の点が多かった。また、細胞生物学において注目される脂質ラフト構造、マイクロドメイン構造については、大きな時空間スケール（数マイクロ秒、 $>10\text{nm}$ ）の計算を要するため、分子動力学計算解析が困難な状況であった。一方、数個の原子を1個の粒子で置き換える粗視化モデルが開発されつつある状況があり、数マイクロ秒の計算が可能となりつつあった。しかしながら、こうした粗視化系の細胞生物、細胞生理学的問題への応用はほとんどなされていなかった。

## 2. 研究の目的

Kv チャネルの4つのサブユニット間の協奏的運動の解析、さらに他の K チャネルの解析にその知見を応用する、そして脂質膜のダイナミクスの理解を深めるための脂質膜のシミュレーション計算、膜融合活性ペプチドの原子レベルでの作用機構の解析、曲率を有する脂質膜における脂質分子の局在、ドメイン形成の解析が目的である。

## 3. 研究の方法

Kv1.2-2.1 キメラチャネルの open 構造から出発し、電位センサーである S1-S4 ドメインの、S4 ヘリックスの高さを様々な位置に固定した条件で分子動力学シミュレーション計算を実施した。計算に主として Gromacs3.3.1 または 4.5.4 パッケージを使用して、Gromos 力場を用い、Berger による脂質膜パラメータを使用した。また、実験系で open-close のダイナミクスを変化させることが既知のアミノ酸改変を導入した分子動力学シミュレーション計算を行い構造変化を追跡した。また、膜融合活性ペプチド研究に関しては、インフルエンザウイルス HA 分子の N 末端融合ペプチドと脂質分子の共存系を用いて、非ラメラ構造への相転移や、脂質膜曲率への影響を分子動力学計算によって解析した。とくに脂質膜融合機構や脂質分子の局在につい

ての情報を得るため、(2つの脂質二重層膜のシス側の片膜のみが融合し)断面がギリシヤ文字のラムダのような形状をしたヘミフューズドリボン (hemifused ribbon) という系を作成し、脂質二重層膜の分岐部での脂質局在を解析できるようにした。計算は、30 台程度 (各 2-6CPU 機) の小型計算機にて実施した。

## 4. 研究成果

四量体 Kv チャネルについて、野生型および (電位応答への影響が実験で示された) アミノ酸改変 Kv1.2 チャネル (4 量体) の全原子シミュレーションを多数実施した。電位センサー S4 の下方移動 (すなわち静止電位において起こるような、細胞内側への偏位) は、同一サブユニット内 S6 への相互作用により (S5 を介さずに) 直接 S6 の動きを調節する傾向が強いことが示された。また、Swartz らの実験でチャネル閉状態を安定化することが知られる変異体 (E395W など) は、シミュレーションでも閉状態への移行を促進した。このことは分子動力学計算の信頼性の根拠を与える結果である。

また、ゲーティングの構造基盤となっている S6 の狭窄部分についての自由エネルギープロファイル計算を実施したところ、疎水性の強いこの部分の狭窄によって水を失い、たとえ直径 1nm 程度のポアが開いていても K イオンに対するエネルギー障壁が急に高まることが示された。また、少なくとも当該分子力場については、4つのサブユニットの対称性は保持されにくい傾向があり、4つのうち、1個または2個のサブユニットが中心軸方向へ移動することによって閉じる状態が実現されるケースが多かった。このことは、従来の対称性の維持を前提としたチャネル分子ダイナミクスモデルに疑問を投げかける結果である。

膜融合活性ペプチド解析においては、インフルエンザウイルス HA2 タンパク質の N 末端ペプチドと、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) またはホスファチジル酸を含むジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 膜でのシミュレーションを実施した。野生型融合ペプチドは、脂質-水境界面に斜めに  $\alpha$  ヘリックスが刺さる配置を示し、平面膜間のストーク (茎) 形成を促進した。実験で活性を持たないことが知られる変異型ペプチドは、水平の配置を取り、ストーク形成を促進しなかった。この結果、並びに、自発的な逆相へキサゴナル構造形成のシミュレーションの結果から、融合ペプチドの配向並びに界面を乱す性質が重要であることが示唆された。

