

課題名 (タイトル) :

膜タンパク質の分子動力学シミュレーション

利用者氏名 : ○森貴治、李秀栄、二島渉、山田健太、末安充央

所属 : 杉田理論分子科学研究室

細胞の外側を取り囲む細胞膜には、チャネルやポンプ、トランスポーターなどの膜タンパク質が存在し、これらのタンパク質は細胞膜を隔てた物質輸送やシグナル伝達などの重要な役割を担っている。遺伝情報の約 30%が膜タンパク質であり、また、膜タンパク質は創薬の重要なターゲットでもあるため、その立体構造と機能メカニズムの解明が盛んに行われている。近年、X 線結晶構造解析や核磁気共鳴分光法、電子顕微鏡などの構造解析技術の発展により、膜タンパク質のような結晶化が困難な生体分子に対しても高解像度の立体構造情報が得られるようになってきた。しかしながら、これらの実験手法から得られる構造はあくまでタンパク質の静止像であり、反応サイクルにおけるタンパク質のダイナミックな構造変化と機能発現の相関を調べることは未だ難しい。

タンパク質のダイナミックな性質を調べる方法として、分子動力学法が広く用いられており、膜タンパク質のナノ秒~マイクロ秒オーダーの運動を解析することが可能である。本研究では、チャネルタンパク質 SecY や多剤耐性に関わるトランスポーター OmpF, MATE, 酸化還元酵素 NOR など、生物学・薬理的にも重要な膜タンパク質をターゲットとして、これらが機能を発揮するときの分子メカニズムを分子動力学シミュレーションにより解明することを目指した。以下に各課題における成果を報告する。

【課題 1】タンパク質透過チャネル SecY の分子動力学シミュレーション (森・末安)

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

細胞内で合成されるタンパク質は、30%以上が膜を透過して細胞外に分泌、または膜タンパク質として膜に埋め込まれるといわれており、このような膜輸送過程で、タンパク質を透過させる装置 Sec トランスロコンが重要な役割を担っている。Sec トランスロコンは、バクテリア中では細胞膜、真確生物中では小胞体膜に

存在し、リボソームで合成された直後のアンフォールドしたタンパク質を透過させ、タンパク質が本来働かすべき細胞小器官に運搬されるための輸送経路を形成している。Sec トランスロコンは、駆動モーター SecA ATPase、タンパク質透過チャネル SecYE、透過促進シャペロン SecDF から構成される複合体で、それぞれのタンパク質が、大規模に構造変化し、協奏的に機能することで効率の良いタンパク質透過を行っていると考えられている。

近年、塚崎 (奈良先端大・准教授) らにより、新たに SecYEG 複合体の結晶構造が解かれた。SecG は二回膜貫通ヘリックスを有しており、それをつなぐループは SecY チャネルの Cytoplasm 側をブロックしていることが分かった。しかしながら、このような構造では、SecY はタンパク質を透過できないため、SecG のループ領域はフレキシブルであり、機能サイクルにおいてチャネルを開かせるように大きく動くことが予想される。そこで本研究では、分子動力学シミュレーションを用い、Sec トランスロコンにおける SecG の役割を明らかにすることを目指した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究では、我々の研究室で開発している分子動力学シミュレーションソフトウェア GENESIS を用いた。X 線結晶構造解析で得られた SecYEG (ペプチド非結合型および結合型) を POPE 脂質二重膜へ埋め込み、それぞれ 700 ns と 160 ns の MD 計算を実行した。系の全体図を図 1 に示す。システムは 1 SecYEG, 361 POPE, 37527 water, 106 K⁺, and 116 Cl⁻ で構成される。SecYEG および POPE のパラメーターには、CHARMM36 力場を用いた。Integrator には Leapfrog Verlet 法、温度/圧力制御には Langevin 熱浴および Langevin ピストン (温度 300K, 圧力 1 atm)、距離拘束には SHAKE/SETTLE、長距離相互作用計算には PME 法および 1/R² lookup table 法 (カットオフ距離 12 Å) を用いた。

