

課題名 (タイトル) :

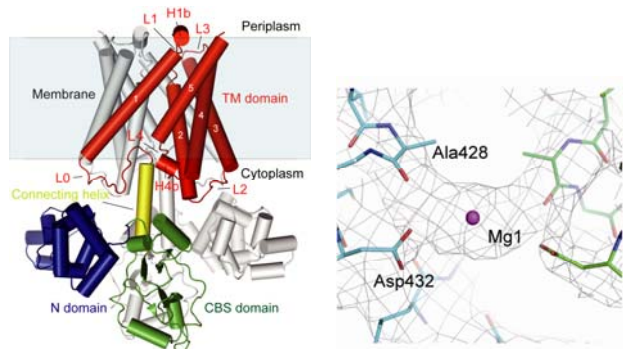
マグネシウム輸送体の分子動力学シミュレーション

利用者氏名 : 石谷隆一郎

所属 : 和光研究所 基幹研究所 杉田理論生物化学研究室

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

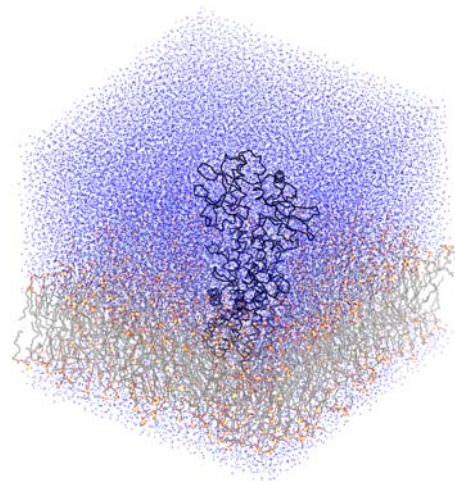
細胞膜は、細胞の内外の境界を決め細胞質を外部環境と異なる状態で維持し、細胞の生存にとって不可欠な役割を果たす。物質を生体内外に輸送することで、この異なる環境を作り出しているのが、膜に埋め込まれたチャネルなどの輸送体蛋白質である。本研究では、生体膜を介してマグネシウムイオン (Mg^{2+}) を輸送する膜蛋白質である、 Mg^{2+} チャネルに着目した。特にチャネルによる二価金属イオンの選択性のメカニズムは不明な点が多く、注目されている分野である。細菌からヒトにわたり広く存在する Mg^{2+} チャネル MgtE (図 1) に関して、脂質二重膜を含む系で、 Mg^{2+} 特異的なイオン透過機構の解明を目指して分子動力学(MD)シミュレーションを行っている。



(図 1) 左 : MgtE の結晶構造,
右 : イオン透過孔中央部の構造

2. 具体的な利用内容、計算方法

まず、RICC を利用して、現在得られているうちでもっとも分解能が高い結晶構造に基づいた MgtE 全長の MD シミュレーションを行った。水と脂質分子を含めた系の大きさは~128 Å 立方となり、約 120,000 原子である。ソフトウェア NAMD2.7 を用いて 256 あるいは 512 CPU にて 100 ns 以上の計算を行った (図 2)。



(図 2) シミュレーションに用いた系

さらに、現在実験的に得られている情報から、開状態に至りやすい MgtE 変異体(Hattori, *et al.*, 2009, *EMBO J.*)について拘束条件付き MD を行い、開状態のモデリングを行った。次に、 Mg^{2+} イオンや Ca^{2+} イオンが輸送体のイオン透過孔 (ポア) を通過するときの自由エネルギー変化(PMF)を見積もった。また、モデル系として、アスパラギン酸と金属イオンのみの系で、イオンとタンパク質の相互作用を検証するシミュレーションも行った。

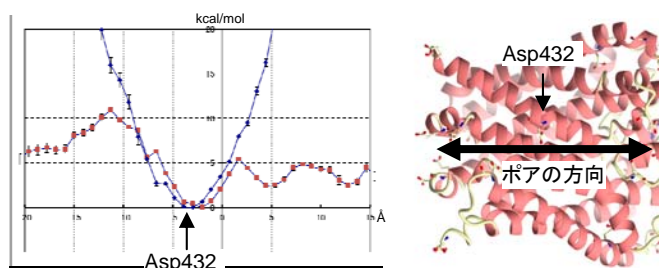
3. 結果

野生型 MgtE 全長の計算の結果から、 Mg^{2+} が結合した閉状態は 100 ns 程度のシミュレーションで非常に安定であることが分かった。さらに、イオン透過性が上昇する変異体 MgtE を用いたモデリングの結果、イオン透過が可能であると思われる開状態構造のモデルを作成できた。

