慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	分子動力学的手法を用いた生体高分子に関する研究
Sub Title	Molecular dynamics studies of bio-molecules
Author	平野, 秀典(HIRANO, Yoshinori)
Publisher	
Publication year	2009
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2008.)
JaLC DOI	
Abstract	分子動力学的手法により、膜および膜タンパクの構造ダイナミクスに関する研究を行った。主に水チャネルであるアクアポリンを対象に水銀による水分子透過阻害機構解明を行うことにより、水分子透過制御機構に関する研究を行った。本研究の成果は、膜および膜タンパク質に興味のある生化学研究者および理論的研究者が抱いている、膜および膜タンパク質に関する謎の部分の解明役立つことを期待される。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2006～2008 課題番号：18790035 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18790035seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C -19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２１年　６月１６日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2006 - 2008
課題番号：18790035
研究課題名（和文）　分子動力学的手法を用いた生体高分子に関する研究

研究課題名（英文）　Molecular Dynamics Studies of bio-molecules

研究代表者
平野　秀典(HIRANO Yoshinori)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：　50360631

研究成果の概要：分子動力学的手法により、膜および膜タンパクの構造ダイナミクスに関する研究を行った。主に水チャネルであるアクアポリンを対象に水銀による水分子透過阻害機構解明を行うことにより、水分子透過制御機構に関する研究を行った。本研究の成果は、膜および膜タンパク質に興味のある生化学研究者および理論的研究者が抱いている、膜および膜タンパク質に関する謎の部分の解明役立つことを期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2006 年度	2,100,000	0	2,100,000
2007 年度	600,000	0	600,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総　計	3,200,000	150,000	3,350,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学
キーワード：分子動力学計算、膜、膜タンパク質

１．研究開始当初の背景

近年、実験技術や設備の進歩などで、天然・人工脂質分子で構成された膜や膜タンパク質に関する生化学的実験や結晶化による立体構造の決定に関する報告が増加している。その為、今まではまったくの謎だった膜の物性や膜タンパク質構造などの一部が明らかになっている。例えば、温度や周囲の環境による、膜の結晶⇔（ゲル）⇔液晶の相転移温度の違いや電子密度などである。また、膜全体の構造に関しては、膜を構成する脂質は両親媒性であるため、脂質分子を水中に分散させると、疎水基同士、親水基同士が集まり、その構成分子の違いにより、球状ミセル、棒状ミセル、ラメラ、逆ヘキサゴナルなど様々な集合体構造を形成することが一般に知られている。膜の動的性質は、1972 年に Singer と Nicolson によって提唱された流動モザイクモデル(1)以来、膜中の脂質は膜表面を自由に移動し、均一に分布していると考えられてきた。人工膜上では、リン脂質の種類や脂肪酸の組成によって膜の面上でクラスターを形成する事が知られている。しかし、生体膜では膜中の脂質が不均一に分布されるという実験結果は得られていない。現在までの種々の生化学的実験により。膜の物性は部分的には明らかになっているが、構成分子の相互作用や配向性などは未だ謎である。

そこで、分子動力学的手法を用いて膜や膜タンパク質の構造・ダイナミクスの解明を行う。

２．研究の目的

膜や膜タンパク質の構造やダイナミクスを理解するキーワードとして、分子-分子間や分子-水間などの相互作用が挙げられる。これらの情報は、生化学的実験のみで得ることは困難である。これらの相互作用を知る方法として分子動力学（MD）シミュレーションがある。MD シミュレーションは、取り扱う対象が分子・原子単位であるため、生化学的実験のみでは得ることの難しい現象を高解像度で知ることが可能である。これまでの膜単独や膜と膜タンパク質の複合体の MD シミュレーションでは、計算機の性能などの問題から、脂質分子を剛体として扱ったものや重原子鎖のみを取り扱ったものなど、制限があるものも多い。さらに、スフィンゴミエリンや、フォスファチジルコリンなどの代表的な脂質分子を除き、脂質分子のパラメータに関しては不十分、または脂質分子のパラメータ自体がない場合がほとんどである。そこで、本研究では、膜を構成する分子についてすべての原子を考慮したパラメータも同時に作成する必要がある。その際には、量子化学および MD シミュレーションの経験・知識が必要となる。また、本研究で行う MD シミュレーションは、これまで行われてきた数万原子単位の膜モデルではなく、数百万原子単位の膜モデルでのシミュレーションを行うため、膜の構築原理、相転移の仕組み、流動性や破壊されていく過程をより正確に解明できると予想される。また、今までにない巨大なモデルを使った計算であるため、従来の計算機資源では性能の面から考えて非現実的である。そこで、分子動力学計算用の超高速計算機である MDGRAPE-3 やクラスタ・コンピュータを使用して計算を遂行する。この超高速専用計算機は、シミュレーション時間の大部分を占める分子間に働く力の項を高速かつ正確に計算することができる。

