

膜タンパク質をつまんで外に引っ張り出す様子

名古屋大学大学院理学研究科（研究科長：松本邦弘）の倭剛久（やまとたかひさ）准教授、山田達矢（やまだたつや）、研究員の研究グループは、美宅成樹（みたく しげき）名誉教授（豊田理化学研究所・元客員フェロー）との共同研究において、細胞膜の中に安定に折りだたまれているタンパク質を解きほぐしながら、膜外に引き抜く様子をコンピューターシミュレーションで再現し、その仕組みを解明しました。

タンパク質は、私たちの生命活動になくてはならない分子ですが、様々な実験手段を用いてその性質を一分子ごとに調べられる時代になってきました。原子間力顕微鏡（AFM）もその方法の一つです。例えば、膜の中に埋まっているタンパク質の端に探針を

つけて徐々に引抜いていくと、探針に働く力は時々刻々と変化しますが、AFMを用いると、その微小な力を精密に測定することができます。力の大きさと引抜いた距離との関係をグラフにすると、タンパク質の種類に応じて特徴的なグラフ（力-距離曲線）が得られることは良く知られていました。ところが、それぞれのグラフの特徴がどのような仕組みで決まっているのか、これまで良く分かっていませんでした。

本研究グループは、独自の計算モデルを活用して計算量を大幅に削減したコンピューターシミュレーションを実行し、膜タンパク質の引抜き過程を再現することに成功し、力-距離曲線の特徴が決まる仕組みを明らかにしました。

本研究により、膜タンパク質の立体構造の形成メカニズムが深く理解され、さらに膜タンパク質の構造予測や新薬の設計につながることで期待されます。

この研究成果は、平成28年11月15日付（米国東部時間12時）米国科学雑誌「Biophysical Journal」（電子版）に掲載されました。

この研究は、文部科学省「グリーン自然科学国際教育研究プログラム（代表：阿波賀邦夫）」、JSPS 科研費、新学術領域研究「3D 活性サイト科学（代表：大門寛）」の支援で進められました。

【ポイント】

- 膜タンパク質の強制引抜き実験における力-距離曲線の研究
- 粗視化モデルを用いて計算を高速化したコンピューターシミュレーションを活用
- 膜タンパク質の立体構造形成メカニズムの解明や設計につながる期待

【研究背景と内容】

タンパク質は私たち生物の活動を支えている重要な分子ですが、全遺伝子のおよそ30%は膜タンパク質の遺伝子で占められています。膜タンパク質は、細胞膜の中に配置され、細胞内外の物質の輸送や情報のやり取りに携わる重要な役割を担っています。また、市販薬の主成分の大半が膜タンパク質に作用する性質を持っており、膜タンパク質の研究がいかに人類にとって重要なかが分かると思います。

タンパク質の研究にはいろいろな方法がありますが、タンパク質の振舞を個々の分子のレベルで直接測定する実験手法が近年盛んに開発されています（単一分子計測）。図1に示す原子間力顕微鏡（AFM）もその方法の1つです。細胞膜の中で安定に折畳んでいる1つの膜タンパク質分子の端にカンチレバーの探針を結合し、徐々に引っ張り上げて行くと、膜タンパク質はほどけながら膜外に出て行きます。この際、探針に作用している力は時々刻々と変化しますが、AFMはこの微小な力を精密に測定することができます。力の大きさと探針を引き上げた距離の関係をグラフにすると、ギザギザしたノコギリ状の曲線（カー距離曲線）を得る事ができます。ここで重要な点は、カー距離曲線の形状は膜タンパク質の種類に応じて異なっていることです。なぜならば、膜タンパク質の種類が違えばアミノ酸配列が異なり、アミノ酸配列が異なれば対応する膜タンパク質の立体構造や性質に違いが生じるからです。

このように、カー距離曲線は、個々の膜タンパク質の個性を反映する貴重なメッセージを呈示しているにも関わらず、残念ながら、これまでにこのメッセージを正確に読み取るすべを私たちは持ち合わせていませんでした。ギザギザのピャクが現れた瞬間、ほどけつつある膜タンパク質

