ダイナミクスを考慮した膜蛋白質の構造モデリング法の開発

医薬基盤研究所　バイオインフォマティクスプロジェクト
水口賢司

Development of a method for modelling dynamics structures of membrane proteins

Kenji Mizuguchi
National Institute of Biomedical Innovation

Despite the recent increase in the number of experimentally determined membrane protein structures, their mechanisms of folding and dynamics are poorly understood. In this project, we combined bioinformatic and molecular simulation techniques: 1) to provide a better understanding of protein-lipid interactions in a lipid bilayer environment; 2) to predict regions involved in conformational changes and to develop a method for modelling dynamic structures of membrane proteins from a limited set of available structures and 3) to apply the newly developed techniques to a complex of protein transmembrane transporters and validate the computational results with experimental data.

1. はじめに

膜蛋白質は、既知医薬品ターゲットの大多数を占めるため、その立体構造情報は非常に重要である。従来、膜蛋白質の立体構造を実験的に決定することは非常に困難だったが、近年、X 線結晶構造解析によって、生体の維持に重要な役割を果たす膜蛋白質の立体構造が次々に決定されるようになってきた。しかし、膜蛋白質の構造解析においては以下のような困難が依然として存在する。

１）結晶構造の分解能が低い。
２）膜蛋白質の構造変化が明らかではない。
３）膜蛋白質複合体の立体構造が解かれていない。
４）脂質分子との相互作用が明らかでない。

本研究では、上記の実験的研究の弱点を克服するために、バイオインフォマティクスと分子シミュレーションの最新技術を結合し、高精度の膜蛋白質構造モデリング法を開発することを目的とした。

2. 研究開発の成果

2.1 脂質二重膜中での膜蛋白質の構造安定化機構の解明

立体構造安定化に関して、膜蛋白質と水溶性蛋白質との最も大きな違いは、前者が脂質二重膜中に存在するということであり、また膜蛋白質の機能発現のために、特定の脂質分子との相互作用が重要な役割を果たすことが知られている。しかし、X 線結晶解析において

は、脂質分子の位置について一般に限られた情報しか得ることができず、一方、脂質分子をあらわに含んだ分子動力学(MD)シミュレーションは、計算量の制約から、ごく少数の蛋白質でしか実行できない。そこで、立体構造データベースと分子シミュレーションからのデータを組み合わせた統計解析（*アミノ酸–脂質相互作用の傾向性解析*）により、膜蛋白質と脂質分子との相互作用について新たな知見を得ることができた。同時に、分子シミュレーションによる膜蛋白質-脂質相互作用を原子レベルで解析するための手法を開発した。

アミノ酸–脂質相互作用の傾向性解析

X 線結晶構造および分子シミュレーションデータのどちらにおいても、疎水性アミノ酸と脂質との相互作用は膜蛋白質と水溶性蛋白質に共通して観察されたが、極性アミノ酸と脂質との相互作用は膜蛋白質固有の傾向性を示すことがわかった。また、これらの傾向性と実験的に決定された各アミノ酸の親脂質性指標を比較したところ、脂質尾部ではアミノ酸–脂質相互作用の傾向と親脂質指標がよく一致したが、頭部においては差異が見られた（図 1）。

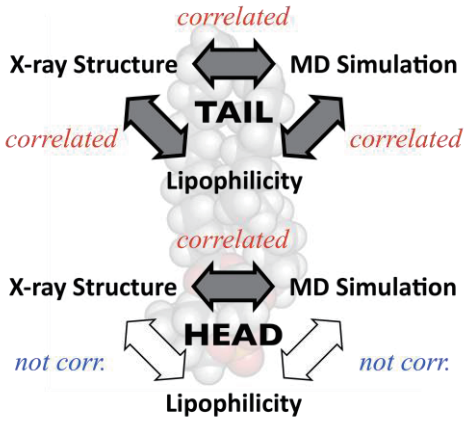

図 1. アミノ酸-脂質相互作用の傾向性

全原子シミュレーションに向けた膜蛋白質の脂質二重膜中での配向予測

膜蛋白質の膜に対する配向・位置を短時間で精度よく予測するために、脂質二重膜を陰的に取り扱う GBMV モデルを用いて配向・位置の最適化を行う手法を開発した。Sec チャネル（後述）に対して予測を行ったところ、得られた構造は全原子モデルでの MD 計算結果や蛋白質の膜内での配向データベースと良く一致していた（図２）。