本研究は 3 ヵ年にわたり、膜および膜タンパク質の構造・ダイナミクスについての研究を行う。本研究の目的はシミュレーションと生化学的研究の整合性をとることにある。実験を再現する脂質分子の力場パラメータを作成することにより、シミュレーションと生化学的研究の互いの長所を生かし、生命現象の本質を理解することが可能になる。本研究の成果は、膜および膜タンパク質に興味のある生化学研究者および理論的研究者が抱いている、膜および膜タンパク質に関する謎の部分の解明役立つことを期待する。

本報告書では、主に膜に存在する水チャネルであるアクアポリン(AQP)について報告する。

３．研究の方法

MD シミュレーションは、取り扱う対象が分子・原子単位であるため、生化学的実験のみでは得ることの難しい現象を高解像度で知ることが可能である。しかし、これまでの膜単独や膜と膜タンパク質の複合体の MD シミュレーションでは、計算機の性能などの問題から、脂質分子を剛体として扱ったものや重原子鎖のみを取り扱ったものなど、制限があるものも多い。さらに、スフィンゴミエリンや、フォスファチジルコリンなどの代表的な脂質分子を除き、脂質分子のパラメータに関しては不十分、または脂質分子のパラメータ自体がない場合がほとんどである。そこで、本研究では、膜を構成する分子に含まれるすべての原子を考慮した力場パラメータも同時に作成する。生化学的実験との整合性のとれた力場パラメータ作成の際には、量子化学計算と MD シミュレーションの両方の知識・経験に加えて、生化学的な知識も必要である。膜の生化学実験を行っている研究者との共同研究により、実験値との整合性のとれた力場パラメータを作成するからである。

本研究で行う MD シミュレーションは、これまでに行われてきたような数万原子単位の膜モデルではなく、十万原子単位の膜モデルを構築することにより、膜の構築原理、相転移の仕組み、流動性や破壊されていく過程をこれまでのシミュレーション結果よりも正確に解明できる。より生化学的実験の条件に近くなるからである。しかし、大規模な膜モデルでシミュレーションを行うためには、数値計算を高速に処理可能な計算機が必要である。また、生化学実験との整合性を取るためには、作成した力場パラメータを用いて MD シミュレーションを行い、その結果の検証を行う必要がある。初年度に申請したホスト用計算機、および超高速分子動力学専用計算機 MDGRAPE-3 の設備は本研究の遂行には必須である。MDGRAPE-3 は、MD シミュレーションにかかる時間の大部分を占める分子間に働く力に関する項を高速かつ正確に計算することができる。また、複数台の計算機を並列につなぎ、１台１台の計算処理を低減させたクラスタ・コンピュータシステムの使用も行う。これらの設備を用いて、膜モデルのシミュレーションを行う。

本研究では、身体の様々な部位に存在するアクアポリン１を対象とした。まず、分子動力学シミュレーションにより、アクアポリン１の膜中での構造ダイナミクスに関する研究を行った。分子動力学シミュレーションを行うためのモデル構造は次のように構築した。アクアポリン１の結晶解析構造を Protein Data Bank よりダウンロードした(PDB entry: 1J4N)。公開されている構造は単量体である。しかし、アクアポリン１は生体内では四量体として存在している。そこで、単量体構造から四量体構造を構築した。構築した四量体構造を脂質（POPE）で構成された二重層膜に埋め込み、二重膜の上下に水分子(TIP3P water)を発生させ、110 Å×110 Å×106 Å の直方体セルを構築した（図 1）。

