シリーズ「化学からみた物性物理」

脂質二重膜・膜蛋白質の分子動力学計算

東京大学分子細胞生物学研究所　杉田有治
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科　池口満徳

（2006年1月25日受理）

要旨

近年の分子生物学と構造生物学の発展により、巨大な膜蛋白質の立体構造が次々に解かれている。これにより膜蛋白質の関わる生命現象の理解は飛躍的に進んだ。さらに、生体膜中での膜蛋白質の分子動力学計算を行うことにより、その構造と機能の関係を詳しく解析することが可能である。しかし、膜蛋白質の動力学を正確に記述するためには、膜蛋白質の構造のみならず、生体膜の構造や物性、膜蛋白質と生体膜の間に働く分子間相互作用などに関する深い理解が必要であり一筋縄ではいかない。本稿では、我々が現在研究している筋小胞体カルシウムポンプを実例にとり、膜蛋白質と脂質二重膜を含む全原子分子動力学計算を実行するために必要な計算手法をまとめた。また、その結果明らかになったカルシウムポンプの機能に関する新しい知見に関しても紹介する。

キーワード：分子動力学計算、統計集団（アンサンブル）、pKa 計算、膜蛋白質、脂質二重膜、筋小胞体カルシウムポンプ、プロトン対抗輸送

1. はじめに

生物体を構成する形態上・機能上の基本単位は細胞であり、その内と外は細胞膜により隔てられている。細胞内には、核、ミトコンドリア、小胞体、液胞などの原形質が含まれるが、それぞれ、核膜、ミトコンドリア膜、小胞体膜、液胞膜などによって包まれている。これらの膜構造を総称して、生体膜と呼ぶ。生体膜を実際に構成しているのは、脂質二重膜とその中に埋もれている膜蛋白質やコレステロールなどである。脂質二重膜は、親水性頭部と疎水性基からなる両親媒性の脂質分子によって構成されており、疎水性相互作用により疎水性基同士が内側を向き、親水性頭部は外側で水と接する構造をしている。

生体膜や膜蛋白質の研究は従来から盛んに行われているが、特に近年、大きく発展しつつある研究分野ではないかと思う。その理由として、以下の 2 点が挙げられるのではないだろうか？

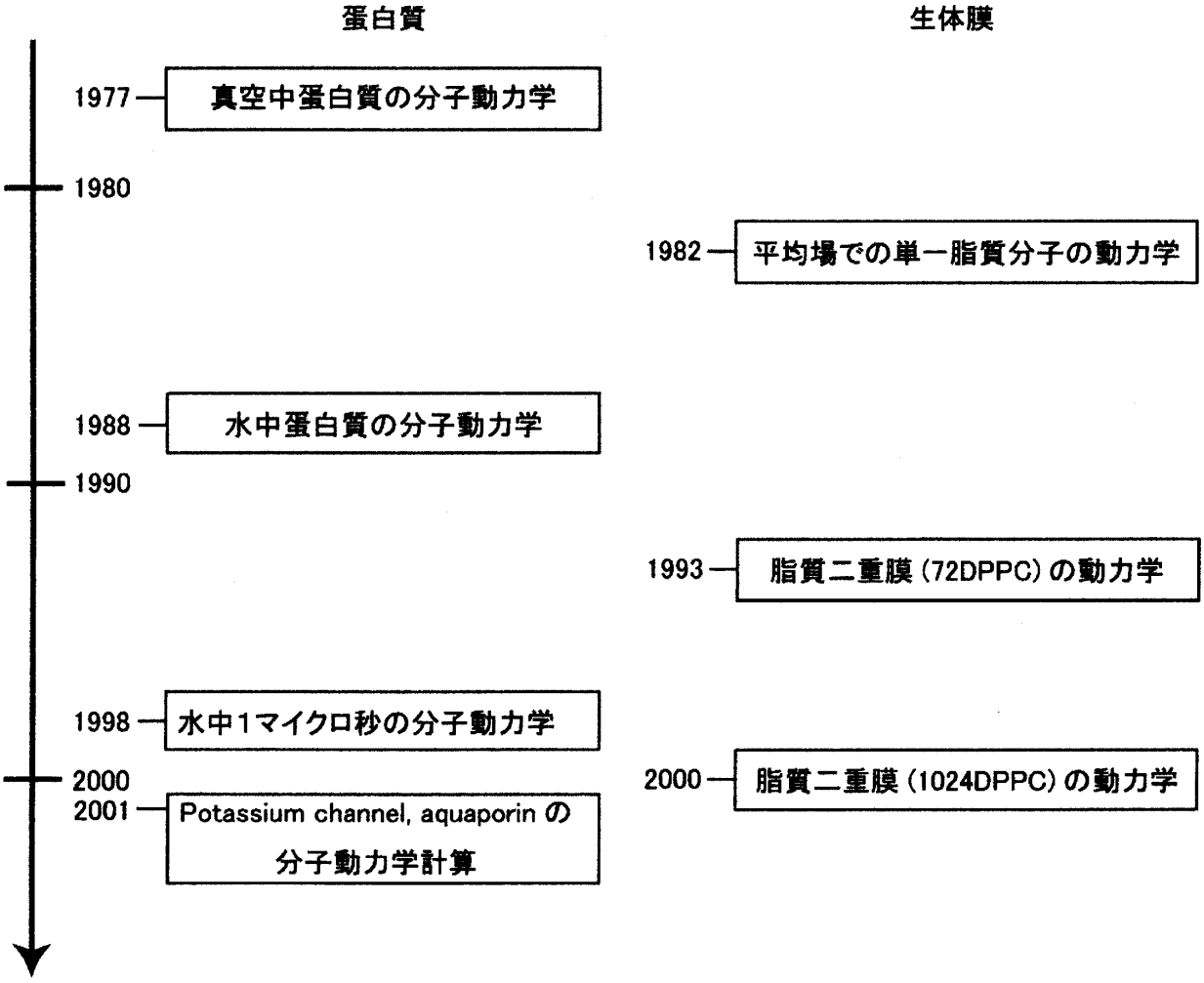
(1) 構造生物学の発展により、膜蛋白質に関する原子レベルでの構造解析が可能になった [1]。膜蛋白質の立体構造が明らかになり、その蛋白質が関与している生命現象に関する理解が格段に進んだ。例えば、2003 年のノーベル化学賞は、細胞膜のチャネル蛋白質に関する発見に貢献したアメリカの Peter Agre 教授と Roderick MacKinnon 教授に与えられた。Agre 教授は水分子を透過するアクアポリンという膜チャネル蛋白質を発見したこと [2] が、MacKinnon 教授はイオンチャネルの 3 次元立体構造と機能の関係を明らかにしたこと [3] がその受賞理由であった。

(2) 分子生物学の発展により、いくつかの膜蛋白質に関する遺伝子の変異と疾患の関係が明らかになった。例えば、心臓疾患の一つである拡張型心筋症は、カルシウムポンプの阻害剤である 52 残基の膜貫通蛋白質である phospholamban の Arg9Cys 変異 [4] と関係していることが明らかになった。また、GPCR (G-protein coupled receptor) を代表とする膜受容体蛋白質はゲノム創薬において主要なターゲットでもある [5, 6]。このように医療や医薬開発の現場でも、膜蛋白質に関する分子レベルでの機能解析の重要性が増している。

脂質二重膜自身に関する物理化学的な測定の精度も近年向上し、定量的な議論が可能となってきた [7]。特に、X 線・中性子散乱 [7-9] や核磁気共鳴 [10-12] などの実験により、異なる脂質分子から構成される脂質二重膜の構造や物性の違いも明らかになってきた。また、脂質二重膜の物性の違いが膜蛋白質の機能に与える影響 [13] に関しても研究が進められている。

一方で、近年の計算機性能の飛躍的な向上とアルゴリズムの進歩により、従来はとても不可能であった巨大な系（原子数 10 万から数 100 万）に関する古典分子動力学計算が可能になってきた。図 1-1 に、蛋白質と生体膜に関する分子動力学計算による主な研究の歴史をまとめた。

