

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770192

研究課題名（和文） 膜タンパク質-脂質二重膜複合体の構造モデリング法の開発

研究課題名（英文） Development of a new method for structural modeling of protein-membrane complexes

研究代表者

森 貴治 (MORI TAKAHARU)

独立行政法人理化学研究所・分子機能シミュレーション研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：90402445

研究成果の概要（和文）：膜タンパク質-脂質二重膜複合体の精密な構造モデリング法の確立を目指し、3つの新しい手法、①ボロノイ分割モンテカルロ積分法、②表面張力レプリカ交換法、③溶媒和自由エネルギー計算に基づく膜タンパク質の配向予測法の開発に成功した。これらの手法を用いることで、膜タンパク質系の分子動力学シミュレーションの精密な初期構造モデリング、シミュレーションの妥当性の判断、混合脂質二重膜に対する効率の良い構造モデリングが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We developed three new methods for reliable structural modeling of protein-membrane complexes: Voronoi tessellation Monte Carlo integration method, Surface-tension replica-exchange molecular dynamics method, and Method to predict the optimal orientation of membrane proteins with Generalized Born implicit membrane model. These methods are useful to perform reliable molecular dynamics simulations of membrane proteins and mixed lipid bilayer systems like lipid rafts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：膜タンパク質、脂質二重膜、脂質ラフト、分子動力学シミュレーション、拡張アンサンブル法、レプリカ交換法

1. 研究開始当初の背景

膜を隔てた物質輸送やシグナル伝達に中心的役割を担っている膜タンパク質は、周囲の脂質分子との特異的相互作用により膜中での構造安定化や機能発現を実現している。例えば、近年、インフルエンザなどの疾病に関わるような膜タンパク質が、ラフトと呼ばれる生体膜中のマイクロドメインと親和性があることが分かってきた。このような膜タンパク質-脂質相互作用の本質を理解すること

は、膜タンパク質の動作原理と機能メカニズムを解明する上でも重要である。

膜タンパク質の分子ダイナミクスを解析する手法として、分子動力学シミュレーションが盛んに用いられている。膜タンパク質系のシミュレーションを行う場合、膜タンパク質-脂質二重膜複合体構造を精密にモデリングする必要がある。これは、一般的にX線結晶構造解析では膜タンパク質を取り囲む脂質二重膜の構造情報を十分に得られないからである。よって信頼性の高いシミュレーション

モンテカルロ法を行う際には、膜タンパク質-脂質二重膜複合体構造を精度良くモデリングし、またモデリング構造が妥当かどうかを判断する必要がある。

2. 研究の目的

近年、生体膜系のシミュレーションに用いられる力場パラメーターが大幅に改善され、単純脂質二重膜については実験データ（膜厚、脂質1分子あたりの表面積、オーダーパラメーターなど）を再現できるようになってきた。しかしながら、膜タンパク質-脂質二重膜複合体の場合、構造が非常に複雑であるため、シミュレーションにおいて膜構造が実際に実験データを再現しているかどうか判断することが従来困難であった。さらに、脂質ラフトのような複雑な混合膜システムに対してはスタンダードな構造モデリング法が確立しておらず、このようなシステムに対して信頼性の高いシミュレーションを行うためには、精密かつ効率の良い構造モデリングが必要不可欠である。このような状況を鑑み、本研究では、

- ① 膜タンパク質-脂質二重膜複合体構造が精度良くモデリングされているかどうかの判断基準の提案と、そのための構造解析法の開発
 - ② 脂質ラフトをモデリングするための、混合脂質二重膜の構造予測法の開発
 - ③ 膜タンパク質の膜に対する配向の理論予測法の開発
- の3つの方法論開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究では上記の各課題に対し、3つの方法論開発を行った。

① ボロノイ分割モンテカルロ積分法

脂質二重膜の構造パラメーターの1つとして、脂質1分子あたりの表面積がある。単純脂質二重膜の場合は、これらは容易に解析することができるが、膜タンパク質-脂質二重膜複合体の場合、タンパク質近傍の脂質分子は、タンパク質との相互作用により非常に複雑な構造をとっているため、単純には解析できない。