このセルに含まれる原子数は約 10 万である。構築したモデル系について、まず、初期構造を構築するために温度(310 K)、圧力(1 atom)一定（NPT）の周期境界条件下で平衡状態の分子動力学シミュレーションを 2 ns 行った。

2ns の分子動力学シミュレーションを行い、最後の 500 ps の平均構造を初期構造とした。この初期構造から、水銀の結合した系(Hg-AQP1)と結合していない系(Free AQP1)を構築し、それぞれの構造について、さらに 40 ns の平衡状態の分子動力学シミュレーションをおこなった。

分子動力学シミュレーション中は水素原子を含む結合長を平衡核間距離に保つために SHAKE 法を用いた。タイムステップは 1 fs とした。遠距離からの寄与は Particle Mesh Ewald (PME)法により計算した。計算プログラムは amber 8 を用いた。

４．研究成果

両者のタンパク質全体の構造を比較するために、主鎖を重ね合わせた（図１）。

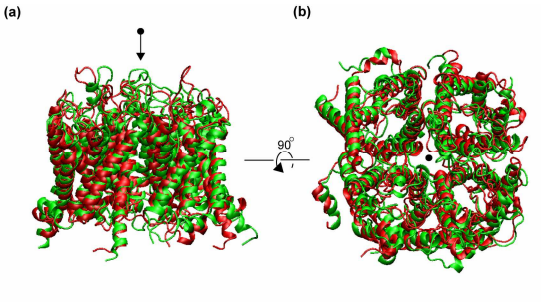

図１：主鎖の重ね合わせ

Free AQP1 を緑色、Hg-AQP1 を赤色で示す。両者の主鎖構造の変化はわずかであった。このことから、水銀が結合することによってはアクアポリン１の構造骨格は影響を与えないことが分かった。しかし、水銀が結合したシステインの周囲のアミノ酸残基を比較すると、両者に明らかな違いが見られた（図２）。

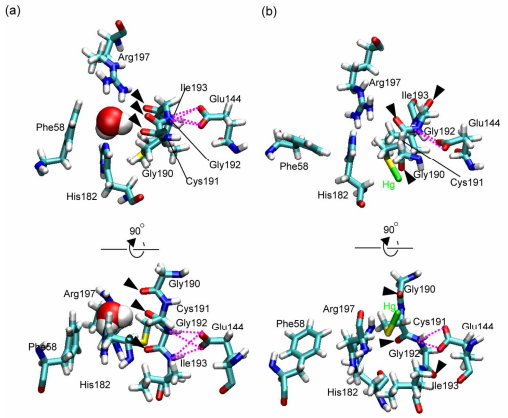

図２：水銀が結合したアミノ酸残基周囲の構造(a): Free AQP1 (b)Hg-AQP1

図２から、水銀が結合することにより、主に水銀の結合したシステインの周囲のアミノ酸の側鎖の立体配置が変化することが分かった。そのことから、両者の pore 径に違いが見られると考えられるので、HOLE プログラムにより半径を測定した(図３)。

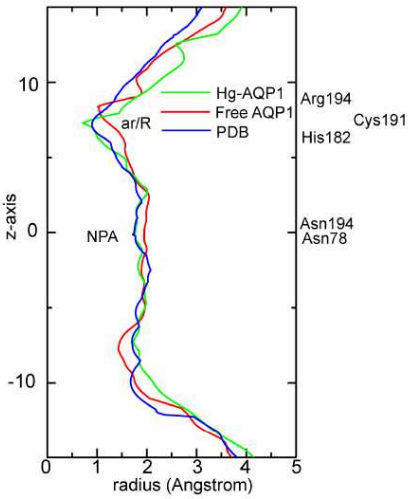

図３： water pore の半径

その結果、Hg-AQP1 の水銀の結合したシステインの周囲の pore 径は Free AQP1 の pore 径よりも広がっていることが分かった。このことから、水銀による水分子透過阻害機構は、水銀が pore を塞いでいるのではないことが示唆された。

また、最後の 10 ns の間に water pore を通った水分子数は Free AQP1 が 23 に対し、Hg-AQP1 は０であった。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計２件）全て査読あり

1. Yukutake, Y., Tsuji, S., Hirano, Y., Adachi, T., Takahashi, T., Fujihara, T., Agre, P., Yasui, M., and Suematsu, M “Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporin-4-reconstituted proteoliposomes”, Biol. Cell., 100, pp.355-363, 2008
2. Hayakawa, T., Hirano, Y., Makino, A., Michaud, S., Lagarde, M., Pegeaux, J.-F., Doutheau, A., Ito, K., Fujisawa, T., Takahashi, H., and Kobayashi, T. “Differential Membrane Packing of Stereoisomers of Bis(monoacylglycero)phosphate”, Biochemistry, 45, pp.9198-9209, 2006.

