

分子動力学シミュレーションによる

巨大生体分子の構造機能相関の解明

Molecular dynamics simulation for elucidation of the structure–function relationship of biomacromolecules

鷹野 優

広島市立大学大学院情報科学研究科

1. 研究目的

電位依存性カリウムイオンチャンネル (Kv チャンネル) は細胞膜の脱分極を感知して活性化され、カリウムイオンを選択的に透過する。これらのタンパク質では、アミノ酸変異によりコンダクタンスや選択性フィルタにおけるイオンの分布が大きく変化することが知られている (I. Díaz-Franulic et al., *J. Gen. Physiol.* **146**, 133–146, 2015) が、変異がタンパク質の構造やタンパク質内のイオンの分布にどのような影響を与えるかについては不明な部分が多い。そこで本プロジェクトでは、脱分極下で C 型不活性化状態となることで知られる Kv1.2 の W366F 変異体をターゲットとして、野生型 (WT) および W366F 変異体の分子動力学 (MD) シミュレーションを行うことにより、C 型不活性化の分子機構を原子レベルで解明することを目的とする。

2. 研究成果の内容

Kv チャンネルで見られる C 型不活性化の分子機構を明らかにすることを目的として、WT および W366F 変異体の MD シミュレーションを行い、z 軸方向に一樣な電場をかけた状態でのタンパク質およびイオンの動態を比較した。図 1A, B の各カリウムイオンの z 座標の時系列データが示す通り、WT では 300 ナノ秒のトラジェクトリ全体にわたってイオン透過が見られたのに対し、W366F 変異体では一部の区間を除いてイオン透過が見られなかった。WT

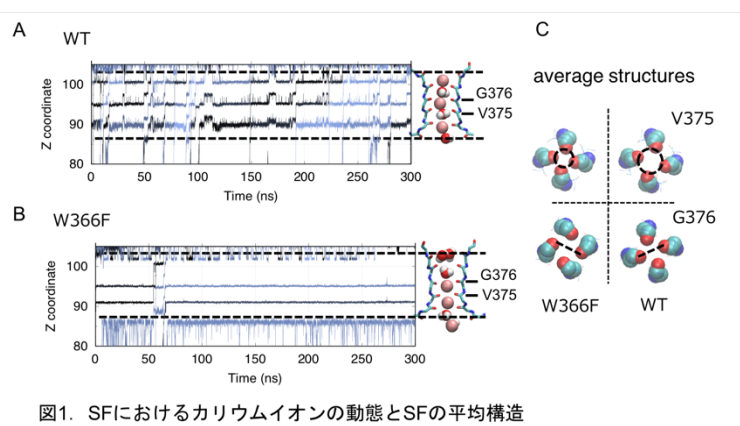


図1. SFにおけるカリウムイオンの動態とSFの平均構造

と W366F 変異体では選択性フィルタ (SF, カリウムイオンが一线になって透過する部分) 内のイオン分布に違いが見られ、WT では SF に 3 個のカリウムイオンが入った 3 イオン状態、W366F では 2 イオ

ン状態が多く観察された。WT と W366F 変異体の SF 部分の主鎖構造に対して主成分分析を行ったところ、2つのトラジェクトリは第一主成分軸 (PC1) でほぼ分かれた。W366F 変異体では、イオンが透過しているときは WT に近い構造を取っているが、透過していないときは SF の構造が異なっていることがわかった。図 1C に WT, W366F 変異体それぞれの PC1 の平均構造を示す。PC1 では特に SF の V375 と G376 に特徴的な変化が見られ、この変化により、W366F 変異体では WT と比べて SF の中心付近が狭まっていた (以下、不活性化状態とする)。不活性化状態の W366F 変異体に対して逆方向の電圧をかけたところ、不活性化状態から回復し、逆方向のイオン透過が見られた。Kv チャンネルの一種である Shaker チャンネルに関する Conti らによる先行研究 (L. Conti et al., *Sci. Rep.* **6**, 27562, 2016) では、SF 内の構造変化に加えて細胞外側の出口が広がるような構造変化も観察されていることから、完全な不活性化状態ではない可能性もあるが、W366F 変異体では電位依存的に SF の構造変化が起こり、SF が狭まることでイオンの透過が妨げられることが示唆された。さらに 3D-RISM による解析から、SF の構造とイオン分布の相関が見られ、PC1 方向の構造変化 (SF が狭まるような構造変化) に