そこで我々は、膜タンパク質周囲の脂質1分子あたりの表面積を精度良く解析できる方法として「ボロノイ分割モンテカルロ積分法」を開発した。本手法は、ボロノイ分割法とモンテカルロ積分法を組み合わせた方法である (Figure 1)。本手法では、まず脂質分子の質量中心位置を母点とし、2次元ボロノイ分割を行う。脂質1分子あたりの表面積はボロノイ多角形の面積から計算する。ボロノ

イ多角形中にタンパク質原子が含まれる場合は、ランダムに疑似原子を挿入することにより脂質領域をプローブし (モンテカルロ積分法)、脂質分子が占める領域の面積を数值的に計算する。

さらに我々は、膜タンパク質から遠く離れた脂質分子がバルク相としての性質を持つという実験事実注目し、シミュレーションにおいてこれらの脂質分子の表面積をモニタリングすることで、構造モデリングの妥当性を判断することが出来ると提案した。

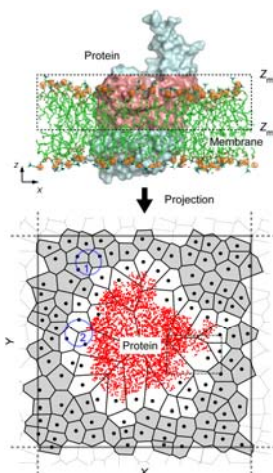


Figure 1. ボロノイ分割-モンテカルロ積分法

② 表面張力レプリカ交換分子動力学法

生体分子系に対する効率の良いシミュレーション法としてレプリカ交換分子動力学法がある。レプリカ交換法とは、対象とするシステムのレプリカを複数用意し、それぞれのレプリカに対して異なる温度でシミュレーションを行い、あるステップおきにメトロポリス判定にしたがってレプリカ間で温度を交換する方法である (Figure 2)。これによって、複雑なエネルギー地形上においても広く構造をサンプリングすることが可能である。しかしながら、従来この温度レプリカ交換法は脂質二重膜系に対してはほとんど適用されなかった。その理由として、脂質二重膜構造が高温で壊れやすくなるためである。

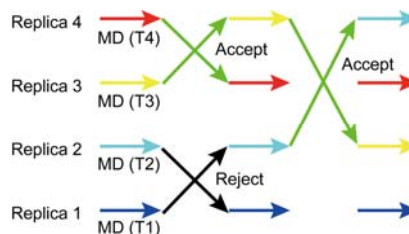


Figure 2. レプリカ交換分子動力学法

本研究ではこのような問題を解決する為に、脂質二重膜系に適用可能な新規拡張アン

サンプル法として「表面張力レプリカ交換分子動力学法」を開発した。本手法は、各レプリカにおいて NPT アンサンブル下（温度・圧力・表面長縁一定）でのシミュレーションを行い、レプリカ間で表面張力を交換する。表面張力とは、異なる 2 相間に発生する力であり、表面張力が増大すれば、表面積および脂質分子の拡散係数が増大し、一方で膜厚が減少することになる。従って、表面張力を交換することによって、脂質二重膜のダイナミックな構造変化を効率良くサンプリングできると期待される。

表面張力レプリカ交換法では、以下の式に従ってメトロポリス判定を行い、表面張力を交換する。

$$\Delta = (\beta_m - \beta_n) \{ E(q^{[j]}, h^{[j]}) - E(q^{[i]}, h^{[i]}) \} \\ + (\beta_m P_m - \beta_n P_n) (h_x^{[j]} h_y^{[j]} h_z^{[j]} - h_x^{[i]} h_y^{[i]} h_z^{[i]}) \\ - (\beta_m \gamma_m - \beta_n \gamma_n) (h_x^{[j]} h_y^{[j]} - h_x^{[i]} h_y^{[i]})$$

③ 膜タンパク質の位置・配向予測法

膜タンパク質の X 線結晶構造には、膜の位置や膜に対する配向などの情報が含まれていないため、膜タンパク質の脂質二重膜中での全原子分子動力学シミュレーションを行う場合は、まずタンパク質の膜に対する初期位置・配向を決めなければならない。従来、これらを決める為に既存の OPM や PDBTM などのデータベースに頼っていた。しかしながら、これらのデータベースに存在しない膜タンパク質のシミュレーションを行う場合は、あらかじめ脂質二重膜に対する位置・配向を理論的に予測する必要があるが、未だスタンダードな方法は確立されていない。

