

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25330355

研究課題名(和文) 分子シミュレーションによる抗菌ペプチド生理機能の研究

研究課題名(英文) Simulation study on functions of an anti-microbial peptide

研究代表者

依田 隆夫 (Yoda, Takao)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類の代表的な抗菌ペプチドの一つであるディフェンシンファミリーに属する分子(Crp-4)に着目した。レプリカ交換分子動力学シミュレーションにより、進化的に保存されている3つのジスルフィド結合の有無が、負に帯電した膜近傍の環境における立体構造分布に及ぼす影響を明らかにした。ジスルフィド結合の数を減らすとともに、ペプチド分子に含まれる正電荷部位と疎水的部位の空間的分布が変化することを示した。特に、Cys11とCys28の間のジスルフィド結合の有無がもたらす影響が、抗菌活性と相関している可能性がある。さらに、脂質二重層と結合している状態における立体構造や相互作用を解析した。

研究成果の概要(英文)：Here we performed simulation studies on conformations of a defensin-family peptide, Crp-4, and its interaction with membrane. Our replica-exchange molecular dynamics simulations have revealed effects of the evolutionally conserved disulfide bridges of Crp-4 on its conformations in an environment near negatively charged membrane. The spatial distribution of positively charged groups in the peptide has been shown to correlate with the number of disulfide bridges formed. The disulfide bridge between Cys11 and Cys28 seems to affect the hydrophobic cluster formation within the peptide molecule.

研究分野：生物物理学

キーワード：抗菌ペプチド 分子シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

抗菌ペプチドは自然免疫の構成成分の一つであり、多くの生物の生体防御に関わっている。その作用は様々であるが、典型的には微生物の細胞表面の膜を攻撃し、細胞の内容物を漏出させる活性(以下、抗菌活性と呼ぶ)を持つ。

本研究で着目したのはマウスの小腸で発現する α -ディフェンシンの一つである、cryptdin-4 (Crp-4)である。 α -ディフェンシンは抗菌ペプチドの代表的なファミリーの一つであるディフェンシンのサブファミリーで、哺乳類に分布している。ストランド3本からなるベータシートを含む立体構造が、進化的に保存された3本のジスルフィド結合により安定化されている。Crp-4はマウスの α -ディフェンシンの中で比較的高い抗菌活性を持つことで知られ、活性メカニズムに関連する(実験的な)研究の報告が多い。コントロールされた組成の脂質二重層を用いた *in vitro* の実験も複数報告されており、シミュレーションとの比較が行いやすい。

ディフェンシンの抗菌活性のメカニズムは様々であると考えられるが、近年、いくつかのディフェンシンにおいて多量体化が重要な役割を果たすことが知られるようになった。Crp-4の場合、水溶液中では単量体として存在すると考えられているが、膜に結合した後に2量体形成することを示唆する実験結果も報告されている。Crp-4の2量体構造は未解明だが、他の α -ディフェンシンではベータシート同士が水素結合を介して特異的に接する2量体構造が知られている。Crp-4による同様の2量体形成が活性にとって必要であるとする、進化的に保存された天然立体構造が活性機構において重要な役割を果たしていることになる。

一方、Crp-4のシステイン残基をアラニンで置換しジスルフィド結合を全て取り除いた変異体(以下、ジスルフィド結合全欠損変異体と呼ぶ)は野生型と同程度の抗菌活性を示すことが知られている。この変異体は構造が不安定であり野生型と同様の「天然構造」へはフォールドしない。よって、大きく構造が揺らいでいる分子が、おそらく野生型のそれとは異なる機構により抗菌活性を発揮していると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、変異型 Crp-4 が抗菌活性を発揮するために、この分子は完全なランダムコイル構造をとるのではなく、環境に依存する何らかの構造的な秩序を持つ必要があるのではないかと考えた。そこで、ジスルフィド結合の欠失が Crp-4 の立体構造に及ぼす影響を明らかにし、それが負に帯電した脂質二重層との相互作用に与える影響を調べることを本研究の目的とした。

