

平成 27 年度 TSUBAME 産業利用トライアルユース 成果報告書

Steered Molecular Dynamics 法による高分子膜とタンパク質の相互作用解析
Analysis of interaction between protein and polymer membrane by Steered Molecular Dynamics simulation.

三枝 俊亮
Shunsuke Mieda

旭化成株式会社 基盤技術研究所
Analysis & Simulation Center, Asahi Kasei Corporation
<http://www.asahi-kasei.co.jp>

Steered Molecular Dynamics 法を用いて高分子膜に対するタンパク質の吸着の強さを評価した。高分子膜モデルとしてアモルファスの薄膜を用いた計算で、実測結果と合う計算結果が得られることがわかった。また、SMD の引っ張り速度やサンプリング回数を変えた計算を行い、計算条件の最適化を検討した。更に、高分子膜に対して平行な方向に SMD シミュレーションを行うことで、タンパク質の吸着方向による相互作用の違いを評価した。

We have performed a Steered Molecular Dynamics simulation for the prediction of polymer membrane-protein interaction. It was found that the amorphous polymer membrane was valid for a model. Moreover, we considered the various calculation conditions such the pulling velocity, the amount of sampling and the absorption direction of protein.

Keywords: Steered Molecular Dynamics, 高分子膜, タンパク質, ファウリング, MD シミュレーション

背景と目的

医療分野で幅広く使用されている透析膜は、セルロース系膜と合成高分子系膜の 2 種類に大別される。その中でも合成高分子系膜は生体適合性の向上が課題であり、当社でも研究開発が進められている。同時に、血液中のタンパク質による高分子系膜へのファウリングによる細孔の詰まりや、意図しない生体反応が開発課題となっている。より高品質の製品の設計・開発のためにも、ファウリング現象の分子レベルでの理解は必須となっている。しかし、AFM などの実測による高分子膜へのタンパク質の吸着性評価では、タンパク質の方向による吸着性の差異評価や、タンパク質のどの部位が吸着へ大きく寄与するかなど、原子レベルの詳細な解析を行うことは難しい。

そこで、当社ではファウリングを抑制するための、高分子の設計・解析手法のひとつとして計算機シミュレーションに注目している。しかし、タンパク質の吸着を評価するシミュレーションはこれまでも広く行われてきたが、無機結晶固体表面など「固い」材料への吸着が主であり、高分子膜などの「柔らかい」材料への吸着評価は大幅な近似を適用ものしか行われていない。このため、

「柔らかい」材料への吸着を評価できる手法の検討を行うことを目的とした。

本研究では Steered Molecular Dynamics 法(SMD)を用いてタンパク質—高分子膜間の吸着の強さを評価した。SMD は高分子膜に吸着したタンパク質を引きはがし、その力の強さから自由エネルギーを計算する手法であり、AFM の測定結果と比較可能である。SMD の試行回数による結果の違いや、高分子の種類による吸着力を計算し、実測結果と比較することで SMD 計算の条件による精度の評価を行った。

概要

本研究では高分子膜としてアモルファスの薄膜を用いた(図1)。

図1のモデルを初期構造とし、SMD 法を用いて脱離過程における Potential Mean Force(PMF)を計算したところ、実験結果を概ね再現できる結果が得られた。SMD の引っ張り速度を複数検討し、最大で 36 回のサンプリングを試行して誤差を評価した。なお、タンパク質は高分子膜に対して垂直の方向への引っ張りを行った。

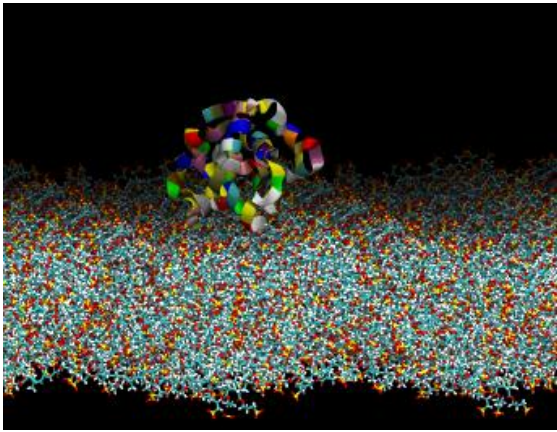


図1: アモルファスの高分子薄膜とタンパク質モデル。

その結果、 3.5 \AA/ns の引っ張り速度で SMD シミュレーションを行えば、少ない試行回数であっても定量的な比較が可能であることが分かった。また、タンパク質の吸着方向による相互作用の違いは、吸着したタンパク質を高分子膜に対して平行方向の SMD シミュレーションを行うことによって評価することが出来た。

