

課題名 (タイトル) :

細胞膜系の分子動力学シミュレーション

利用者氏名 :

○森 貴治

山田 健太

松岳 大輔

Po-hung WANG

末安 充央

二島 渉

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、レセプターなど様々な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(NMR)、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立体構造は、タンパク質が機能を発現しているときの、ある瞬間的な状態にすぎない。そのため、タンパク質が本来有している揺らぎや、揺らぎと機能の相関、反応サイクルにおける重要な中間状態などを実験だけから調べることは難しい。

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いる。分子動力学法とは、ニュートン方程式を数値的に解くことで、分子集団系の時間発展を追跡する方法である。生体分子系に対しては、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、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明らかにすることを目指す。

課題1 プロトン駆動モーターSecDFの分子動力学計算**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。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、駆動モーター SecA ATPase、タンパク質透過チャネル SecYEG、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。SecDFは 10 回膜貫通ヘリックスを有し、大きな水溶性ドメイン P1 および P4 を形成している。P1 ドメインは F 型および I 型と呼ばれる 2 つの状態を遷移し、SecYチャネルから運搬されるポリペプチドと相互作用しながらこのような運動を伴うことで、タンパク質の透過を促進していると考えられている。このような大規模な運動は、膜を隔てたプロトン輸送によって駆動されていると考えられているが、その分子メカニズムは未だよく分かっていない。本研究では、SecDF の膜中での全原子分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、プロトン輸送経路および重要なアミノ酸の同定を行うことで、SecDF の動作原理の解明を目指す。

2. 具体的な利用内容、計算方法

実験により、膜貫通ヘリックス TM5 中の保存されたア

ミノ酸残基 Asp339 がプロトン輸送に必須であることが分かっている。そこで、本研究では、X 線結晶構造解析により得られた SecDF を POPE 脂質二重膜に埋め込み、Asp339 のプロトン化状態を変えて 2 種類の MD 計算を実行し、プロトン輸送に関与するような水チャネルが膜貫通領域に形成されるかどうかを検証した。シミュレーションソフトウェアには GENESIS, 力場パラメーターには CHARMM36, 静電相互作用を PME 法で計算し、温度・圧力コントロールは Langevin 法により 300K, 1atm の下で 200ns の計算を実行した。初期構造には、X 線結晶構造中に見られる結晶水に加えて、DOWSER を用いて膜貫通領域中に水分子を配置した。系の原子数は 244,864 個 (水 : 56,250 個, POPE : 516 個, K⁺: 159 個, Cl⁻: 169 個)から構成される。

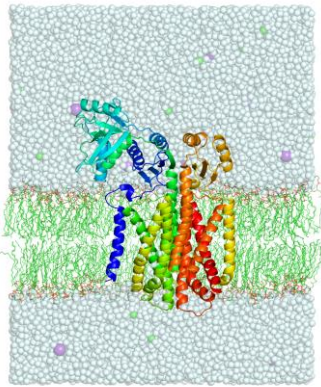


図 1 SecDF-POPE 二重膜複合体

3. 結果

シミュレーションの結果、Asp339 が脱プロトン化状態にある場合、TM ヘリックスが構造変化し、Cytoplasm 側から SecDF 内部に水分子が侵入していく様子が観察され、Asp339 は水分子と常に水素結合を形成することが分かった。一方、Asp339 プロトン化状態では TM ヘリックスはあまり構造変化せず、水分子は外から SecDF 内部にほとんど侵入しなかった。これらの結果から、Asp339 のプロトン化状態が Cytoplasm 側のチャネルの開閉を制御していることが推測される。また、膜貫通領域中央において保存されている Tyr636 の側鎖の動きを解析したところ、Asp339 のプロトン化状態に関わらず、大きく揺らいでいることが分かった。Tyr636 はプロトン透過経路に位置しているため、側鎖の大きな Tyr636 が揺らぐことでプロトン透過の妨げ役割をしていると考えられる。本シミュレーションにより、プロトン透過経路におけるアミノ酸側鎖のダイ