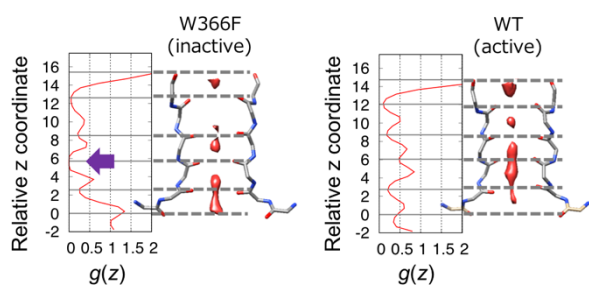


図2. 3D-RISMによるカリウムイオンの分布の解析

より SF 内にイオンの遷移が起こりにくくなる領域ができること、細胞外側の出口付近のカリウムイオンが拡散し 2 イオン状態が安定化されることが示された (図 2)。SF 構造変化のメカニズムを調べるために SF の裏側の水分子の動態についても解析を行った。C 型不活性化については

バクテリアのカリウムチャンネル KcsA でよく研究されており、Ostmeyer らの研究 (J. Ostmeyer et al., *Nature* **501**, 121-124, 2013) から SF の裏側の水分子との相互作用が SF の構造変化に重要であることが報告されている。しかしながら、本研究では SF の構造変化の前後において水分子の配置の大きな変化は見られず、KcsA と Kv チャンネルでは C 型不活性化の分子機構が異なる可能性も示唆された。

3. 今後の展望

本解析からタンパク質の構造とイオン分布に相関があることはわかったが、イオン分布の変化がタンパク質の構造変化を引き起こすといった一方向の因果関係ではなく、不活性化を引き起こすメカニズムを完全には解明できていない。特に、トリプトファンからフェニルアラニンへの変異がタンパク質の構造揺らぎに与える影響が十分に解明できたとはいえない。今後は本研究で観測されたタンパク質の構造変化に重要な相互作用やヒステリシスの分子機構の解明を目指す。さらに、イオン透過に変化が見られる他の変異体についても解析を行いたいと考えている。

4. 成果発表

(1) 学術論文

"Molecular Mechanism of Depolarization-Dependent Inactivation in W366F Mutant of Kv1.2," Hiroko X. Kondo, Norio Yoshida, Matsuyuki Shirota, Kengo Kinoshita, *The Journal of Physical Chemistry B* **122**, 10825-10833, 2018

(2) 学会発表

・口頭発表

+ 「電位依存性カリウムチャネル Kv1.2 における C 型不活性化の分子機構の解析」, 近藤寛子, 吉田紀生, 城田松之, 鷹野優, 木下賢吾, 凝縮系の理論化学, 石垣市, 2019 年 3 月

+ 「電位依存性カリウムチャネル変異体の不活性化機構の解析」, 近藤寛子, 第 3 回イオンチャネル研究会, 福井市, 2018 年 7 月

+ 「電位依存性カリウムチャネル変異体の電位依存的な不活性化機構の解析」, Hiroko X. Kondo, Matsuyuki Shirota, Yu Takano, Kengo Kinoshita, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟市, 2018 年 6 月

・ポスター発表

+ "Molecular dynamics study on the mechanism of inactivation in a mutant of the voltage-gated potassium channel Kv1.2," Hiroko X. Kondo, Norio Yoshida, Matsuyuki Shirota, Yu Takano, Kengo Kinoshita, 63rd Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, March 2019

+ "Molecular dynamics study on the mechanism of voltage dependent inactivation in a mutant of the voltage-gated potassium channel," Hiroko X. Kondo, Norio Yoshida, Matsuyuki Shirota, Yu Takano, Kengo Kinoshita, Asian Biophysics Association Symposium and Annual Meeting of the Australian Society for Biophysics, Melbourne, December 2018

(3) その他

使用計算機	使用計算機 に○	配分リソース※	
		当初配分	追加配分

COMA	○	33,720	
Oakforest-PACS			
※配分リソースについてはノード時間積をご記入ください。			