図 1-1 蛋白質と生体膜に関する主な分子動力学計算



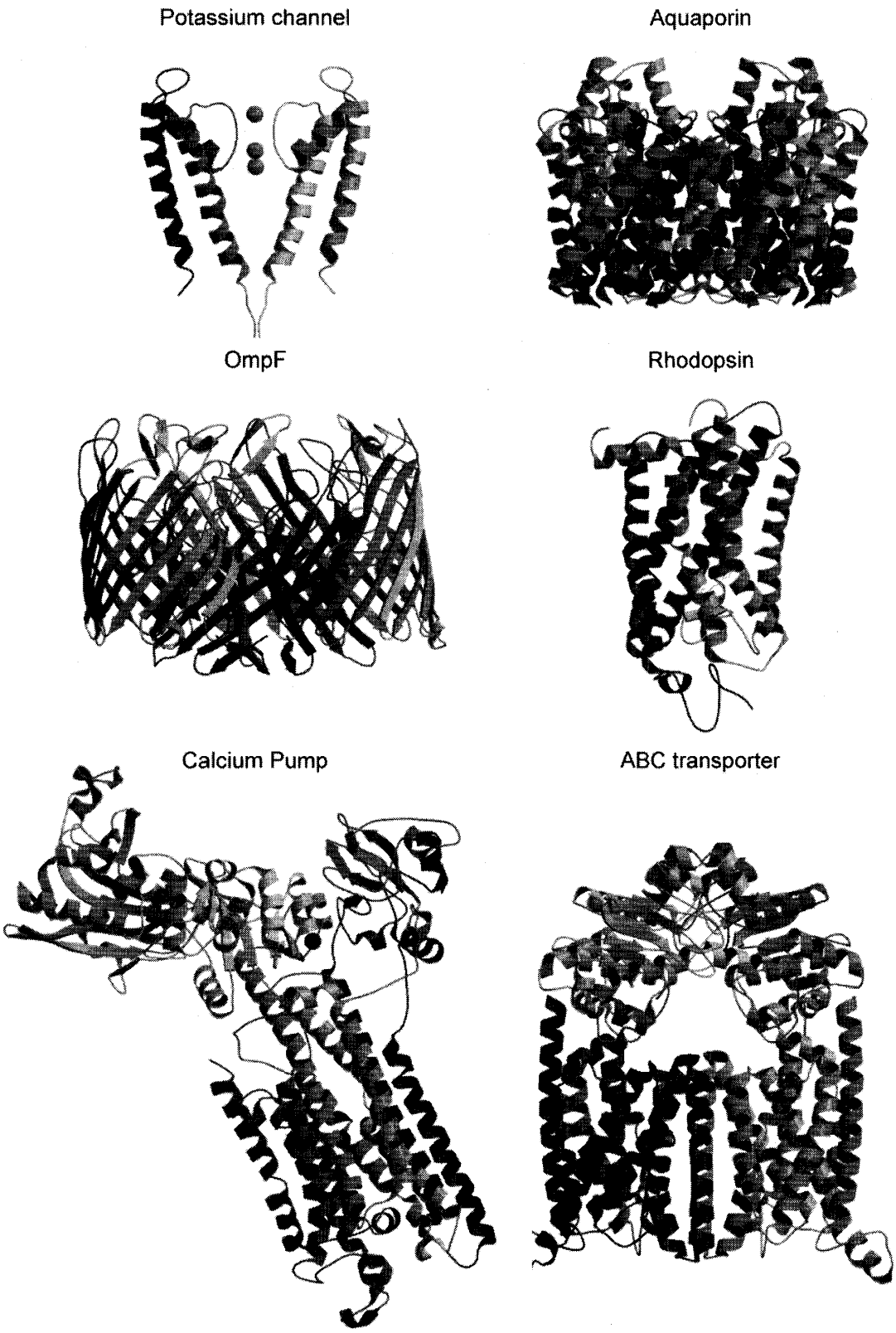
最も初期の蛋白質の分子動力学計算(1977 年) [14] では、蛋白質を真空中における孤立分子として取り扱っていた。その約 10 年後には蛋白質の周囲の水分子も露わに含む計算 [15] が実行された。我々の知る限り、水中での蛋白質の分子動力学計算の最長記録は 1998 年に P.A. Kollman らにより報告された Villin に関する 1 マイクロ秒の計算 [16] である。一方、最も初期の生体膜の計算も、膜環境を平均場として近似した中での単一脂質分子の系から出発した [17, 18]。その後 1990 年代に入り、溶媒と 72 分子程度の脂質を含む系での数百ピコ秒の分子動力学計算が可能となり、脂質二重膜に関する物理化学的な測定結果との比較が行われた [19]。現在では、同様の系に関する数百ナノ

秒以上の計算[20]や、脂質分子を千個以上も含む巨大な系[21]での数十ナノ秒以上もの計算も実行されている。

脂質二重膜や溶媒を露に含む膜蛋白質の全原子分子動力学計算は、系に含まれる原子数が必然的に数万から数十万に至る巨大系となるため、本格的な計算が実行されるようになったのは2000年以降である。しかし、膜蛋白質内のイオンや水分子の透過現象などに関しては、既に生物学的にも重要な知見を生み出している[22,23]。なぜなら、これらの生命現象はナノ秒程度の非常に短い時間で起こるため、分子動力学計算で十分に手の届くところにあるためである。現在では、図1-2に示すような様々な膜蛋白質[24-29]に関する分子動力学計算が実行され、膜蛋白質の機能の理解に貢献している[22,23,30-32]。

本稿では、これまでに行われた膜蛋白質および脂質二重膜の計算結果を網羅的に記すのではなく（このような目的の最近の総説としては、Tieleman らによる総説[33]が挙げられる）、我々が現在研究している筋小胞体カルシウムポンプという膜蛋白質の分子動力学計算を実行するために用いた計算手法と得られた結果を紹介したい。まず、次章では、脂質二重膜の分子動力学計算を行うための方法をまとめた。特に、脂質二重膜の計算で重要な統計集団の選択に関して、実際の分子動力学計算の結果も含めて詳しく議論した。第3章では、カルシウムポンプの立体構造とその機能に関して簡単に述べた上で、カルシウムポンプ・脂質二重膜・溶媒を含む原子数30万以上の系を構築する手順に関して述べた。最後に分子動力学計算によって得られた、カルシウムポンプの機能に関する最近の知見[31,34]を紹介したい。

図 1-2 分子動力学計算によって、近年、解析された主な膜蛋白質の立体構造[24-29]