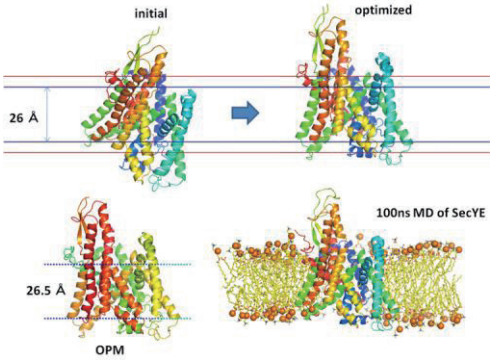

図 2. GBMV モデルを用いた膜蛋白質の脂質二重膜への埋め込み

ボロノイ分割法に基づく膜蛋白質-脂質二重膜複合体構造の検証法

膜蛋白質-脂質二重膜複合体構造の確からしさを判断するための基準として、実験値がよく分かっている脂質１分子あたりの表面積に注目し、蛋白質周囲の脂質表面積をボロノイ分割法に基づいて計算する新しいアルゴリズムを開発した。この方法を用いて、SecY チャネルやカルシウムポンプの膜中での分子動力学計算結果を解析したところ、タンパク質から離れた脂質二重膜は十分バルク相の性質に近づいていることが確認できた。さらに膜蛋白質から離れた脂質表面積を容易に実験値に一致させることができる新しい平衡化手順を提案した（図3）。

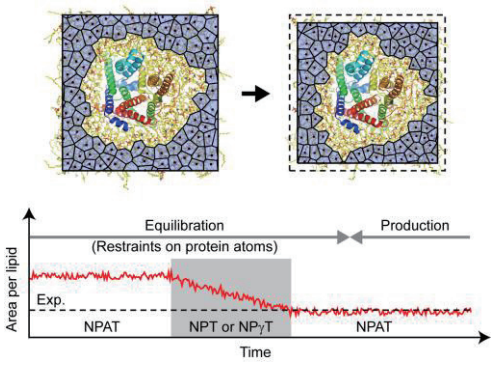

図 3. ボロノイ分割による膜蛋白質周囲の脂質表面積

2.2 動的で大規模な構造変化を起こしやすい領域の予測とそれを考慮したモデリング技術の確立

膜蛋白質の構造変化を考慮したモデリング法の確立に向けて、既知立体構造情報、アミノ酸配列情報、及び分子シミュレーション手法それぞれの活用のために必要となる要素技術を開発した。構造変化を理解するためのもっとも直接的なアプローチとしては、複数のX線結晶構造が明らかになっている蛋白質を解析することが考えられるが、膜蛋白質については、そもそもどの程度の既知情報が蓄積されているかも明らかではなかった。そこで、膜蛋白質の構造変化を網羅的に抽出したデータベースを開発し、立体構造情報を有効に活用する基盤を構築した（*MultiCoMP* データベース）。更に、構造情報が限られている場合でもアミノ酸配列を有効に利用するために、膜蛋白質の比較モデリング法の改良と [1][2]、機械学習を用いて構造揺らぎを起こしやすい領域を予測する方法の開発とを行なった[3]。
また、膜環境を陰的に取り入れた拡張アンサンブル計算を実施することで、モデル系において膜タンパク質の立体構造予測が可能であることを示した [4][5]。

MultiCoMP データベース

蛋白質立体構造データベース（PDB）に登録されているエントリーを分類・整理し、複数種類のコンフォメーションが得られている膜蛋白質を得た。ここで得たデータは後述のように他の研究の展開に用いられているが、同時にデータベースとしてプロジェクト終了後に Web での公開を予定している（図4）。このデータベースでは、Web ブラウザ上でコンフォメーションの重ね合わせを表示したり、コンフォメーション間の差異の解析結果を閲覧したりすることが出来る。