そのために、野生型とジスルフィド結合全欠損型 Crp-4 が膜近傍の環境で取る立体構造を

分子シミュレーションにより探索した。

その際、計算量低減のために陰溶媒近似を活用し、また、大きく揺らいでいる鎖状分子の立体構造探索を効率よく行うために、拡張アンサンブル法を使用することとした。

3. 研究の方法

(1) 負に帯電した膜近傍の水相における Crp-4 とジスルフィド結合全欠損変異体の立体構造探索

まず、負に帯電した膜の近傍の水相を模した条件で、Crp-4 の野生型とジスルフィド結合全欠損変異体、また、3つのジスルフィド結合のうち1つまたは2つを欠く6種類の変異体の立体構造空間を探索した。ここでは、charmm c36 力場を使用し、計算コスト低減のために陰溶媒を使用した。さらに、構造探索を効率的に行うために、レプリカ交換分子動力学法(REMD)を使用した。この計算を2013年度に一度実行し、パラメータの一部を修正した上で2015年度に再度実行した。その結果についてここでは記述する。細菌の細胞膜は真核生物のそれよりも大きな負電荷を帯びているが、その影響を近似的に取り入れるために、-z方向に様な電場をかけた。281 K から 650 K までの温度を 16 個のレプリカに割り当てて REMD を行い、(レプリカあたり) 239 ns (一様電場無しの場合) または 919 ns (同ありの場合) の REMD のデータを分析の対象とした。データ分析として(a)クラスター解析による立体構造の分類、(b)ペプチド分子に含まれる正電荷を持つ官能基の空間的分布の算出、(c)同疎水側鎖の空間的分布の算出 等を行った。

(2) 負に帯電した脂質二重層と接触している Crp-4 およびその変異体の立体構造および相互作用の解析

膜に接触している時にペプチドが取りやすい立体構造を探索するために、implicit membrane の使用を試みた(charmm ソフトウェアを使用。力場は charmm c22)。負電荷を持つ脂質を 100% または 30% 含む膜に相当する電荷密度を implicit membrane に設定し、2種類のジスルフィド結合部分全欠損変異体の MD を行った。

また、(1)のシミュレーションで得られたジスルフィド結合全欠損変異体の立体構造のクラスタリングで得られた構造グループのうち、頻度の高かった上位3つから代表構造を取り出した。全疎水的側鎖の重心から正電荷を持つ官能基全ての重心までを結ぶベクトルが膜側を向くように分子を回転させ、陽に表現した 128 分子の POPG からなる膜の表面近傍の水相に配置し、MD を行った(力場は charmm c36)。

膜へ接触した後のペプチド分子について、正電荷と疎水的側鎖の空間分布、ペプチドと脂質の間に形成される水素結合の数などを評価した。

(3) 粗視化モデルを用いた Crp-4 存在下の脂質二重層再構成シミュレーション

リン脂質、水、Crp-4 を一辺が 150 Å の立方体の箱の中にランダムに配置した状態を高温 MD 計算 ($T = 2000 \text{ K}$) により生成し、その後温度を室温に戻すことによって脂質二重層を構成させるシミュレーションを行った。Crp-4 分子の個数が 4, 8, 12, 16 の場合について、各 3 回ずつ同様の MD を実行した。計算コストの低減のため、ここでは、ポリペプチドおよび脂質の粗視化モデルとして広く使われている Martini モデルを使用した。また、Crp-4 分子にはエラスティックネットワークによる拘束を行った。なお、このシミュレーションではさらなる条件検討が必要であると考えており、今回提示するのは予備的な結果である。

4. 研究成果

(1) 負に帯電した膜近傍の水相における Crp-4 とジスルフィド結合全欠損変異体の立体構造探索

陰溶媒中の Crp-4 野生型と 7 種類のジスルフィド結合全欠損変異体の立体構造を REMD で探索し、300 K における立体構造を解析した結果、以下のことが明らかになった。

Cys Ala 変異によりジスルフィド結合の数を減らすと分子の構造多様性が増えるが、Cys11-Cys28 のジスルフィド結合を持つ変異体では野生型に類似の構造が他と比べて出現しやすかった。これは変異体の構造に関する実験事実と部分的に一致すると考えられる。

