

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06037

研究課題名（和文）抗微生物ペプチドCryptdin-4多量体の膜透過過程と活性機構の解明

研究課題名（英文）Membrane permeation processes and inter-molecular interactions of Cryptdin-4 studied by molecular dynamics simulations

研究代表者

依田 隆夫（Takao, Yoda）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：50367900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Cryptdin-4（Crp4）はマウスの小腸で発現している α -防御ペプチドの一つである。負に帯電した脂質二重層に対してCrp4を作用させると低分子の膜透過性が上がる。同時にCrp4自身も膜を透過する。そこでCrp4が脂質二重層を透過する時の分子間相互作用を明らかにし、Crp4の膜透過と低分子の膜透過性の亢進との関係に関する知見を得ることを目的として膜形成シミュレーションを行った。形成された膜中にCrp4が見出されたMDのデータ分析により、水、イオン、脂質のhead group、蛍光色素などの低分子の空間分布および分子間相互作用の特徴を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌ペプチドと脂質二重層の相互作用は、典型的な蛋白質間相互作用に見られる鍵と鍵穴のタイプの相互作用と比べると、立体構造的な特異性が低いと考えられる。この性質のため、分子動力学シミュレーションは有力な研究手段となる。本研究では、ペプチドの濃度や分子表面の性質、膜を構成する脂質の組成、水に溶解している低分子などの影響を受ける抗菌ペプチドの相互作用を膜形成シミュレーションにより研究した。得られた成果は活性メカニズムの理解に資すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cryptdin-4 (Crp4) is an α -defensin expressed in the small intestine of mice. The interaction of Crp4 with negatively charged lipid bilayers increases the membrane permeability of small molecules. At the same time, Crp4 itself also permeates the membrane. Here, we performed membrane formation simulations to clarify the intermolecular interactions and to gain insight into the relationship between Crp4 membrane permeation and the increased membrane permeability of small molecules. Data analysis of our membrane self-assembly simulations in which Crp4 was found in the formed membranes revealed the spatial distribution of ions and small molecules such as water, head groups of lipids, and fluorescent dyes, as well as the characteristics of their intermolecular interactions.

研究分野：生物物理学

キーワード：抗菌ペプチド 分子動力学シミュレーション

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の研究対象である Cryptdin-4 (Crp4) はマウスの小腸で発現している α -ディフェンシンの一つである。脂質二重層と相互作用している抗菌ペプチドの高分解能一分子観察が可能な全原子分子動力学シミュレーションは、その活性機構を探る有力な研究手段であるといえる。

負に帯電した脂質二重層に対して Crp4 を作用させると低分子の膜透過性が上がることが知られている(以下、これを「(低分子の)膜透過性の亢進」と呼ぶ)。同時に、Crp4 自身が膜を透過することも知られている。両者は互いに関連し合っていると考えられているが、詳細な分子メカニズムには不明な点が多い。

2. 研究の目的

Crp4 が脂質二重層を透過する時の分子間相互作用を分子動力学シミュレーションにより明らかにすることと、Crp4 自身の膜透過と低分子の膜透過性の亢進との関係に関する知見を得ることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

周期境界条件の下で脂質、イオン、水をランダムに配置した初期状態から常温で NPT 分子動力学シミュレーションを実行すると、脂質の自己組織化が起こり膜が形成される様子を観察できる。このシミュレーションに Crp4 分子を含めておくことによって、Crp4 の存在による膜の状態や分子間相互作用に対する影響を調べる。

Crp4 との相互作用により脂質二重層はダメージを受ける(その結果、膜透過性の亢進が起こる)が、相互作用する Crp4 分子数が少ない場合には、このシミュレーションの初期状態(脂質と水の配置がランダム)は、Crp4 が膜中にとどまる状態と比べて熱力学的に不安定であると考えられる。このことから、この手法により Crp4 が膜中にとどまる状態を準安定状態として出現させられる可能性があると考えられる。

研究開始当初の時点で、脂質の組成、Crp4 分子数、イオン濃度の影響についての検討を既に行っていた。本研究ではまず、Crp4 の多量体化と膜中におけるイオンや脂質の頭部との相互作用の関係を分析した。さらに、*in vitro* の膜漏出実験で使用される蛍光物質や消光剤を膜形成シミュレーションの系に含めることにより、Crp4 との相互作用について検討した。

