

生体分子の混み合いが細胞膜上シグナル伝達過程に及ぼす影響の分子動力学法による考察

高本 怜¹, 西森 拓^{1,2}, 栗津 暁紀^{1,2}

広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻¹, 広島大学 RcMcD²

概要

細胞は自身のシグナル伝達系を通じて、外部環境の変化を認識できる。この過程はまず環境変化に応じて細胞膜を貫通している受容体が活性化し、それが膜上シグナルタンパク質を活性化することで開始する。近年、細胞質及び細胞膜上は様々な高分子で混み合っており、分子の排除体積効果はその生化学過程に対し様々な影響を及ぼす可能性が示されている。実際マウス網膜細胞において、細胞膜上の光受容体密度が高い野生型よりも、密度がその半分の変異型の方が、シグナル伝達速度が速い事が実験的に見出されている。そこで我々は、網膜細胞膜上のシグナル伝達過程の粗視化分子動力学モデルを構築し、分子の排除体積効果の影響を考察した。そして実験で示唆された通り、受容体の混雑がシグナル伝達の律速となることを見出した。

Analysis of molecular crowding effect on signal transduction process on cell membrane by molecular dynamics simulations

Rei Takamoto¹, Hiraku Nishimori^{1,2}, Akinori Awazu^{1,2}

Department of Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University¹

Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics, Hiroshima University²

Abstract

Cells can sense the environmental variations by their signal transduction processes. Such processes start with the activation of receptors and signaling protein on the cell membrane. Recent studies suggest that various macromolecules are crowded in the cell and their excluded volumes often affect several biochemical reactions. For example, a recent experiment of mouse retina cell suggest the signal transduction of wild-type cells with dense photoreceptors on the cell membrane is slower than that of the mutants with half of the density of photoreceptors. Then, we investigated the influences of the molecular crowding using a coarse-grained molecular model of signal transduction on the membrane of retina cell. By simulations, we found the crowding of receptors slow down the signal transduction as expected from the experiment.

1 研究の背景

生命の活動は、その最小単位であるミクロな細胞内の様々な生体高分子の相互作用に支えられている。そして近年、細胞内はそのような多数の高分子で非常に混雑している事が示唆されている。実際、典型的な

in vitro 実験における分子の体積濃度が 1-10mg/mL であるのに対して、細胞内における高分子の体積濃度は 50-400mg/mL 程度と見積もられている [1]。この'Molecular Crowding'によって、細胞内の分子の拡散や変形はその排除体積により強く抑制されると考えられる。近年このような空間的な制約が、分裂

促進因子活性化タンパク質キナーゼの processive なリン酸化 [2] や、タンパク質のフォールディング [3] の促進に寄与する可能性が報告されている。また格子ガスモデルを用いたシミュレーションから、細胞膜上のシグナルタンパク質が、混み合うことによって、シグナル伝達を通じてその伝達に効率的なタンパク質分布を自発的に形成する可能性も [4] 示唆されている。

更に、マウス網膜細胞の光応答に関するシグナル伝達について、以下の実験結果が報告されている [5]。マウス網膜桿体細胞では光子の補足を確実にするため、円盤膜上に約 10^9 個のロドプシンを配置している。このときロドプシンの膜に対する面占有率は約 27% となり、これほど密な配置は、シグナル伝達を担う他の分子の膜上拡散を制限し、逆にシグナル伝達を阻害してしまうのではと予想された。そこで2つあるロドプシン遺伝子の一方を破壊し、細胞膜上のロドプシン数を野生型の約半分 (面占有率は約 13.5%) に下げた、変異型のマウスを用いた実験がなされた [5]。その結果、変異型は野生型に対し、光に対する応答と回復が約 1.7 倍速くなる事が見出された。つまり実際に桿体細胞では、光受容タンパクであるロドプシンの細胞膜上での混み合いが、そのシグナル伝達自身の律速となっている可能性がある。

そこで本研究では、桿体細胞膜上の光シグナル伝達過程について粗視化分子動力学モデルを構築し、膜上分子動態をシミュレーションすることで、ロドプシン占有率とシグナル伝達速度の関係を考察する。