ナミクスと周囲の水分子との相互作用の詳細を明らかにした。

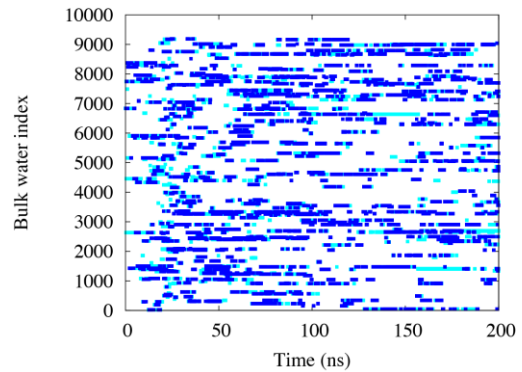


図 2 ASP339 と水素結合を形成した水

4. まとめ

Sec トランスロコンにおいて、タンパク質の膜透過を促進するプロトン駆動モーター SecDF の全原子分子動力学計算を行い、SecDF がプロトンを輸送する際の水分子の運動を解析した。その結果、保存された Asp339 のプロトン化状態が重要であることが分かった。

5. 今後の計画・展望

Sec トランスロコンは、膜透過チャネル SecYEG, SecA ATPase, プロトン駆動モーター SecDF が複合体を形成し、共役することで機能を発揮することが分かっているが、その全容は未だ明らかになっていない。今後はタンパク質がトランスロコンを透過する分子機構を全原子 MD シミュレーションにより明らかにしたい。

課題 2 膜貫通型酵素複合体の NO 移動経路の解明

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

細菌による脱窒は、4 種類の金属酵素によって硝酸塩や亜硝酸塩が窒素分子に変換される、一連の還元反応である。この反応の中間体である一酸化窒素(NO)は、ラジカル分子のため周囲分子と反応しやすく、細胞毒性をもつ。また、亜酸化窒素(N₂O)は、排出量が年々増加している強力な温室効果ガスである。このため、細菌による N₂O 排出の抑制を見据え、NO 消去を触媒する、膜貫通型タンパク質である一酸化窒素還元酵素

(NOR)における反応機構が注目されている。

このような状況において、理研播磨・城グループによって、脱窒菌の1つである緑膿菌の NOR の結晶構造が解かれ、理論による反応機構の議論も行われるようになった。さらに、NO 生成を触媒する、亜酸化窒素還元酵素(NiR)と NOR との複合体、NOR-NOR 複合体の結晶構造も解かれた。この複合体によってはじめて、NiR において生成された NO が、酵素間で安全に輸送され、NOR で消去されるという一連の NO 動態を捉えることができる。しかし、得られた結晶構造に対して、結晶化手法によるものではなく、生体内でタンパク質複合体は形成されていることを、実験手法によって吟味することは難しい。そこで、これまで全原子分子動力学(MD)計算によって、生体内における複合体構造の安定性を評価することに取り組んできた。

昨年度は、電気中性の単一脂質分子(POPE)によって形質膜のモデリングを実施した。しかし、緑膿菌の形質膜は負電荷をもつ脂質分子を含むことが報告されており、この電荷が複合体の挙動に影響する可能性がある。そこで、本課題では、生体膜をより適切にモデリングした膜を用いた MD 計算によって、生体環境における複合体の構造安定性を議論することを目的とした。

2. 具体的な利用内容、計算方法

まず、緑膿菌の形質膜における脂質組成比を真似て、モデル混合膜を作成した。NiR-NOR 複合体の結晶構造を作成した混合膜へ埋め込んだあと、210 ns の全原子 MD 計算を、初期速度を変えて2回実行した。全ての MD 計算は、われわれの研究グループで開発している GENESIS を用いた。力場は、一部に改変を加えた CHARMM36 を用いた。Integrator には velocity Verlet 法、温度/圧力制御には Langevin 熱浴/圧浴(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、ならびに R⁻² lookup table 法(カットオフ距離: 12 Å)を用いた。

3. 結果

本課題で実施した計算時間では、NiR-NOR 複合体構造は維持されるという結果が得られた。結晶構造から、

NiR と NOR の結合部位には E119-R71 の塩橋があることが分かっている。そこで、この結合部位、および、NiR が膜に接触する部位における水素結合を取り上げ、複合体構造の維持に寄与する相互作用を調査した。

図1に、NiR-NOR 結合部位における代表的なスナップショットを示す。MD トラジェクトリの解析によって、この結合部位では、塩橋はほぼ常に維持されること、NOR の K100 をはじめとした塩橋周囲の残基によって、酵素間・酵素内において水素結合が頻繁に生成されることが分かった。したがって、塩橋を含めて、水素結合ネットワークが複合体の維持に寄与していると示唆される。