膜形成 MD の条件の概要は以下の通りである。Gromacs を使用して分子をランダムに配置したあと、ポテンシャルエネルギー極小化を行い、合計 20 ns の平衡化を等方的な圧力制御の下で行った。その後、300 ns (一部については 3 μ s) の MD を非等方的な圧力制御の下で行った。エネルギー極小化と分子動力学計算は全て Amber ソフトウェアパッケージの pmemd モジュールを使用して行った。温度は 310 K、圧力は 1 bar である。使用した力場は Amber ff14sb (ペプチド) と LIPID17 (脂質)、TIP3P 水分子モデルである。また、蛍光分子と消光剤は GAFF によりモデル化した。

4. 研究成果

(1) 膜中に Crp4 多量体が含まれる状態を初期状態としたマイクロ秒等温等圧 MD。

300 ns の膜形成 MD で得られた、Crp4 多量体が膜中に観察された状態を 5 つ選び、NPT MD を延長することにより合計 3 μ s の MD データを得た。選んだのは、膜中で観察された Crp4 分子間の接触数の多い複合体構造である。シミュレーションの結果、マイクロ秒程度では Crp4 複合体が膜外へ排出されないことが示された。5 つの系のうちの 1 つについて、300 ns 時点と 3 μ s 時点の構造を示す(図 1)。

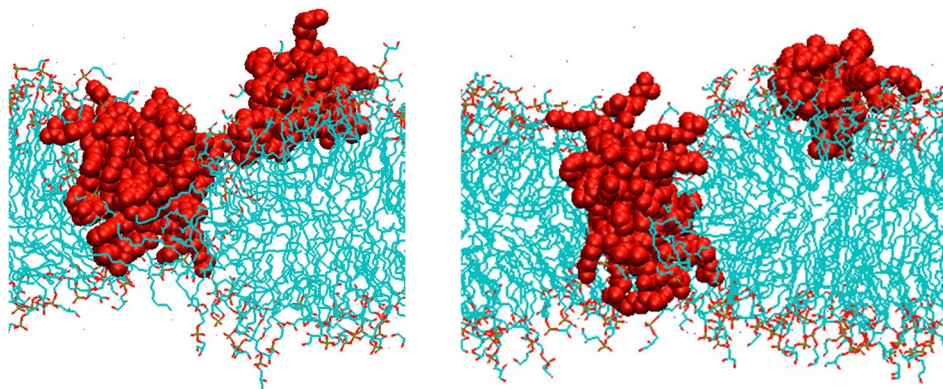


図 1 3 μ s の POPG 膜形成 MD の、300 ns 時点の構造(左)と終構造(右)。赤いスペースフィル表示となっているのは Crp4 である。300 ns 時点で既に膜が形成されている。終構造では膜中に 2 分子、表面に 1 分子の Crp4 が見える。系は Crp4 をあと 1 分子含んでいるが表示していない。

(2) 膜形成 MD で Crp4 が膜中に見出されたトラジェクトリーの追加的分析

本研究開始時に既に得られていたものも含めて 118 個存在する膜形成 MD のトラジェクトリーの追加的な分析を行った。その結果、以下の知見を得た。

(a) Crp4 が膜中に存在する時、脂質分子の head group (本研究のシミュレーションでは PG と PE) が Crp4 と相互作用しつつ膜中に分布するが、PE と PG の膜方線方向の分布を求めたところ、負電荷を持つ PG は Crp4 単量体と相互作用しているときよりも多量体と相互作用しているときの方が膜の中心部の疎水的な領域に見出されやすいことが示唆された。他方、正味の電荷がゼロである PE についてはそのような傾向が見られなかった。PG の方が膜中でより多く Crp4 と相互作用することを示しており、静電相互作用の重要性が示唆される。

(b) 水とイオンも Crp4 の表面に相互作用しつつ Crp4 とともに膜中にも見出された。カチオン (Na^+) は Crp4 単量体と相互作用しているときよりも多量体と相互作用しているときの方が膜の疎水領域に見出されやすいことが示唆された。他方、アニオン (Cl^-) についてはそのような傾向が見られないばかりか、膜中心部の疎水的な環境ではほとんど見出されないことが示された。このことは、Crp4 によって乱された膜の中に入ってくるイオンは、膜中に進入した Crp4 分子 (正味の電荷 > 0) に直接静電的に結合することは少なく、脂質と静電的に結合する傾向が相対的に高いことを示唆している。