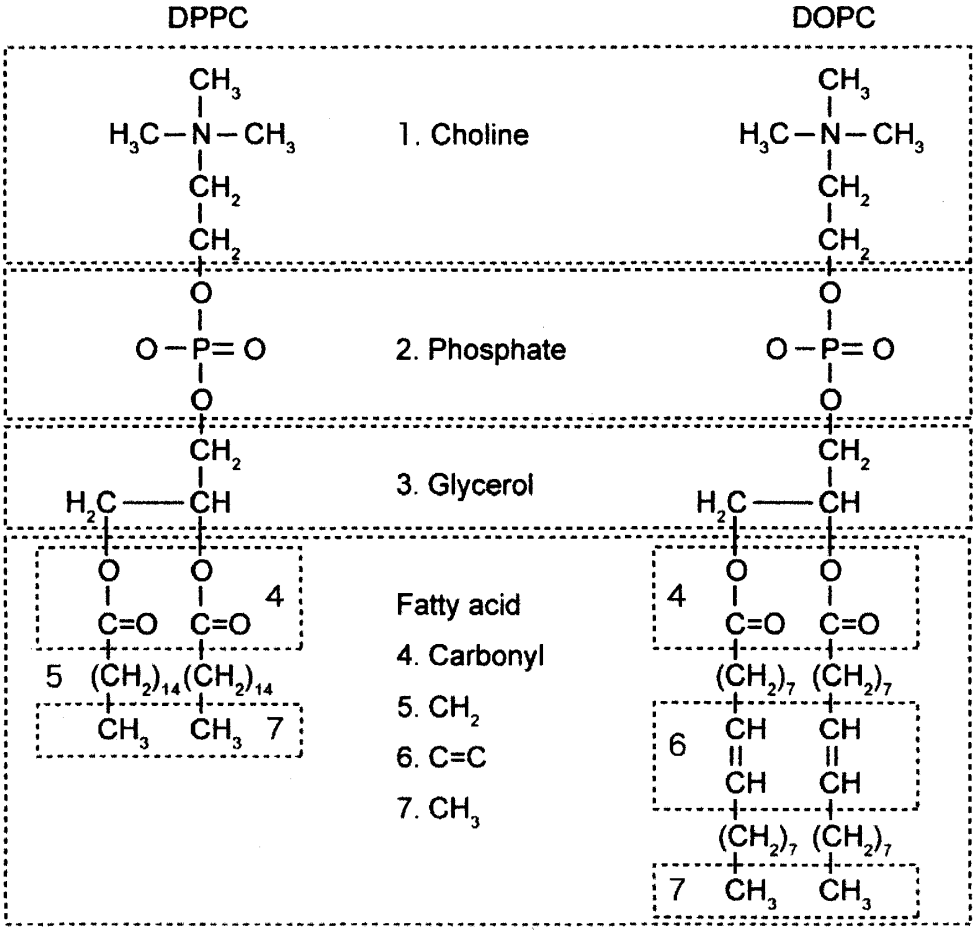


2. 脂質二重膜の分子動力学計算

2.1. 脂質二重膜の構造

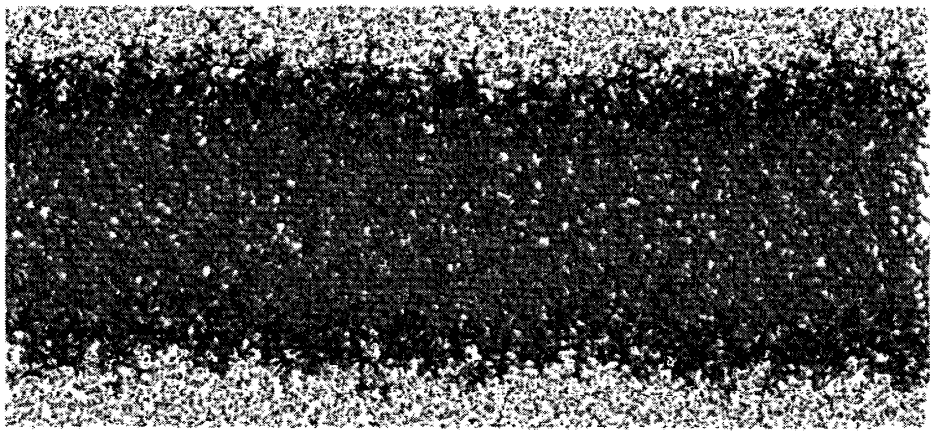
生体膜を構成する脂質二重膜は、様々な種類の脂質分子からできている。図 2-1 に、実験的にも理論的にもよく調べられている代表的な脂質分子である DPPC (dipalmitylphosphatidylcholine) と DOPC (dioleoylphosphatidylcholine) の分子構造を示す。脂質分子は、コリンとリン酸基とグリセロール基を含む親水性の頭部と、炭化水素基を含む疎水性の脂肪酸とがエステル結合した両親媒性分子である。生体内含まれる脂質分子の違いは、親水性頭部と疎水性脂肪酸の種類が異なる組み合わせで結合していることによって生ずる。例えば、図 2-1 に示した 2 つの脂質分子の親水性頭部は共通であるが、脂肪酸の種類が異なっている。DPPC の脂肪酸はすべて一重結合からなる飽和脂肪酸であるのに対して、DOPC の脂肪酸は各鎖に一本の二重結合を含む不飽和脂肪酸である。

図 2-1. 代表的な脂質分子である DPPC と DOPC の分子構造



このように、脂質分子は両親媒性の分子であるため、水溶液中では疎水性相互作用によって自発的に疎水性脂肪酸同士が凝集し、親水性頭部が溶媒に露出した二重膜を形成する。図 2-2 に我々の行った分子動力学計算によって得られた 512 個の DOPC 分子で構成される脂質二重膜の構造を示す。生理的な条件下における脂質二重膜の物理化学的な性質は、親水性頭部と疎水性脂肪酸の化学的な性質によって決定されている。

図 2-2. 分子動力学計算で得られた脂質二重膜 (DOPC) のスナップショット



512 個の DOPC 分子と 16384 個の水分子を含む系に関して 1 ナノ秒の分子動力学計算を実行することによって得られた脂質二重膜の平衡構造。

液晶相における脂質二重膜の構造は大きく揺らいでおり、蛋白質のような固有の立体構造を持たない。このため、ごく最近までは脂質二重膜の物理化学的な測定に関しては誤差が非常に大きく、信頼できる実験値を得ることが困難であった。例えば、液晶相における DPPC1 分子当たりの表面積の実験値としては 57 ($Å^2$)から 72 ($Å^2$)までの大きく異なる値が報告されている[9]。しかし近年、米国の JF. Nagle や S. White らによる研究[7-9, 35-42]により、代表的な脂質分子から構成されている脂質二重膜に関してはようやく信頼できる実験データが集積されてきた。表 2-1 に DPPC 二重膜と DOPC 二重膜に関する主な実験データをまとめた。分子動力学計算の結果を、この表の値（実験データ）と比較することにより、計算に用いたモデルと手法の信頼性を見積もることができる。

表 2-1. DPPC 二重膜と DOPC 二重膜に関する主な実験データ*

Lipid	DPPC	DOPC
Temperature (°C)	50	30
V_L (Å^3)	1232	1303
D (Å)	67	63.1
A (Å^2)	64 (62.9)**	72.5 (72.1)**
D_{HH} (Å)	38.3	36.9
n_W (Å)	30.1	32.8

V_L : lipid molecular volume、 D : lamellar repeat distance、
A : average interfacial area/lipid、 D_C : thickness of hydrocarbon core、
D_{HH} : headgroup peak-peak distance、 n_W : number of water molecule/lipid
*JF. Nagle、 Biochimica et Biophysica Acta 1469 (2000) 159-195 より抜粋。
** DPPC と DOPC の表面積に関しては、2 つの実験値をリストした。括弧内は Nagle の総説とは異なる実験値である。 我々の分子動力学計算は、DPPC に関しては 62.9(Å^2) [43]、DOPC に関しては 72.5(Å^2) [42] といういずれも古い実験データを用いて実行した。

2.2. 脂質二重膜の分子動力学計算

次に、我々が脂質二重膜や膜蛋白質の分子動力学計算で用いた計算手法を紹介する。もっとも、ほとんどの計算手法や分子力場ポテンシャルの関数形などは水溶性蛋白質の計算で用いられているものと何ら変わらない。例えば、脂質二重膜の分子動力学計算で用いられる分子力場ポテンシャル関数は、CHARMM[44-46]、OPLS[47]、GROMOS[48]（現状では、AMBER[49] には生体膜のパラメタは存在しない）などの生体高分子の分子動力学計算で標準的に用いられるものであり、通常以下のような形をしている。

$$E_{tot} = \sum_{bonds} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{angles} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} V\left[1 + \cos(n\phi - \phi_0)\right] + \sum_{improper} k_\gamma (\gamma - \gamma_0)^2 + \sum_{nonbonded} \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}}\right)^{6}\right] + \sum_{nonbonded} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \quad (2\text{-}1)$$

ここで、第一項から第四項は分子内相互作用であり、それぞれ、結合長の伸縮、結合角の偏角、二面角の回転に関する関数である。第五項と第六項は分子間相互作用であり、それぞれ、Lennard-Jones 相互作用と静電相互作用を表している。我々の計算では、CHARMM27[45, 46] という分子力場ポテンシャルを用いた。その理由は、CHARMM27 は、GROMOS[48] とは異なり、水素原子等も露わに含む全原子モデルであること、蛋