2 細胞膜上シグナル伝達系のモデル化

ロドプシンは膜貫通型の光受容体であり、G タンパク共役型受容体 (GPCR) の一種である。一般に GPCR から始まるシグナル伝達は、以下のように進行する。まず GPCR (以下 R) が、光や臭気のような細胞外からのシグナルにより活性化する。この活性化型 R (以下 R*) に細胞質側の細胞膜上にある GTP 結合型シグナルタンパク質 (以下 S) が結合すると、S は活性化型 S (以下 S*) となる。次いで細胞質と膜上を行き来するターゲットタンパク質 (以下 T) に S* が結合すると、T は活性化型 T (以下 T*) として膜から解離し、最終的に遺伝子調節まで繋がる細胞質中シグナル伝達系を活性化する。

そこで今回 GPCR シグナル伝達系のモデルを以

下のように構築する。まず活性化型及び不活性化型受容体 (R* と R)、活性化型及び不活性化型シグナルタンパク質 (S* と S)、膜に結合したターゲットタンパク質 (T と T*)、及び一連のシグナル伝達とは関係のない分子 (混み合い分子、以下 C) が、それぞれ細胞膜を模した 2 次元平面上を拡散し、対応する分子同士が衝突することにより、上記の活性化伝達が起こるとする。ここで各分子はそれぞれ有限の体積を持つ、質量 m 、半径 r の円であるとし、それらの排除体積による斥力相互作用の下、以下のランジュバン方程式

$$m \frac{d\mathbf{v}_i(t)}{dt} = -\mu \mathbf{v}_i(t) + \boldsymbol{\xi}_i(t) + \sum_j \mathbf{F}_{i,j}$$

$$\mathbf{F}_{i,j} = -k[|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j| - 2r] \frac{\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j}{|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j|}$$

に従って運動するものとする。ここで $\mu, \boldsymbol{\xi}_i(t)$ はそれぞれ、各分子にかかる動粘性抵抗係数、各分子にかかるランダム力を表す。ここで、 m, r, μ は分子の活性・不活性に関わらず一定であるとした。ただし R 及び R* は膜貫通型のため、他のタンパクに比べて遅い運動をすること、及び排除体積の影響が他のタンパクに比べて小さいことを考慮し、動粘性抵抗係数 μ が他の分子に比べて 100 倍大きく、R 同士もしくは R と他の分子間の斥力のバネ定数 k が、他の場合と比べ 5 倍小さいとした。

また各分子の活性化及び不活性化は、以下の規則に従って起こるとした (図 1)。

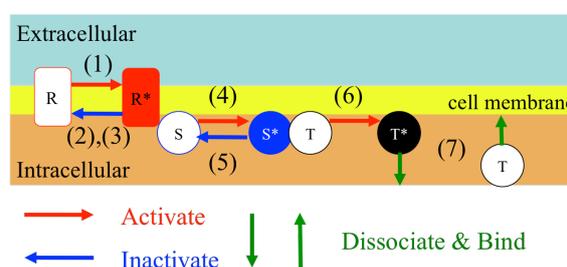
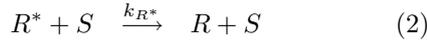


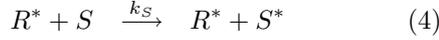
図 1: 本研究におけるシグナル伝達経路の模式図

(1) まず R は外部からの刺激により R* へ変化する (活性化)。(2) R は S と衝突することにより、反応確率 k_{R^*} で R に変化する (不活性化)。(3) また、

一定時間経過すると R へ変化する (不活性化)。



(4) S は R* と衝突することにより、反応確率 k_S で S* に変化する (活性化)。(5) S* は T と衝突することにより反応確率 k_{S^*} で S に変化する (不活性化)。



(6) T は S* と衝突することにより、反応確率 k_T で T* に変化 (活性化) し、(7) T* は活性化後すぐに膜から解離し、別の T が 2 次元空間上 (膜上) の空いている部分に結合するとする。