本研究では、陰的溶媒モデル(GB/SA implicit membrane モデル)を用いた膜タンパク質の位置・配向予測法を開発した。GB/SA モデルとは、系に含まれる分子の溶媒自由エネルギーを、静電相互作用に由来する極性項と、van der Waals 相互作用に由来する非極性項から計算する。さらに GB/SA implicit membrane モデルは、膜の疎水性コアを表現するために系に低誘電率な領域を与えるモデルである。本手法では、膜タンパク質の溶媒和自由エネルギーを GB/SA implicit membrane モデルを用いて計算し、溶媒和自由エネルギーが最小となるように膜タンパク質をランダムに並進運動・回転運動をさせて位置・配向を最適化する(Figure 3)。本研究では、分子シミュレーションソフトウェア CHARMM と、それに実装されている GBMV モデルを利用した配向予測ツールを作成した。

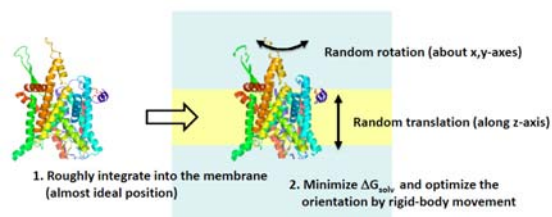


Figure 3. 膜タンパク質の膜に対する位置・配向予測法の概略図

4. 研究成果

① ボロノイ分割-モンテカルロ積分法

本研究に先立ち、4 種類の異なるシステム（タンパク質透過チャネル ttSecY-POPC、mjSecY-POPC、Fab-ttSecY-POPC 二重膜、および筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase-DOPC 二重膜複合体）に対する 100 ns の全原子モデル分子動力学シミュレーションを実行し、得られたトラジェクトリーに対して、脂質 1 分子あたりの表面積を解析した。

Figure 4 に Ca^{2+} -ATPase-DOPC 複合体中の DOPC 1 分子あたりの表面積の時間変化を、 Ca^{2+} -ATPase から距離に従ってプロットした。シミュレーションにおいて、タンパク質から 18 Å 以上離れている脂質分子の表面積は、単純脂質二重膜の表面積（実験値）と良く一致していることが分かった。即ち、これらの脂質分子はタンパク質の摂動をあまり受けておらず、バルク相中の脂質分子とよく似た構造をとっていることを示唆している。従って、このシミュレーションにおいて、脂質二重膜は十分に平衡化されており、構造モデリングの妥当性の判断に本手法が有効であることが示された。

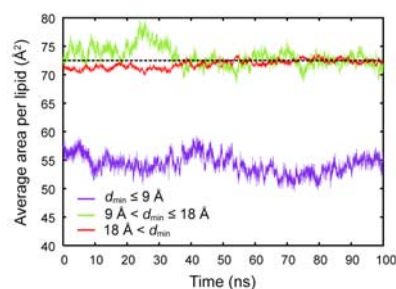


Figure 4. 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase-DOPC 脂質二重膜複合体の MD トラジェクトリーにおける脂質 1 分子あたりの表面積の時間変化

さらに ttSecY-POPC 複合体のシミュレーションにおいては、時間が経過するに従ってバルク相中の脂質表面積が増大していた。これは、SecY チャネルがシミュレーション中で Pre-open 状態から Closed 状態へと構造変化し、

それが周囲の脂質分子の構造変化を誘起していた為であることが分かった。

以上から、本手法は、タンパク質-脂質相互作用を解析するツールとしても有用であることが実証された。本研究で開発した解析プログラムは、理化学研究所・当研究室ホームページにて無償で配布している。