白質の分子動力学計算には最も実績があること、そして、以下に示すように脂質二重膜の分子動力学の計算手法が既に確立していたことである。

それでは、脂質二重膜（膜蛋白質も含む）の分子動力学計算を行う上で、水溶性蛋白質の計算と異なる条件は何だろうか？表 2-2 に、（我々が考えている）主な違いをまとめた。

表 2-2. 水溶性蛋白質と脂質二重膜の分子動力学計算における異なる条件

対象	水溶性蛋白質	脂質二重膜
初期構造	構造解析で得られた原子モデル	脂質分子を配置して作成
境界条件	周期的境界条件または球状境界条件	周期的境界条件
座標軸	特別な意味はない	X、Y 軸：膜と平行 Z 軸：膜と垂直
統計集団（アンサンブル）	NPT （原子数・圧力・温度一定） または NVT （原子数・体積・温度一定）	NPT （原子数・圧力・温度一定） または NPAT （原子数・圧力・表面積・温度一定） または NPγT （原子数・圧力・表面張力・温度一定）

まず、液晶相にある脂質二重膜は大きく揺らいでいるため、実験によって原子モデルを得ることはできない。そのため、分子動力学計算における脂質二重膜の初期構造は、その構造情報（膜の厚さや 1 分子あたりの表面積など）を再現するように脂質分子を配置して作成するしかない。しかし、この方法を用いると、脂質二重膜を平衡化させるために非常に長時間の計算を必要とする。最近はインターネット上で既に平衡化された脂質二重膜の構造を公開しているサイトも存在しており、これを利用することも可能である。

次に、脂質二重膜の計算における境界条件は周期境界条件に限定される点が挙げられる。全原子モデルを用いた場合に、現在の計算機環境で計算可能な脂質分子の数は

たかだか数百から千程度であり、一つの細胞を被う生体膜の大きさと比較して遥かに少ない。このため境界付近に存在する脂質分子に生ずる計算誤差を最小にするためには、周期境界条件を課して計算せざるを得ない。計算結果の解析がしやすいように、通常、脂質二重膜と垂直な軸をZ軸とすることが多い。脂質二重膜の計算においては、通常の3次元の周期境界条件を用いることにより、実験で用いた系を再現できる。何故なら、脂質二重膜の実験自身も、厚さ D（表 2-1 参照）の二重膜が複数堆積した Multilameller vesicle (MLV) [7] を用いて測定しているからである。しかし、膜蛋白質によるイオンなどの物質輸送を計算する際には、生体膜の内と外は本来異なる環境（イオン濃度など）であるため、通常の3次元の周期境界条件は大きな近似である。

脂質二重膜の分子動力学計算では、水溶性蛋白質の計算とは異なる統計集団（アンサンブル）が用いられる場合がある。特に、圧力の制御の方法として、膜面に対して垂直方向と水平方向を区別して取り扱う NPAT アンサンブル（原子数・圧力・表面積・温度一定のアンサンブル）や NPγT アンサンブル（原子数・圧力・表面張力・温度一定のアンサンブル）がよく用いられている。これらの方法は、約10年前に米国の NIH のグループによって開発された手法 [50-52] であるが、生体膜の分子動力学計算を実際に行っている研究者以外にはあまりなじみのない手法であると思われるため、次節以降でやや詳しく紹介する。

2.3. NPAT、NPγT アンサンブル

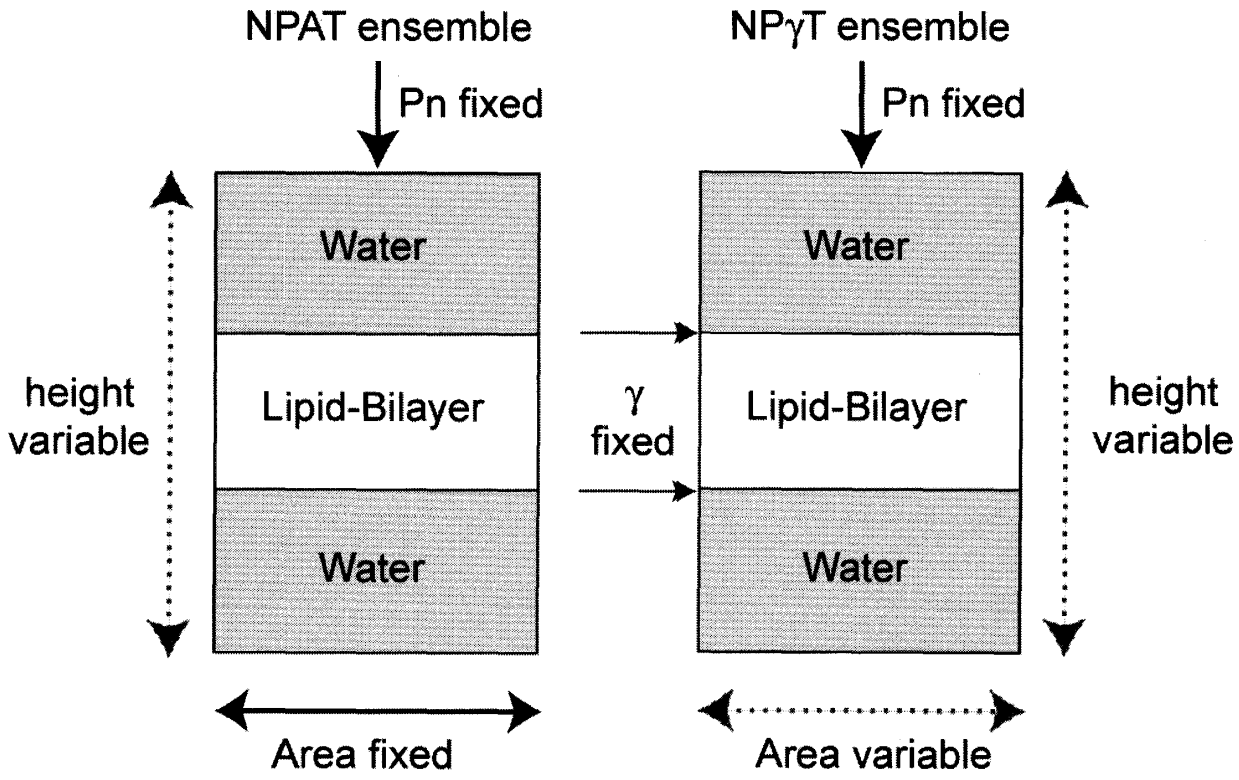
水溶液中の蛋白質や核酸の分子動力学計算では、通常、NVT アンサンブルあるいは NPT アンサンブルが用いられることが多い。しかし、これらのアンサンブルを生体膜系の分子動力学計算に用いた場合には、脂質二重膜の重要な構造情報を再現することが困難であることがわかってきた。この問題を解決するために提案されている手法が、NPAT アンサンブルあるいは NPγT アンサンブルである。方法に関する厳密な議論は原論文 [50-52] に譲るとして、ここでは概念的な説明を行う。

図 2-4 に脂質二重膜と溶媒を含む系の概念図を示す。この系では、脂質二重膜・溶媒の境界面は表面積 A の平面と仮定され、その境界面と垂直な方向に Z 軸がとられている。さらに、バルクの圧力 P と同じ圧力 (P_n) が境界面にかかっており、系に含まれる粒子数の変化は起こらないと仮定する。

NPAT アンサンブルでは、脂質二重膜の表面積 A の初期値は対応する温度と圧力の下での実験データを採用し、分子動力学の実行中はその値に固定する。従って、圧力 P_n に従う系の体積変化は、Z 軸方向の変化のみによって実現される。一方、NPγT ア

ンサンブルでは、表面積 A は固定せず、代わりに表面積に共役な熱力学変数である表面張力γを入力パラメタとする。従って、圧力 P_n による系の体積変化は、表面積 A の揺らぎと Z 軸方向の変化の両方によって実現される。一般に、脂質二重膜における表面張力γの測定は表面積の実験的測定と比較して困難であるため、実際の分子動力学計算では幾つかの表面張力の値を試すことにより、脂質二重膜の表面積の実験データを再現する表面張力の値を最終的に採用することが多い。

