脂質膜の構造安定性と透過性の分子動力学 シミュレーションによる予測

篠田 渉

産業技術総合研究所計算科学研究部門 〒305-8568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2

Molecular Dynamics Study on Stability and Permeability of Lipid Membranes

Wataru Shinoda

Research Institute for Computational Sciences, National Institute of Advanced Industrial Science and
Technology, Central 2, Umezono 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8568, Japan

A slight structural change in lipid molecules sometimes produces dramatic changes in the membrane properties such as structural stability and solute permeability. For example, archaeal lipids bearing ether-linked, highly branched hydrophobic chains form stabile bilayers with low permeability of ionic and nonionic solutes. Nowadays, it is possible to investigate the alteration of the membrane properties induced by a variation of the molecular structure of lipids by using molecular dynamics (MD) simulations. The approach will open a way to design a novel lipid, which should form a membrane with desirable physical properties on the purpose, based upon molecular simulations. In this review, we will introduce a few of our recent MD studies on the effect of chain branching and ether-linkage on the membrane properties.

Key words : archaeal lipid / structural stability / permeability / lipid membranes / ether-linkage / chain branching

1. はじめに

脂質膜の物理的な安定性や低分子やイオンの透過性は、膜を構成する脂質の分子構造に依存して大きく変化する。この事実は合成脂質分子を用い新しい機能性を持った脂質膜の創製に取り組む多くの研究を動機づけており、バイオリアクタ・センサなどのデバイスを構築しようとするバイオテ

クノロジー分野においても、近年、新規合成脂質を使用した材料開発が盛んに進められている¹⁾。苛酷な環境下（高温、低pH、高塩濃度など）で棲息する古細菌は高い安定性と低い透過性を持つ膜を有すると考えられており、この特性はデバイスへの応用における要求性能と符合する。そのため、近年、古細菌型合成脂質の開発がなされ、実際それらの膜が外部ストレスに対しても安定で、

プロトンなどに対して低透過性を示すことが示されている²⁾。古細菌膜構成脂質の分子構造は、1) 疎水鎖が多くメチル分岐を有し、2) 疎水鎖とグリセロールがエーテル結合によって結ばれ、しばしば 3) 極性基を2つ持つ膜貫通型の脂質分子が存在するという特徴を持つ。このような分子構造の特徴は、分子集合体である膜の安定性や透過性と、分子論的にどのような相関を持つのであろうか？その知見は合成脂質の分子設計において大変重要な情報である。分子構造をもとにモデルを組み立て、統計力学的に分子集合体物性を解析する分子シミュレーションは、これらの知見を与える最も有効な研究ツールの一つであろう。

脂質膜の分子シミュレーション、中でも分子動力学 (MD) シミュレーションが本格的に始められたのは90年代に入ってからであり、当初は DPPC 二重層膜を対象とした方法論的な研究が主流であった。脂質膜系のMDによる方法論的な枠組みの完成と原子間相互作用力場の改良、さらには汎用プログラムの普及やコンピュータ性能の向上によって、90年代後半から急速にアプリケーション研究が進み、現在では様々な分子構造を持つ脂質膜、イオンチャネルやポンプなどの膜タンパク質が介在する膜、コレステロールなどの添加物を含む膜の物性研究がMDシミュレーションによって報告されるまでになった³⁻⁵⁾。本稿では、最近、我々が取り組んでいる古細菌型脂質膜のMDシミュレーションを例とし、計算科学を用いてどのような膜物性の解析が可能なのかについて紹介したい。

2. 古細菌型脂質膜のMD計算

古細菌型脂質の分子構造の大きな特徴、①疎水鎖の分岐、②エーテル結合、という分子構造変化が膜物性に及ぼす影響をそれぞれ調べるため、我々はまず極性基がホスホコリン基であるリン脂質、ホスファチジルコリン (PC) を採用し、脂質膜の中で最も物性研究の進んでいるジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を参照脂質として選び、①分岐鎖を持つジフィタノイルPC

Fig. 1 Chemical structures of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC), and diphytanyl phosphatidylcholine (ether-DPhPC).