結果および考察

タンパク質として Lysozyme (PDB ID: 3WUM) を使用し、高分子膜として 2-Methacryloyloxyethyl-phosphorylcholine (MPC)、2-Trimethylammonium-methylmethacrylatechloride (TMAEMA)、3-sulfopropylmethacrylate potassium salt (SPMA)、n-Butyl methacrylate (BMA) を用いた。BMA のみ疎水性ポリマーであり、MPC, TMAEMA, SPMA はいずれも親水性ポリマーである。シミュレーション中での溶解を防ぐために、一部の原子の座標を固定した。また、シミュレーションソフトウェアとしては NAMD を用いた。

GPU を用いて計算した時の影響を評価するために、GPU を使用しない場合と使用した場合のそれぞれで Lysozyme の RMSD の計算を行った。RMSD 計算の際には分子力場としては CHARMM、AMBER の 2 通りを用いた(図2)。いずれの力場でも GPU の有無によって RMSD はほぼ変化しないことがわかった。ただし、若干の違いはみられるため、より長いシミュレーションなどでは誤差が蓄積する可能性もあると考えられる。また、AMBER 力場の方が GPU の有無による差は少ない傾向にあった。

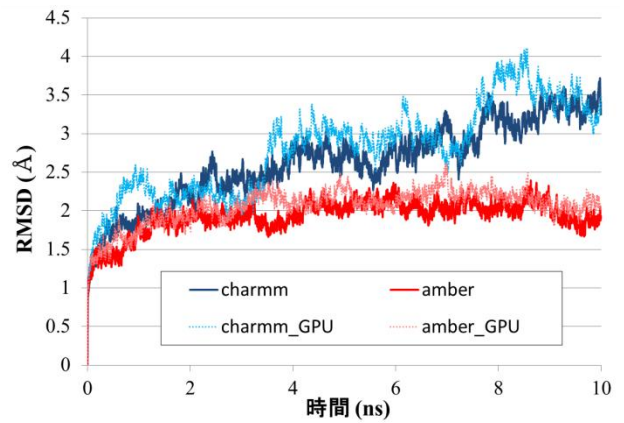


図2: GPU の有無による Lysozyme の RMSD の違い

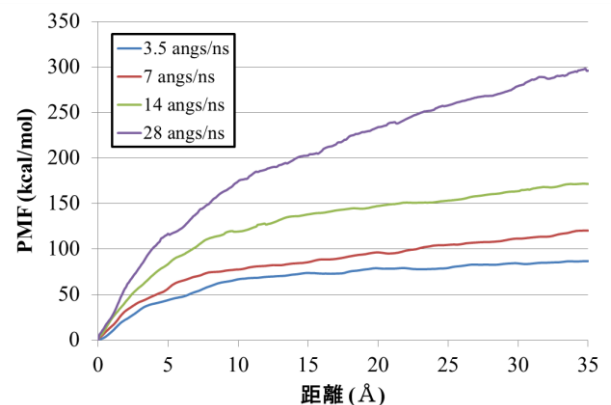


図3: 引っ張り速度による PMF の違い

次に、SMD シミュレーションの引っ張り速度による PMF の比較を行った。図3では SPMA 膜を使用した結果であり、いずれもサンプリング 36 回のアンサンブル平均の結果を示している。グラフの横軸はタンパク質の中心座標の初期位置からの距離である。引っ張り速度が速いほど吸着の PMF を高く評価することが分かった。また、引っ張り速度が速い場合は溶媒の水からの影響を強く受けるため、高分子膜から十分離れた位置においても PMF は収束していない。このことから、引っ張り速度は 3.5 \AA/ns とする必要があると考えられる。

サンプリング回数による誤差評価、および高分子膜の種類による吸着力の違いを図4に示す。図4におけるエラーバーは標準誤差である。5 回程程度のサンプリングでも半定量的な結果が得られており、36 回以上のサンプリングでほぼ定量的な議論が出来るようになることが分かった。