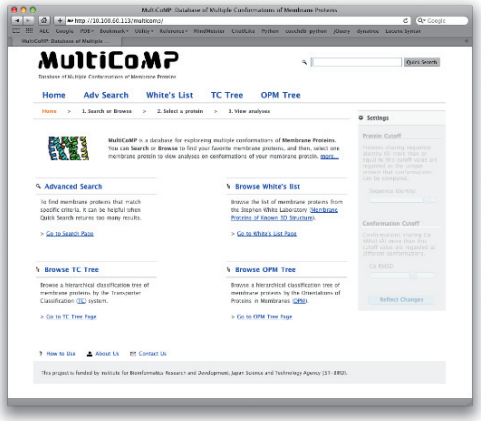

図 4. 膜蛋白質構造変化のデータベース MultiCoMP データベース

機械学習を用いて構造揺らぎを起こしやすい領域を予測する方法

機械学習の手法を用いて、アミノ酸配列のみから膜蛋白質の複数の構造パラメータ（溶媒露出表面積、ヘリックス–ヘリックスコンタクトなど）を統一的に予測する手法を開発し、個々のパラメータを独立に予測する従来法に比べて、より高精度の予測が可能になった。また、ここで予測された構造パラメータを入力として、ニューラルネットワークによって膜蛋白質の揺らぎが大きい部分を予測する手法を開発し、粗視化基準振動解析の結果をある程度再現することに成功した。

大規模な構造変化は、構造ゆらぎの大きい所を介して起こる可能性が高いと考えられるので、この結果は構造変化予測の第一歩となる。より直接的に構造変化が起きている部位を予測するため、大規模構造変化に伴う構造パラメータの変化を MultiCoMP データベースから抽出し、同様の機械学習の手法での解析に着手した。

拡張アンサンブル計算による、ヘリックスパッキングの予測

拘束をかけた拡張アンサンブル計算によるヘリックスパッキング予測のモデル系として、バクテリオロドプシンの膜貫通ヘリックスのレプリカ交換モンテカルロシミュレーションを実行した。７本のヘリックスを膜領域に拘束し、ヘリックスの平行移動と回転、側鎖の２面角の回転についてのシミュレーションを行った。その結果、天然構造と同じトポロジーの構造がエネルギー極小状態として得られるとともに、３本のヘリックスにおいては特に精度の良い予測ができた（図 5)。

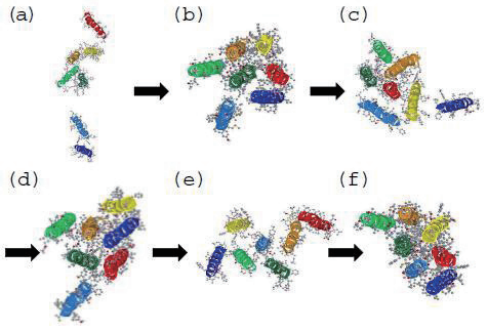

図 5. バクテリオロドプシンのヘリックスパッキングシミュレーション

2.3 膜蛋白質複合体の立体構造モデリングへの具体的応用

上記の解析によって得られた脂質分子との相互作用に関する知見やモデリング手法などを生かし、さらに実験データを最大限に利用して、膜蛋白質複合体構造の高精度モデリングを試みた。具体的には、蛋白質膜透過装置である Sec 複合体の構造モデリングを実施し、クロスリンクなどの生化学実験を用いて、得られたモデリング構造の評価を行なった [6] [7]。

SecY チャネルおよびSecA–SecY 複合体構造を模倣した Fab-SecY 複合体の脂質二重膜中での全原子分子動力学計算を行った。SecY チャネルのプレオープン型からクローズド型への大きな構造転移を再現することに成功し、クロスリンク実験結果とも良い一致が得られた（図 6)。さらに膜タンパク質の構造変化に脂質分子の側方運動が関与する新しいメカニズムを発見した。