(DPhPC)、②さらにエーテル結合を持つジフィタニルPC (ether-DPhPC) を採用し (Fig. 1)、それぞれの脂質が水中で形成する脂質膜のMDシミュレーションにより、これらの脂質膜の物性を比較した。膜のMD計算における方法論的な解説は他に譲り^{6,7)}、ここでは用いた計算条件を簡単に述べる。各システムは脂質72分子及び水2,088分子で構成した。MD計算は温度・圧力一定条件で行い、温度は323K (DPPC, DPhPC)、298K (DPhPC, ether-DPhPC) で行い、圧力はいずれの場合も1気圧に設定した。1~3 nsの平衡化計算の後、10~25 nsの本計算をそれぞれのシステムで行い、構造や動的性質の解析を行った。

3. 脂質膜の物性変化

3.1 疎水鎖の分岐の影響

疎水鎖分岐の影響は、DPPCとDPhPC脂質二重層膜の物性の比較から調べた。Fig. 1から分かるように、DPhPCには3, 7, 11, 15の炭素の位置にメチル分岐があり、その分岐によって主鎖の二面角の状態に変化がもたらされる。直鎖のDPPCの場合、その液晶相では疎水鎖中に*gauche*構造の二面角が25-36%程度現れることが実験からもMDからも報告されている^{8,9)}。分岐鎖の場合はメチル分岐の隣接二面角がほぼ50%近い*gauche*構造を持つ。これはメチル分岐の立体障害によって*trans*構造

Fig. 2 Typical snapshot of the lipid membrane patches. Taken from Ref.10).

の*gauche*構造に対するエネルギー的な優位性が小さくなり、熱ゆらぎによって容易に*gauche*構造に転移するためである。主鎖に*gauche*構造が存在すると、その位置で鎖は折れ曲がる。つまりDPhPCの疎水鎖は分岐炭素の位置で特異的に折れ曲がり構造を持つ¹⁰⁾。このコンフォメーション変化が様々な物性変化の起源となっている。

DPPCなどの直鎖型脂質膜では、膜面内での隣接疎水鎖間の配向の相関が強く、遠方の疎水鎖に比べ近接疎水鎖と、より平行に並ぶ傾向を持つ。これに対し分岐鎖を持つDPhPCでは、先述の疎水鎖の折れ曲がり構造のため、近接疎水鎖の平行配列が困難となり、脂質鎖のパッキングが大きく変化する¹¹⁾。Fig. 2に各脂質膜の断片を切り出したスナップショットを示す。図からDPPCでは特に1分子内の2本の疎水鎖が平行に並ぶのに対し、DPhPCでは隣接脂質の疎水鎖が2本の疎水鎖の間に介在するような構造が多く見られることがわかる。このような分子間の疎水鎖同士の交差は、脂質膜の構造的な安定性をもたらす原因であり、また疎水鎖の運動性を低下させている。実際に疎水鎖内二面角の*gauche-trans*異性化運動、疎水鎖の振り子運動 (wobbling in a cone) を観測すると、分岐鎖におけるそれらの時定数はそれぞれ約5倍、2倍と長くなっていることがわかった¹⁰⁾。さらに、DPhPC脂質の側方拡散や回転運動なども2-3倍程度、直鎖のDPPCに比べ遅くなっていることがわかった¹¹⁾ (Table 1)。これらの計算値は実験値とおおよそ一致しているが、しばしば無視できない誤差が見られる。その理由として、計算ではモデル

Table 1 Lateral diffusion coefficient, D [$\times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$], rotational relaxation time, τ^{rot} [ns], and relaxation times of the wobbling motion of the hydrophobic chain, τ^{wobbling} [ns], and of the PN vector in the headgroup, τ^{PN} [ns].

	DPPC	DPhPC
D_{cal}	35.3 $\pm$ 0.6	13.7 $\pm$ 0.5
$D_{\text{exp}}^{\text{a}}$	20.7 $\pm$ 2.8	18.1 $\pm$ 5.6 ^b
τ^{rot}	4.8 $\pm$ 1.2	10.2 $\pm$ 2.5
$\tau_{\text{cal}}^{\text{wobbling}}$	1.7 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.3
$\tau_{\text{exp}}^{\text{wobbling}^{\text{a}}}$	1.79 $\pm$ 0.91	2.27 $\pm$ 1.14 ^b
τ^{PN}	0.53 $\pm$ 0.1	0.45 $\pm$ 0.1

^a The experimental data are taken from 2).

