

3 ウィルスの全原子分子動力学シミュレーション

安藤嘉倫 岡崎 進

名古屋大学工学研究科化学・生物工学専攻

研究の背景

● ウィルスとは

ウィルスはカプシドと呼ばれる数種のタンパク質から構成される外殻と、カプシド殻に取り囲まれた核酸、さらにはときにはエンベロープと呼ばれるカプシドを外側から取り囲む脂質二重層膜から構成される¹⁾。ウィルスは球状・筒状等さまざまな形状をとり、その大きさも数10ナノメートルから最大1.5マイクロメートルほどに幅広く分布している。代表的な球状ウィルスを分類とともに図-1Aに示す。特にここで話題にするピコルナウィルス科のポリオウィルスは急性灰白髄炎（ポリオ）^{かいほうずいえん}の原因となるウィルスであり、エンベロープのない露出した直径30ナノメートルほどのカプシド殻内部に一本鎖RNAを含有した球形のウィルスである。

一般にウィルスは図-1Bに示すようなライフサイクルを持つ。ウィルスは細胞膜表面に露出した受容体と特異的に結合したのち、エンドサイトーシスを経て細胞内に侵入し核酸を細胞内部に放出する。ファージなどエンドサイトーシスを経ず細胞膜に穴を開け直接核酸を細胞内へ放出するウィルスも存在する。放出された核酸は細胞核へ到達後宿主細胞のタンパク合成機構を利用して核酸の複製および個々のカプシドタンパク質を大量に合成させる。これら部品は再び組み立てられ大量のウィルス粒子が再形成される。形成されたウィルス粒子はエキソサイトーシスにより外部に放出され次の宿主細胞へと拡散していく。核酸の複製およびカプシドタンパク質の大量合成は細胞に大きなダメージを与える。またウィルスが放出されるときにはしばしば細胞膜が破壊さ

れる。このようにしてその構成細胞が多数破壊された生体組織はその機能を失い病気の発現へとつながる。ウィルスには単独で自身の子孫を残す能力はないものの、宿主細胞の機能を借りて自身を大量に複製する能力を持つ。この意味でウィルスは物質と生物の境界であると見なされている。

● ウィルスの分子構造

カプシドの分子構造はX線構造解析およびクライオ電子顕微鏡観察によって原子スケールから明らかとなっている¹⁾。多くのカプシドは数種類のカプシドタンパクからなる「サブユニット」と呼ばれるドメインを基本構成要素とした二十面体対称性を持った構造をとっている（図-2）。ポリオウィルスの場合VP1～VP4の4つのカプシドタンパク質が1つのサブユニットを構成し、このサブユニットが3つ集まった三角形の部品が20個集まることで1個のカプシドを構成している。一般にカプシドがこのような対称性の高い構造をとるのは、カプシド内部の微小空間には限られた塩基数の核酸しか格納できないという制約のもと、効率よく自身（核酸およびカプシドタンパク質）の複製を繰り返すことを目的に遺伝子情報が最適化されたためと考えられている。なおポリオウィルスの各サブユニットにはポケットファクターと呼ばれる脂質分子が1つ埋まっているが、脱殻時に外れるということ以外その役割はよく分かっていない。

一方、内部の核酸の構造については密かつ規則的にパックされた二重鎖DNAウィルスに限りその詳細が分かっている。対してポリオウィルスのような一本鎖RNAウィルスについては、カプシド内

部の核酸のパッキングが比較的疎かつ不規則であるためにその詳細は明らかにされていない。カプシドの内側に接地したRNAの断片のみ辛うじて構造が分かっている。そのため我々は核酸を含まない「エンペティカプシド」を計算対象としている。残るエンベロープについては細胞膜と同様にその不規則な構造および膜の流動性から構造の詳細はほとんど分かっていない。

● ウィルスに関する研究

ある種のウィルスにおいては、エンペティカプシドであっても生理電解質水溶液中において安定に存在しかつ感染能力を保持し得る。

そのためエンペティカプシドは物理化学的な基礎研究、たとえばカプシドタンパク質自己会合過程の熱力学的考察、カプシドの静電気学理論、およびカプシドのヤング率測定の対象となってきた。さらに最近ウィルスカプシドはドラッグデリバリーの輸送体、ナノ蓄電体、および薄膜センサなどへの広い応用の可能性が見出されている。病気の原因としてマイナスのイメージであったウィルスはいまや最新のナノテクノロジー研究の中心的役割を果たすと期待されている。

一方、近年の計算機能力の増大はカプシドを分子動力学 (MD) 法に基づく計算機シミュレーションにより扱うことを可能にしてきた。当初はカプシド

の二十面体対称性を利用しつつ回転対称周期境界条件下でのカプシド断片のみを扱う計算であった。2000年代の後半にサテライトタバコモザイクウィルスを対象に初めてカプシド全体を扱ったMD計算が行われた (計算長数ナノ秒)。その後計算長は数10ナノ秒に伸び、得られた原子座標の時間発展を解析することによりエンペティカプシド集団運動モードの解析、カプシドの外圧による弾性変形および座屈転移についての研究が行われてきた。それら研究の目的は弾性モデルの観点からカプシドの力学特性を調べることにあった。しかしこれらの研究ではMD計算時間の短さもあり、エンペティカプシドが十分熱平衡状態に達した状態で解析を行えてい

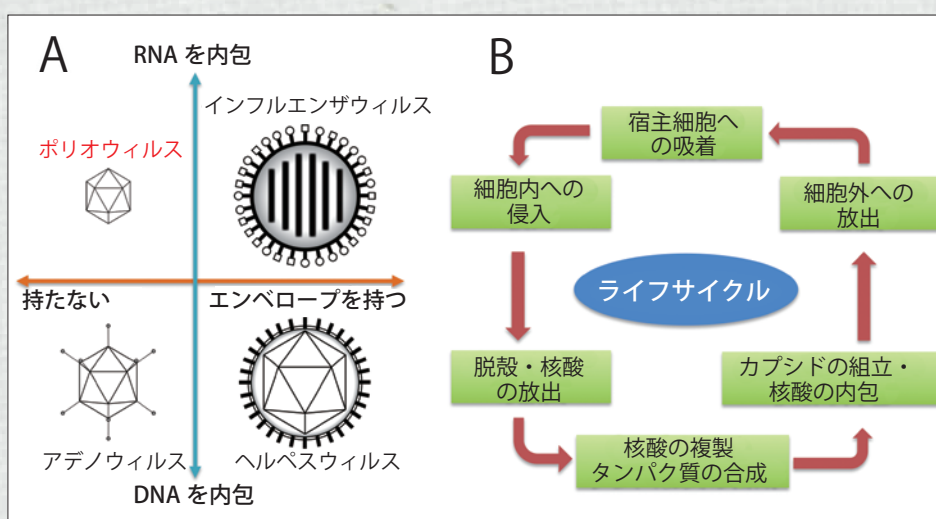


図-1 球状ウィルスの分類と代表例 (A) およびウィルスのライフサイクル (B)

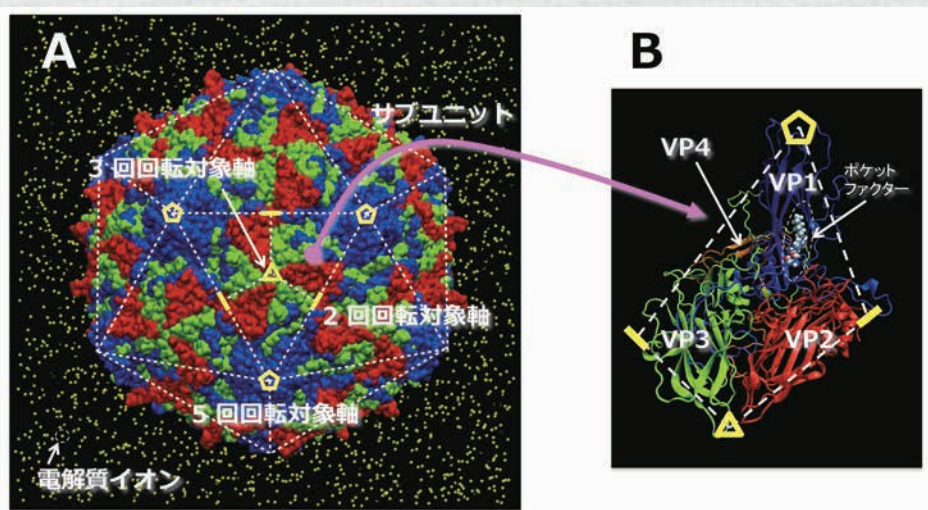


図-2 リン酸緩衝生理食塩水中でのポリオウィルス全体像 (A) およびサブユニット (B)。サブユニットは4つのカプシドタンパク質VP1～VP4から構成される。VP4はカプシド裏側に張り付いている

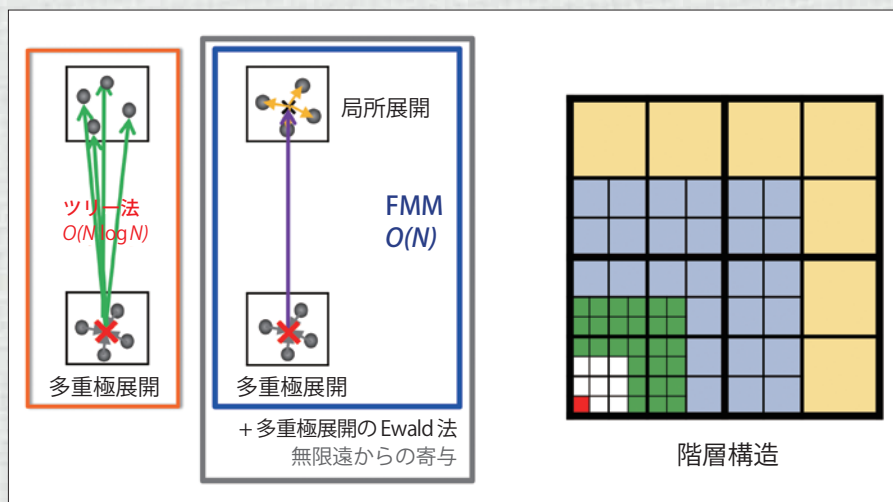


図-3 高速多重極展開法 (FMM)³⁾ の概念図。ツリー法では相互作用元を多重極展開するにとどめているのに対し FMM では被相互作用点についても局所展開する。FMM では右図のように計算対象の基本セルを階層的に分割する。被相互作用原子の含まれたセル (赤) とその近傍セル (白) 内原子との相互作用は粒子対計算で、遠方セル (緑、青、黄) 内原子との相互作用は多重極展開および局所展開によって評価する

るとは言いがたい。さらには、我々の研究でテーマとするカプシドという自己集合体が水溶液中で安定に存在するメカニズムについての議論はほとんど行われてこなかった。

この問題を克服するために当グループでは「京」コンピュータの性能を十分に発揮できる高並列対応汎用分子動力学計算ソフトウェア MODYLAS^{☆1)}の開発を進めてきた²⁾。

汎用分子動力学計算ソフトウェア MODYLAS の開発

ウィルスのような巨大生体分子系を計算するための MD ソフトウェアはさまざまな要件—分子間および分子内相互作用を取り扱えること、統計力学に沿った温度・圧力制御を行えること、運動方程式の数値積分を精度よく行えること、周期境界条件に対応していること、および計算速度を向上させるための高 MPI 並列に対応していること等—を満たす必要がある。

特に分子間相互作用の 1 つである静電相互作用は原子間距離の -1 乗に比例した遠距離力の一種であり、タンパク質構造の維持、タンパク質間相互作用の正しい評価、タンパク質まわりのカウンターイオン分布の再現のためには、無限遠からの静電的寄与

をきちんと含めた計算が必要である。しかし遠方の寄与を計算するためには遠方のプロセスの保持する情報が必要であり、それに関する通信は高 MPI 並列化を阻む要因たり得る。静電相互作用を計算するための方法として現在主流となっている Particle Mesh Ewald (PME) 法では内部で高速フーリエ変換 (FFT) を利用しているためにプロセス数の増加とともに FFT 内部の全対全通信^{☆2)}が支配的になる。ゆえに「京」のような数万ノード規模での実行の際には PME 法では高効率での並列化計算が達成できないことが予想された。

これを回避するため MODYLAS では周期境界条件下での高速多重極展開法 (FMM)³⁾ による静電相互作用ルーチンを新たに実装した。FMM では近傍相手原子との相互作用は通常の粒子対計算の形で評価する一方、遠方原子からの寄与は分割された領域ごと多重極展開と局所展開によって評価する (図-3)。相互作用元の多重極展開のみを取り入れたツリー法が演算量 $O(N \log N)$ であるのに対し、被相互作用点での局所展開を取り入れた FMM は演算量が $O(N)$ であるという特徴を持つ。

さらに我々は「京」の性能を最大限引き出すためトラスネットワークに最適化した通信コードを製作した。一新したデータ構造によって通信の際のデータコピーを最小限にとどめることで「京」コンピュータのフルノード規模においても高 MPI 並列

☆1) Molecular Dynamics simulation software for LArge System の略。
www.modylas.org においてコード公開。

☆2) すべての計算機の間で互いの情報をやりとりする通信。

性能を維持する MD 計算コードを開発した。「京」65,536 ノードを用いたベンチマークテストにおいて1,000 万原子系を1 ステップあたり5 ミリ秒程度で計算できることを確認した²⁾。「京」コンピュータと MODYLAS を使うことによってポリオウィルスの全原子 MD 計算を100 ナノ秒のオーダーで行うことが可能になった。

「京」を用いたポリオウィルスの分子動力学計算

● 初期配置と計算の内容

MD 計算では、初期条件として系に含まれる全原子の座標および速度が必要である。今回の目的—電解質水溶液中でのポリオウィルスエンベロップシドの熱平衡状態での安定性を議論—に沿えば、VP1～VP4のカプシドタンパク質60個をあらかじめカプシドの形成にならべておき電解質水溶液をその周囲に配した配置が初期条件として適切である。そこで以下の手順で初期座標を作成した。

ポリオウィルスカプシドの初期座標には0.22 ナノメートルの高分解能でX線結晶構造解析により決定されたサブユニット構造(PDB ID 番号: 1HXS⁴⁾)を用いた。カプシド構造の回転対称性を考慮した上でこの1サブユニットを60個複製しカプシドを構築した。結晶構造解析実験は極低温で行われており、生体温度37℃中での熱膨張を考慮してカプシドを動径方向に約3% 拡張させた。これを一辺約40 ナノメートルの立方体基本セルの中央に設置した。その上でカプシドの内外に水分子を配置し、中性pH条件下においてポリオウィルスカプシドの持つ正味の負電荷(−240e, ここでeは素電荷)に対するカウンターイオンNa⁺を殻内外水相に設置した。さらに実験⁴⁾でのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)濃度となるようNa⁺, K⁺, Cl[−]イオンを設置した。総原子数は6,480,326個となった。

タンパク質およびイオンの分子内および分子間相

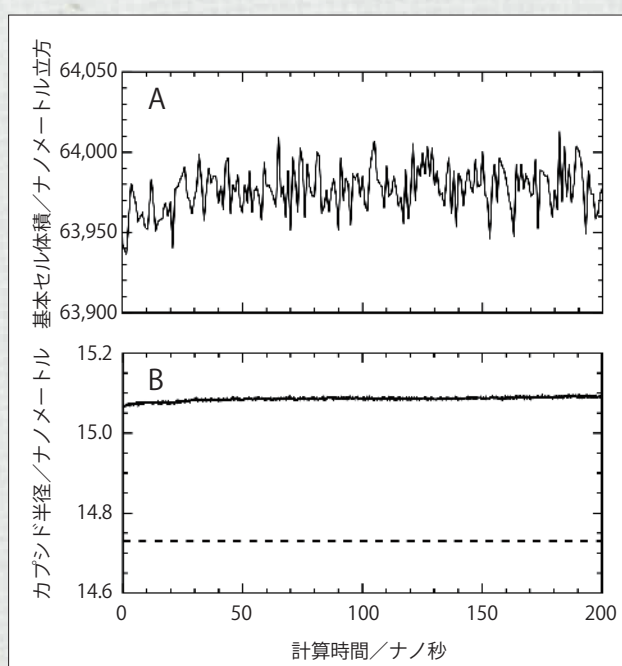


図-4 MD 計算による基本セル体積 (A) およびカプシド半径 (B) の時間変化. B における破線は結晶構造⁴⁾での半径14.73 ナノメートル

互作用力場には全原子モデルのCHARMM^{☆3)}, 水分子にはTIP3P剛体モデル^{☆4)}を用いた。初期座標の構造最適化ののち適切な初期速度(初期温度)を与え、系の温度を徐々に37℃へと昇温させた。さらに、温度・圧力一定(37℃, 1気圧)条件のもとMD計算を200ナノ秒行った。

● 系の熱平衡化

上記のように細心の注意を払って作成した初期座標であっても、タンパク質同士の接触面およびタンパク-水の界面構造、カプシド内外での水分子数比、および周囲のカウンターイオン分布が不自然なものとなっている。温度・圧力一定条件下において十分長いMD計算を行うことにより系の構造は自発的に緩和され初期座標に依存しない熱平衡状態に至る。

ではどの程度計算すれば熱平衡状態に至ったと判断できるのであろうか。図-4Aには温度・圧力一定条件に切り替えて以降の基本セル体積の時間変化、図-4Bにはカプシド半径の時間変化を示した。両者

☆3 M. Karplus らによって開発されたタンパク質系の原子力場。ほかタンパク質系の原子力場にはAMBERがある。

☆4 水分子の酸素および水素原子2つをあらわに扱いかつ幾何形状の固定された剛体として扱うモデル。

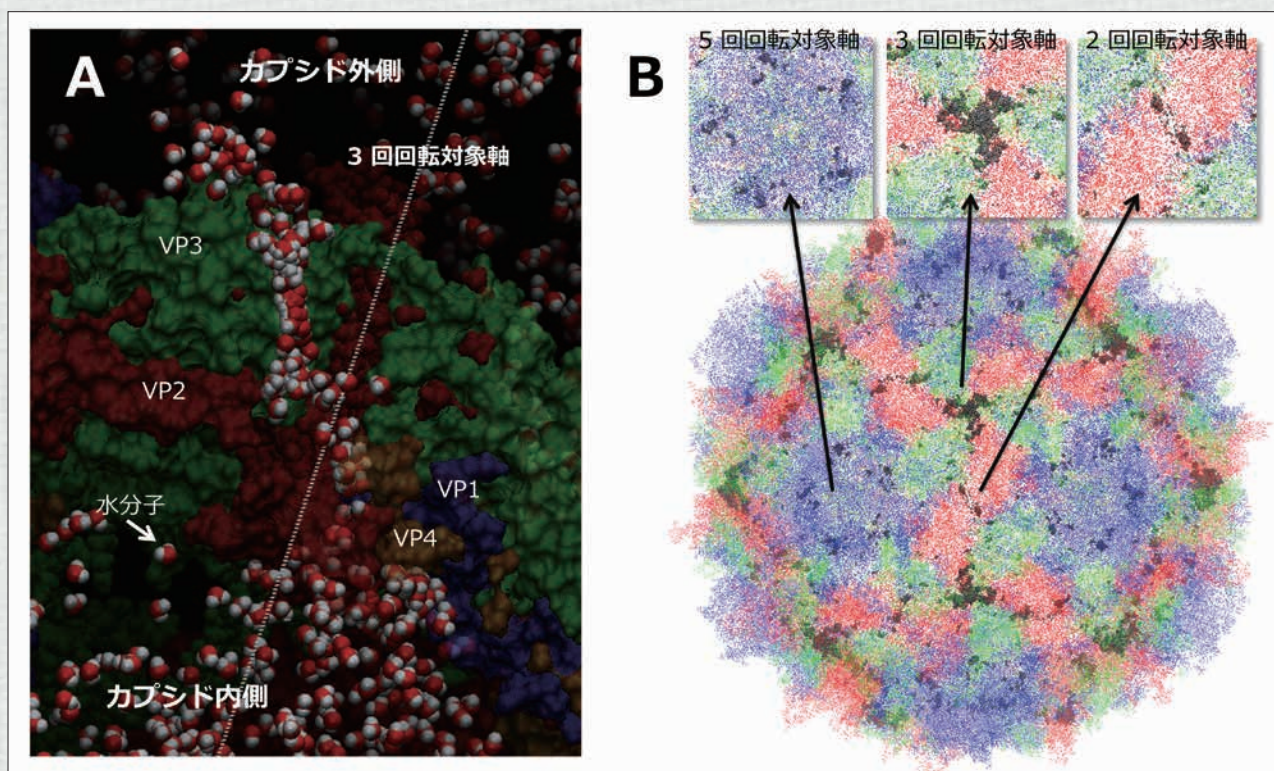


図-5 カプシドの3回回転対称軸付近を通過する水分子の20ピコ秒ごとのストロボショット (A) および水分子の透過箇所 (B)。Bにおいて透過水分子は灰色で示してある。カプシドタンパク質の色分けは図-2に同じ

とも始めの100ナノ秒間にわずかに増加して以降一定値に収束している。カプシド半径の収束値約15.1ナノメートルは電子顕微鏡写真から計測されるポリオウィルスのカプシド半径約15ナノメートルとよく一致している。以上から我々は開始100ナノ秒のMD計算によって系の構造は十分緩和され熱平衡状態に至ったと見なした。

● カプシドの水透過性

図-5Aにカプシドの内側から外側へ移動した水分子の20ピコ秒ごとのストロボショットを示す。カプシドの内側と外側の境界面を定義し、平衡化後の基準時刻からこの境界面を跨いだ水分子の個数をカウントすることでカプシド内外の水分子交換の定量化を行った。その結果カプシドの内側から外側、および外側から内側への水分子の移動個数は双方向に1ナノ秒に8個と非常に速いことが分かった。

水分子の通過場所についても興味深い。解析の結果3回回転対称軸に沿って透過経路が存在し最も多くの水分子を透過することが分かった (図-5B)。

ほかにも2回回転対称軸周辺のVP2同士の接合面で水分子の通過が見られた。5回回転対称軸では水分子の透過は起こらず対称軸付近のキャニオンと呼ばれる部位あたりで通過が見られた。経路に沿った水の数密度分布から自由エネルギー分布を計算することができ、たとえば3回回転対称軸に沿った経路には熱揺らぎの数倍程度の自由エネルギー障壁が存在することを明らかにした。

8個/ナノ秒の移動速度であると25マイクロ秒程度あればカプシド内部の水は自発的にすべて外部水と入れ替わることができる。したがってもしポリオウィルスに瞬間的な外圧が加えられたとして、それ相当数の水分子が移動することで内外圧差を素早く調整できることになる。実験的に観測されているポリオウィルス特有の高い耐圧性⁵⁾はこの調整機構によるものであろう。この調整機構は主に比較的低い自由エネルギー障壁を持った3回回転対称軸で機能していると推測される。頻繁な水分子の移動が観測された一方で、計算時間内においてイオンの透過は一度も観測されなかった。すなわちポリオウィ

ルスのカプシドはイオンを透過させない浸透膜としての性質を持つことも示された。

現在進行中の研究課題

「京」コンピュータの計算能力をフル活用し 100 ナノ秒オーダーでの MD 計算を実行することにより、ポリオウィルスカプシド単体の安定性に関する物理化学を明らかにしつつある。さらに我々はポリオウィルスの細胞への感染の初期過程を調べるためにポリオウィルス受容体 CD155 とポリオウィルスとの相互作用を 1,000 万原子系での MD 計算により自由エネルギーの観点から定量化しようと試みている。先に述べたようにポリオウィルスカプシドは正味負に帯電しており、その一方で CD155 についても正味負に帯電している。明らかに真空中では静電反発するはずの両者が電解質水溶液中ではむしろ好んで会合する物理化学は非常に興味深いところである。その分子論が明らかになればウィルスと受容体との会合を阻害するという新しい発想による抗ウィルス

剤の開発にもつながるであろう。

参考文献

- 1) Racaniello, V. R. : Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins, Vol.1, pp.795-838 (2007).
- 2) Andoh, Y., et al. : J. Chem. Theory Comput, 9(7), pp.3201-3209 (2013).
- 3) Greengard, J. F. : The Rapid Evaluation of Potential Fields in Particle Systems, MIT Press (1988).
- 4) Miller, S. T., Hogle, J. M. and Filman, D. J. : J Mol Biol, 307(2), pp.499-512 (2001).
- 5) Kingsley, D. H., et al. : J. Food Protect, 65(10), pp.1605-1609 (2002).

(2014 年 2 月 28 日受付)

安藤嘉倫 yoshimichi.andoh@apchem.nagoya-u.ac.jp

慶應義塾大学理工学研究科開放環境科学専攻博士課程修了（工学博士）。現在は名古屋大学工学研究科化学・生物工学専攻にて CMSI 重点研究員としてウィルスおよび脂質二重膜を対象とした MD 計算研究に従事。

岡崎 進 okazaki@apchem.nagoya-u.ac.jp

京都大学工学研究科工業化学専攻博士課程修了（工学博士）。現在は名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻教授。専門はコンピュータ・シミュレーション、理論化学、物理化学。