

博士論文（要約）

分子動力学法のための脂質力場の改良と
それを用いた膜タンパク質構造の再構成法に関する研究

先端学際工学専攻

紙谷 希

1. 序論

細胞の内と外は脂質二重膜によって隔てられている。しかし、生命活動には、細胞外からの必要な物質の取り込み、不要な物質の細胞外への排出や、細胞外の刺激情報を細胞内に伝達する必要がある。これらの役割は、細胞に存在する多様な膜タンパク質によって担われている。こうした膜タンパク質は、創薬標的としても重要であるが、詳細についてまだわかっていない点がある。例えば GPCR のひとつである $\beta 2AR$ は、活性化、不活性化のメカニズムがわかっていない。また、大腸菌の細胞膜に存在する多剤排出トランスポーターや ABC トランスポーターは、アダプタータンパク質や外膜チャネルと複合体を形成していると考えられているが、複合体構造はわかっていない。

これらの膜タンパク質の機能を理解していくためには、MD シミュレーションによる研究が有効であると考えられる。MD シミュレーションでは、ニュートン方程式に従う系の時間発展を追うことで、タンパク質の自発的な構造変化を追うことが可能であり、また、不安定構造から安定構造へ自発的に移行させることが可能である。GPCR や多剤排出トランスポーター、ABC トランスポーターの構造変化を追うことにより、それらの機能の理解に役立つと考えられる。

本研究は、膜タンパク質の MD シミュレーションを精度よく実行するのに必要な基盤技術の開発、検討を目的とする。

第2章は、様々な脂質二重膜の MD シミュレーションを用いて、近年提案されているいくつかの力場の精度を系統的に検証することを目的とする。これまでに提案されている各脂質膜力場を検証し、脂質二重膜の物性を再現する力場のうち、AMBER の流儀にほぼ従って導出されている Lipid14 が、AMBER タンパク質モデルと組み合わせて利用するのに最もよいものであることについて述べる。

第3章は、厳密な AMBER の流儀に従い、新しい RESP (Restrained electrostatic potential) 電荷を導出し、Lipid14 の電荷と入れ替えることで、脂質力場を改良することを目的とする。更に、MD シミュレーションを実行することで、電荷のわずかな違いが膜物性にどれくらい大きな影響を及ぼし得るのか調査する。

第4章は、巨大な膜タンパク質を安定に脂質二重膜に埋め込み、精度の高い MD シミュレーションの初期構造を与えることを目的とし、脂質二重膜に巨大タンパク質を埋め込む新規手法を提案する。更に、本手法を多剤排出トランスポーター及び ABC トランスポーターに適用し、有効性を実証する。

2. 脂質膜力場の検証

膜タンパク質の機能を MD シミュレーションで調べるには、精度の高い力場が必須である。タンパク質の力場については、近年、藤谷らにより、精度の高い Fuji 力場が提案されている。例えば、Fuji 力場を用いた結合自由エネルギー計算は、実験と非常によく一致することが報告されている。

タンパク質の力場に比べ、脂質力場の開発は遅れている。CHARMM27, Lipid11 といった力場が開発されてきたが、系に人為的な表面張力を与えなければ、基本的な脂質二重膜の物性を再現できない。こうした人為的な表面張力を使わなくても、現実的な膜のシミュレーションを可能にするために、CHARMM 力場の流儀で開発された CHARMM36 や、AMBER 力場と組み合わせて使用することが可能とされている Slipids といった、新しい脂質力場が近年提案されてきている。更に、AMBER 力場の流儀で開発された Lipid14 は、2014 年に論文が出た大変新しいものである。

信頼できる膜タンパク質の MD シミュレーションを行うために、精度の高い脂質力場を選ぶことは重要である。しかしながら、上記の新しい脂質力場を系統的に比較検討した研究例はまだない。このため、様々な脂質二重膜の MD シミュレーションを用いて、近年提案されているいくつかの力場の精度を系統的に検証することを目的とし、各種脂質分子について、area per lipid 及び bilayer thickness を MD シミュレーションで見積もり、温度依存性を実験値と比較することにより、力場の精度の検証を行った。

脂質二重膜の物性を再現するという観点からは、Slipids, CHARMM36, Lipid14 は、ほぼ同程度に実験値を再現した。しかし、これらの力場の基盤となる思想は大きく異なる。CHARMM36 脂質力場は、CHARMM 力場の流儀で開発されたもので、AMBER のタンパク質力場と組み合わせることができない。従って、Fuji 力場と組み合わせて MD シミュレーションを行うことは不可能である。Slipids は、AMBER 力場と組み合わせて使用することが可能とされている力場である。しかし、力場パラメータの導出方法は、標準的な AMBER の流儀とは異なる。一方で、Lipid14 は、AMBER の流儀にほぼ従って導出されている。従って、この3つのモデルの中では、AMBER タンパク質モデルと組み合わせて利用するのに最もよいものであろうと考えられる。

3. 脂質膜力場の改良

Lipid14 はいくつかの点において厳密な AMBER の流儀と異なる導出過程があり、改良する余地が残されている。このため、厳密な AMBER の流儀に従って新しい RESP 電荷を導出し、Lipid14 の電荷と入れ替えて MD シミュレーションを実行し、電荷のわずかな違いが膜物性にどれくらい大きな影響を及ぼし得るのか調査した。