^b The data were obtained for egg yolk phosphatidylcholine bilayers.

の精度や統計誤差が考えられ、また実験における蛍光プローブ使用に由来する誤差などが影響する。しかし、ここでの結果は定性的な議論においては十分な精度を持つものと考えられる。疎水鎖の分岐によってDPhPCの運動性がすべて下がる訳ではなく例外がある。それは極性基の回転運動である。PC分子内のリン酸基 (P) からコリン四級アミノ基 (N) にかけて大きな双極子があるが、そのPN双極子の回転運動を調べると、DPhPCの方がやや短い回転緩和時間を示した (Table 1)¹¹⁾。分岐の存在による一連の運動性の変化は、脂質膜にコレステロールを添加した際の変化と類似している。コレステロールを脂質膜に添加すると、脂質膜の秩序度が高くなり運動性を下げるが、極性基の運動だけはやや促進される。その原因はコレステロール添加によって膜内の脂質間距離が大きくなり、極性基間の双極子-双極子相互作用が低下するためである^{12, 13)}。分岐鎖のDPhPCにおいても、膜面積はDPPCに比べ15%程度大きく (DPPC: 62 Å², DPhPC: 77 Å²)、同様の議論が成

り立つ。

次に膜中の物質透過に関する解析について述べる。親水性分子、例えば水分子が脂質膜を横切る透過現象は、分子レベルでは非常に稀にしか起こらない事象であるため、現在の限界である10～100 nsのMD計算では、直接その現象を捉えることは困難である。しかし、そのような現象に関係する物理量、ここでは透過係数、を計算する手法はすでに開発されている。Marrinkらによると¹⁶⁾、透過が拡散律速において起こると仮定すると、透過係数 (P) が次式によって算出される。

$$1/P = \int_{z_1}^{z_2} \frac{\exp(\Delta G(z)/kT)}{D_z(z)} dz \quad (1)$$

この式では膜透過における自由エネルギー変化 ΔG および透過分子の拡散係数 D_z の計算が必要である。 k はボルツマン定数、 T は絶対温度、 z は膜面垂直軸で、積分の端点は膜の中と外にそれぞれ取る。自由エネルギー ΔG は、分子シミュレーションによって得られる最も重要な物理量の一つで、一般に計算が容易でなく、これまで様々なサンプリング手法が開発されている¹⁴⁾。各手法は原理的には同じ自由エネルギーを計算するものであるが、対象によって各アルゴリズムの計算値の収束性や計算効率は大きく異なる。ここでは、空隙に対してのみサンプリングする粒子挿入法 (Cavity insertion method)¹⁵⁾、存在確率分布法 (Probability ratio method)¹⁶⁾、及び熱力学的積分法 (Thermodynamic integration) の組み合わせによって、効率的かつ高精度で求められた水分子の膜を横切る自由エネルギープロフィールを Fig. 3a に与える。この場合、水相を自由エネルギー計算 (計算されるのは自由エネルギー差である) の原点にとっており、脂質膜内部で水分子の熱力学的な安定性が低くなることがわかる。DPPC 及び DPhPC 膜いずれの場合も、水分子に対して膜内部におよそ 6 kcal/mol 程度の自由エネルギーバリアを示した。両者の差はほとんど統計誤差内ではないが、透過が遅いと考えられている DPhPC 膜の方がむしろ、ややバリアが低いとい

Fig. 3 Free energy profiles of water molecule along the bilayer normal, z . (a) DPPC and DPhPC bilayers at 323K. (b) ether- and ester-DPhPC at 298K. The origin of the z -axis was taken at the bilayer center.

う予測に反する結果となった。結局、DPhPCにおける水の透過係数の低下は、膜中での水分子の易動度の低下が原因であることがわかり、水分子の局所拡散係数 D_z を計算し、(1) 式を用いて透過係数を計算すると、DPPC膜で約 1.6×10^{-2} cm/s, DPhPC膜で約 1.1×10^{-2} cm/sとなり、疎水鎖分岐によって水の透過係数が3割程度低下することが予測された¹⁷⁾。実験データは数多く存在するが、透過係数の値は実験条件の詳細に非常に敏感で定量的な議論が難しく $10^{-2} \sim 10^{-4}$ cm/s の範囲で報告されている¹⁸⁾。水の透過係数を同じ条件で調べた研究例として、直鎖脂質からなる大腸菌膜とDPhPC膜では透過係数がそれぞれ 4.9×10^{-3} cm/s, 4.29×10^{-3} cm/sとなり、分岐によって透過係数が約2割下がるのが観測されており¹⁹⁾、MD計算の値と定性的な変化量はおおよそ一致している。

上で透過係数の計算を行ったが、透過現象のメ

Fig. 4 Cavity distribution in the lipid bilayers averaged over 1.5 ns MD trajectories. The isosurface shows the probability of cavity formation at a level of 0.15. As a guide for the eye, a snapshot of the DPPC system is also drawn with the same box size.

カニズムについての情報はほとんど得られていない。得られている原子座標から何かヒントをつかむことができないであろうか？水分子の易動度や疎水性鎖の運動性の解析から、それらの間の時定数は少なくとも1桁違うことが分かってきた。例えばバルク水中の隣接水分子の交換は疎水鎖の二面角異性化速度に比べて1桁以上も短い時間で起こる。このことから水分子が膜中を横切の際には、脂質分子はほとんど止まっているように見え、脂質膜中にできた空隙に沿って水分子が移動するという推測が成り立つであろう。この仮定に基づき膜中の空隙分布を調べた。その結果、Fig. 4に見られるように、DPPCでは膜中央のスリッパ面を中心に大きな空隙分布が存在するのに対し、DPhPC膜では小さな空隙が離散的に分布していることが判明した。この差は定性的にしか意味を持たないが、DPhPC中を移動する水分子は空隙間をジャンプするような運動を示し、膜の垂直方向だけでなく側方への拡散も拘束を受けることが予測される。また、分布の差から水分子の膜内部での会合（クラスター化）も分岐によって制限されることも予測され、水分子間の水素結合網をプロトンが透過するというプロトンワイヤー仮説²⁰⁾に基づく、プロトンの透過係数も脂質疎水鎖の分岐によって大きく減少するはずであり、これは実験とよく対応する。水分子の脂質膜内部での運動については、実際に水分子を膜中に配置した初期構造からのMD計算を何度も繰り返し、水分子の膜内での運動を観測することで、上記の描像が

正しいことを支持する結果を得ている¹⁷⁾。

3.2 エーテル結合の影響

エステルをエーテルに置換することによって、実験からも示されているように、静電ポテンシャル（膜電位）が約半分程度まで低下した²¹⁾。またエステル基とエーテル基の比較では、前者が水分子とより強く会合することがわかり、ether-DPhPCではグリセロール付近への水分子の浸透が減少した。また、水分子の膜を横切る自由エネルギープロフィールにおいてもはっきりとした違いが見られた。ether-DPhPCはエステル型のDPhPCよりも膜内部で常に高い自由エネルギー障壁を示している（Fig. 3b）。エーテル/エステル結合が存在する領域はおおよそ $|z| = 14 \sim 15 \text{ \AA}$ であるが、膜疎水鎖領域にわたってエーテル型脂質膜がより高いエネルギー障壁を示した。これはカルボニル双極子の存在が膜中での水分子の静電的な安定性に寄与していることを示している。すなわち、エステルからエーテル結合に置換することによって、膜内部への水分子（また極性分子）の浸入はより阻害されるという結果が得られ、疎水鎖の分岐だけでなく、エーテル結合という古細菌脂質の構造の特徴は、膜の透過性の低下に重要な寄与をしていることが分かった。