次に、PMF 計算の結果、MgtE が良く透過する Mg^{2+} イオンの場合は、 Mg^{2+} は強固に水和した状態で輸送体のポアを通過し、 Mg^{2+} とタンパク質残基間の直接的相互作用は見られなかった。活性に重要である、ポアの中央に位置するアスパラギン酸残基(Asp432)と Mg^{2+} イオンが、水分子を介して間接的に相互作用した状態が、エネルギー的に安定であることが分かった。

これは、結晶構造解析から得られている知見にも符合する(図 1 右 ; Hattori, *et al.*, 2007, *Nature*).

一方で, MgtE が輸送しない二価金属イオンである Ca^{2+} の場合は, ポアを透過する途中で水和水が剥がれてしまい, タンパク質とイオンの直接的相互作用が見られた. 特に Asp432 と Ca^{2+} が直接的に相互作用することがわかった. この相互作用は, 今回行ったシミュレーションのタイムスケールでは不可逆的であり, かなり安定な複合体を作ることが示唆された. ただし, 実験結果や生体の生理的条件を考慮すると, MgtE が Ca^{2+} と不可逆的な複合体を作ることにはないと思われるので, (現在のシミュレーションでは到達不可能ではあるが) マイクロ~ミリ秒オーダーで, 可逆的に解離するものと推測される. さらに同様の計算を条件などを変えて複数回行ったところ, 再現性良く同様の結果が得られた.



(図 3) MgtE のポアに対する PMF 計算

左: 赤が Mg^{2+} , 青が Ca^{2+} に対する PMF. 横軸がポア中の位置, 縦軸が自由エネルギー変化をあらわす.

右: MgtE 膜貫通領域の構造. 矢印が, 左グラフの横軸と対応している. Asp432 が中央に位置する.

これらの結果から, Ca^{2+} と Mg^{2+} の識別は, Mg^{2+} とは直接的に相互作用しないことによって高速に透過するが, Ca^{2+} とは安定な複合体を形成してしまい, 結果的に効率的に輸送できなくなることが示唆される. すなわち, 透過しないイオンの方に高親和性で相互作用し逆にブロックするという「排他的選択性モデル」が示唆された. また, アスパラギン酸と金属イオンのみに単純化したモデル系の計算からも, このモデルの妥当性が示唆された.

4. 今後の計画・展望

後述するように, 今回は予定に比べて演算時間を使用できなかったため, Mg^{2+} と Ca^{2+} 以外のイオンについては PMF 計算などによるイオン透過機構の検証を行

うことができなかった. 今後は他のイオンの透過性についても検討したい.

次に, 今回の理論計算により示唆された「排他的選択性モデル」については, 現在実験的に検証するため, 国内の研究者と共同で赤外分光法によりカルボン酸残基と二価金属イオンの原子レベルでの相互作用状態を検証する研究を推進している. また, 今回モデリングした MgtE の開状態構造は, おおむね現在得られている実験結果と一致するものではあるが, さらに MgtE の開状態構造について, 結晶構造解析や他の実験的手法により検証していく必要があると考えている.

5. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由

当初, 投入した計算ジョブがある程度の待ち時間で実行に移るものと仮定して計算時間を算出し申請を行っていたが, 実際は状況が異なっており, 特に秋以降は 1 週間以上たっても計算が始まらない, という状況であった. それでも根気よくジョブを投入し続けた結果, 辛うじて予定の 40% 程度は演算時間を使用することができた. しかしながら, 予定していた計算をすべて行い, 全時間を消費するには至らなかった.

6. 利用研究成果が無かった場合の理由

上述のような理由により研究の遂行がやや遅れたものの, 二価金属イオン識別機構に対する理論的な枠組みを構築することができた. 今後は, 展望にも記したとおり, 実験面からの検証も考慮に入れたうえで, 投稿論文として研究成果を発表していく予定である. そのため, 現時点では利用研究成果はない状況となっている.