はどんな姿をしているのでしょうか？ピークの高さはどんな原因で高くなったり低くなったりするのでしょうか？など、多くの疑問が残ったままでした。

前述のとおり、多くの実験手法がタンパク質の構造解析に確かに有効です。一方、実験手法に

負けず劣らず著しい進歩を見せているのがコンピューターによる研究です。私たちの生活に身近なところでもこのような研究は大変役立っています。例えば、インフルエンザの薬として有名な

「タミフル」は、コンピューターを活用して設計されたことは良く知られています。前述のカー

距離曲線の解釈に関して、コンピューターによる研究がこれまでも試みられてきました。とこ

ろが、強力なコンピューターをもってしても、カー距離曲線の特徴はなかなか良く再現できませ

んでした。困難の要因の一つは、現実の膜タンパク質を考慮するにはとても沢山の数の原子を取り入れなければならず、それらの原子の間に働く相互作用を計算するにはとても多くの計算量が必要となる点でした（図2）例えば、約三百個程度のアミノ酸が連なった膜タンパク質を原子レベルで精密にシミュレーションしようとする、周囲をとりまく脂質分子や水分子などを含め、

少なくとも約十万個程度の原子を考慮しなければなりません。

そこで、我々は発想を転換して、思い切り大胆に単純化した計算モデルを使ってコンピューターシミュレーションをすることにしました。まず、膜タンパク質を構成しているアミノ酸のそれぞれをビーズに見立て、それらが数珠つなぎにつながった鎖状のモデルを作りました。次に、アミノ酸の鎖が螺旋構造（1ヘリックス）をとりやすい性質を取り入れました。そして、最後にアミノ酸の「個性」を考慮しました。タンパク質を構成するアミノ酸は20種類ありますが、その中には水の中を好む親水性のアミノ酸や油の中を好む疎水性のアミノ酸があります。細胞膜は脂質（油）で出来ているため、疎水性のアミノ酸は膜内にとどまろうとしますが、反対に親水性のアミノ酸は、膜の外（水中）に存在していた方が安定です。そこで、我々の計算機シミュレーションでは、疎水性のビーズ（アミノ酸）が膜内から膜外に出ようとするときに膜内に押し戻す力が、また、親水性のビーズ（アミノ酸）が膜外から膜内に入ろうとするときに、膜内から膜外へ押し出す力が働く様に設計しました。その結果、全原子を考慮するモデルに比べると著しく単純化されたモデル（粗視化モデル）を構築することができました。

我々は、バクテリオロドプシンとよばれる膜タンパク質分子に、粗視化モデルを適用しました。図3は、コンピューターシミュレーションによって膜から引抜く実験を再現し、得られたカー距離曲線を示しております。この曲線は、AFM実験のカー距離曲線と同様にギザギザした特徴を持っており、ギザギザのピークの場所は実験と非常に良く一致しており、バクテリオロドプシンが、ピークが出現する際にはどのような構造をとっているのかを調べました（図3）。すると膜と水の界面で疎水性や親水性のアミノ酸が大きな力を出して、引抜き力に抵抗している様子が分かりました。

【成果の意義】

生命活動にとって膜タンパク質は重要な分子ですが、コンピューターシミュレーションで膜タンパク質を取り扱うための非常に有効な計算モデルができました。そして、膜タンパク質の安定な構造を徐々に引き抜いて行く過程で、分子がとる中間的な立体構造について重要な知見を得る事ができました。これらの研究成果は、膜タンパク質の立体構造形成機構や設計に役立つと期待されます。さらに研究をすすめることで、膜タンパク質に作用する有効な薬剤分子の設計に結びついていくことが期待できます。

【用語説明】

原子間力顕微鏡(AFM) :

AFMは Atomic Force Microscope の略。試料と探針との間に働く力を精密に測定する事が出来る装置。

膜タンパク質 :

生物の細胞の細胞質は脂質分子の二重層でできた細胞膜で囲まれている。膜タンパク質は細胞膜の中に埋め込まれており、細胞質に存在する水溶性のタンパク質(水溶性タンパク質)と異なる特徴を有する。

粗視化モデル :