負に帯電した膜の近傍の環境を模するために一様電場を導入すると、立体構造分布が

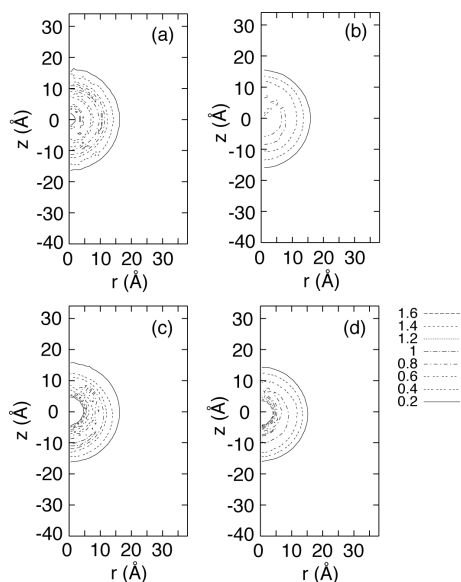


図 1. 野生型 ((a), (c)) とジスルフィド結合全欠損変異体 ((b), (d)) の正電荷部位の空間分布。一様電場なし ((a), (b)) の場合と一様電場ありの場合 ((c), (d))。

変化し天然類似構造の出現確率が下がった。また電場の影響により、ペプチド分子の正電荷の空間分布に偏りが生じた (図 1)。ただし、その度合いは変異体ごとに異なり、ジスルフィド結合を 2 つ持つ変異体 (2 カ所の Cys 残基を Ala に置換した変異体) において、膜近傍への正電荷の局在が顕著であった。分子の柔軟性が増したために、より多くの正電荷が膜の方へ移動できたと考えられる。他方、ジスルフィド結合全欠損変異体では正電荷が狭い領域に局在することは観察されなかった。立体構造に対するジスルフィド結合による束縛が無くなり、正電荷間の斥力により分布が広がるためであると考えられる。

一様電場の下では、疎水側鎖が (正電荷とは) 逆側へ局在する様子が観察された (図 2)。ただし、疎水側鎖の空間分布は変異体

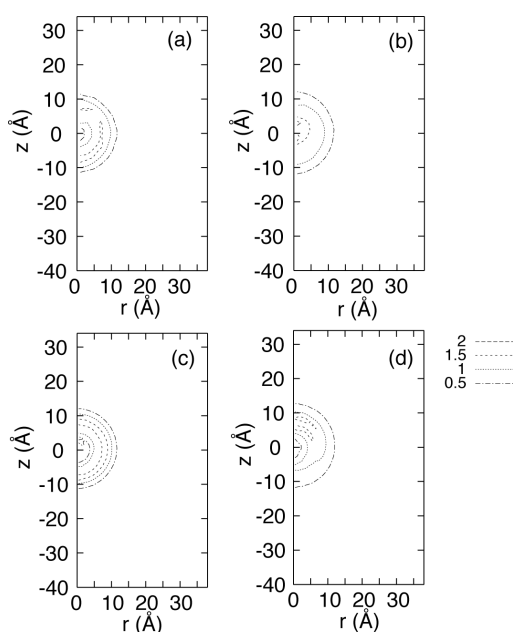


図 2. C6/21A 変異体 ((a), (c)) とジスルフィド結合全欠損変異体 ((b), (d)) の疎水側鎖の空間分布。一様電場なし ((a), (b)) の場合と一様電場ありの場合 ((c), (d))。分子が自由に回転するため分布が球状になる。

によって異なっており、ジスルフィド結合全欠損変異体において、膜に近い領域における疎水的側鎖の密度がもっとも小さかった。野生型を含めた 8 種類のペプチドの結果を比較すると、Cys11-Cys28 のジスルフィド結合の有無が疎水的側鎖の空間分布に大きな影響を及ぼすことが示された。

以上のように、分子全体の柔軟性だけでなく Cys11-Cys28 のジスルフィド結合の有無が負に帯電した膜の近傍の環境における Crp-4 の振る舞いに大きな影響を及ぼすことが明らかになった。このジスルフィド結合を持つ変異体 (C6/21A) がジスルフィド全欠損変異体や野生型と比べて低い抗菌活性を持つこ