なお、ペプチドの2次構造が $\alpha$ ヘリックスであること、そしてそれが斜めに膜に刺さった位置にあることが、界面を乱すために重要であることは、以下の結果によって示唆された。すなわち、フリー（特段に拘束を用いない）のシミュレーション計算では、TammらのNMR構造解析に基づく構造と異なる構造（ヘリックスが壊れたランダム構造）に変化し膜界面に対する作用を示さなかったが、2次構造を保持する弱いペプチド主鎖2面角固定を導入した場合には $\alpha$ ヘリックス構造が保持されたのみならず、Tammらの結果に沿う斜めの配置をとり、膜界面を乱す性質を示した。このことは、（実際には、力場が実験系と異なることを考慮すると）人工的に2次構造を保つ拘束を導入することが適切であるケースと考えられた。

当初の計画にはなかった研究展開として、近年Marrinkらのグループによって考案された脂質ラフト形成の粗視化モデルを、筆者らが開発したヘミフューズド-リボン（hemifused ribbon）の系に応用し分子動力学計算を実施した。コレステロール依存性のドメイン形成が再現された。コレステロールを加えずに計算すると均一の混和状態を示したのに対し、コレステロールの添加によって、ナノメートルスケールでのマイクロドメイン形成が起こった。ヘミフューズド-リボンにおいても、平面膜と同様の時間スケールでドメイン形成が起こり、構造秩序の高いLoドメインが比較的平坦な膜部分に形成され、Ldドメインは高い負曲率を有する部分に形成される傾向を示した。各脂質分子の有する自発曲率によるソーティングだけでは説明できないレベルの脂質分子分布の偏りが、膜の曲率とドメイン形成の協奏効果によって生じることから、実際の細胞内でもマイクロドメイン形成が脂質ソーティングに寄与する可能性が示唆された。とくに、Lo/Ld両ドメインの境界部分が、脂質膜の曲率の高い部分に合致する傾向がみられた。このようなドメイン境界の異常な柔軟性が、ドメイン分離が脂質ソーティングに寄与する上で重要である可能性が示唆された。

#### 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5件）

①Manami Nishizawa, Kazuhisa Nishizawa, Coarse-grained simulations of branched bilayer membranes --Effects of cholesterol-dependent phase separation

on curvature-driven lipid sorting. J Biophys Chem (査読有) 2011;2: 268-284

②Manami Nishizawa, Kazuhisa Nishizawa, Curvature-driven lipid sorting: coarse-grained dynamics simulations of a membrane mimicking a hemifusion intermediate. J Biophys Chem (査読有) 2010; 1: 86-95

③Manami Nishizawa, Kazuhisa Nishizawa, Molecular dynamics simulation analyses of stalk-inducing effect of viral fusion peptides: importance of oblique orientation in membranes. J Biophys Chem (査読有) 2010; 1:19-32

④Kazuhisa Nishizawa. Molecular Dynamics Simulations of Kv Channels and Gating-Modifier Peptide Toxins. Current Computer-Aided Drug Design 2009 (査読有) 5:155-173

⑤Manami Nishizawa, Kazuhisa Nishizawa, Coupling of S4 helix Translocation and S6 Gating Analyzed by Molecular Dynamic Simulations of Mutated Kv channels. Biophys J (査読有) 2009; 97: 90-100

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計1件）

① Kazuhisa Nishizawa. Atomistic molecular simulation of gating modifier venom peptides -two binding modes and effects of lipid structure. In : Kamkin A (ed) . Mechanosensitivity in Cells and Tissues 4:Mechanosensitivity and Mechanotransduction, Berlin, Springer, 2010, p167-190

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://homepage3.nifty.com/~gene>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西澤 和久 (NISHIZAWA KAZUHISA)  
帝京大学・医療技術学部・教授  
研究者番号：00260935

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし