

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23350014

研究課題名(和文)階層的分子モデリングによる生体膜融合過程の研究

研究課題名(英文)Multiscale Molecular Modeling of Membrane Fusion

研究代表者

篠田 渉 (Shinoda, Wataru)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70357193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜融合の分子プロセスの解明のため、全原子モデルを元に定量的粗視化分子モデルを作成し、ベシクルなどの曲率を持った膜間の相互作用や膜融合の解析を分子シミュレーションによって行い、さらに自由エネルギー障壁を解析した。膜を構成する脂質分子種やペプチドによる膜融合への影響を明らかにすると同時に、膜の線張力、曲げ弾性係数などを分子系から定量的に測定する手法開発を行い、これによって連続体モデルと分子シミュレーションの結果の比較を行い、膜弾性理論は融合エネルギーを定量的に説明できるが、定量性はなく分子のコンフォメーションの変化による影響が大きいことを示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the molecular mechanism in the membrane fusion process, a series of molecular dynamics simulation of membrane systems including vesicles has been conducted using a newly developed (semi)-quantitative coarse-grained molecular model on the basis of all-atom molecular dynamics trajectories. Interaction between curved membranes such as vesicles and fusion process has been investigated in terms of free energy analysis. Effects of lipid components and the presence of the peptides have been analyzed in the free energy calculations. New methods to accurately evaluate the line tension and curvature moduli of membranes have been also developed. The calculated physical constants were used to compare a simple continuum model and molecular dynamics for the free energy barriers of membrane fusion, which elucidated that the elastic energy contribution explains the fusion energy barrier only qualitatively.

研究分野：物理化学、分子シミュレーション

キーワード：膜融合 分子シミュレーション 自由エネルギー 粗視化モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体膜融合過程の分子論的な研究は、現象論的な粒子モデルや連続体モデルによる研究がなされていたが、化学的な分子の詳細に踏み込んだ分子力場を用いた解析は十分にこなされておらず、実験からの生体膜融合過程の分子論的な情報も乏しい状況であった。

(2) 分子動力学法による膜融合過程の解析の取り組みも一部が始まっていたが、系の規模や時間が限定されており、初期配置の問題などクリアすべき問題が多い状況であった。また、膜融合過程の自由エネルギーによる解析は全く不十分な状況であった。

(3) 一方で、全原子モデルに基づいた粗視化モデリング手法がいくつか提案されていた。特に膜融合の自由エネルギー障壁を取り扱うために必要な膜変形時のエネルギー得失を定量的に表現しうる精密な粗視化モデルの候補が中性脂質についてはすでに完成しており、大変形を伴う構造変化や自由エネルギー変化の解析が望まれていた。

2. 研究の目的

(1) 生体系における情報・物質伝搬の重要なプロセスである膜融合について、脂質分子の種類・組成変化の影響及び融合ペプチド・タンパクなどの役割を分子論的に解明する。この目的を、分子シミュレーションを用いて達成するため、以下の3つの項目を具体的な目標とした。

(A) 全原子及び粗視化分子モデルを併用した階層的分子モデリング技術を構築・応用し、50-100nmの系の分子シミュレーションを実現する。

(B) 従来、不可能であった曲率を持った生体膜の変形、付着、細孔形成、融合などの動的過程を直接観測し、脂質分子の自発曲率などの分子レベルの情報をもとに分子集合体構造変化の解析を行う。

(C) 膜融合プロセスで見られる融合中間体間の構造遷移の自由エネルギー計算を行い、その分子メカニズムの解明に取り組む

3. 研究の方法

(1) 粗視化分子モデルの構築には、表面・界面張力、密度、膜面積弾性率、溶媒と自由エネルギー、また、全原子モデルによる分子動力学シミュレーションから得られた構造(分布関数)を目的物性として最適化を行う。レファレンスとする全原子モデルは CHARMM36 力場を用い、特に実験では評価が困難なアミノ酸残基の膜を横切る自由エネルギープロフィールなどを計算し、それを粗視化モデル

においても再現するようにパラメータフィッティングを行った。

(2) 粗視化分子モデルによって膜系を構築し、分子動力学シミュレーションを用いて、膜の変形、付着、細孔形成、融合の自由エネルギーを見積もる計算手法を開発し、これによって膜融合過程における自由エネルギー障壁の高さを定量的に評価する。さらに脂質分子種や添加分子の違いによる自由エネルギーの変化とその原因を分子論的に解明する。

(3) 階層的なシミュレーション技術の確立のため、分子シミュレーションから膜の曲げ弾性係数、線張力などを精密に求める手法を開発し、連続体モデルの評価や限界を明らかにするとともに、階層的シミュレーション技術の向上に貢献する。

4. 研究成果

(1) 分子シミュレーションによって脂質膜系の曲げ弾性係数や線張力を定量的に評価するため、膜に曲げや細孔形成を誘起する外場を与え、外場への膜系からの応答を観測する手法を開発した。曲げや細孔形成という変化に必要な自由エネルギーの観測に基づく手法であり、粗視化分子モデルで記述された膜系においては曲げ弾性係数や線張力を高い精度で決定できる手法であることがわかった。曲げ弾性係数は従来、膜面高さの揺らぎのスペクトル解析から求められるが、フィッティング誤差の影響を受けやすい問題があったが、外場による方法ではこの問題が改善されている。また、ガウス弾性係数を測定するため、膜を横切るストレスプロフィールを計算する手法を開発した。特に、この手法を球座標系に拡張し、小さなリポソーム(ベシクル)のような球状に閉じた膜系においてもストレス分布を正確に求めることができる方法を開発し、汎用分子動力学ソフトウェア LAMMPS に組み込み公開した。これにより、球状の分子集合系の表面張力を精密に測定することが可能となった。さらに、理論解析手法の開発により、ベシクルを形成した曲がった膜のガウス弾性係数を算出することに成功し、弾性係数の曲率依存性を議論することが可能とした。

(2) 粗視化分子モデルによる分子シミュレーションによって、脂質凝集体の自己粗視化構造変化を時系列で観測することができ、小さな凝集体はバイセルと呼ばれる円盤構造に転移するのに対し、より大きな凝集体は球状ベシクル(リポソーム)に転移することが見いだされた。より大きな系ではランダムな脂質集合体からマルチラメラベシクル(多重層膜のベシクル)が形成されることも見いだされた。粗視化分子動力学シミュレーションによって、50nm以上のサイズを持つ膜系におい

ても構造形成や変化の観測は十分に達成されている。最も小さなベシクルは16-17nmほどの直径であり、実験的に観測されている最も小さなベシクルサイズ(15-23nm)と良い一致が得られた。このサイズの凝集体はベシクル・バイセルの両構造で安定性を示し、一端どちらかの構造が形成されると他の構造への変化は、シミュレーション時間内($\sim 10 \mu\text{s}$)に観測することが困難であった。そこで、ベシクル構造安定性の議論を行うため、これらの構造間転移の自由エネルギーを計算することにした。外場による自由エネルギー評価手法を球状ベシクルに適用することによって、ベシクルからバイセルへの転移の自由エネルギー障壁を測定することに成功した。図1はこの自由エネルギー変化を脂質膜の縁の長さの関数としてプロットしたものであり、縁の長さゼロは完全な球状ベシクルで、ベシクルが開口し徐々に円盤状に変化する際の自由エネルギー変化である。この自由エネルギー変化を連続体理論である Fromherz の理論式と比較した。最初、平面膜に対して分子動力学シミュレーションから見積もられた弾性係数や線張力の値を用いて、Fromherz 式を評価したところ、自由エネルギー障壁を大きく過大評価することがわかった。しかしながら、(1)で求めた弾性係数の曲率依存性を考慮して理論を組み立てることにより、分子シミュレーションの自由エネルギー変化をより定量的に再現できることを見いだした。図1には弾性係数をベシクルから見積もった際の自由エネルギー曲線の立ち上がり方を赤線で示している。弾性係数の曲率依存性を考慮することで、連続体モデルでも、粗視化分子シミュレーションから得られた自由エネルギー曲線をよく再現することがわかる。

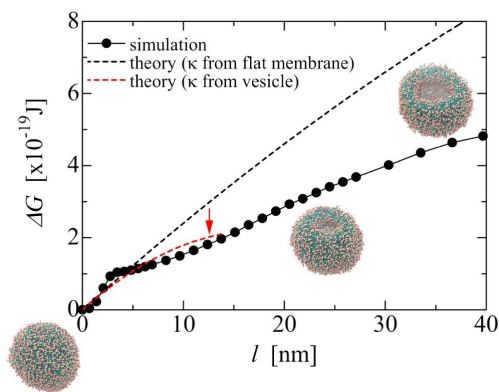


図1: ベシクルからバイセルへの転移の自由エネルギー障壁。横軸は開口した膜端の長さ

(3) ベシクル間相互作用を自由エネルギー計算によって評価した。ホスファチジルコリン(PC)脂質とホスファチジルエタノールアミン(PE)脂質を評価し、PCではベシクル間相互作用は単純な斥力であるのに対し、PEでは付着性を示すことが示唆された。さらに、PC/PE混合のベシクルでは、ベシクル間の接触に際して脂質ソーティング(特定の脂質分