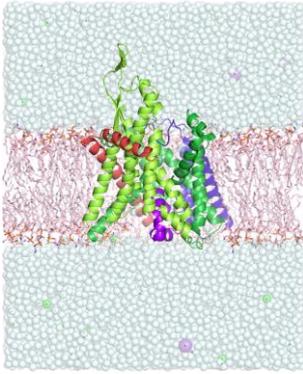


図1 シミュレーションを行った SecYEG-POPE 複合体

3. 結果

塚崎らによる Cross-link 実験によると、SecY チャンネルの入り口付近に存在する Ile272 と SecG のループ領域にある Leu35 が強く相互作用していることが分かっている。そこで我々は、SecG のループ領域の動きを調べる為に MD トラジェクトリー中の Ile272 と Leu35 の距離の時間変化を解析した。その結果、SecG は SecY から 12 Å 程度解離することがあるが、ジスルフィド結合形成距離にあたる 7Å に近づくとときもあり、比較的柔軟であることが分かった (図 2)。このことから、SecG は静止状態において、SecY のチャンネルの Cytoplasm 側を弱くブロックしているものと考えられる。

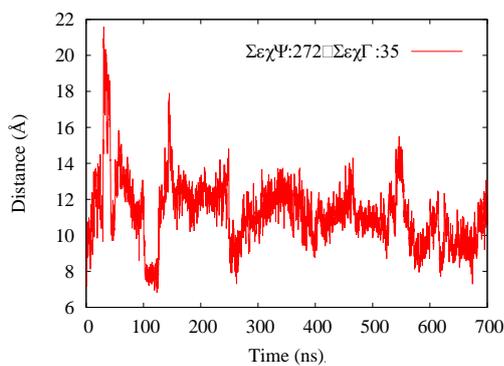


図 2 SecY I272 - SecG L35 間距離の時間変化

また、ペプチド非結合型 SecYEG の MD 計算では、SecYEG のラテラルゲートが閉じる様子が観察され、タンパク質が SecYEG を透過する際、透過ペプチドが SecY のラテラルゲートの構造変化を誘起することがシミュレーションにより明らかになった。

4. まとめ

SecYEG-POPE 複合体の全原子分子動力学シミュレーションを実行し、Sec トランスロコンにおける SecG

のダイナミックな役割を明らかにした。

5. 今後の計画・展望

我々のグループは、以前、SecYE の構造変化には脂質分子との相互作用変化が重要であることを提唱した (T. Mori et al., *Biochemistry*, 2010)。今後の展開として、SecYEG と脂質分子との相互作用と構造変化機構を拡張アンサンブル法などの方法を用いて自由エネルギー解析により明らかにする。また、Sec トランスロコンの機能メカニズムの全容の解明を目指す。

【課題 2】外膜タンパク質ポーリンの物質輸送 (李)

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

大腸菌をはじめとするグラム陰性菌は細胞壁の外側に外膜を有する。外膜に埋め込まれたタンパク質 (ポーリン) は、抗菌薬の侵入経路となっており、重要な創薬ターゲットでもある。これまでの生化学的な実験やポーリンの結晶構造解析から、外膜タンパク質は筒状の β バレル構造をもち弱いリガンド選択性を示すことが知られている。モデル膜を用いた分子動力学計算により、リガンド (抗薬剤) の結合サイトやイオン透過のメカニズムも明らかになってきた。しかし、外膜環境がこれらに及ぼす影響について知られていることは少ない。外膜の構造は脂質二重膜からなる内膜のものとは異なり、リン脂質とその外側を覆うリポ多糖 (LPS) からなる非対称な構造をしている。実験的には、外膜の組成 (リポ多糖の長さや種類) によりリガンドの親和性が大きく変化することが知られている。しかし、実験系の構築が難しいこともあり、構造生物学的な知見はほとんど得られていない。そこで本研究では、LPS の種類や長さがポーリンタンパク質の構造とダイナミクスに与える影響を、分子動力学計算を用いて明らかにすることを目的とした。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究では、外膜タンパク質ポーリンのうち、最も大きな口径を持ち良く調べられている OmpF に着目した。LPS とタンパク質間の相互作用を調べるために、外膜環境を露に取り込んだ全原子レベルのモデルを構築した。LPS の種類や長さの異なる 7 つのシステムに対して、1 気圧 310K の分子動力学計算を各々 500ns