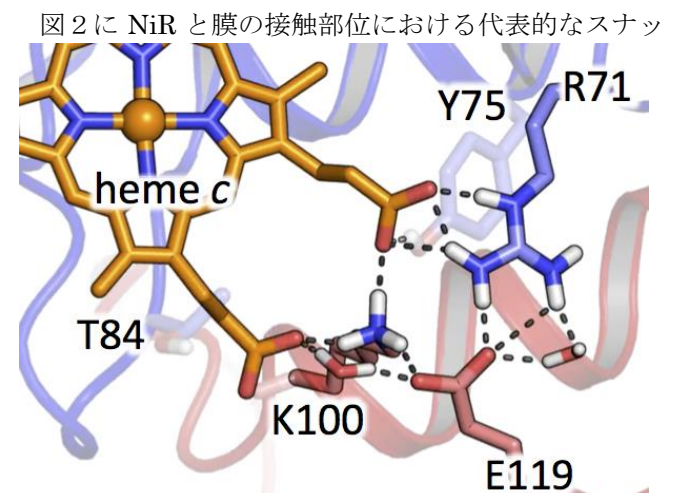


図1：結合部位における酵素間・酵素内の水素結合ネットワーク。青色が NiR、赤色が NOR であり、破線が水素結合を表している。

スナップショットを示す。NiR の荷電残基と極性残基が、膜の脂質分子と相互作用していることが見て取れる。MD トラジェクトリを解析したところ、ループ構造を構成する D455-Y463 残基は、脂質分子のリン原子の平均位置よりも膜中央よりに位置する頻度が高かった。また、D460、D455 や K462 が、負電荷をもつ脂質分子ではなく、POPE の NH₃⁺部とよく水素結合を形成していることが分かった。上記ループを中心とした領域が船のアンカーのように働くことによって、NiR の動きを抑制し、NOR から解離し難くしていると考えられる。

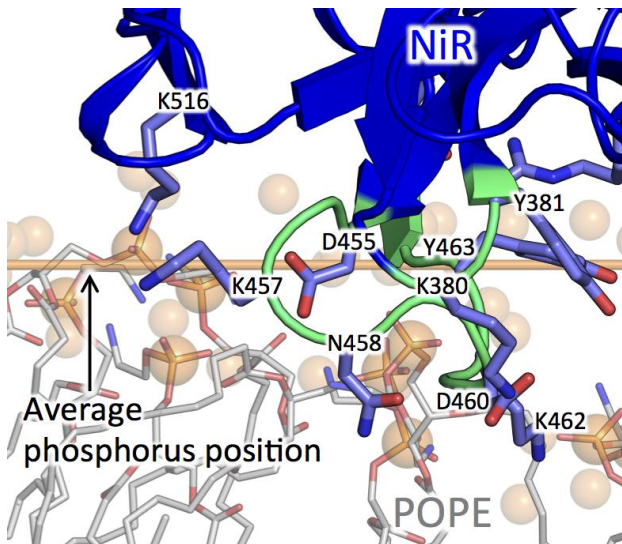


図 2：接触部位における残基-脂質分子間の相互作用。橙色の球はリン原子を示す。

4. まとめ

NiR-NOR 結合部位は、残基間の水素結合ネットワークによって頑強になっていること、NiR-膜の接触部位は、脂質分子と主に Asp(D)と Lys(K)残基の水素結合によって、親和性をもつことを明らかにした。これらの部位の協働が複合体構造の安定性をもたらしており、生体内で複合体として存在できることを提案した。

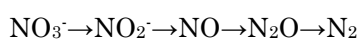
5. 今後の計画・展望

今後は、局所的な水素結合とは別の相互作用である、ファンデルワールス相互作用や溶媒効果を MM-PBSA または MM-GBSA 法によって評価し、より大局的な観点から構造安定性について調べたい。また、NOR がもつ機能である NO 還元反応の反応メカニズムを明らかにしたい。

課題 3 Analysis of NO diffusion pathway in the NOR-NiR complex

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

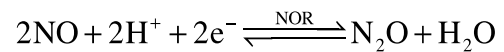
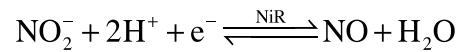
Denitrification is an important microbial anaerobic respiration by some bacteria living in anaerobic environment:



This process sequentially reduces nitrogen compounds into dinitrogen as an end product and is

coupled to bioenergy production. Pathogens like *P. aeruginosa* utilize this process to survive in patients' cystic fibrosis lungs, where limited oxygen is provided. As shown in the equation, cytotoxic NO molecules are produced as an intermediate, yet denitrifying bacteria can grow unaffected, a fact suggesting that an effective NO decomposition is occurred inside bacteria.