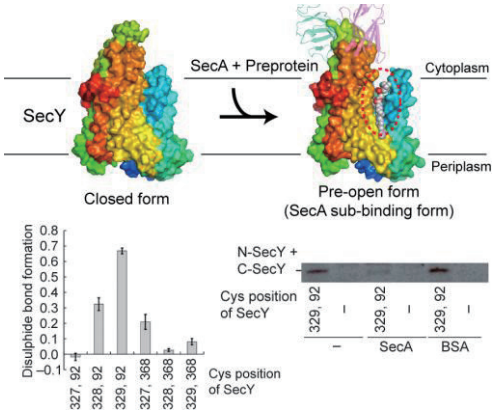

図 6. SecA-SecY 複合体の構造転移

3. まとめ

本課題で掲げた目的のうち、脂質二重膜中での膜蛋白質の構造安定化機構の解明については、アミノ酸—脂質分子相互作用の傾向性について新たな知見を得、また膜蛋白質-脂質二重膜複合体構造の妥当性を検証する新たな方法を開発した。動的で大規模な構造変化を起こしやすい領域の予測とそれを考慮したモデリング技術の確立については、目的達成の重要なマイルストーンとして、アミノ酸配列のみから揺らぎの大きい部位を予測する方法や構造変化を網羅的に収集したデータベースの開発に成功した。これらの技術を統合した自動モデリング法の確立については今後の課題となった。一方、ここまでに開発した技術の、膜蛋白質複合体の立体構造モデリングへの具体的応用として、蛋白質膜透過装置 Sec 複合体のモデリング解析を行なった。従来の技術では難しかったモデリングを実行し、実験データを用いたモデルの評価を行なった。

4. 研究開発実施体制

代表研究者　水口賢司（医薬基盤研究所、バイオインフォマティクスプロジェクト）
ダイナミクスを考慮した膜蛋白質の構造モデリング法の開発

(1)　バイオインフォマティクス
　　グループリーダー　水口賢司（医薬基盤研究所、バイオインフォマティクスプロジェクト）

(2)　分子シミュレーション
　　グループリーダー　杉田有治（理化学研究所、杉田理論生物化学研究室）

(3)　分子シミュレーション
　　グループリーダー　岡本祐幸（名古屋大学、大学院理学研究科物質理学専攻（物理系））

(4)　膜蛋白質に関する実験的研究
　　グループリーダー　森博幸（京都大学、ウィルス研究所）

5. 参考文献

[1] Mokrab Y., Stevens T.J. and Mizuguchi K. Lipophobicity and the residue environments of the transmembrane alpha-helical bundle. *Proteins* **74**, 32-49 (2009)

[2] Mokrab Y., Stevens T.J. and Mizuguchi K. A structural dissection of amino acid substitutions in helical transmembrane proteins. *Proteins* **78**, 2895-2907 (2010)

[3] Ahmad S., Singh H., Paudel Y., Mori T., Sugita Y. and Mizuguchi K. Integrated prediction of one-dimensional structural features and their relationships with conformational flexibility in helical membrane proteins. *BMC Bioinformatics*, in press

[4] Mori T. and Okamoto Y. Folding simulations of gramicidin A into the β-helix conformations: simulated annealing molecular dynamics study. *Journal of Chemical Physics*, **131**, 165103-165108 (2009)

[5] Kokubo H. and Okamoto Y. Analysis of helix-helix interactions of bacteriorhodopsin by replica-exchange simulations. *Biophysical Journal*, **96**, 765-776 (2009)

[6] Tsukazaki T.*, Mori H.*, Fukai S., Ishitani R., Mori T., Dohmae N., Perederina A., Sugita Y., Vassylyev D.G., Ito K. and Nureki O. Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. *Nature*, **455**, 988-991 (2008) *These authors contributed equally to this work.

[7] Mori T., Ishitani R., Tsukazaki T., Nureki O. and Sugita Y. Molecular mechanisms underlying the early stage of protein translocation through the Sec translocon. *Biochemistry*, **49**, 945-950 (2010)