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

Title	動的不均一場における膜蛋白質の複合体形成機構解明に向けた計算手法の開発
Sub Title	Development of computational methods to investigate the clustering dynamics of membrane proteins in heterogeneous biological membranes
Author	山本, 詠士(Yamamoto, Eiji) 秋元, 琢磨(Akimoto, Takuma) 村松, 眞由(Muramatsu, Mayu)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	生体膜では，細胞の機能維持において重要な特定の脂質やタンパク質が集まることで，大きさが10~200 nmオーダーの動的かつ不均一なドメインが形成されることが知られているが，場の不均一性が場を拡散する生体分子挙動に与える影響は不明な点が多い．本研究では，反応拡散方程式とブラウン動力学法を組み合わせた2次元メゾスケールシミュレーション法の開発を行い，場の不均一性がそこを拡散する分子挙動に与える影響を明らかにした． In biological membranes, specific lipids and proteins, which are important for maintaining cellular functions, assemble and make dynamical and heterogeneous domains with a size of 10-200 nm. In this study, we developed a two-dimensional mesoscale simulation method that combines the reaction-diffusion equation and Brownian dynamics and clarified the effect of heterogeneity on the molecular behavior in the field.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2020～2021 課題番号：20K14432 研究分野：生物物理
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K14432seika

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、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ５ 月 ２７ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：２０Ｋ１４４３２

研究課題名（和文）動的不均一場における膜蛋白質の複合体形成機構解明に向けた計算手法の開発

研究課題名（英文）Development of computational methods to investigate the clustering dynamics of membrane proteins in heterogeneous biological membranes

研究代表者
山本　詠士（Yamamoto, Eiji）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・講師

研究者番号：００７７９３４０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体膜では，細胞の機能維持において重要な特定の脂質やタンパク質が集まることで，大きさが10~200 nmオーダーの動的かつ不均一なドメインが形成されることが知られているが，場の不均一性が場を拡散する生体分子挙動に与える影響は不明な点が多い．本研究では，反応拡散方程式とブラウン動力学法を組み合わせた2次元メゾスケールシミュレーション法の開発を行い，場の不均一性がそこを拡散する分子挙動に与える影響を明らかにした．

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では生体膜における場の不均一性の影響が顕著になる時空間スケールの現象をシミュレーションできる手法の開発を行うことで，生体分子挙動を扱える分子動力学シミュレーションと一分子計測実験の時空間分解能が交差するメゾスケールの現象を扱うことが可能となったことには学術的意義がある．今後，生体膜におけるタンパク質相互作用の破綻により生じる病理の解明に繋がることが期待されるため，社会的意義がある．

研究成果の概要（英文）：In biological membranes, specific lipids and proteins, which are important for maintaining cellular functions, assemble and make dynamical and heterogeneous domains with a size of 10-200 nm. In this study, we developed a two-dimensional mesoscale simulation method that combines the reaction-diffusion equation and Brownian dynamics and clarified the effect of heterogeneity on the molecular behavior in the field.

研究分野：生物物理

キーワード：不均一場　生体膜　メゾスケール　反応拡散方程式　ブラウン動力学法

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

生体膜は様々な種類のタンパク質や脂質で構成されており，生体分子が膜内のどの場所でどういった分子と相互作用するかが，膜の機能維持の鍵を握る．生体膜は流動的であり，飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸で構成される脂質同士が混ざると秩序液体相（L_o 相）と無秩序液体相（L_d 相）に液-液相分離を起こし，10~200 nm オーダーのドメインが形成される（時間スケールで 10^{-3}~10^{2} 秒）．脂質組成や温度条件によってドメイン挙動は大きく変わる．特に，スフィンゴ脂質や糖鎖脂質，コレステロールが集まることで形成される脂質ラフトと呼ばれるドメインは，選択的に特定のタンパク質をその場所へ誘導し，細胞膜における物質輸送や細胞内シグナル伝達，細胞骨格構築機構，病原菌の細胞内への侵入など，様々な現象において重要な働きを示すと考えられている [文献①].

近年，一分子計測実験によって，生体膜内におけるタンパク質の拡散現象やクラスター形成挙動に関する研究が盛んに行われている．生体膜を拡散する脂質の拡散性がドメインへの過渡的なトラップによって変化する様子[文献②]やタンパク質のクラスター化 [文献③] が報告されてきた．しかし，時間分解能（10^{-4} 秒）の制限や同時に複数種類の分子を計測することが難しいことから，タンパク質の拡散性やクラスター化に周りの脂質ドメインの動的不均一性がどのような影響を与えるのかに関して不明な点が多い．