タンパク質の運動をコンピューターシミュレーションで再現する際、分子に含まれる全ての原子をあらわに考慮する(全原子モデル)方法に対して、いくつかの原子からなる原子団を単一の“粒子”として扱い、分子構造を単純化して計算するためのモデルのこと。

バクテリオロドプシン :

高度好塩菌に含まれる膜タンパク質。光エネルギーを用いて水素イオンを膜内外で輸送する光駆動水素イオンポンプとして知られており、最も良く調べられている膜タンパク質の一つ。

親水性アミノ酸 :

水と似た性質をもつ側鎖を有するアミノ酸。

疎水性アミノ酸 :

油と似た性質を持つ側鎖を有するアミノ酸。

【著者、論文タイトル、掲載誌】

Tatsuya Yamada, Takahisa Yamato, Shigeki Mitaku, "Forced Unfolding Mechanism of Bacteriorhodopsin as Revealed by Coarse-Grained Molecular Dynamics", Biophysical Journal

DOI: 10.1016/j.bpj.2016.09.051

タイトル:膜タンパク質の強制アンフォールディングの粗視化シミュレーション

著者:山田達矢 倭剛久

細胞膜と膜タンパク質

生物の細胞は細胞膜に包まれ、細胞内外とのシグナル伝達や物質輸送を制御することで生命活動を維持している。また、ミトコンドリアや葉緑体などの細胞内小器官が有する生体膜も同様の機能をもっている。脂質二重膜で構成された細胞膜の中には膜タンパク質が埋め込まれており、膜タンパク質は役割に応じた適切な機能を果たす。例えば、シナプスにおける神経伝達物質の受容、網膜における光刺激の受容、あるいはイオンの選択的な透過など、生物にとって重要な反応が細胞膜を舞台にして繰り広げられている。

細胞膜を構成する脂質二重膜は、おおよそ 4nm 程度の厚みを持ち、無極性の足部と極性の頭部から成る脂質分子が水中で自発的に会合して形成される。足部は炭化水素鎖でできており、細胞内外を疎水性の高い領域で隔て、水分子やイオンなどの極性溶媒の自由な往来を妨げている。また、膜タンパク質は、多数のアミノ酸が結合してできたポリペプチド鎖であり、自由エネルギーが最小となるように一定の立体構造に自発的に折り畳まれて脂質膜に埋まり込んでいる。個々の生物が持つタンパク質の全種類数は、例えば人間の場合には数万種類以上と言われており、そのうち約 20~30% が膜タンパク質である。典型的な膜タンパク質には、ポリペプチド鎖が螺旋構造を形成して膜を垂直に貫通する柱状になった構造(膜貫通ヘリックス)がしばしば見られ、それらが 7 本束になった 7 回膜貫通型ヘリックス構造がよく知られている。

フォースカーブ測定

膜タンパク質分子の長い研究の歴史の中では、分光学的及び熱力学的な測定が多く用いられてきた。これらの測定では、試料に含まれている多数の膜タンパク質分子の平均的な性質が測定される。近年、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope, AFM)を用いた実験手法が発達し、膜タンパク質一分子を機械的に引き解いて、その力学的性質を計測できるようになった。膜中で安定な構造をとっていた膜タンパク質が強制的にアンフォールドされていく過程で得ら

れる測定結果は、その構造形成に関する知見を一分子レベルで与えるものであり、大変興味深い。実際の実験では、'基板上に付着させた膜タンパク質を含んだ脂質膜の表面にカンチレバーの針先を ~ 1 sの間、 ~ 1 nNの力で押し付ける。すると、ポリペプチド鎖のNまたはC末端領域が、確率的に付着する。続いて、 ~ 100 nm/sの一定速度で膜から針先を引き離していくと、膜タンパク質は徐々にアンプオールドしつつ引き出されて伸張鎖となる。この間、針先には力Fが作用しており、Fを引抜いた距離 x の関数として計測すると、F x 曲線(フォースカーブ)が得られる(図1b下部)。強制アンプオールドの過程の途中、膜タンパク質が引き出されることに強く抵抗する中間状態が複数あり、そのような箇所では引き出しは一旦中断する(例として、図1b(i))。すると、伸張鎖は x の増大に伴ってゴム紐のように引き伸ばされ、張力が増大していく(図1b(ii))。ついに張力が抵抗力に打ち勝つと、急激に引き出しが再開されて伸張鎖は弛緩する(図1b(iii))。このような間欠的なアンプオールディングによって、F-D曲線は鋸歯状の形状を示す。