子種が局所的に集積する現象)が見られ、この現象によって膜の変形に伴う自由エネルギー損が混合膜の場合に著しく下がること判明した。すなわち、混合膜はより柔らかく変形によるエネルギー損が少ない。これは膜融合過程の自由エネルギー変化にも非常に密接に関係する。これらの計算によって、別にわかったことは、小さなベシクルであっても単純な接着のみでは簡単に膜融合は進行せず、接着状態を保っていても自発的に融合が進む現象は、シミュレーション時間内では確認されなかった。

(4) 実験的に観測されている融合中間体ストーク構造を経由する経路に沿って、膜融合過程の自由エネルギー障壁の高さを精度良く見積もる分子シミュレーション手法の開発に成功した。この手法では、外場ポテンシャルを用いることによって脂質膜の局所的な親水・疎水界面を制御することで2枚膜からストーク形成を経て、融合ポア形成に至る一連のプロセスの自由エネルギー計算を可能とした。この計算には、融合過程を制御するいくつかの制御パラメータが必要であるが、各パラメータの適切な選択についても検討し、最小エネルギー経路(近傍)をたどる融合自由エネルギーの定量的な評価手法として確立することができた。図2には2枚のPC平面膜の融合過程に沿った自由エネルギー計算結果を示している。この場合は最も高い自由エネルギー障壁を示しており、これをレファレンスとして、脂質混合系におけるPE系脂質の役割、膜の曲率の影響を明らかにした。については、PCのみで構成される脂質膜間融合と、PC/PE(1:1)の混合膜での融合の自由エネルギーを比較した。融合の自由エネルギー障壁はPEが入ることによって著しく低下し、中間状態のストーク構造の安定性も高める結果となった。これは融合プロセスにおいて生じる負の曲率を持つ膜表面(例えばストーク周辺)にPEが集積することによって、弾性エネルギー損を低減するためと考えられる。先に述べたように、このような脂質ソーティングは、膜変形時にも観測されているが、その自由エネルギーへの影響は大きく、数十 kT のエネルギー障壁の低下となった。また、については、平面膜間の融合とベシクル間の融合の自由エネルギー変化を比較することによって評価した。平面膜においては、ストーク形成、融合ポア形成にかけてほとんど自由エネルギーが増加していく傾向であったが、ベシクル間ではストークや融合ポアの自由エネルギーが著しく低下した。この結果は弾性体理論から予測される傾向と良く一致したが、弾性エネルギーのみでは自由エネルギー変化をおよそ3倍程度に過大評価することを見いだした。その主な原因は、連続体理論では考慮されない脂質分子の主に疎水鎖のコンフォメーション変化の寄与が大きいことが解析によって示された。また、

PE の影響として水和エネルギーが通常の脂質よりも小さいことが原因として指摘されてきたが、本研究の解析結果は PE 膜の負の自発曲率による弾性エネルギーの利得による融合促進効果が大きいことを示唆した。

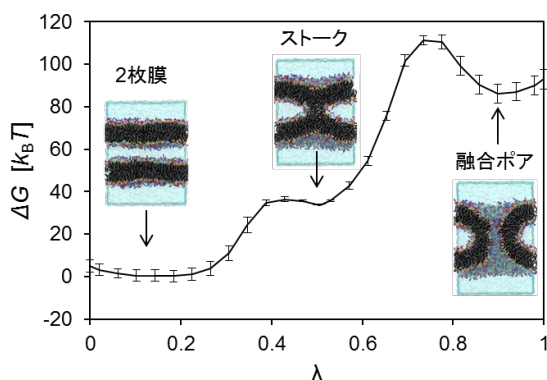


図2: 2枚の平面膜(PC)からストークを経て、融合ポアに至る融合過程の自由エネルギープロフィール。λは膜融合のストークモデルに沿って膜を変形させる外部パラメータ。

(5) 膜融合過程へのタンパク質・ペプチドの影響を観測するため、これらの粗視化分子モデルの構築に取り組んだ。すでに構築した脂質分子の粗視化モデルとの整合性を綿密に検討し、各残基の膜を横切る自由エネルギープロフィール、各種膜タンパクの膜内での配向、分布、タンパク質(ヘリックス)同士の会合自由エネルギーを実験や全原子シミュレーションと一致するように最適化を行った。レファレンス系を増やしたため、最適化には多大な試行と時間が必要となったが、多くの膜タンパクに適用可能な粗視化モデルが完成した。本粗視化モデルは生体膜系の様々な現象解明の研究に適用可能と考えている。この粗視化モデルを用いて、例として融合ペプチド、ヘマグルチニン(HA)の働きを検討した。HAを2枚の膜間に添加するとストークモデルに沿った融合過程の自由エネルギー障壁は予想に反し上昇する結果となった。HAは膜表面へ吸着後、膜に正の曲率を誘起することがわかった。さらに3~5分子のHAが膜細孔の縁に吸着し、膜細孔を安定化することがわかった。この結果は、HAはSNAREタンパクなどとは異なり、ストーク形成そのものを促進するのではなく、膜の線張力を制御して細孔形成や細孔を経由した脂質分子交換などにより、融合を促進す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12件)