〔学会発表〕（計１６件）

1. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「分子動力学的手法を用いたアクアポリンに関する研究」 日本薬学会第１２９年会 京都 2009 年 3 月 27 日
2. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「AQP1 の選択的分子透過機構に関する研究」, 第 82 回日本薬理学会年会 横浜 2009 年 3 月 16 日
3. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「分子動力学的手法を用いたアクアポリンの水透過性に関する研究」 日本生物物理学会第 46 回年会 博多 2008 年 12 月 5 日
4. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「水銀によるアクアポリンの水透過阻害メ機構の解明」, 第 22 回分子シミュレーション討論会 岡山 2008 年 11 月 18 日
5. Hirano, Y., Yasuoka, K., Suematsu, M., and Yasui, M. “Water exclusion mechanism of aquaporin-1 by Molecular Dynamics simulations” 3d INTERNATIONAL WORKSHOP MSSMBS'08 “ Molecular Simulation Studies in Material and Biological Sciences”, Dubna (Russia), 11th September, 2008. (keynote lecture)
6. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「分子動力学的手法を用いたアクアポリンに関する研究」 日本薬学会第１２８年会 横浜 2008 年 3 月 26 日
7. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「水銀によるアクアポリンの水透過阻害メカニズムに関する研究」, 第 81 回日本薬理学会年会 横浜 2008 年 3 月 19 日
8. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「分子動力学的手法を用いたアクアポリンに関する研究」 日本生物物理学会第 45 回年会 横浜 2007 年 12 月 21 日
9. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「分子動力学的手法を用いたアクアポリンに関する研究」 第 21 回分子シミュレーション討論会 金沢 2007 年 11 月 27 日
10. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「分子動力学的手法を用いたアクアポリンに関する研究」, 第１１７回日本薬理学会関東部会 東京 2007 年 10 月 6 日
11. Hirano, Y., Yasuoka, K., Suematsu, M., and Yasui, M. “Water exclusion mechanism of aquaporin-1 by Molecular Dynamics Simulation”, The 27th Anniversary International CBI Conference, Hiroshima, 4th October 2007.
12. Hirano, Y., Yasuoka, K., Suematsu, M., and Yasui, M. “Water Exclusion Mechanism of Aquaporin-1 by MD simulations” The 5th International Conference of Aquaporin, Nara, 13th June, 2007.
13. 平野 秀典, 泰岡 顕治, 末松 誠, 安井 正人 「計算科学的手法を用いたアクアポリンに関する研究」 日本薬学会 127 年会 富山 2007 年 3 月 29 日
14. Hirano, Y., Okimoto, N., Suenaga, A., Taiji, M., Imamoto, N., Yasui, M., and Ebisuzaki, T. “Investigation of The Structure-Function Relationship of Importin-β by Molecular Dynamics simulations”, 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan 2006, Okinawa, 13th Nov. 2006.
15. Hirano, Y., Yasuoka, K., Makita, N., Yasui, M., and Suematsu, M. “Molecular Dynamics Simulations of Water Channel: Aquaporin”, Keio Aquaporin Mini Symposium, Tokyo, 31st October, 2006
16. Hirano, Y., Yasuoka, K., Suematsu, M., and Yasui, M., “Molecular Dynamics Simulation of Aquaporin”, The 21 Century COE Young Scientist Workshop 2006 in Shonan, Hayama, 18th Sep. 2006.

〔図書〕（計０件）
なし

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
なし
○取得状況（計０件）
なし

〔その他〕
受賞
1. Hirano, Y. “Award for the Excellent Poster”, The 27th Anniversary International CBI Conference, October, 2007.

６．研究組織

(1)研究代表者
平野 秀典(HIRANO Yoshinori)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号： 50360631

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし