

主論文の要約

論文題目 **Molecular dynamics study of membrane pore formation induced by antimicrobial peptides**
(分子動力学法を用いた抗菌ペプチドによる膜細孔形成機構の研究)

氏名 宮崎 裕介

論文内容の要約

【研究背景】

抗菌ペプチドは細菌に対して抗菌作用を示すペプチドであり、生体防御において重要な役割を担っている。細菌膜に吸着し細孔を形成することで細菌の内容物の漏出を引き起こし、細菌を死滅させる **pore-forming** タイプの抗菌ペプチドは、膜のバリア機能を直接低下させるため耐性菌が生じにくく、近年有効な抗菌剤のモデルとして注目を集めている。

細孔形成を引き起こす抗菌ペプチドは、一般的にカチオン性の両親媒ペプチドである。抗菌ペプチドのカチオン性は、アニオン性の細菌膜と静電相互作用により吸着を促進させる。水中ではランダムコイル構造をとる抗菌ペプチドだが、膜に吸着後は α ヘリックスなどの二次構造を形成することで、親水性アミノ酸残基が多く存在する部分と疎水性アミノ酸残基が多く存在する部分が生じ両親媒性を示す。膜に吸着した抗菌ペプチドの濃度がある閾値を超えると膜に細孔を形成することが様々な実験により知られている。実験で提唱されている抗菌ペプチドによる細孔形成モードには、**barrel-stave mode**、**toroidal mode**、**carpet mode**、**bursting** があるが、それぞれのモデルには特徴があり、抗菌ペプチドによってどの細孔形成モードを発現するのかが実験的に検証されている。例えば、ハチ毒由来の代表的な抗菌ペプチド **melittin** は、**toroidal mode** と **carpet mode** の二つのモードを示すことが実験により既知である。実験では、**solid NMR** や **dye efflux** アッセイ、**X線回折法**などを駆使して抗菌ペプチドにより形成された細孔の構造や抗菌ペプチドの膜上でのダイナミクスを捉えようとしてきたが、系の複雑さ故にその分子論的な詳細は未だに不明のまま

である。

上記の実験に加え、抗菌ペプチドによる膜細孔形成過程の研究には分子動力学シミュレーションも用いられることが多い。分子動力学シミュレーションは、膜細孔形成過程のようなナノスケールで生じる現象の分子論的解析に有効な手法である。抗菌ペプチド **melittin** の研究に関して言えば、シミュレーションによる研究は 1989 年から始まっており、全ての原子を露わに扱う全原子シミュレーションや複数の原子を一つのサイトとして扱う粗視化シミュレーションを使用したマルチスケールな解析が行われてきた。しかし、高精度な全原子シミュレーションではエネルギー解析やペプチドのコンフォメーション変化を扱えるものの、細孔形成過程をトレースするには計算コスト的に未だに困難である。一方、粗視化シミュレーションを用いれば、細孔形成過程をトレース可能であるが、形成された細孔の構造や抗菌ペプチドの配向が実験データと一致しないという分子モデルの精度の問題があり、細孔形成過程に関する正しい分子論的知見が得られていない可能性がある。

本博士論文では、分子動力学シミュレーションを用いることで実験では明らかになっていない抗菌ペプチドの配置、膜の構造と細孔形成モードの関係を解明することを目的とした。この研究により、未解明であった細孔形成過程の分子機構を解析することで抗菌ペプチドの複雑な作用機序を理解できれば、抗菌ペプチドの活性発現機構を模倣した抗菌剤の開発に繋がるのが期待できる。

【第 1 章】

シミュレーションを用いた従来の細孔形成過程の研究では現象論の解析が多く、抗菌ペプチドにより膜に形成された細孔の安定性や細孔形成に必要なエネルギーについて定量的な解析がされていなかった。また、膜に吸着後の **melittin** が細孔形成するとき、一分子ずつ膜に挿入されることで細孔形成する **one by one insertion**、または、複数の分子で同時に細孔形成を行う **collective pore formation** の二つの過程が考えられるが、どちらがエネルギー的に有利か不明である。本研究では、この自由エネルギー解析により多数の脂質分子とペプチドで構成される複雑な系で発現する細孔高形成過程の定量的評価に挑戦した。

計算系は 256 分子のパルミトイルオレオイルフォスファチジルコリン(POPC)で構成される脂質二重層の片側の層のみに抗菌ペプチド **melittin** 4~7 分子を N 末端を互いに向けた配置で且つ膜に平行に吸着させた系を用意した。この系を用いた **collective pore formation** の自由エネルギー解析の結果、**melittin** の数が 4 または 5 分子の系では細孔形成に必要な自由エネルギーが 20 kJ/mol 以上であり、**melittin** の数が 6 または 7 分子の系では 2~3 $k_B T$ 程度になることがわかった。また、比較のため **one by one insertion** に相当する **melittin** 1 分子を膜中に挿入するために必要な自由エネルギー計算を行ったところ、**melittin** が膜表在状態から膜貫通状態に移行するためには 50 kJ/mol の大きな自由エネルギーバリアを超える必要があることがわかった。これらの結果より、複数の **melittin** 分子が協同的に細孔形成する **collective pore formation** はエネルギー的に尤もらしい細孔形成過程であることが