篠田 渉、中村壮伸、Steven O. Nielsen、Free Energy Analysis of Vesicle-to-Bicelle Transformation、Soft Matter、

査読有、Vol.7、2011、9012-9020。

DOI: 10.1039/c1sm05404j

中村壮伸、篠田 渉、池庄司民夫、Novel Numerical Method for Calculating the Pressure Tensor in Spherical Coordinates for Molecular Systems、Journal of Chemical Physics、査読有、Vol.135、2011、094106 (10pages)。

DOI: 10.1063/1.3626410

齋藤大明、篠田 渉、Cholesterol Effect on Water Permeability through DPPC and PSM Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study、Journal of Physical Chemistry B、査読有、Vol.115、2011、15241-15250。DOI: 10.1021/jp201611p

篠田 渉、Russell DeVane、Michael L. Klein、Computer Simulation Studies of Self-Assembling Macromolecules、Current Opinions in Structural Biology、

査読有、Vol.22、2012、175-186。DOI: 10.1016/j.sbi.2012.01.011

中村壮伸、篠田 渉、Method of Evaluating Curvature-Dependent Elastic Parameters for Small Unilamellar Vesicles Using Molecular Dynamics Trajectory、Journal of Chemical Physics、査読有、Vol.138、2013、12490(7pages)、DOI: 10.1063/1.4795579

篠田 渉、脂質膜の粗視化分子シミュレーション、Colloid & Interface Communication、査読有、Vol.12、2013、55-61。DOI:なし

川本周平、中村壮伸、Steven O. Nielsen、篠田 渉、A Guiding Potential Method for Evaluating the Bending Rigidity of Tensionless Lipid Membranes by Molecular Simulation、Journal of Chemical Physics、査読有、Vol.139、034108(10pages)

DOI: 10.1063/1.4811677

篠田 渉、Dennis E. Discher、Michael L. Klein、Sharon M. Loverde、Probing the Structure of PEGylated-Lipid Assemblies by Coarse-Grained Molecular Dynamics、Soft Matter、査読有、Vol.9、2013、11549-11556。

DOI: 10.1038/c3sm52290c

川本周平、篠田 渉、Free Energy Analysis along the Stalk Mechanism of Membrane Fusion、Soft Matter、査読有、Vol.10、2014、3048-3058。DOI: 10.1039/C3SM52344F

篠田 渉、Michael L. Klein、Effective Interaction between Small Unilamellar Vesicles as Probed by Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations、Pure and Applied Chemistry、査読有、Vol.86、2014、215-222。

DOI: 10.1515/pac-2014-5023

中村壮伸、川本周平、篠田 渉、Precise

Calculation of the Local Pressure Tensor in Cartesian and Spherical Coordinates in LAMMPS、Computer Physics Communications、査読有、Vol.190、2015、120-128

DOI: 10.1016/j.cpc.2014.11.017

篠田 渉、脂質膜透過現象の分子シミュレーションによる研究、膜(MEMBRANE)、査読有、Vol.39、2014、372-378 . DOI: なし

[学会発表](計 24 件)

篠田 渉、Molecular Simulation of Liposomal Membranes、The 2nd international symposium on "Multi-scale Simulations of Biological and Soft Materials" (MSBSM 2011)(招待講演)、2011年9月10日、京都。

篠田 渉、Molecular Dynamics Study of Self-Assembly of Amphiphiles、International Workshop: Mathematical approach to emerging topics in Material Science 2012(招待講演) 2012年2月19日、東北大学、仙台。

篠田 渉、中村壮伸、Steven O Nielsen、Stability of Liposome: Free Energy Analysis of Vesicle-to-Bicelle Transformation、Conference on Computational Physics 2011、2011年11月2日、Gatlinburg, Tennessee。

川本 周平、篠田 渉、膜融合の分子メカニズムの解析、第 67 回日本物理学会、2012年3月24日、大阪。

篠田 渉、Molecular Dynamics Study of Effective Interaction Between Liposomes、IACIS2012 (International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference)、2012年5月15日、仙台。