以下ではこれらの分子の反応・拡散過程を分子動力学法を用いてシミュレーションし、膜上 GPCR シグナル伝達系の挙動を考察する。そして R と T の活性化を仲介する S の活性化速度及び不活性化速度を見積もり、シグナル伝達の速さを評価する。

3 シミュレーション結果

前節で導入したモデルに基づき、野生型及び変異型のマウス桿体細胞膜上におけるシグナル伝達過程をシミュレーションする。ここで野生型、及び変異型の違いは、各分子の細胞膜上の面占有率の違いで表現する。具体的には実験 [5] に基づき、野生型及び変異型における受容体 (R 及び R*)、シグナルタンパク質 (S 及び S*)、ターゲットタンパク質 (T 及び T*)、混み合い分子 (C) の膜上での面占有率 $[R]$, $[S]$, $[T]$, $[C]$ をそれぞれ、野生型) $[R] = 0.282$, $[S] = 0.047$, $[T] = 0.047$, $[C] = 0.047$ 、変異型) $[R] = 0.141$, $[S] = 0.047$, $[T] = 0.047$, $[C] = 0.047$ と与えた。シミュレーションではまず非活性型の各分子 (R, S, T, C) を、周期境界条件を課した $[0, L] \times [0, L]$ の二次元正方形内にランダムに配置し、その平面上を運動するとした。そしてある時刻 (時刻 0) に、ある確率で R を R* に変化させ、その後の各分子の挙動を観察した。ここで、時刻 0 における総受容体数に対する R* の割合

($[R^* \text{ の個数}] / [R \text{ 及び } R^* \text{ の総数}]$) と実験における光の強度は、正の相関があると考えられる。そこで今回は、時刻 0 における R* の割合を実験における光強度を表すパラメーターと見做し、議論を進める。

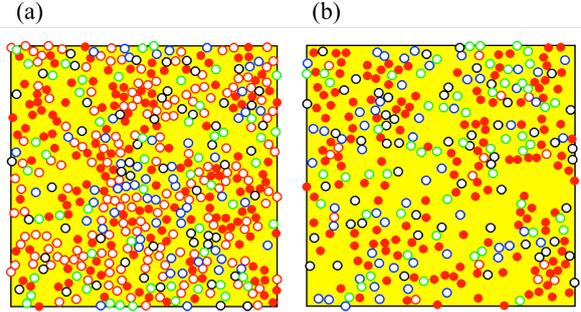


図 2: シミュレーションのスナップショット。(a): 野生型のモデル、(b): 変異型のモデル。分子の色は R:赤、S:青、T:黒、C:緑に対応

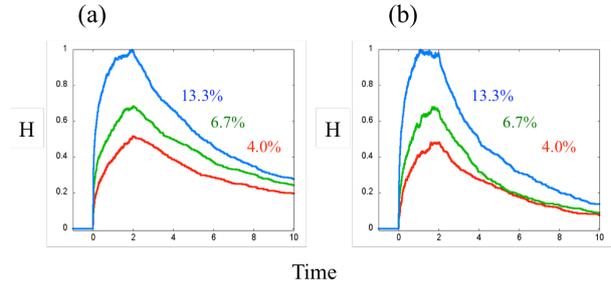


図 3: シミュレーション結果。(a): 野生型、(b): 変異型モデルにおける、 H の時間変化。各曲線の色は初期に活性化される受容体の割合 (R* の割合) を表し、青、緑、赤の順で、光が強いとしている。

図 2 は (a) 野生型 (b) 変異型モデルにおけるシミュレーションのスナップショットである。この図から、変異型に比べ野生型は分子が非常に混み合っており、各分子が互いにその移動を妨げ易くなっている事が分かる。

そして図 3 は (a) 野生型、(b) 変異型モデルのシミュレーションから得られた、[全体のシグナルタンパク質 (S 及び S*) に占める S* の割合] $\equiv H$ の時間変化を示したものである。ただしここでは実験 [5] と同様に、野生型、変異型それぞれについて、最も強い光が照射された場合で得られる H の最大値が 1 となるように、規格化している。このグラフ中の曲線の色の違いは、光強度に対応するパラメーター (時