とが知られているが、ここで解明された立体構造分布の特徴との関連が注目される。

(2) 負に帯電した脂質二重層と接触している Crp-4 およびその変異体の立体構造および相互作用の解析

2 種類の変異体をそれぞれ implicit membrane の表面、内部の疎水的な領域、および両者の境界領域に配置して MD を実行したところ、全ての試行においてペプチド分子は速やかに implicit membrane の外側へ押し出され、implicit membrane の表面に吸着した。Crp-4 (野生型) は膜表面に結合しやすく、膜の内部への侵入はレアイベントであることが過去の実験により示唆されており、定性的にはこれと合致している可能性がある。

水と脂質二重層を陽に含むモデルを用い、膜表面近傍の水相に Crp-4 の野生型とジスルフィド結合全欠損変異体の分子をそれぞれ配置した状態から MD を実行した。得られた 100-150 ns のトラジェクトリに基づいてペプチドの正電荷と疎水的な側鎖の空間分布を求めた。

ペプチド分子の正電荷部位と疎水的側鎖の空間分布を解析したところ、疎水的な側鎖が正電荷部位よりも (膜の) 外側に位置する状態に留まった。ジスルフィド結合全欠損変異体では野生型と比べて疎水的部位と正電荷部位の空間的な分離が大きい傾向が見られた。また、ジスルフィド結合全欠損変異体の異なる初期構造を用いた MD 同士を比較すると、結果が初期構造に依存しており、3 回行った MD のうち 1 つでは、疎水側鎖の分布が膜表面側へシフトする様子が観察された。

(3) 粗視化モデルを用いた Crp-4 存在下の脂質二重層再構成シミュレーション

高温 MD で生成した乱雑な状態を初期状態として室温 MD を実施した。野生型 Crp-4 の個数を 4, 8, 12, 16 の 4 通りとして室温で MD をおこなったところ、ほとんどの MD において脂質二重層が再び形成された。また、終状態ではほとんどの Crp-4 分子は脂質二重層内部には留まっておらず、膜の表面に位置していた。脂質二重層の膜が再び形成されるまでに要した時間と Crp-4 分子の個数の間に緩やかな相関が見られた。

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4件)

1. T. Tsuji, T. Yoda, and T. Shirai*, "Deciphering Supramolecular Structures with Protein-Protein Interaction Network Modeling" *Scientific Reports* **5**, 16341 (2015).

査読あり, DOI: 10.1038/srep16341

2. T. Yoda* and T. Tsuji. "A simulation study on conformations of an anti-microbial peptide.", "Computational Materials and Biological Sciences" 63-71, (Kholmurodov ed.) (2015) Nova Science Publishers, Hauppauge, NY. 査読なし
https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=54387&osCsid=24a936f14677121ef97cbd2080e40833
3. J. Jung, T. Mori, C. Kobayashi, Y. Matsunaga, T. Yoda, M. Feig, and Y. Sugita*, "GENESIS: A hybrid-parallel and multi-scale molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms for biomolecular and cellular simulations" *WIREs – Comput. Mol. Sci.* **5**, 310-323 (2015). 査読あり, DOI: 10.1002/wcms.1220
4. T. Yoda*, Y. Sugita, and Y. Okamoto, "Salt effects on hydrophobic-core formation in folding of a helical mini protein studied by molecular dynamics simulations", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **82**, 933-943 (2014). 査読あり, DOI: 10.1002/prot.24467

[学会発表](計4件)

1. T. Yoda, "Simulation Study on Conformations of Antimicrobial Peptide Cryptdin 4 and its Mutants", 2nd International Symposium on Computational Materials and Biological Sciences, 2015年9月1日, 名古屋大学野依学術交流館(愛知県名古屋市).
2. T. Yoda, "Simulation Study on Conformations of Small Peptides.", Dushanbe Symposium on Computational Materials and Biological Sciences 2014, 2014年9月24日, ドゥシャンベ(タジキスタン共和国).
3. 依田隆夫, 辻敏之, 杉田有治, 「抗菌ペプチド Cryptdin-4 ジスルフィド結合変異体の分子動力学シミュレーション」第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月27日, ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア(神奈川県横浜市).
4. T. Yoda, Y. Sugita, and Y. Okamoto, "Salt effects on folding of a helical mini protein villin headpiece subdomain HP36 studied by generalized-ensemble simulations", Biophysical Society 58th Annual Meeting, 2014年2月19日, サンフランシスコ(米国).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依田 隆夫 (YODA Takao)

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