川本周平、篠田 渉、Effect of lipid components on the stability of stalk of membrane fusion、IACIS2012 (International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference)、2012年5月15日、仙台。

篠田 渉、Coarse Grained Molecular Simulations of Lipid Self-Assembly、Bridging Scales in Computational Polymer Chemistry(招待講演)、2012年8月7日、Providence, RI, USA

川本周平、篠田 渉、生体膜融合における融合細孔の形成過程のシミュレーション、日本物理学会 2012 秋季大会、2012年9月20日、横浜

川本周平、篠田 渉、Morphology change of fusion stalk of lipid bilayer membrane studied by molecular dynamics simulation、第 50 回日本生物物理学会年会、2012年9月23日、名古屋

川本周平、篠田 渉、膜融合過程の自由

エネルギー解析、第 26 回分子シミュレーション討論会、2012年11月26日、福岡
川本周平、篠田 渉、曲げ応力による膜の曲げ弾性係数の解析手法、第 26 回分子シミュレーション討論会、2012年11月28日、福岡

篠田 渉、階層的分子シミュレーションによる脂質膜・ベシクルの研究、第 16 回ペプチドフォーラム(招待講演)、2012年12月21日、京都

篠田 渉、Coarse-Grained Molecular Simulation of Lipid Self-Assembly、APS March Meeting 2013(招待講演)、2013年03月19日、Baltimore, MD, USA

篠田 渉、Coarse-Grained Molecular Dynamics Study on Stability of Liposome and Effect of Carbon Nanoparticles、246th ACS National Meeting(招待講演)、2013年9月12日、Indianapolis, IN, USA

篠田 渉、川本周平、Free Energy Analysis of Topological and Morphological Changes in Lipid Membranes: Molecular Dynamics Study、3rd International Conference on Molecular Simulation 2013 (ICMS2013)(招待講演)、2013年11月20日、神戸

篠田 渉、Coarse-Grained Molecular Dynamics Study of Self-Assembled Macromolecules、International Conference on Biomolecular Simulations & Dynamics(招待講演) 2013年11月29日、Chennai, India

篠田 渉、Molecular Dynamics Study of Lipid Self-Assembly、33rd International Conference on Solution Chemistry(招待講演) 2013年7月9日、京都

篠田 渉、膜の柔らかさと機能：分子シミュレーションによるアプローチ、日本化学会第 94 春期年会(招待講演) 2014年3月27日、名古屋

篠田 渉、膜構造形成の分子シミュレーション、日本物理学会第 69 回年次大会(招待講演) 2014年3月28日、神奈川

篠田 渉、膜の粗視化分子シミュレーション、第 359 回 CBI 学会講演会「粗視化による生体分子系のシミュレーション」(招待講演)、2015年02月24日、東京

21 川本周平、篠田 渉、Michael L Klein、Free Energy Analysis of Membrane Fusion、XXVI IUPAP Conference on Computational Physics、CCP2014、2014年08月11日、Boston, USA。

22 川本周平、Giacomo Fiorin、Chris MacDermaid、Russell DeVane、篠田 渉、Michael L. Klein、膜タンパクの粗視化モデル、第 28 回分子シミュレーション討論会、2014年11月12日、仙台。

23 篠田 渉、川本周平、Michael L. Klein、

Membrane Fusion: Free Energy Analysis,
International Symposium on Extended
Molecular Dynamics and Enhanced
Sampling: Nose Dynamics 30 Years
(NOSE30)、2014年11月10日、東京。

- 24 川本周平, Giacomo Fiorin, Chris
MacDermaid, Russell DeVane, 篠田
渉, Michael L. Klein, Coarse- grained
model of membrane protein 、
International Symposium on Extended
Molecular Dynamics and Enhanced
Sampling: Nose Dynamics 30 Years
(NOSE30)、2014年11月10日、東京。

〔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〕

ソフトウェア

http://cpc.cs.qub.ac.uk/summaries/AEVH_v1_0.html

分子動力学シミュレーションを行いながら、
3次元格子点や球座標系でのストレス分布の
計算を可能とするアルゴリズムを、LAMMPS プ
ログラムに組み込んで使用可能なソースコ
ードを公開した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 渉 (SHINODA, Wataru)

名古屋大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70357193

(2) 研究分担者

都築 誠二 (TSUZUKI, Seiji)

産業技術総合研究所・上級主任研究員

研究者番号：10357527

(3) 連携研究者

Michael L. Klein (Klein, Michael)

Temple University, College of Science
and Technology, Dean

研究者番号：N/A