② 表面張力レプリカ交換分子動力学法

本研究で開発した表面張力レプリカ交換分子動力学法の性能を調べる為に、DPPC 二重膜を対象としてシミュレーションを実行した。ソフトウェアには本研究室で開発中の MD プログラム GENESIS を使い、脂質分子の力場には CHARMM36 を用いた。レプリカ数は 4 個とし、各レプリカに対して異なるターゲット表面張力 (0, 6, 12, 18 dyn/cm) を割り当て、各レプリカ 150 ns の計算を実行した。温度・圧力制御アルゴリズムには Langevin dynamics, 結合拘束には SHAKE, SETTLE, 非結合相互作用には Lookup table 法および Particle Mesh Ewald 法を用いた。

Figure 5 に表面張力レプリカ交換シミュレーションにより得られた DPPC 二重膜の構造スナップショットを示す。脂質二重膜は壊れることなく急激に水平方向に伸縮していることが分かった。また、シミュレーションにおいて、システムが表面張力空間をランダムウォークし、それにより表面積空間および膜厚空間でのランダムウォークが実現することが分かった。

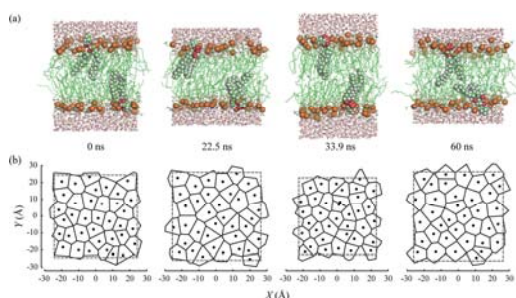


Figure 5. 表面張力レプリカ交換シミュレーションにより得られた DPPC 二重膜のスナップショット

脂質分子の膜平面上での 2 次元平均二乗変位(側方拡散)を解析したところ、表面張力レプリカ交換シミュレーション中の脂質分子は、通常分子動力学計算法にくらべて 1.5 ~ 2.0 倍拡散係数が增大していることが分かった (Figure 6)。この理由として、表面張力を交換することで表面積の増大・減少が繰り返され、脂質分子の周辺に空洞が発生しやすくなり、分子の移動度が増したと考えられる。

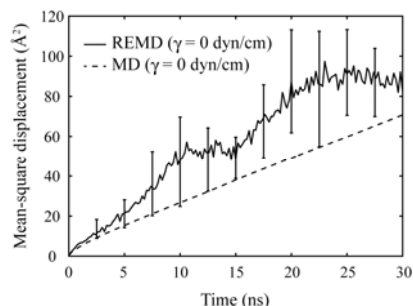


Figure 6. 表面張力レプリカ交換法および通常の分子動力学法から得られる脂質分子の側方拡散

以上の結果から、表面張力レプリカ交換シミュレーションにより、①脂質二重膜を激しく伸縮させられる、そして②脂質分子の側方拡散が増大し、脂質分子がより混じり合った構造をサンプリングできることが分かった。これら 2 つの特徴は、膜タンパク質-脂質二重膜複合体の効率の良いシミュレーションや、脂質ラフトのような混合脂質膜系の構造モデリングに有用であると考えられる。近年、多くの膜タンパク質の構造安定性・構造変化・機能発現に、脂質分子との相互作用が本質的に重要であることが分かってきた。しかしながら、膜タンパク質が触媒する力学反応・化学反応は、マイクロ秒~ミリ秒といった非常に長い時間スケールで起こるため、従来のシミュレーション法でこのような現象を解析することは非常に困難である。また、実際の生体膜は様々な種類の生体分子から構成されており、混じり合い方で様々なコンフォメーションをとるため、通常的手法では限られた構造しかサンプリングできない。本研究で新たに開発した手法の 2 つの特徴を活かすことで、タンパク質-脂質相互作用のサンプリングや膜タンパク質の大規模構造変化の観測、脂質ラフトの効率の良い構造モデリングなどに応用できると期待している。

本研究に関する論文(T. Mori, J. Jung, Y. Sugita, “Surface tension replica exchange molecular dynamics method for enhanced sampling of biological membrane systems) は、現在投稿中である。