(3) ベシクルからの漏出実験で用いられる低分子化合物の GAFF によるモデル化と同化合物を含む系における膜形成シミュレーション 1

低分子の膜透過性に対する抗菌ペプチドの影響を試験管内で評価するために、ベシクルに閉じ込めた低分子の漏出量の測定がしばしば行われる。このような低分子はその抗菌ペプチドの作用によって実際に膜を透過することが確かめられた物質であると言える。そこで、Crp4 の漏出実験で用いられた実績のある水溶性蛍光色素である 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) を general AMBER force field (GAFF) によりモデル化し、POPG や Crp4 と共にランダムに配置した構造を初期状態とする膜形成シミュレーションを行った。POPG は負に帯電しているが、 Na^+ を加えて系全体の電荷を 0 にしている。5-CF を用いた場合と 6-CF を用いた場合で結果に大きな差が見出されなかったため、ここでは両者を区別せず単に CF と呼ぶ。

乱数を用いて異なる分子配置の初期構造を複数用意し、Crp4 無しの系の膜形成 MD シミュレーションを独立に 6 回、Crp4 を 4 分子含む系の膜形成 MD シミュレーションを独立に 6 回 (5-CF を含む系と 6-CF を含む系のそれぞれで 3 回ずつ) 行った。脂質の分子数に対する CF の分子数および、Crp4 の分子数の比は試験管中の漏出実験の条件を参考にして決めた。Crp4 を含まない系の膜形成 MD の終状態では、脂質二重層の疎水的な領域と親水的な領域のインターフェース近傍にほとんどの CF 分子が分布し、水中には CF が見出されなかった。

Crp4 存在下で行った膜形成 MD では、独立に行った 6 回のシミュレーションのうち 4 回で膜形成が観察された。そのうち 3 回の終状態で Crp4 が膜中に見出された。形成された膜の中心から CF 分子を構成する原子までの膜方線方向の距離の分布を求めたところ、Crp4 が膜中に見出されたシミュレーショントラジェクトリーでは、脂質二重層の疎水的な領域にも CF が分布していたことが明らかとなった。Crp4 が膜内部には見出されず終状態において膜表面近傍に吸着していたシミュレーショントラジェクトリーでは、そのような分布は得られなかった。このことから、CF は Crp4 と共に膜内部に取り込まれたと判断できる。

(4) ベシクルからの漏出実験で用いられる低分子化合物の GAFF によるモデル化と同化合物を含む系における膜形成シミュレーション 2

(3) とは異なる種類の低分子の場合についても検討を試みた。Crp4 による膜透過実験で使われたことのある蛍光色素 (8-Aminonaphthalene-1,3,6-Trisulfonic Acid, ANTS) と消光剤 (p-xylene-bis-pyridinium bromide, DPX) を GAFF でモデル化し (3) と同様の計算を行った。水中では ANTS は負に DPX は正にそれぞれ帯電している。Crp4、ANTS、DPX の分子の数は実験を参考にして決めた。POPG は負に帯電しているが、 Na^+ を加えて系全体の電荷を 0 にしている。

Crp4 の有無および DPX の有無が異なる 4 つの条件で膜形成 MD を実行した。分子をでたらめに配置した初期状態を複数用意して、各条件につき 4~5 回の膜形成シミュレーションを独立に実行した。Crp4 非存在下では実行した 10 回のシミュレーションで膜が形成された。終状態において、ANTS および DPX は膜の表面近傍に分布する傾向が高かった。また、少数の ANTS や DPX が膜から離れて水中に溶け出ている様子も観察された。これは CF を含む系のシミュレーションでは見られなかった振る舞いである。また、膜における局在の様子も異なっている。CF は膜の疎水的な領域と親水的な領域のインターフェース近傍、すなわち (ANTS と比べて) より膜の中心部に近い位置に分布することが多かった。これは電荷など物性の違いを反映していると考えられる。

Crp4 存在下では、それぞれ 4 回ずつ実施したシミュレーションのうち、DPX を含まない系では 4 回、含む系では 2 回において膜が形成された。そのうち、DPX を含まない系では 2 回、含む系でも 2 回の終状態において、膜中心部に Crp4 が見出された。これらのトラジェクトリーにおいて、ANTS や DPX が Crp4 と共に膜内部にも分布することが示された。また、POPG の head group も Crp4 と共に膜中にも分布していた。

本研究で得られた結果は、Crp4 の作用により低分子である CF、ANTS、DPX の膜透過性が大き

くなるという観測事実と定性的に合っていると考えられる。しかし、本研究のシミュレーションで形成された膜は実験で作られるリポソームよりも相当小さい。そのため、3分子よりも多数の Crp4 が同時に侵入して膜と相互作用する様子は観察できなかった。多数の Crp4 分子の相互作用が脂質二重層へ及ぼす影響をシミュレーションにより探ることが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依田隆夫
2. 発表標題 Conformations and distributions of Cryptdin-4, lipids, and water observed in membrane self-assembly molecular dynamics simulations
3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会
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
---------	---------