図 2-4. NPAT、 NPγT アンサンブルの概念図



このように、NPAT アンサンブルや NPγT アンサンブルでは、分子動力学計算を実行する際に、脂質二重膜の表面積という実験データを必要とする。従って、この手法には、既に実験的に表面積の値が求められている脂質二重膜にしか適用できないという大きな問題点が存在する。しかし、ここではまず、実際に NPAT アンサンブルを用いて平衡化された脂質二重膜が実験データをどの程度再現できるのか、そして、NPT アンサンブルや NPγT アンサンブルではどうなるか比較してみることにしよう。

2.4. 脂質二重膜の分子動力学計算

我々が計算に用いた脂質二重膜は、既に図 2-1 に示した DPPC と DOPC からなる二重膜である。計算に用いた分子力場ポテンシャルは CHARMM27[45, 46] であり、プログラムは池口により開発された MARBLE[53] を用いた。他の分子動力学ソフトウェアと比較して、MARBLE は以下のような特徴を持つ。

(1) 水素原子を含むメチル基などを剛体として取り扱うことが可能であること
(2) Symplectic Integrator を採用することにより、系の全エネルギーが長時間の動力学計算の間、ほとんど完全に保存されていること
(3) 通常のアンサンブル (NVE、 NVT、 NPT) に加えて、先に述べた NPAT アンサンブルや NPγT アンサンブルなどの脂質二重膜・膜蛋白質のための計算手法が利用できること
(4) 並列化効率が非常に高く、100 台以上の CPU を用いた場合でもスケーラブルに計算速度が加速していくこと

これらの利点が存在するため、MARBLE を用いた分子動力学計算は他のプログラムを使った場合と比較して高精度であり、かつ、(同じ計算機資源を利用したとしても) より長時間の計算が可能である。

この節で紹介する DPPC や DOPC 二重膜は代表的な脂質二重膜であるため、既に多くの計算例が報告されている [21, 45, 46, 54, 55]。しかし、その多くは、計算機資源が劣る 1990 年代に報告されており、サンプリング（計算時間）がやや不十分であった。そこで、我々は、MARBLE を用いて 10 ナノ秒以上の分子動力学計算を実行することにより、これらの結果を再検討してみた。

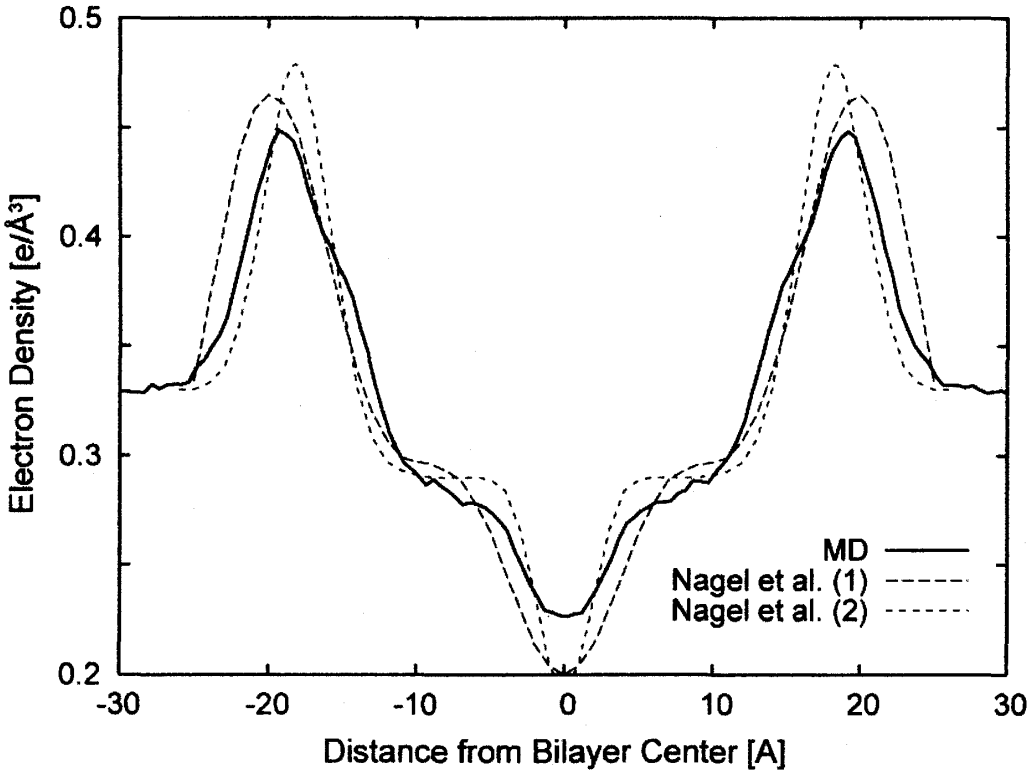
2.4.1. NPAT アンサンブルによる分子動力学計算

まず初めに、NPAT アンサンブルを用いた分子動力学計算によって得られた計算結果と実験結果との比較を行った。既に述べたように、液晶相では脂質二重膜は大きく揺らいでいるため、実験による測定結果は固有の立体構造を反映したものではなく熱的平均値を求めていることに対応する。代表的な実験手段としては、X 線・中性子による散乱実験 [7-9, 35-42] や核磁気共鳴（NMR）[10-12] などが挙げられる。

X 線・中性子による散乱実験によって、脂質二重膜と垂直な軸に関する密度プロファイルが求められる [35-39]。X 線散乱プロファイルは、脂質分子に含まれる原子の中で

最も電子数の多いリン酸基からの寄与が最大であるため、上層と下層のリン酸基の位置にピークを持つ。このピーク間の距離は D_{HH} と呼ばれ、脂質二重膜の厚さを示す重要な構造情報の一つである。また、二重膜の中心は最も密度が低くなるため散乱プロファイルの値も最小になる。図 2-5 に、DPPC の液晶相における X 線散乱プロファイルを示す。実験データとして、2 本の点線が記されているが、これらは同一の実験ではあるがデータの解釈が異なるものである。NPAT アンサンブルを用いた分子動力学計算から得られた X 線散乱プロファイルは、実験データとよく一致しており、その誤差範囲に含まれている。

図 2-5. DPPC 二重膜の X 線散乱プロファイル

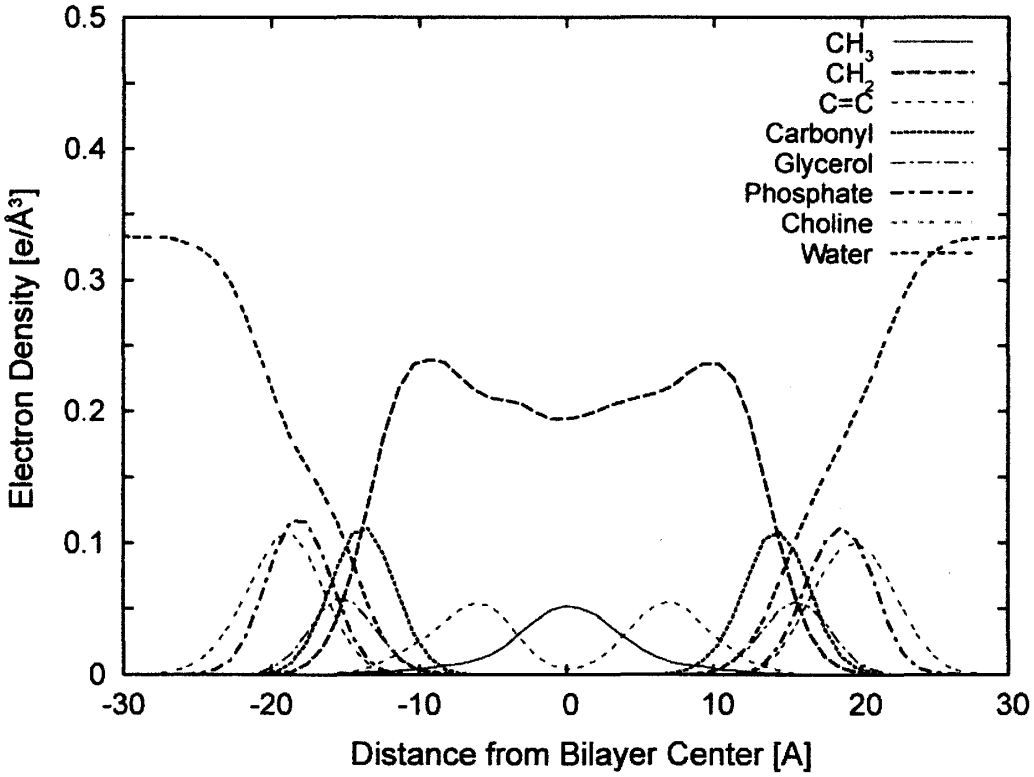


72 個の DPPC 分子と 2094 個の水分子を含む系に関して、50°C、1atm の条件で 10 ナノ秒間の分子動力学計算を実行した。表面積の値として、62.9 (Å^2)を採用した。実線は分子動力学計算、破線は Nagle らにより測定された実験データ [43]。