刻0での R^* の割合) の違いを表している。また図4は実験 [5] において得られた、(a) 野生型、(b) 変異型マウス桿体細胞膜上における H の変化の概形である。

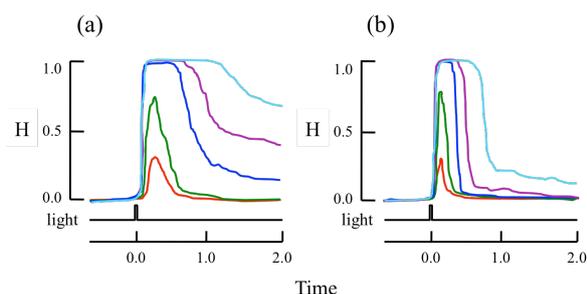


図4: 網膜細胞における光応答の速さの実験 ([5] を参照) から得られた、 H の時間変化。

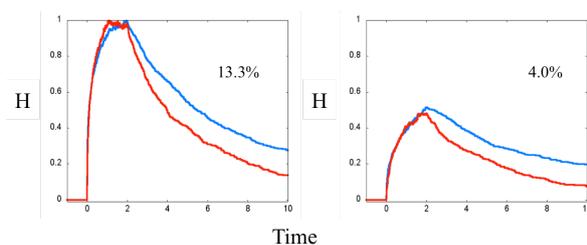


図5: シミュレーション結果。初期に活性化される受容体の割合 (R^* の割合) が等しい場合 (左:13.3%, 右:4.0%) における、 H の時間変化。青色:野生型、赤色:変異型

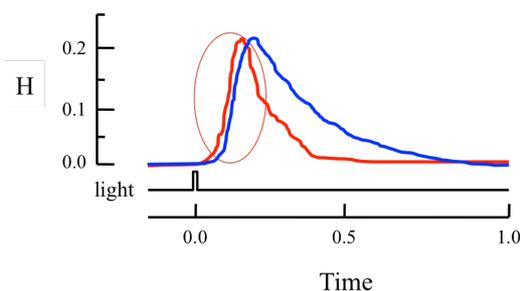


図6: 光の弱い時の実験 ([5] を参照) から得られた、 H の時間変化。青色:野生型、赤色:変異型

図5は、初期に活性化される受容体の割合 (R^* の割合) が等しい場合における、野生型、変異型モデルの H の時間変化を比較したものである。この図からまず H の増加は、変異型の方が野生型より若

干速い、もしくは同程度であるという結果が得られた。これについては、図6のように実験 [5] においても、変異型の方が野生型より H の増加がやや速くなる結果が得られている。また同時に H の減少についても、変異型の方が野生型に比べ顕著に速くなるという実験と同様の結果が得られた。

これらの結果から、シミュレーションの結果が実験の結果を定性的に再現していると考えられる。

4 まとめと今後の展望

本研究では、細胞膜上 GPCR シグナル伝達過程を模した粗視化分子動力学モデルを構築し、膜上における分子混み合いがシグナル伝達に及ぼす影響の考察、およびマウスの光受容シグナル伝達過程で得られている実験結果との比較を行った。今回、受容体分子の密度の高い野生型、及び低い変異型に対応する状況をシミュレーションし、野生型マウスの方が変異型マウスと比べ、シグナル伝達速度が遅くなるという、実験結果を定性的に再現する結果が得られた。このことから実際に、マウス細胞膜上における受容体分子の混み合いが、シグナル伝達過程の律速になる可能性が見出された。

今後は、各分子の物性パラメーターを現実の値と比較し、定量的な議論を進めていく。

謝辞

本研究は文部科学省生命動態システム科学推進事業「核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点」の助成を受けたものです。

参考文献

- [1] A.B.Fulton, Cell 30 (1982) 345-347
- [2] K.Aoki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2011) 12675-12680
- [3] A.Kinjo et al., Phys. Rev. E 66 (2002) 051902
- [4] M.Fuji, H.Nishimori, and A.Awazu, PLOS ONE 8(2013) e62218
- [5] P.D.Calvert, et al., Nature 411 (2001) 90-94