脂質二重膜の物性は、脂質分子のコンフォメーションのフレキシビリティと関係しており、脂質二重膜や、そこに埋め込まれた膜タンパク質を高精度にシミュレーションするためには、脂質分子のモデル化におけるフレキシビリティの考慮が重要と考えられる。本研究では、脂質分子のコンフォメーションのフレキシビリティを RESP 電荷に反映するため、脂質分子 1 個を水中に置いた MD シミュレーションを行い、その結果得られるトラジェクトリーから 400 個のコンフォメーションを得た。これを分子軌道計算の初期構造とし、6-31G*基底と 6-31+G*基底でそれぞれ構造最適化、静電ポテンシャル計算を行い、256 個の静電ポテンシャルを部分電荷にフィッティングして新しい RESP 電荷

を決定した。6-31+G*基底は diffuse orbital を含み、リン酸基部分の精度のよいモデル化が期待できる。

MD シミュレーションの結果、6-31G*基底を用いて導出した RESP モデルでは、実験値から若干のずれが見られたが、6-31+G*基底を用いて導出した RESP モデルでは、実験値をより良く再現するようになっていた。後者に対し、Lipid14 の二面角エネルギープロファイルを再現するようにパラメータを最適化することにより、脂質力場が改良され、Fuji 力場と組み合わせて、膜タンパク質のシミュレーションに適用可能な脂質力場が得られた。加えて、head と tail を分割して電荷を導出する Lipid14 の欠点が明らかとなった。

4. 膜タンパク質構造の再構成

膜タンパク質の MD シミュレーションを実行するためには、多数の水分子を膜タンパク質の周囲に配置するだけでなく、脂質二重膜に膜タンパク質を安定に埋め込む必要がある。こうした MD シミュレーションのための準備プロセスは、現在、様々な手法が提案されているが、十分に確立されていない。

膜タンパク質と脂質二重膜の MD シミュレーションの実践的な解説としては、InflateGRO というツールを用いてペプチドを DPPC の脂質二重膜に埋め込み、GROMACS を用いて MD シミュレーションを行う方法の解説や、それを $\beta 2AR$ に発展させたものがある。後者で解説されている方法を用いて、脂質二重膜と $\beta 2AR$ の周囲に水分子を配置する際には、脂質二重膜の内部に水分子を配置しないようにするため、水分子とそれ以外の分子の接触判定に用いる、炭素原子の半径を拡大する。この方法では、脂質二重膜の内部への水分子の配置は抑制されるが、同時に、脂質分子の head と水分子の距離、及び膜タンパク質と水分子との距離は拡大する。加えて、体積及び温度一定の MD シミュレーションを行うと、脂質二重膜の upper leaflet と lower leaflet の間に空隙が生ずる。

本研究では、脂質二重膜と膜タンパク質の隙間を最小限とするため、膜タンパク質の膜貫通ドメインが脂質二重膜と重なるように整列させた後、膜タンパク質と脂質分子の間で、重原子間の距離を計算し、閾値未満に膜タンパク質に接近している脂質分子を取り除いた。平衡化された SPC モデルの水分子 216 個を含むセルを基本セルに敷き詰め、タンパク質と接触する水分子を取り除くことにより基本セルを水分子で満たした後、upper leaflet と lower leaflet のリン原子に挟まれた水分子を取り除いた。この方法は、疎水的な脂質二重膜の内部に水分子を配置することがないだけでなく、シミュレーションの初期状態からの体積変化も従来の方法に比べて小さいことがわかった。また、MD シミュレーションの初期段階で脂質分子の重原子を初期位置に拘束することにより、空隙の発生を回避できることがわかった。

MD シミュレーションのための準備プロセスとして提案した、脂質二重膜に膜タンパ

ク質を埋め込み、それらの周囲に水分子を配置する新規手法は、多剤排出トランスポーターや ABC トランスポーターといった巨大なタンパク質複合体と脂質二重膜からなる、大規模、長時間（ $\sim 1\mu\text{s}$ ）の MD シミュレーションで系を安定に保ったことから、本手法の有効性が示された。

5. 結論

これまでに提案されている Lipid14, GAFFlipid, CHARMM36, CHARMM27, Slipids の各脂質膜力場を検証し、Slipids, CHARMM36, Lipid14 が、脂質二重膜の物性の実験値を、ほぼ同程度に再現することを確認した。

厳密な AMBER の流儀に従って、新しい RESP 電荷を導出し、AMBER の流儀にほぼ従って導出されている Lipid14 の電荷と入れ替えることで、脂質力場の改良を試みた。MD シミュレーションの結果では、6-31G*基底を用いて導出した RESP モデルでは、実験値から若干のずれが見られたが、6-31+G*基底を用いて導出した RESP モデルでは、実験値をより良く再現するようになっていた。

脂質二重膜に巨大タンパク質を埋め込む新規手法を提案し、有効性を実証した。

以上を含めた本研究の結果から、膜タンパク質に対する MD シミュレーションのさらなる応用が期待できる。

以上