中性子による散乱プロファイルは、負の散乱強度を持つ水素原子からの寄与を含まないカルボニル基の位置にピークが存在する。S. White らは、異なるピーク位置を持つ X 線と中性子の散乱強度プロファイルを相補的に利用することにより、脂質分子を構成する各化学基の分布を正確に求めることができることを示した [35-39]。一方、分子動力学計算では、トラジェクトリから各化学基の存在確率を計算することにより、対

応する密度プロファイルを計算することができる。図 2-6 に DOPC 二重膜に含まれる 7 つの化学基 (CH_3基、 CH_2基、 C=C 基、 カルボニル基、グリセロール基、リン酸基、コリン基)と水分子の分布を示す。十分に水和された DOPC 二重膜において、これらの化学基が広い分布を持っていること、すなわち、液晶相における DOPC 脂質二重膜中でそれぞれの分子の構造が大きく揺らいでいることが分かる。また、ここにデータは示していないが、低水和条件での DOPC 二重膜の分子動力学計算によって得られた各化学基の分布のピーク位置は、S. White らの（対応する熱力学条件下の）実験データとよく一致していた。

図 2-6. DOPC 分子に含まれる各化学基の密度プロファイル



72 個の DOPC 分子と 2304 個の水分子を含む系に関して、37 °C、1 atm の条件で 10 ナノ秒間の分子動力学計算を実行した。表面積の値として、72.5 ($Å^2$)を採用した。

表 2-3 に、DPPC と DOPC の NPAT アンサンブルを用いた分子動力学計算から得られた脂質二重膜の主な構造情報をまとめた。表 2-1 に挙げた JF. Nagle らによる実験データと非常によく一致していることがわかる。しかし、この表に記されている構造情報は、主に脂質二重膜の厚さや体積に関係するものである。NPAT アンサンブルによる分子動力学計算では脂質分子の表面積を仮定しているため、（密度が一定であ

ることを考慮すると）脂質二重膜の厚さが実験データと合っているのは当たり前なのかもしれない。

表 2-3. 分子動力学計算により得られた DPPC と DOPC 二重膜の構造情報

Lipid	DPPC	DOPC
Temperature (°C)	50	37
V_L (Å^3)	1222.2	1301.9
D (Å)	66.9	62.5
A (Å^2)	62.9	72.5
D_{HH} (Å)	38.7	36.4
n_W (Å)	29.1	32

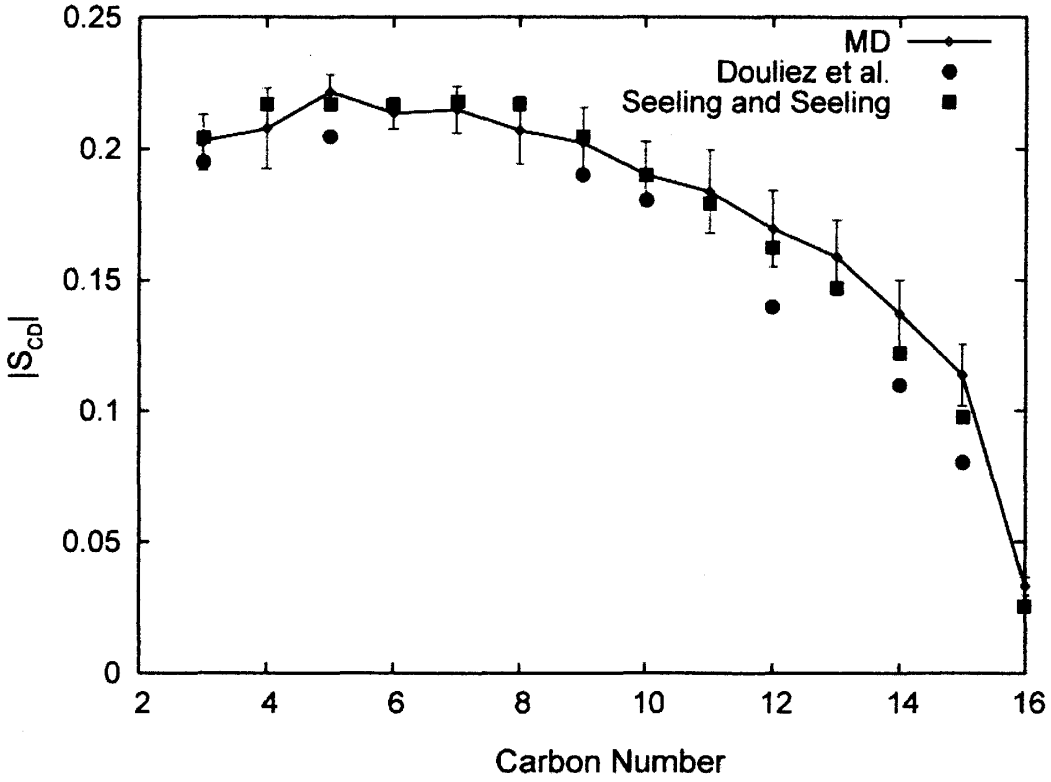
V_L : lipid molecular volume、 D : lamellar repeat distance、
A : average interfacial area/lipid、 D_C : thickness of hydrocarbon core、
D_{HH} : headgroup peak-peak distance、 n_W : number of water molecule/lipid

そこで、異なる構造情報として重水素化された脂質分子を用いた核磁気共鳴(NMR)の実験[10]によるオーダーパラメタ (S_{CD})の値を計算してみた。S_{CD}は、脂質二重膜と垂直な軸と脂肪酸に含まれる C-H ボンド（実際は C-D）の成す角度をθとし、以下の式を用いて定義される。

$$S_{CD} = \left\langle \frac{1}{2}\left(3\cos^2\theta - 1\right)\right\rangle \tag{2-2}$$

この物理量は、脂質分子の脂肪酸の構造揺らぎの程度を表している。図 2-7 に、先ほどと同じ DPPC の分子動力学計算によって得られたオーダーパラメタ(S_{CD})を示す。この物理量に関しても、計算による平均値は異なる 2 つの実験データの誤差範囲に含まれる程度によく一致していることが分かる。このように、脂質分子の表面積の実験データを分子動力学計算における入力パラメタとするだけで、脂質二重膜の構造のかなり詳細にいたるまで上手く再現できることがわかった。

図 2-7. DPPC 分子のオーダーパラメタ (S_{CD})



実線は、図 2-5 と同じ分子動力学計算によって得られた平均値。黒丸と黒四角は、異なる 2 つのグループ[10, 11]による実験値。sn-2 鎖に含まれる C-H からの寄与のみ考慮されている。

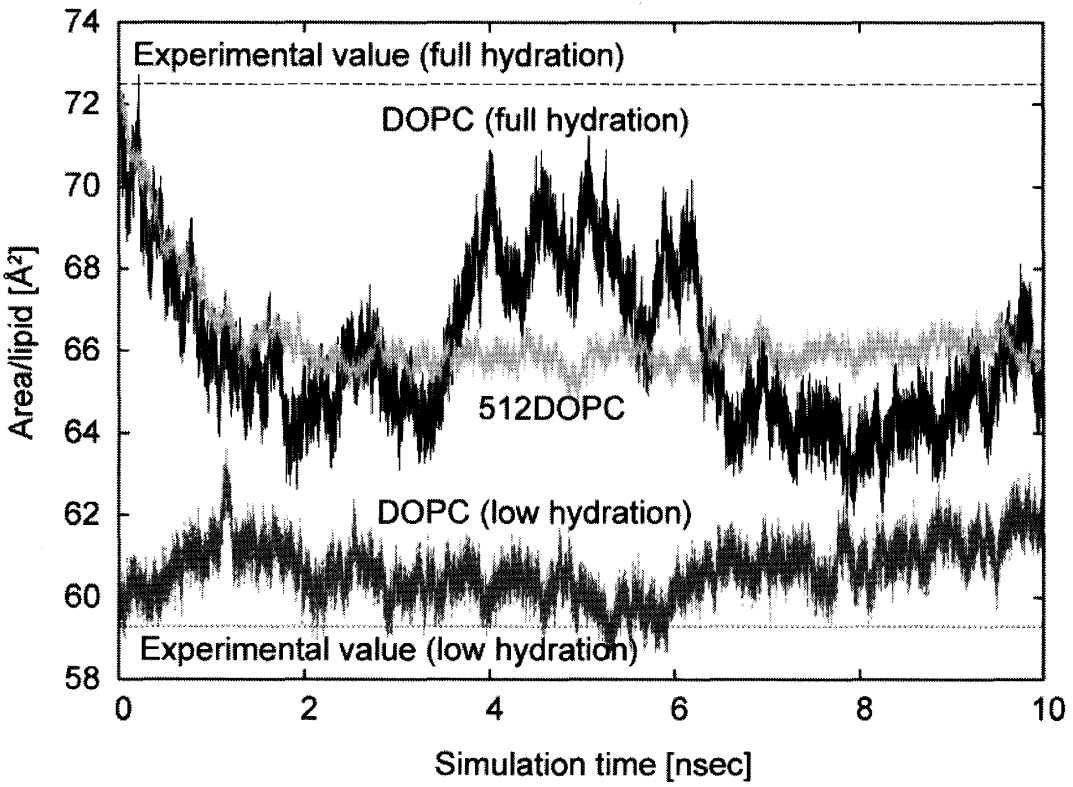
2.4.2. NPT アンサンブルと NPγT アンサンブルの比較

それでは、NPT アンサンブルや表面張力を入力パラメタとした NPγT アンサンブルを用いた計算結果はどのような振る舞いをするのであろうか？前節とは逆に、今度は、脂質分子の表面積の時間変化に注目してみよう。図 2-8 に 3 つの異なった条件で NPT アンサンブルを用いて実行された DOPC 二重膜の分子動力学計算の結果を示す。

脂質二重膜の構造が、系に含まれる水分子の数に大きく依存することはよく知られている[8]。十分に水和した脂質二重膜では大きな表面積をとり、水分子を少ししか含まない乾燥した脂質二重膜では表面積が小さく厚い形になるのである。図 2-8 を見ると、脂質 1 分子あたり 32 個の水分子を含む系では実験値(72.5 (Å^2))と比較して表面積が小さくなっているのに対して、脂質 1 分子あたり 5.4 個の水分子しか含まない低水和の条件では実験値(59.3 (Å^2))よりもやや大きな表面積の値をとっていることが分かる。しかし、定性的には NPT アンサンブルを用いた分子動力学計算でも水和の違い

による表面積の変化を再現している。

図 2-8. DOPC 二重膜における脂質 1 分子の表面積 (Area/lipid) の時系列

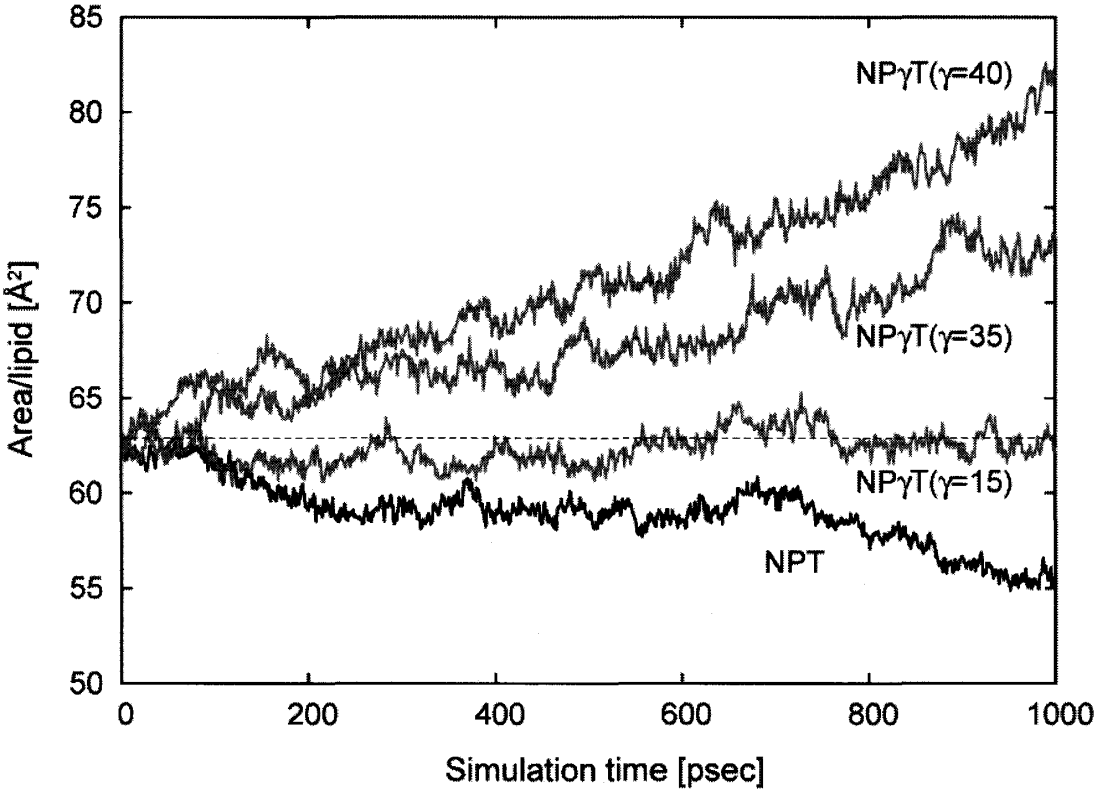


NPT アンサンブルを用いた 3 つの分子動力学計算における表面積の時間変化。 黒色：72 個の DOPC 分子と 2304 個の水分子を含む系 (32 water/lipid)、濃灰色：72 個の DOPC 分子と 389 個の水分子を含む系 (5.4 water/lipid)、薄灰色：512 個の DOPC 分子と 16384 個の水分子を含む系 (32 water/lipid)に関する分子動力学。点線は、高水和条件と低水和条件での実験による表面積の測定値を示す。

また、高水和条件での 72 個の DOPC 分子を用いた計算では、表面積の値が 64(Å^2)から 70 (Å^2)まで大きく揺らいでいた。これは、Lindahl らによる GROMOS 力場を用いた 100 ナノ秒の分子動力学計算 [21] でも観測された長時間に渡る大きな表面積の大きな揺らぎに対応する。我々は、さらに、512 個の DOPC 分子を含む大きな脂質二重膜に関しても高水和条件で 10 ナノ秒までの分子動力学計算を実行した。今度は、表面積の時間変化に大きな揺らぎはみられず、66(Å^2)程度の値に収束していた。しかし、この場合でも NPT アンサンブルを用いる限り、DOPC 二重膜の表面積は実験値とは大きく異なった値に収束していた。