親水性ポリマーの吸着の強さは SPMA が最も強く、TMAEMA が最も弱い。これは AFM による実測結果

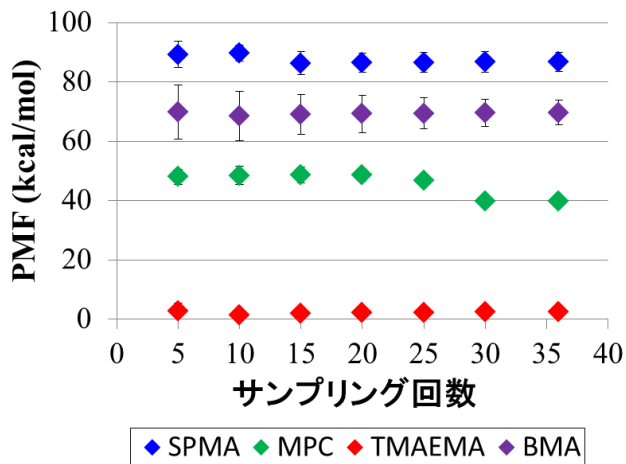


図4: サンプル回数による誤差評価、および高分子膜の種類による吸着力の違い

とも合致した傾向であった[1]。一方、疎水性ポリマーであるBMAはSPMAよりも低いPMFであり、AFMの結果と一致しない。これは今回行ったシミュレーションがアモルファス膜を使用したものである一方、AFMによる実測結果はブラシポリマーによる評価であるためだと考えられる。このように、親水性ポリマーと疎水性ポリマーの比較はモデルを更に検討する必要があるが、親水性ポリマー同士の比較は現時点でも可能であるといえる。

タンパク質の吸着方向による高分子膜との相互作用の違いは、膜に吸着させたタンパク質を膜に対して平行な方向に引っ張り、各点で相互作用エネルギーを計算して評価した(図5, 6)。図5に示した通り、SPMA膜のような吸着力の強い高分子膜であれば、平行方向に引っ張ることでタンパク質は膜に吸着したまま回転することが分かった。この時の各点における相互作用エネルギー計算することで、タンパク質がどの方向で吸着しやすいかを評価することが可能である。図6にタンパク質の吸着方向による高分子膜との相互作用エネルギーの違いを示す。最初の吸着位置におけるタンパク質の中心位置を0とし、引っ張った距離を横軸とした。吸着方向によって相互作用エネルギーが大きく異なるため、吸着の強さを評価する際にはタンパク質の方向も重要であることが分かった。

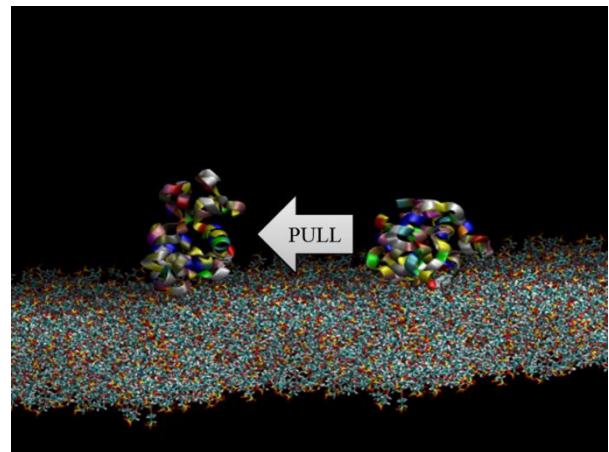


図5: 高分子膜に対して平行方向へのSMD

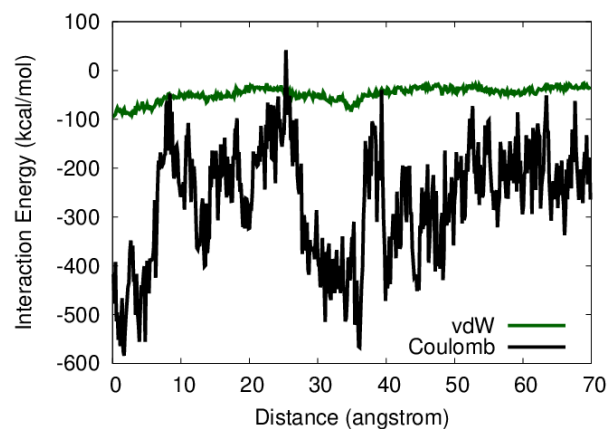


図6: タンパク質の吸着方向による高分子膜との相互作用エネルギーの違い

まとめ、今後の課題

SMD法を用いてタンパク質の高分子膜への吸着の強さを評価した。引っ張り速度やサンプル回数など計算条件の検討を行った。高分子膜の種類を変えた計算も行い、測定結果とも合う結果が得られた。タンパク質の吸着方向による高分子膜との相互作用の違いを評価する方法についても提案を行った。

今後はアモルファスの膜モデルだけではなくブラシやコポリマーでの評価も行っていく予定である。

参考文献

[1] S. Sakata, Y. Inoue and K. Ishihara *Langmuir*, **31**, 3108–3114 (2015).