示唆された。

【第2章】

生体分子系のシミュレーションでは水分子間の静電相互作用の計算に多くの時間を費やすため、粗視化分子力場における水は計算コスト削減のために電荷を持たないモデルや陰に取り扱われることが多い。この場合、静電遮蔽効果は計算系全体に一律な誘電率を課すことで取り込まれていた。そのため、脂質膜系のような誘電率が大きく変化する不均一系では静電相互作用を正しく記述するのが困難であった。実際、全原子シミュレーションで安定となるはずの **melittin** の膜細孔は、従来の粗視化力場を使用した場合に不安定になってしまう。そこで、本研究では自己集合過程を含む細孔形成過程全体を高精度なシミュレーションを可能とするため、当研究室で独自に開発されてきた階層的分子モデリング手法を用いて、極性を持つ粗視化水モデルをベースとした定量的粗視化分子力場 **pSPICA** を開発する。

力場の構築にあたって、まず初めに粗視化水モデルの構築を行った。構築した粗視化水モデルは、水3分子を正の電荷と負の電荷をそれぞれ持つ二粒子で代表することにより極性を持つものとした。この水モデルは、6つの調整可能なパラメータを有していたが、水の密度、表面張力、誘電率の実験値が再現されるよう最適化した。水モデル構築後、粗視化脂質モデルの構築を行った。構築した粗視化脂質モデルで構成される二重層膜は、膜を特徴付ける量である膜面積や面積圧縮率、膜厚の実験値を再現するだけでなく、全原子シミュレーションから得られる分布関数や脂質尾部の秩序パラメータも再現した。粗視化タンパク質モデルはアミノ酸残基の溶媒和自由エネルギーや膜透過自由エネルギー、膜表在タンパクの配向などの実験値や全原子シミュレーションの計算値を再現するように構築した。この粗視化分子力場を使用した **melittin** 分子の膜細孔形成状態をシミュレーションしたところ、全原子シミュレーションと同様に安定した細孔状態が保たれることが確認できた。以上のように、本研究で開発した力場 **pSPICA** によって、粗視化シミュレーションによる抗菌ペプチド系の計算機実験を初めて精度よく実行可能となった。

【第3章】

抗菌ペプチドによる細孔形成過程の発現には、脂質分子に対するペプチドの数 **peptide-to-lipid ratio (P/L)** がある閾値を超えることが必要であるため、細孔形成過程の濃度依存性に関する知見は重要である。しかし、実験では **P/L** に依存して抗菌ペプチドがどのように配置することで細孔形成を誘起するか分子論的な観点から明らかになっていない。そこで本研究では、**melittin** が脂質膜に吸着した系を異なる **P/L** で用意し **pSPICA** を用いたシミュレーションを行うことで、**melittin** の配置や膜の構造、細孔形成モードの関係の解明に迫る。

計算系には 1024 分子で構成される **POPC** 膜に対して **melittin** 10, 20, 30, 40 分子を片側

の膜にのみ吸着させたものをそれぞれ用意し、5 μ s の粗視化シミュレーションを実行した。シミュレーションの結果、melittin 10 分子系では melittin による細孔形成は観測されなかった。melittin の POPC 膜に対する細孔形成に必要な P/L は 1/64 であり、melittin 10 分子系の P/L は 1/100 であるため実験と矛盾しない結果となった。P/L が 1/51 である melittin 20 分子系では細孔形成が生じ、こちらも実験と矛盾しない結果となった。この系で形成された細孔は toroidal であり、細孔形成時に 6 分子の melittin の N 末端が集合する局所構造が観測された。これより、toroidal モードを経由する細孔形成過程では melittin の N 末端が集合した局所構造を起因とした collective pore formation が発現されることがわかった。melittin 30 分子系(P/L=1/34)と 40 分子系(P/L=1/26)では、melittin の吸着した膜側の脂質が melittin により引き抜かれる現象が発現した。この現象が生じる領域には 3~4 分子の melittin の C 末端が交差した局所構造が形成されていた。細孔形成モードとして実験で提案されている carpet モードでは、脂質のミセル化により抗菌ペプチドが吸着した脂質膜の体積の現象が観測されている。本研究で観測された脂質が引き抜かれた現象は、脂質膜の体積現象とミセル化を引き起こしており、分子論的な詳細が不明だった carpet モードに相当していると推測する。また、P/L=1/26 のより大きな脂質膜系で melittin のシミュレーションを行った結果、toroidal モードと carpet モードに相当する現象に加えて、形成された細孔の大きさが非常に速く成長する現象 bursting が観測されたが、それぞれの現象は melittin の局所的な配置、配向と膜表面における濃度によって説明できることが示唆された。

【結論と今後の展望】

本研究により、細孔形成過程は複数の melittin が集合することにより生じる collective pore formation によって引き起こされることが定量的に示された。melittin の細孔形成過程は 3 種類に分類され、それぞれ分子論的に説明可能であることが示唆された。また、どの細孔形成モードにおいても、melittin の膜表面における濃度と局所的な配置により競争的に決まっていることがわかった。これらにより、現在に至るまで未解明だった最高刑背過程の分子機構による分類と発現に重要な因子が明らかとなった。

本研究で開発した pSPICA は高精度な粗視化分子力場であるため、抗菌ペプチドの膜選択制の議論や抗菌ペプチドの自己集合自由エネルギーの計算、脂質種による細孔形成過程への影響などの更なる抗菌ペプチド系に関する計算機実験に留まらず、様々な生体分子系での活躍が期待できる。