4. おわりに

古細菌膜脂質の分子構造の特徴である疎水鎖の

分岐やエーテル結合による膜物性の変化を、MDシミュレーションによって解析した研究を紹介した。MD計算によって様々な情報を得る可能性を示したが、実験情報なしに、予測的にシミュレーションが使えることを示すには至っていない。しかし、これまでの経験上、定性的な物性変化の予測は可能であると考えており、現在、極性基を2つ持つテトラエーテル型脂質膜ではMDによる物性予測を実験に先駆けて行っている。しかしこれは分子シミュレーションが完成の域に達していることを決して意味せず、まだその適用範囲は限定的である。今後の発展には、定量性に向けてのモデルの精度向上やさらなる計算効率の向上が必要で、その適用可能性を広げ、予測技術としての価値を高める努力が要求される。ドラッグデザインの分野で行われているように、実際に新規脂質を合成する前にいくつか候補を精度よくスクリーニングすることが分子集合体設計においても近い将来現実のものとなると期待する。

謝 辞

本研究のほとんどは、産業技術総合研究所 三上益弘博士、馬場照彦博士、羽藤正勝博士、篠田恵子博士との共同研究であり、これらの方々に感謝したい。また本研究は、文部科学省 超高速コンピュータ網形成プロジェクト NAREGI ナノサイエンス実証研究 によってコンピュータリソース及び研究資金の援助を受けている。

文 献

- 馬場照彦：膜, **27** 303-309 (2002)
- Baba T, Minamikawa H, Hato M, Handa T : *Biophys. J.*, **81** 3377-3386 (2001)
- Scott HL : *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12** 495-502 (2002)
- Saiz L, Klein ML : *Acc. Chem. Res.*, **35** 482-489 (2002)
- Tieleman DP, Marrink SJ, Berendsen HJC : *Biochim. Biophys. Acta*, **1331** 235-270 (1997)
- 篠田 渉, 岡崎 進 : *Electrochemistry*, **68** 129-133 (2000)
- 岡崎 進 : 生体系のコンピュータ・シミュレーション, 化学同人, pp.168-177 (2002)
- Mendelsohn R, Davies MA, Brauner JW, Schuster HF, Dluhy RA : *Biochemistry*, **28** 8934-8939 (1989); Pink DA, Green TJ, Chapman D : *Biochemistry*, **19** 349-356 (1980); Seelig J, Seelig A : *Q. Rev. Biophys.*, **13** 19-61 (1980)
- Shinoda W, Namiki N, Okazaki S : *J. Chem. Phys.*, **106** 5731-5743 (1997)
- Shinoda W, Mikami M, Baba T, Hato M : *J. Phys. Chem. B*, **107** 14030-14035 (2003)
- Shinoda W, Mikami M, Baba T, Hato M : *Chem. Phys. Lett.*, **390** 35-40 (2004)
- Davis JH : *Biochim. Biophys. Acta*, **737** 117-171 (1983)
- Saito H, Arais T, Shirahama H, Koyama T : *J. Biochem.*, **109** 559-565 (1991)
- Frenkel D, Smit B : "Understanding of Molecular Simulation" 2nd. Ed., Academic Press, San Diego (2002)
- Jedlovsky P, Mezei M : *J. Am. Chem. Soc.*, **122** 5125-5131 (2000)
- Marrink SJ, Berendsen HJC : *J. Phys. Chem.*, **98** 4155 (1994)
- Shinoda W, Mikami M, Baba T, Hato M : *J. Phys. Chem. B*, **108** 9346-9356 (2004)
- Disalvo EA, Simon SA : "Permeability and Stability of Lipid Bilayers" CRC Press, Boca Raton, FL (1995)
- Mathai JC, Sprott GD, Zeidel ML : *J. Biol. Chem.*, **276** 27266 (2001)
- Nagle JF : *J. Bioenerg. Biomembr.*, **19** 413-426 (1987)
- Gawrisch K, Ruston D, Zimmerberg J, Parsegian VA, Rand RP, Fuller N : *Biophys. J.*, **61** 1213-1223 (1992)
- Shinoda K, Shinoda W, Baba T, Mikami M : *J. Chem. Phys.* **121** 9648 (2004)

(受付2004年9月27日 掲載決定9月30日)

著者略歴

篠田 渉 (しのだ わたる)

1993年 同志社大学工学部卒業
1998年 東京工業大学総合理工学研究科博士課程修了
1998年 三菱化学株式会社入社
2000年 工業技術院 物質工学工

業技術研究所 入所
2001年4月1日 組織改編により 産業技術総合研究所 入所 現在 計算科学研究部門 在職中