

## 膜タンパク質をつまんで外に引っ張りだす様子を コンピューターシミュレーションで再現

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た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っていくことが期待されます。

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ります。

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（力-距離曲線）を得る事ができます。ここで重要な点は、力-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。

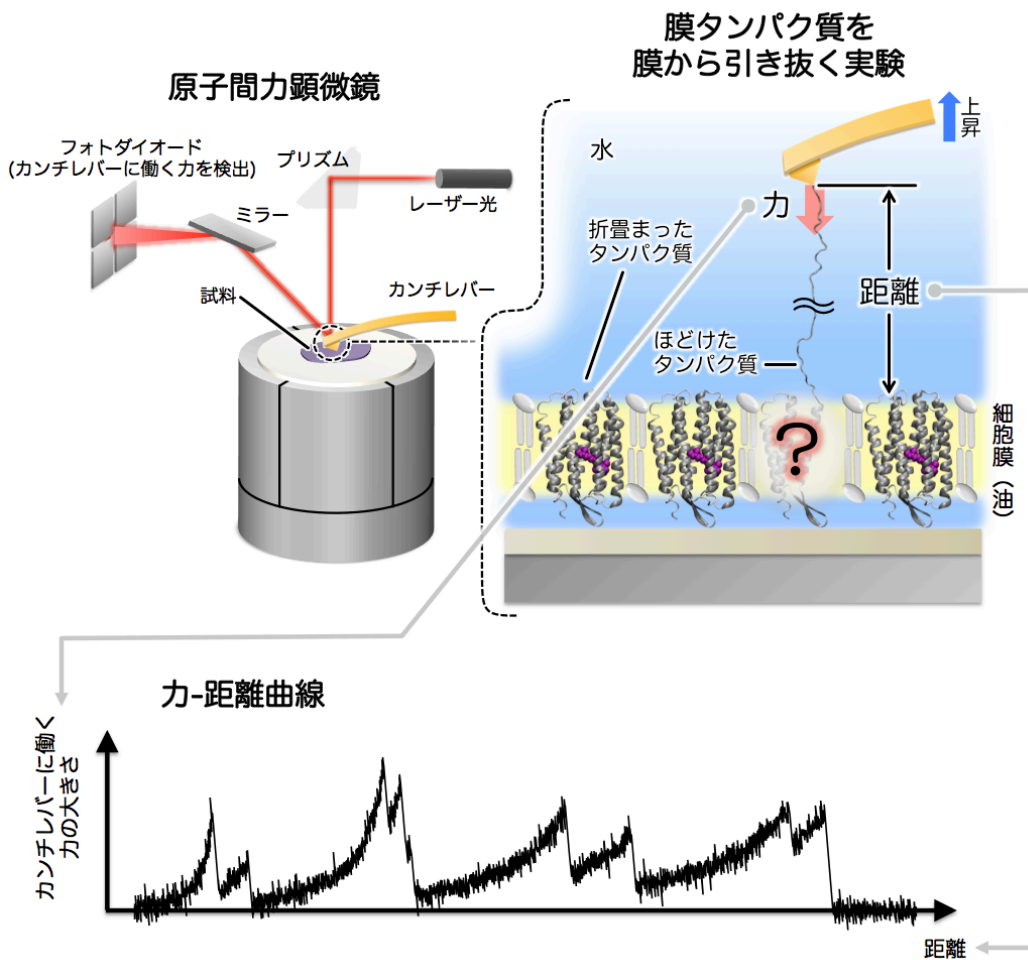


図1

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。ギザギザのピークが現れた瞬間、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ない、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。