F x 曲線は、膜タンパク質に関する力学的性質を一分子レベルで精密に測定したデータであり、多くの重要な情報が埋もれていると考えられる。ところが、今日まで、そのアンプオールディング中間体の構造やF-D曲線の形状を決定付ける物理的要因などの解明は十分であるとは言えなかった。とりわけ重要なのは、F-D曲線を特徴付ける力のピークが出現するメカニズムである。力のピークは膜タンパク質の強制的アンプオールディング経路に存在している自由エネルギー障壁と密接に関係していると考えられる。それでは一体、その自由エネルギー障壁の起源は、何なのであろうか？そこで我々が着目したのは、ポポ(Popot)らの二段階モデルである⁵⁾。このモデルでは、膜タンパク質のフォールディングが、(I)水中のポリペプチド鎖が膜に取り込まれ、個別の膜貫通ヘリックスを形成する段階、及び、(II)それらが集まって最終的な立体構造を形成する段階の2段階で進行すると考える(図1c)。自由エネルギー障壁の起源を知るためには、その自由エネルギーが主としてどちらの段階に起因するのかという簡単な問いから始めるのが良さそうである。

粗視化シミュレーション

最近筆者らは、上記の問題に取り組むため、バクテリオロドプシン(bR)をC末端側から機械的にアンプオールドしていく過程の計算機シミュレーションを試

みた6)。bRは、光エネルギーを使って水素イオンを細胞内→外へ輸送する機能を持ち、最も良く研究されている膜タンパク質の一つである。シミュレーションでは、個々のアミノ酸を一つのビーズ粒子と見なしてポリペプチド鎖を表現した。そしてそれらのビーズ間には、ポリペプチド鎖の主鎖間に形成される水素結合、及び、各々のアミノ酸残基の脂質膜に対する親和性を表現するポテンシャルを与えた。各ポテンシャル定数は、ペプチド結合及びアミノ酸残基の類似体に関する物理化学的相互作用の実験値(水-オククノール分配係数など)から導いた。このモデルは(I)に働く相互作用を良く表現している。一方、(II)の相互作用は取り入れなかった。このシミュレーションの結果、実験と類似したF-D曲線が得られ、特に力のピークの位置は実験に良く一致した。また、自由エネルギー障壁の高さと幅についても実験値が定量的に再現された。これらの結果は、力のピークの出現機構が、(I)の相互作用で説明できることを示している。また解析の結果、自由エネルギー障壁は、アミノ酸の膜-水間輸送エネルギー、及び、膜中と水中での水素結合エネルギーの違いが互いに関与しあって形成されていることがわかってきた。これらの知見は、今後のF-D曲線の実験の解析において重要な手がかりを与え得るだろう。

極めて単純な粗視化モデルを用いて複雑な問題の糸口を掴むことができたのは、一見不思議に思える。案外、生物の背後には、このような単純な仕組みが普遍的に存在しているのかもしれない。尚、力のピークの高さや出現率は、ヘリックス間相互作用や補欠分子によっても変化することが実験で示されている。今後これらの効果を加えたシミュレーション手法が開発できれば、膜タンパク質の折り畳み問題やリガンドと膜タンパク質との相互作用に関して新たな突破口を切り拓くことができるのではないかと期待できる。

参考文献

- 1) R. Sawada and S. Mitaku: *J. Biochem.* 151, 189 (2012).
- 2) C. A. Bippes and D. J. Muller: *Reports Prog. Phys.* 74, 86601 (2011).
- 3) F. Oesterhelt et al.: *Science*, 288, 143 (2000).
- 4) H. Janovjak et al.: *ChemPhysChem*. 9, 954 (2008).
- 5) J. L. Popot and D. M. Engelman: *Annu. Rev. Biochem.* 69, 881 (2000).
- 6) T. Yamada et al.: *Biophys. J.* 111, 2086 (2016).