③ 膜タンパク質の位置・配向予測法

本研究で開発した手法を用い、14 種類の膜タンパク質 (α ヘリカルタンパク質 9 種類、 β バレルタンパク質 5 種類) に対して膜に対する位置・配向を予測した。そのうちの 1 つとして、タンパク質透過チャネル SecY の配向予測結果を Figure 7 に示す。溶媒和自由エネルギーは滑らかなパラボラ型の地形をしており、最適化により得られた構造は自由エネ

ルギー極小位置にあった。

今回テストに用いた 14 種類すべての膜タンパク質に対して、わずか 500 ステップという短い計算で溶媒和エネルギー極小構造を探索することに成功した。しかしながら、今後の課題として、膜タンパク質中に大きな空洞（ポア）を形成しているものについては、膜の位置や配向が直感的にずれており、正しく予測できていない可能性も同時に示唆された。これは配向予測法の精度よりはむしろ GB/SA モデルの計算精度に由来するものであり、モデルの改善などが必要であると考えられる。

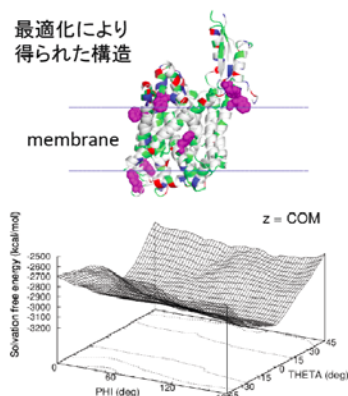


Figure 7. 予測された配向と溶媒和自由エネルギー地形

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Takaharu Mori, Fumiko Ogushi, and Yuji Sugita, “Analysis of lipid surface area in protein-membrane systems combining Voronoi tessellation and Monte Carlo integration methods”, *J. Comput. Chem.*, **33**, 286-293 (2012). [査読有]
- ② 森貴治, 杉田有治, “膜タンパク質が触媒する物質輸送現象の分子メカニズム(<小特集>計算化学)”, *シミュレーション*, **30**, 30-36 (2011). [査読無]

[学会発表] (計 7 件)

- ① Takaharu Mori, Jaewoon Jung, Yuji Sugita, “Development of a new replica-exchange molecular dynamics method for bio-membrane systems”, *The 3rd AICS International Symposium*, 2013/2 (神戸)
- ② 森貴治, 杉田有治 『表面張力レプリカ交換法による脂質二重膜の構造サンプリング』第 50 回生物物理学会年会、2012/9 (名古屋)
- ③ 森貴治 『分子シミュレーションによる膜タンパク質のダイナミクスと機能の理

解』生命医薬情報学連合大会、2012/10 (東京)

- ④ Takaharu Mori, Fumiko Ogushi, and Yuji Sugita, “Analysis of the area per lipid in protein-membrane systems”, *Biophysical Society 56th Annual Meeting*, 2012/2, San Diego (USA),
- ⑤ 森貴治 『分子シミュレーションによる膜タンパク質のダイナミクス解析』CBI/JSBi2011 合同大会、2011/11 (神戸)
- ⑥ Takaharu Mori, “Molecular dynamics simulations for the protein secretory pathway”, 第 49 回日本生物物理学会年会、2011/9 (姫路)
- ⑦ 森貴治, 小串典子, 杉田有治 『膜タンパク質-脂質二重膜系における脂質 1 分子表面積解析法の開発』日本物理学会 2011 年秋季大会、2011/9 (富山)

[図書] (計 1 件)

- ① 杉田有治, 森貴治, A. Pislakov, “スーパーコンピュータを用いた膜タンパク質の分子動力学シミュレーション(第 27 章)”, *膜タンパク質構造研究 最前線* (仮題) 岩田想 編, (印刷中).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 貴治 (MORI TAKAHARU)

独立行政法人理化学研究所・分子機能シミュレーション研究チーム・基礎科学特別研究員
研究者番号：9 0 4 0 2 4 4 5

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

杉田 有治 (SUGITA YUJI)

独立行政法人理化学研究所・杉田理論分子科学研究室・主任研究員

小串 典子 (OGUSHI FUMIKO)

独立行政法人理化学研究所・杉田理論分子科学研究室・協力研究員

マイケル・ファイグ (MICHAEL FEIG)

Michigan state university, Department of Biochemistry & Molecular Biology, Associate Professor