分子動力学（MD）シミュレーションを用いた生体膜に関する研究では，原子からナノレベルでのタンパク質–タンパク質，タンパク質–脂質相互作用に関する報告がされており，実験結果の分子レベルでの解釈が行われてきた．近年は大規模かつ複雑な生体膜モデルを扱う粗視化 MD シミュレーション研究が行われ始めているが，MD シミュレーションにおける時間（~10^{-5} 秒）および空間（~数 10 nm）スケールの制限から，一分子計測実験で観測されるメゾスケールでの生体膜シミュレーションやモデル化には至っていない．シミュレーションと実験の時空間が交差するメゾスケール領域のシミュレーション法の確立によって，シミュレーションと実験のギャップを埋め，生体膜で形成される動的かつ不均一なドメイン挙動がタンパク質の挙動やタンパク質同士の相互作用に与える影響を解明する必要がある．

２．研究の目的

本研究では，L_o 相と L_d 相が不均一に分布する生体膜におけるタンパク質の拡散およびクラスター化現象を解明するために，反応拡散方程式とブラウン動力学法を組み合わせたメゾスケールシミュレーション法の開発を行った．L_o 相と L_d 相が不均一に分布する生体膜モデルを用いることで，場の不均一性がタンパク質の拡散性やクラスター化に与える影響を解析した．

３．研究の方法

L_o 相と L_d 相に分離した生体膜モデルについては，先行研究で提案されている[文献④]．反応拡散方程式を有限差分法によって解くことで格子点上の脂質濃度分布の時間変化を計算した（図1）．各モデルは不均一な細胞膜モデルであり，model I は臨界温度付近における熱揺らぎ，model II は不動性膜タンパク質による界面組成の固定，model III は小胞との脂質の交換，model IV は非小胞との脂質の交換，model V は脂質リザーバーとの脂質の交換による脂質ラフト形成を表している．場を拡散する 1 粒子の時系列（x, y 座標）は，拡散係数が場に依存して変化する拡張型ランジュバンモデル[文献⑤]を用いた．ある時刻における粒子の拡散係数は，有限差分法から得ら

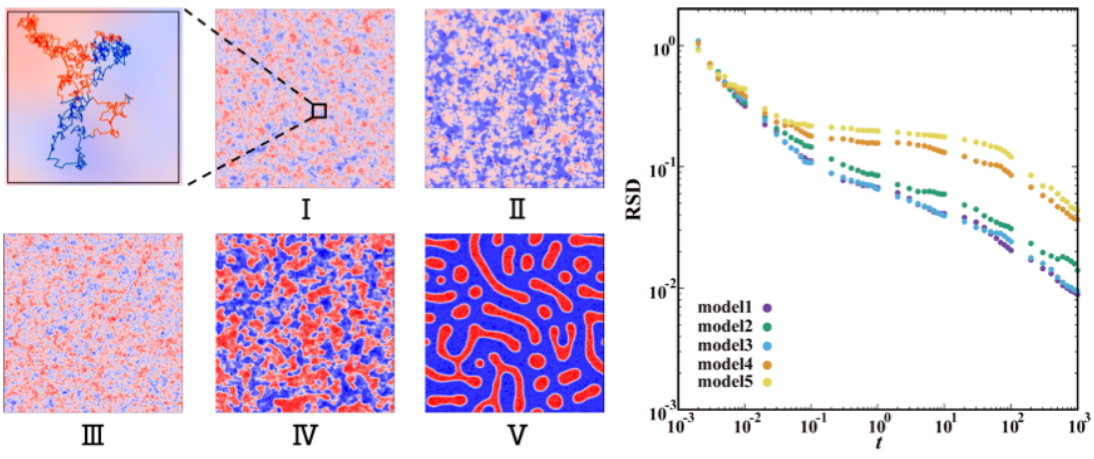

図 1．5 つの不均一脂質膜モデル．赤色は秩序液体相（L_o 相），青色は無秩序液体相（L_d 相）．拡大図は場を拡散する粒子の時系列を示した．滞在している層ごとに色分けを行った．右図は拡散性のゆらぎを表す RSD.

れる粒子近傍の脂質濃度分布に応じて変化させた（図 1）．実験結果と同様に，L_o 相に比べ L_d 相での粒子の拡散係数を大きくした．多粒子系では，粒子同士の相互作用として引力項および斥力項（Lennard-Jones ポテンシャル）を与えた．また，L_o 相と L_d 相とでは，各相に含まれる脂質分子の種類が異なる．生体膜内のタンパク質は脂質分子の嗜好性があるため，L_o 相と L_d 相に好んで滞在するものに分かれる．タンパク質の場の嗜好性を考慮するために，粒子と場との親和性を L_o 相と L_d 相の間にポテンシャル壁を設けることで再現した．

４．研究成果

（1）図 1 には，各モデルにおける脂質濃度を 0（L_d 相：青）〜1（L_o 相：赤）にスケーリングした濃度分布を示した．モデルごとに異なる大きさの相を形成し，分布が異なることがわかる．場を 1 粒子のみが拡散するシミュレーションを行い粒子の時系列データを取得した．粒子の時系列データから，平均 2 乗変位（MSD），拡散係数のゆらぎ，プロパゲータなどの拡散性を特徴付ける統計量を解析した．時間平均された 2 乗変位（TAMSD）は線形に増加するが，濃度分布の不均一性の影響により，場を拡散する粒子の拡散係数が顕著なゆらぎを示す異常拡散を示すことがわかった．さらに，拡散性のゆらぎを定量的に評価するために，TAMSD の Relative standard deviation（RSD）を解析した．拡散性にゆらぎがない通常拡散では，RSD は観測時間 t の増加に伴い減衰するが，不均一場における粒子の拡散性のゆらぎには異常なふるまいが観られた．図 1 に示すように，拡散性が顕著にゆらぐ異常拡散では，RSD の減衰が見られず，プラトーを示した．プラトーから減衰へのクロスオーバーは拡散性のゆらぎの緩和時間に対応する．各膜モデルを比較すると，場の不均一性や場への粒子の滞在時間の違いが，拡散性のゆらぎ大きさや緩和時間に影響を与えることがわかった．

（2）分子間相互作用を考慮した多粒子系では，粒子が凝集しクラスターを形成する現象が確認できた（図 2）．粒子濃度を増加させた場合や相互作用の強さを大きくした場合，粒子の凝集効果が大きくなり，粒子の動きが制限されることで，TAMSD の値が小さくなることが確認された．TAMSD の傾きも粒子濃度に依存して小さくなった．また，粒子濃度，相互作用の強さの変化による RSD の変化は少なく，拡散性のゆらぎの顕著な違いは見られなかった．

（3）タンパク質と脂質膜相の親和性を考慮するためにポテンシャル壁を導入した計算では，場の嗜好性によって拡散性への影響が見られた．場の嗜好性がある場合，嗜好性がない場合に比べて，同一相に粒子が滞在しやすくなることにより，拡散性のゆらぎの緩和時間が短くなった．さらに，粒子が好む相の膜全体での占める割合の大きさが拡散性のゆらぎや緩和時間に影響を与えることがわかった．例えば，生体膜内での L_o 相の占める割合が L_d 相の占める割合より小さい膜モデルでは，L_d 相を好む場合の方が同一相での粒子の滞在時間が増加し，拡散性のゆらぎが小さく，緩和時間も短くなった．

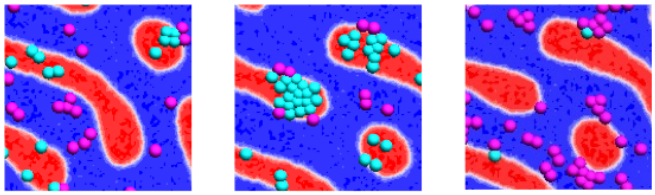

図 2．粒子と場との親和性を考慮したモデル．左：場の嗜好性がない場合，中央：L_o 相（赤）を好む場合，右：L_d 相（青）層を好む場合．粒子の色は L_o 相と L_d 相に存在する場合で色分けした．

粒子と場との親和性の強さの違いによる拡散性への影響を調べるためにポテンシャル壁のポテンシャル高さを調整した計算では，嗜好度によって拡散性の違いが観られた．L_o 相への嗜好度を強くすると，TAMSD が劣線形に増加する遅い拡散を示した．これは，粒子同士のクラスター化による拡散性の低下の影響が大きいと考えられる．また，嗜好度が強いほど，同一相において多くの粒子がクラスター化するようになり，拡散性のゆらぎが速く緩和することが確認できた．

＜参考文献＞

① E. Sezgin *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 361 (2017)
② H. M. Wu *et al.*, *Sci. Rep.* **6**, 20542 (2016)
③ D. M. Saka et al., *Nat. Commun.* **5**, 4509 (2014)
④ J. Fan et al., *Phys. Rev. Lett.* **104**, 118101 (2010)
⑤ T. Akimoto and E. Yamamoto, *Phys. Rev. E* **93**, 062109 (2016)

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 坂本健，秋元琢磨，村松眞由，Mark S.P.Sansom，Ralf Metzler，山本詠士
２．発表標題 不均一な場における粒子の拡散性のゆらぎ
３．学会等名 第35回分子シミュレーション討論会
４．発表年 2021年

１．発表者名 坂本健，秋元琢磨，村松眞由，Mark S.P.Sansom，Ralf Metzler，山本詠士
２．発表標題 メゾスケールシミュレーション手法による生体膜内の分子拡散の解析
３．学会等名 日本機械学会 関東支部 第28期総会・講演会
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	秋元　琢磨 (Akimoto Takuma)		
研究協力者	村松　眞由 (Muramatsu Mayu)		

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	ポツダム大学			
英国	オックスフォード大学			