実施した。全ての分子動力学計算は GENESIS を用いて行った。

3. 結果

はじめに、外膜環境が OmpF 構造に与える影響を調べた。7つのシステムに対して根平均二乗変位 (RMSD) を求めた結果、外膜環境に依らず OmpF のバレル構造は非常に安定であることがわかった。一方で、同システムに対して求めた根平均二乗揺らぎ (RMSF) では、OmpF 表面ループの構造揺らぎが LPS の種類によって異なっており、OmpF が LPS と相互作用していることを示唆する。

次に、LPS の構造とダイナミクスを調べた。外膜を覆う LPS が均一な場合とそうでない場合とで LPS の運動性に違いが見られた。前者では LPS 間のパッキング相互作用が強く LPS の運動が束縛されるのに対して、後者では LPS 間の相互作用が弱く LPS の運動性が高くなっていることがわかった。このことは、OmpF の開口部の環境が LPS の種類や長さによって異なることを示唆する。

最後に、OmpF 表面のアミノ酸残基と LPS との相互作用を解析した。抗体に対するエピートープとして考えられている3つのループ領域 (L1、L4、L5) に着目すると、L1 と L5 は LPS と相互作用していることがわかった。但し、両者は LPS の異なる部分と相互作用している。一方で、L4 は別の OmpF のループ領域と相互作用する (OmpF はホモ 3 量体として存在する)。これらの結果は、3つのエピートープの抗体認識が外膜によって妨げられていることを示唆する。さらに、外膜の組成が L1 と L5 の認識能に影響を与える一方で、L4 に対しては影響しないことを示唆する。計算結果は、外膜組成により抗薬剤の OmpF 親和性が大きく変わるとする生化学的な実験結果と良く一致する。

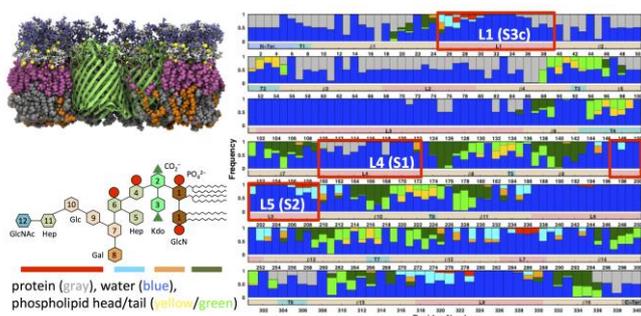


図 1. OmpF のアミノ酸残基と LPS との相互作用マップ

4. まとめ

本研究では、外膜タンパク質 OmpF の構造とダイナミクスが外膜組成の影響を受けて変化することを、分子動力学計算により明らかにした。

5. 今後の計画・展望

今後は、OmpF のリガンド結合とチャネル透過の分子動力学計算を行い、外膜タンパク質の物質輸送メカニズムを明らかにしたい。外膜表面部分は親水性が高く、水分子が外膜タンパク質の機能に与える影響も大きいと思われる。複雑な外膜環境での水分子の構造やダイナミクスを明らかにし、そのタンパク質機能との相関を調べたい。

【課題 3】多剤排出トランスポーター-MATE の薬剤排出(二島)

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

多剤排出タンパク質は、老廃物や有害物質を細胞外に排出しバクテリアから高等真核生物まで多くの種に共通して存在している。これらのタンパク質はがん細胞や寄生体において多く発現され、薬剤耐性の原因の一つになることが知られている。我々は、MATE (Multidrug and toxic compound extrusion protein) と呼ばれる多剤排出トランスポーターに注目し、分子動力学 (MD) 等のシミュレーションを行いながら、輸送メカニズムについて知見を深めてきた。

2. 具体的な利用内容、計算方法

条件を変えたシミュレーションを独立に行うことで、プロトン化状態と、脂質分子の役割を理解しようとしている。本年度は、前年度に特定したプロトン移動経路についての量子効果を取り入れた (QM/MM) シミュレーションでの再現性の確認と、脂質分子がドメイン間の隙間に入ることができるかの長時間 MD (1 μ s) での検証を主に行った。

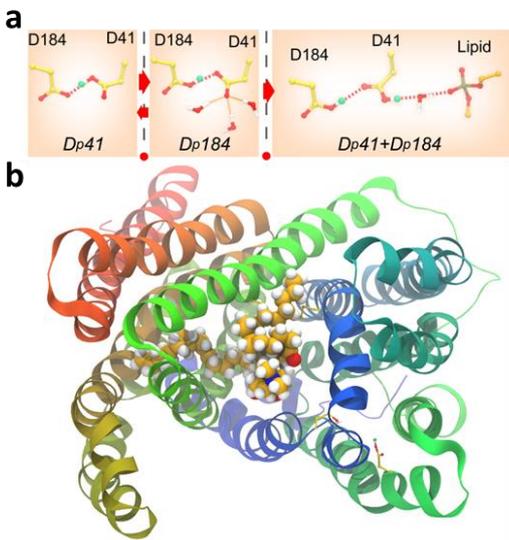
3. 結果

前年度までの計算から、図 a のような 2 ステップのプロトン移動経路が示唆されていた。MD のスナップショットを使用して、1 ステップ目について 3 回、2 ステップ目については 6 回 QM/MM 計算を行い、実際に

プロトンが移り得ることを示した。

1 ステップ目の移動に関しては、プロトン結合サイトに配位した水を除いて QM/MM 計算を行うとプロトンが移動しないケースが現れた。これによりプロトンの移動しやすさは、少なくとも配位した水が影響していることが示唆された。

2 ステップ目のプロトン移動が起こるためには、脂質分子がプロトン結合サイトに近づく必要があったが、長時間 MD(1ps)を行うことにより、脂質分子がドメイン間の隙間に入ってプロトン結合サイトに近づくことができることを示した。(図 b)



a. プロトン移動経路 b. 長時間 MD のスナップショット (D184 がプロトン化している場合)

4. まとめ

MATE における多剤排出時のプロトン移動経路モデルを提唱した。薬剤排出時には、脂質も重要な役割を果たしていると考えられる。異なる種類のシミュレーション(MD, QM/MM, electrostatics)は、首尾一貫して同じ結果を示唆しており、また、同じ条件の複数のシミュレーションを追加計算することで、同じ結果、同様の傾向が再現されることを示した。

5. 今後の計画・展望

提案したモデルは、“プロトン化が原因で、タンパク質の構造変化(Straightから Bent)が起こる”というステップがまだ仮説として残っているので、その仮説をシミュレーションで検証したいと考えている。

【課題4】膜貫通型酵素複合体のNO移動経路の解明(山

田)

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

一酸化窒素(NO)は、生体内において血管の拡張や筋肉の緩和に関わるシグナル伝達の役割を担うと考えられている。その一方で、不対電子をもつ NO は、DNA や脂質などの生体物質と容易に過酸化反応を起こすことから、細胞毒性を示す。そこで生体内では、NO の拡散を制御し、かつ、NO を速やかに消去するメカニズムが存在すると考えることができる。

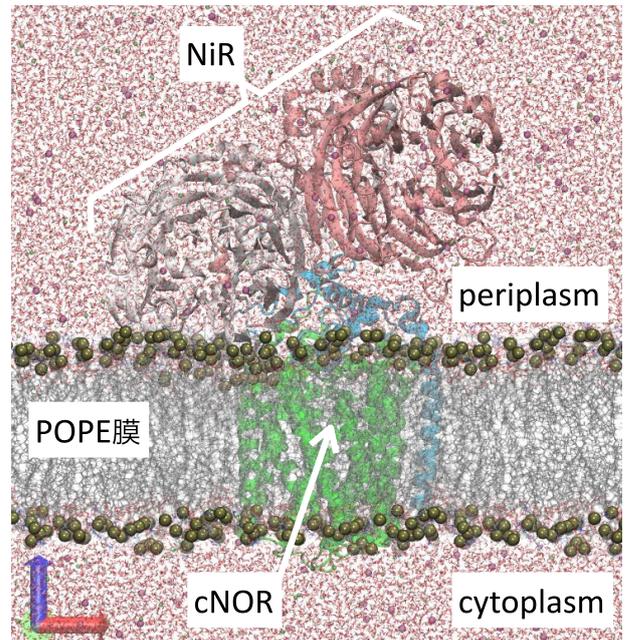
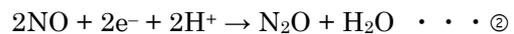
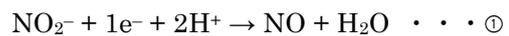


図 1. POPE 膜中の NiR-cNOR 複合体。ただし、POPE 分子の P 原子を球で表している。

現在、われわれが注目している膜貫通型酵素複合体(NiR-cNOR 複合体)は、グラム陰性菌である緑膿菌の形成膜に存在するタンパク質である。この複合体は、細胞内(サイトプラズム)から、形成膜と外膜と間の空間(ペリプラズム)に運ばれる NO₂を、還元反応によって N₂O に変換する機能を有する。この還元反応の素反応は



であり、反応①と②はそれぞれ NiR と cNOR で起こる。つまり、NiR で生成される NO は、ペリプラズムに拡散されずに cNOR まで運ばれて、その反応領域で消去される、という過程が推定される。そこで、タンパク質と脂質二重膜、溶媒の働きが動的、かつ、複雑に絡み合っていて実現している、この NO 移動経路を取り上げ、NiR から cNOR に至るまでの経路を決定し、その経路

がもつペリプラズムへの拡散防止機構まで明らかにすることを目的とした。

2. 具体的な利用内容、計算方法

理研播磨の城研究室において解かれた NiR-cNOR 複合体の X 線結晶構造を、生体膜のモデルである POPE 脂質二重膜に埋め込み、水とイオンを加えた系を用意した。常温常圧(300 K, 1atm)の条件下で分子動力学(MD)計算を行い、まず生体環境における複合体の振る舞いを調べた。MD 計算の実施には、本研究室で開発している GENESIS パッケージを用いた。

複合体を構成する cNOR は POPE 膜を貫通している一方、NiR は、その一部が膜に埋まっている程度である。そこで、生体環境を記述するのに適したモデルを決定するために、NiR とコンタクトしている POPE 分子の扱いについて、I. POPE 分子を取り除かない、II. NiR から 2.5 Å 以内にあるものを取り除く、III. NiR か

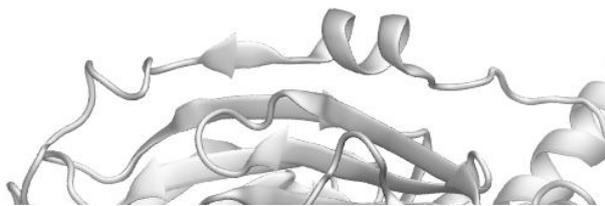


図 2. NiR が POPE 膜に埋まっている領域。ただし、青・金・赤・橙色の球はそれぞれ、2.0, 2.5, 3.0, 5.0 Å 以内の脂質分子に含まれる P 原子を示す。

ら 5.0 Å 以内にあるものを取り除く、という 3 パターンの初期構造をつくった。

3. 結果

パターン I では、230 ナノ秒の結果として、初期構造では NiR によって凹まされている膜領域の、その凹みをなくそうとする復元力が主因となり、NiR は、あたかも膜上を弾んでいるように、大きく上下に動いた。この運動によって NiR-cNOR 間結合が切れることはなく、強い相互作用で結合していることが分かった。パ

ターン II では、200 ナノ秒の結果として、パターン I のような大きな上下運動は見られず、長時間にわたって NiR と POPE 膜がコンタクトした状態が維持された。これは、NiR の下にあった POPE 分子を取り除いたことにより、膜の復元力が生じなかったことが原因であろう。パターン III は、まだ数十ナノ秒の結果だが、パターン II とよく似た傾向が見られた。ただし、パターン III では脂質二重膜における上下層の密度差が大きいことから、100 ナノ秒程度で、膜が湾曲してしまうと予測できる（現在計算中）。以上の計算結果から、複合体に対する適切な生体環境モデルはパターン II であると結論づけた。

4. まとめ

本研究では、MD 計算を用いた NO 移動経路の解明への第一段階として、NiR-cNOR 複合体の生体環境モデルを決定した。この結果は、これから経路解明を実施していく上で、重要な基盤となるものである。

5. 今後の計画・展望

MD 計算で NO を扱った研究自体が多くなく、必要な力場の開発も発展途上である。提案されている力場の吟味として、水中やヘプタン中（タンパク質の簡易モデル）、水+脂質二重膜中における、NO の拡散係数を評価する。必要ならば力場を調整したのち、NiR-cNOR 複合体系に NO を挿入して、NO 移動経路を明らかにしていく計画である。

また、現在は POPE 膜を用いているが、より適切に生体環境を記述するために、緑膿菌の形成膜の脂質分子組成をモデリングした混合膜の使用を考えている。

平成 27 年度 利用研究成果リスト

【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】

- 1) T. Mori, N. Miyashita, W. Im, M. Feig, and Y. Sugita, “Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms”, *BBA-Biomembranes* (in press). doi:10.1016/j.bbamem.2015.12.032.
- 2) Patel, D., Re, S., Wu, E., Qi, Y., Klebba, P., Widmalm, G., Yeon, M. S., Sugita, Y., and Im, W. “Dynamics and Interactions between OmpF and Lipopolysaccharide: Influence on Pore Accessibility and Ion Permeability”, *Biophys. J.*, 2016 (in press).
- 3) W. Nishima, W. Mizukami, Y. Tanaka, R. Ishitani, O. Nureki, Y. Sugita, “Mechanics for Two-step Proton Transfer Reactions in the Outward-Facing Form of MATE transporter” *Biophys. J.*, 2016 (in press)
- 4) Y. Tanaka, Y. Sugano, M. Takemoto, T. Mori, A. Furukawa, T. Kusakizako, K. Kumazaki, A. Kashima, R. Ishitani, Y. Sugita, O. Nureki, and T. Tsukazaki, “Crystal structures of SecYEG in lipidic cubic phase elucidate a precise resting and a peptide-bound state”, *Cell Reports*, **13**, 1561-1568 (2015).

【国際会議などの予稿集、proceeding】

なし

【国際会議、学会などでの口頭発表】

- 1) 森貴治、杉田有治「拡張アンサンブル法の混合脂質二重膜系への応用」第 29 回分子シミュレーション討論会、新潟（2015 年 11 月）
- 2) 森貴治、杉田有治「膜タンパク質-脂質相互作用の定量的解析法の開発と応用」第 53 回生物物理学会年会、金沢（2015 年 9 月）
- 3) T. Mori and Y. Sugita, “Multidimensional surface-tension replica-exchange molecular-dynamics simulations of biological membranes”, Supercomputational Life Science 2015, Tokyo, 2015/10
- 4) T. Mori and Y. Sugita, “Replica-exchange molecular-dynamics simulations of mixed lipid bilayer systems”, Biophysical Society Thematic Meeting “Biophysics of Proteins at Surfaces: Assembly, Activation, Signaling”, Madrid (Spain), 2015/10
- 5) 李秀榮「構造から機能へ：糖鎖科学における計算化学の挑戦」第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会（BMB2015）、神戸（2015 年 12 月）
- 6) S. Re, P.-H. Wang, I. Yu, Y. Sugita, “Modeling the MAPK/ERK pathway under crowding environment by the combined multi-scale simulations.” Supercomputational Life Science 2015 (SCLS2015), Tokyo, Japan
- 7) S. Re, W. Nishima, T. Tahara, Y. Sugita, “Hydration structure at ceramide/water interface: A molecular dynamics simulation study.” 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢（2015 年 9 月）
- 8) 李秀榮、渡部茂久、二島渉、宗行英朗、山口芳樹、杉田有治「分子動力学シミュレーションによる N 型糖鎖衝突断面積の計算」第 34 回日本糖質学会年会、東京（2015 年 8 月）
- 9) 李秀榮、渡部茂久、二島渉、宗行英朗、山口芳樹、杉田有治「レプリカ交換分子動力学計算による糖鎖イオン移動度質量スペクトルの予測」第 1 回理化学研究所・産業技術総合研究所共同シンポジウム「ビ

平成 27 年度 利用報告書

ビッグデータとビッグシミュレーションによる生命医科学の未来」、東京（2015 年 6 月）

- 10) 李秀榮「生体外膜ポーリン OmpF の全原子モデリング」「分子システム研究」第 4 回春合宿、静岡（2015 年 5 月）
- 11) W. Nishima, W. Mizukami, Y. Tanaka, R. Ishitani, O. Nureki, Y. Sugita “Molecular mechanisms of proton transfer in H⁺-coupled MATE in outward facing form”, 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢（2015 年 9 月）

【その他（プレスリリース、学術会議以外の一般向けの講演など）】

- 1) 李秀榮「生体系の分子科学・計算化学」理事長定例記者懇談会（第 4 回）、埼玉（2015 年 9 月）