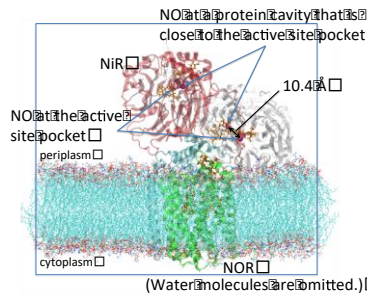
Recently Prof. Shiro's group at RIEKN Spring-8 has solved a new protein complex structure using X-ray crystallography, where membrane-bound NO reductase (NOR) and periplasmic nitrite reductase (NiR) are coupled:



NO is the product of NiR and also the substrate of NOR, so it is of great interest to examine how NiR interact with NOR to channel NO and to prevent NO leakage to the cellular environment.

2. 具体的な利用内容、計算方法

We have built a system with 1 NiR, 1 NOR, 78837 water, membrane (439 POPE, 92 POPG, and 91 PVCL2), and 4 NO. Two NO molecules are placed at the active site and 2 additional NO molecules are in a protein cavity close to the active site pocket. For each replica we performed 100 ns simulation using GROMACS 5.1.2 and initial velocities taken from Maxwell-Boltzmann distribution at 300 K. The forcefield is CHARMM36 and the isothermal-isobaric ensemble is maintained at 300 K using Nosé-Hoover thermostat and at 1 atm using Parrinello-Rahman barostat. The electrostatic interaction is treated using Particle-Mesh-Ewald method and the cut-off distance for van del Waals interaction is 12 Å. In total we have 20 100-ns trajectories and 60 NO trials were analyzed.

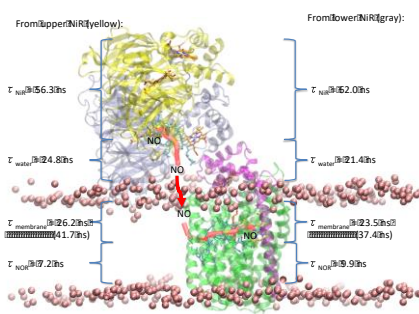


3. 結果

We have observed the following findings:

- (1) Out of 60 trials, 41 NO molecules can diffuse out of NiR within 100 ns. Among these 41 events, 6 NO successfully enter NOR.
- (2) The 41 NO molecules that leave NiR can be divided into 2 groups: 21 from upper NiR and 20 from lower NiR, i.e. no preference is observed.
- (3) Tracing the 41 NO molecules, we have found 3 pathways for diffusing out of NiR, one of them accounting for 66% of total flux.
- (4) 33 out of 41 NO molecules entered the membrane within 30 ns.
- (5) One of the cavities inside NOR identified in MD simulations agree well with the Xe-binding site found in experiment.

The major diffusion pathway and relative kinetics can be visualized in the following figure.



4. まとめ

We successfully observed NO molecules diffusing out of NiR and migrating through water and membrane until they reach the active site of NOR within 100 ns simulation time. Three NO pathways inside NiR were found, one of them accounting for 66% of total flux. NO can quickly move into membrane once it leaves NiR in that hydrophobic NO is 4-to-5 more soluble in membrane

than in water.

5. 今後の計画・展望

The current study has revealed the NO diffusion pathways inside NiR but the kinetics obtained from this approach is very rough. In the near future, we will perform more simulations and calculate the NO diffusion rate into NOR using our Markov state model methodology. The calculated results will be compared with experiment and the controlled NO dynamics in bacteria will be understood in this context.