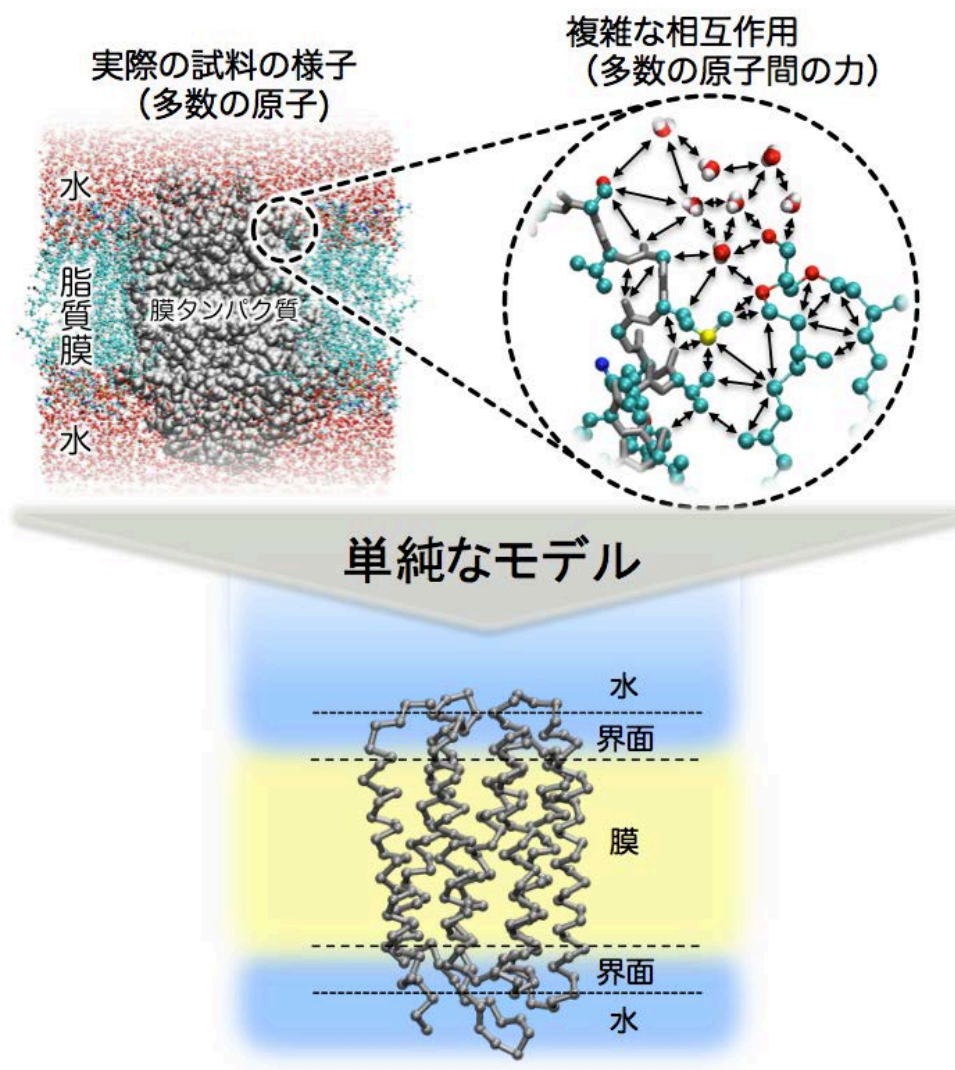


図2

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 ( $\alpha$  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。

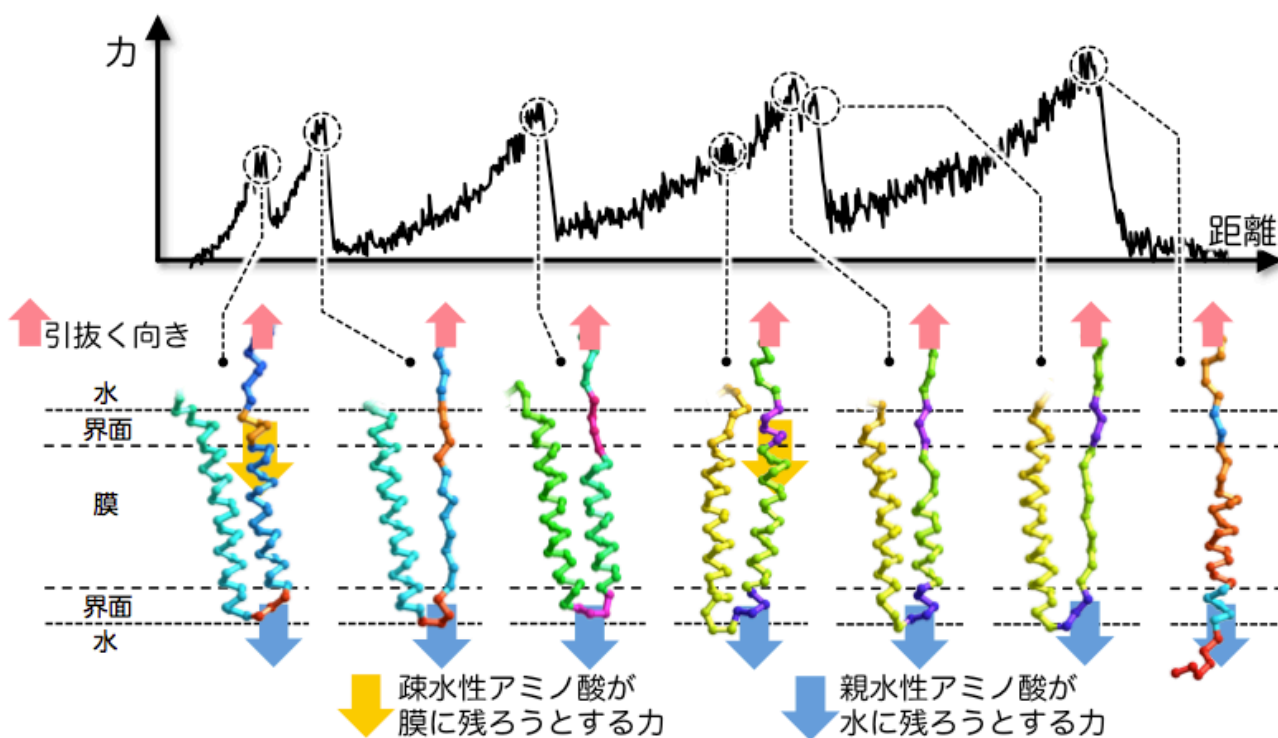


図3

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、得られた力-距離曲線を示しております。この曲線は、AFM 実験の力-距離曲線と同様にギザギザした特徴をもっており、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)と異なった特徴を有する。

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