課題 4 FGFR3 のレプリカ交換法による膜貫通ヘリックスの構造サンプリング

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

繊維芽細胞増殖因子 FGFR3 は細胞表面に存在するシグナル伝達タンパク質であり、細胞増殖や分化に重要な役割を果たす。この蛋白質はホモ二量体で機能しており、各モノマーは、細胞外ドメインと細胞内キナーゼドメインが1回膜貫通蛋白質で結合した構造を持つ。細胞外ドメインにリガンドが結合すると、1連の構造変化を経験し、細胞内キナーゼドメインにある残基がリン酸化されることで、細胞内のシグナル伝達を開始されると考えられている。

FGFR3 膜貫通(TM)領域に存在する病原性変異体 G380R は常時活性を示すことから、TM 領域もまた FGFR3 の機能に重要な働きをしていることが考えられる。大阪大学の佐藤毅 講師らによって、野生型(WT)と G380R 変異体では、TM 領域の二量体構造が異なることが提案されたが、そのナノレベルでの構造は不明である。WT と変異体とで、TM 領域の二量体構造がどう異なり、それが FGFR3 の作用機序とどう関連しているかを解明することを目的として、下記に示す分子動力学(MD)シミュレーションを行った。

なお本課題は理研・独創的研究課題 ”脂質の統合的理解”の1サブプロジェクト『脂質—膜タンパク質相互作用』に関連する課題として行われているものである。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究では、TM 領域および膜近傍領域(JM)からなる膜貫通ペプチドの二量体を作成した。脂質二重膜として DMPC/DMPG を 10:3 の比で混合したものを使用した。FGFR3 二量体の初期構造は、佐藤らの実験で提案された二量体界面構造を基に作成した。

この系に対し、310 K, 1 atm の条件下でまず、通常の MD シミュレーションを 1 μ s 以上行ったが、このシミュレーションでは、FGFR3 二量体構造は初期構造からほとんど変化しなかった。

そこで、脂質分子とペプチド分子の温度を仮想的に 310 K - 450 K の範囲にある温度に上げた複数のレプリカを用意し、レプリカ交換 MD 法の 1 種である REST シミュレーションを行った。WT に対して 210 ns 以上のシミュレーションを行い、二量体構造のサンプリングを行った。上記シミュレーションおよびデータ解析は、本研究室で開発を行っているプログラム”GENESIS”を用いた。

3. 結果

通常の MD シミュレーションでは、WT と G380R 変異体では次のような違いを得ることができた：

- 1) G380R 変異体の TM ヘリックス部位の重心が、WT のものと比べ 5 Å 程度上方に移動している(Fig.1a)。
- 2) G380R 変異体のヘリックス慣性主軸の膜法面に対する角度は、WT の値と比較して小さい (Fig.1b)。

上記の現象はこれまで行われた実験結果と合致するものであり、G380R 変異による TM ヘリックスの膜脂質との相互作用の変化で説明ができる。しかしながら、二量体構造については、それぞれ 1 μ s を超えるシミュレーションを行ったにもかかわらず、初期構造から変化することはなく、初期モデル依存性を取り除くことはできなかった (Fig.1c)。

対して、レプリカの最高温度を 450 K に設定した REST 法を用いた場合、複数の二量体構造をサンプリングすることができた(Fig.1d)。REST シミュレーションでの各レプリカのトラジェクトリーを追跡すると、二量体の構造遷移には、下記に示す複数のパターンがあることが分かった：

- 1) 二量体を維持したまま、別の界面を持つ二量体構造へと遷移する。
- 2) 一旦、二量体が壊れた後、各モノマーは脂質二重膜

中をランダムウォークし、その最中に再会合して新たな界面を示す二量体を形成する。

FGFR3 TM 領域と周囲のリン脂質との相互作用を調べた結果、常温で膜-水界面に存在する親水性(Tyr, Arg)側鎖は、高温下にあるレプリカにおいても、膜-水界面に存在しており、リン脂質のカルボニル基やリン酸基と直接、あるいは水分子を介して相互作用していた。高温でもこの相互作用が維持されているため、450 K のような高温に膜貫通ペプチドが一時的に置かれたとしても、ヘリックスが膜に埋もれたり、反転したりすることはなく、2本の TM ヘリックスが脂質膜中をランダムウォークすることで二量体を再形成可能である。

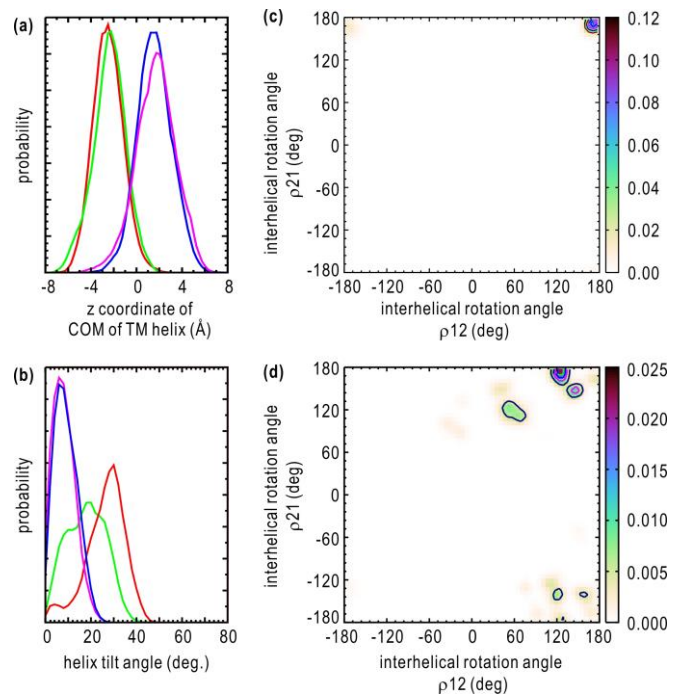


Fig 1. (a) TM 領域にあるヘリックスの重心の z 座標分布、(b) TM helix の慣性主軸の膜法面に対する角度(tilt angle)の分布。パネル(a, b)において緑・赤線は WT、青・紫線は G380R 変異体のシミュレーションから計算された分布を示す。(c) 通常のシミュレーションから計算された WT の TM helix の相対的向きに関する 2 次元分布。p12 は、ヘリックス 1 からヘリックス 2 を見た時の、ヘリックス 1 の向きを表す。(d) REST シミュレーションから計算された WT の TM helix のヘリックスの相対的向きの分布。

4. まとめ

常温下では膜脂質分子の運動性が低いため、膜中での膜貫通ヘリックス二量体の構造を調べることは、通常の MD シミュレーションのみでは困難である。今回、脂質分子とペプチド分子の温度を仮想的に高温に上げることで、脂質分子の運動能を高め、膜貫通ヘリックス二量体の解離・再会合を促し、複数の二量体構造を

サンプリングすることができた。

5. 今後の計画・展望

G380R 変異体に対して REST シミュレーションを継続し、WT と G380R 変異体に対する構造の差異を検討する。また REST シミュレーションによってサンプリングされた二量体の構造安定性を調べ、REST 法による構造サンプリング手法の評価を行う。

平成 28 年度 利用研究成果リスト

【国際会議、学会などでの口頭発表】

- 1) “Molecular mechanisms underlying proton transport in SecDF”, T. Mori, Y. Tanaka, K. Yoshikaie, T. Tsukazaki, and Y. Sugita, 第 54 回日本生物物理学会年会 (つくば)、Nov. 2016
- 2) “Molecular mechanisms underlying proton transfer through SecDF”, T. Mori, T. Tsukazaki, and Y. Sugita, The 7th AICS International Symposium, Kobe, 2017/2
- 3) “分子シミュレーションによるプロトン駆動モーター SecDF のプロトン透過経路の探索” 森貴治、田中良樹、吉海江国仁、塚崎智也、杉田有治、第 42 回日本生体エネルギー研究会 (名古屋)、2016/12
- 4) “分子シミュレーションによるタンパク質透過チャネル因子 SecG の構造揺らぎの解析” 森貴治、塚崎智也、杉田有治、日本物理学会 2016 年秋季大会 (金沢)、2016/9
- 5) “Characterizing NO diffusion in nitrite reductase:nitric oxide reductase complex by molecular simulation”, P. Wang, K. Yamada, T. Tosha, Y. Shiro, and Y. Sugita, The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Tsukuba, 2016/11.
- 6) “Theoretical study of dynamics of membrane protein complex in denitrifying bacteria” K. Yamada, P. Wang, T. Mori, K. Yagi, T. Tosha, Y. Shiro, Y, and Y. Sugita, The 4th International Symposium for Young Chemists on Stimuli-Responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules, Osaka University, Suita (Dec, 2016)
- 7) “cd1NiR:cNOR 複合体構造を安定化する相互作用の理論解析” 山田健太、森貴治、八木清、當舎武彦、城宜嗣、杉田有治、第 54 回日本生物物理学会大会、つくば国際会議場、つくば (11, 2016)