それでは、DPPC 二重膜に関してはどうであろうか？今度は、NPT アンサンブルのみならず、異なる表面張力の値を用いた場合の NPγT アンサンブルによる計算結果も比較する。図 2-9 に示すように、NPT アンサンブルを用いた場合に DPPC 二重膜の表面積は高々1 ナノ秒の間に実験値と比較して、5(Å^2)以上も小さくなってしまった。一方、NPγT アンサンブルを用いた計算では、γ=15dyn/cm という表面張力を仮定した場合に、ほぼ実験データを再現することができた。しかし、より大きな表面張力の値を仮定した場合には、DPPC の表面積は実験値と比較してずっと大きな値になってしまった。NPγT アンサンブルでは、脂質二重膜の表面積が小さくなり過ぎないように表面張力を加えて引っ張っているので、その引っ張りが強すぎると、脂質二重膜の表面積が大きくなりすぎるのである。

図 2-9. DPPC 二重膜のおける脂質 1 分子の表面積 (Area/lipid) の時系列



72 個の DPPC 分子と 2094 個の水分子を含む系に関して、50 °C、1 atm の条件で 1 ナノ秒間の分子動力学計算を実行した。NPT、 NPγT アンサンブルを用いた。

S. Feller による DPPC 二重膜に関する NPγT アンサンブルを用いた計算[56]では、γ=35～45dyn/cm という表面張力の値を用いた場合に、表面積の値が実験データとよ

く一致すると報告されている。この最適な表面張力の値の違いは、使用した分子力場パラメタの違いに起因する。我々が用いたのは CHARMM27[45, 46] という力場であるのに対して、S. Feller らは一世代前の CHARMM22[57] という力場を用いて分子動力学計算を実行していた。このように、NPγT アンサンブルを用いることによって、DPPC 二重膜の実験データを再現することは可能ではあるのだが、計算結果は表面張力という入力パラメタに大きく依存する。

以上のように、脂質二重膜の分子動力学計算において、NPAT アンサンブル以外の計算手法を用いた場合に、脂質二重膜の表面積という最も基本的な物理量を再現することは（無理ではないが）困難である。さらに、脂質二重膜に膜蛋白質やコレステロールなどを埋め込み生体膜の計算をしようとしたときに、脂質二重膜がどのような形になるか予想ができない。また、図 2-5 などに示したように、表面積の値が再現できないと D_{HH} などで表現される膜の厚さに関しても実験値とは異なる値を持つ。膜の厚さは膜蛋白質と脂質二重膜の間に働く相互作用を決定する重要な因子であるため、NPAT アンサンブル以外の計算手法を用いた場合には、安定な膜蛋白質の分子動力学計算が実現できないかもしれない。このような考察から、膜蛋白質においても、NPAT アンサンブルを用いた分子動力学計算が多く実行されている。

NPγT アンサンブルを用いた我々と S. Feller の計算結果の相違に見られたように、脂質二重膜の表面積は系を記述する分子力場パラメタに非常に敏感に応答する。実際、NPAT アンサンブルを開発した NIH のグループもこの点を考慮して、精度の高い量子化学計算をベースに CHARMM 力場の改良を図っている[58]。また、GROMOS 力場は NPT アンサンブルを用いて表面積の実験値を再現するように最適化されているため、NPAT アンサンブルを用いていない。しかし、精度の高い X 線散乱プロファイルと分子動力学計算の詳細な比較[59]によると、いずれの分子力場を用いた場合でも両者が完全に一致しているとはいえなかった。

従って、脂質二重膜に関する全原子モデルを用いた分子動力学計算をさらに信頼性の高いものにしていくためには、より長時間の計算を実行するとともに系を記述する分子力場ポテンシャルの精度を高めていく努力が必要となる。また、これらと平行して、脂質二重膜の構造を決定している物理化学的な因子に関するさらに深い考察を進めていくことも重要であると思われる。このように脂質二重膜自身の分子動力学計算に関してもまだまだ改良すべき点が残されているが、（我々の本来の目的は膜蛋白質そのものの動力学計算であるので）現状で最も容易に脂質二重膜の実験データを再現する NPAT アンサンブルを生体膜系の分子動力学計算に利用することにして、膜蛋白質（主に筋小胞体カルシウムポンプ）の話題に移ろう。

3. カルシウムポンプの分子動力学計算

3.1. カルシウムポンプの構造とその機能

筋細胞中の Ca^{2+}は、筋小胞体（Sarcoplasmic Reticulum; SR）と呼ばれるベシクル中に蓄えられており、筋肉が収縮する際に Ca^{2+}放出チャネルを通して細胞質中へ放出される。一方、筋肉が弛緩するためには、放出された Ca^{2+}を細胞質中から筋小胞体内腔へと戻す必要があり、その輸送を行う膜蛋白質が筋小胞体カルシウムポンプ(Ca^{2+}-ATPase あるいは Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase 1; SERCA1)である。

表 3-1 に示すように、細胞内外での各種のイオン濃度は大きく異なっている。筋細胞においても、細胞質中に存在する Ca^{2+}イオンの濃度は、筋小胞体中の濃度と比較して約 10^4 倍も少ない。従って、カルシウムポンプは濃度勾配に逆らって Ca^{2+}を輸送しており、ATP を加水分解することによって生じたエネルギーを使って Ca^{2+}の輸送を可能にしている（このような輸送を能動輸送と呼ぶ)。一方、Ca^{2+}放出チャネルによる Ca^{2+}の輸送は濃度勾配に従って行われるため、外部からのエネルギーを必要としない（受動輸送と呼ばれる)。このように生体膜を隔てたイオンの物質輸送を行う膜蛋白質としてはチャネルとポンプの 2 種類が存在し、その機能や構造は大きく異なっている。

表 3-1. 筋細胞内外のイオン濃度の比較

種類	細胞内濃度(mM)	細胞外濃度(mM)
Na^+	10	110
K^+	120	2.5
Ca^{2+}	10^{-4}	1.8
Mg^{2+}	1	1

カルシウムポンプは、イオンの能動輸送を行うイオンポンプ(P 型 ATPase)の一つであり、その構造と機能に関して膨大な実験データが蓄積されている。他にも代表的なイオンポンプとしては、ナトリウムカリウムポンプやプロトンカリウムポンプなどが存在する。例えば、ナトリウムカリウムポンプは、ATP1 分子の加水分解によるエネルギーを用いて、3 つの Na^+を細胞外に運び 2 つの K^+を細胞内に運んでいる。

このようなイオンポンプの酵素反応は、E1/E2 機構[60, 61]と呼ばれる反応機構に基づいて解釈されている。古典的なモデルにおいては、E1 状態は Ca^{2+}と強い親和性を持

ち、その Ca^{2+}結合部位が細胞質側からアクセス可能である状態として定義されている。一方、E2 状態は Ca^{2+}との親和性が低く、Ca^{2+}結合部位が小胞体内腔からアクセス可能な状態であるとされている。この酵素反応をより詳しく調べると、図 3-1 に示したように、少なくとも 8 つの反応中間体が必要であることがわかった[62]。反応サイクルの途中で自己リン酸化が起こることは、カルシウムポンプやナトリウムカリウムポンプなどを含む P 型 ATPase[63]に共通な性質であり、図 3-1 に含まれる E1P や E2P は ATP によってカルシウムポンプの Asp351 が自己リン酸化された状態を示している。

図 3-1. E1/E2 モデルに基づくカルシウムポンプの反応機構

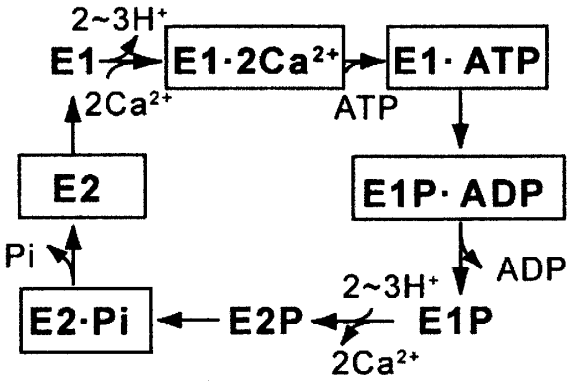
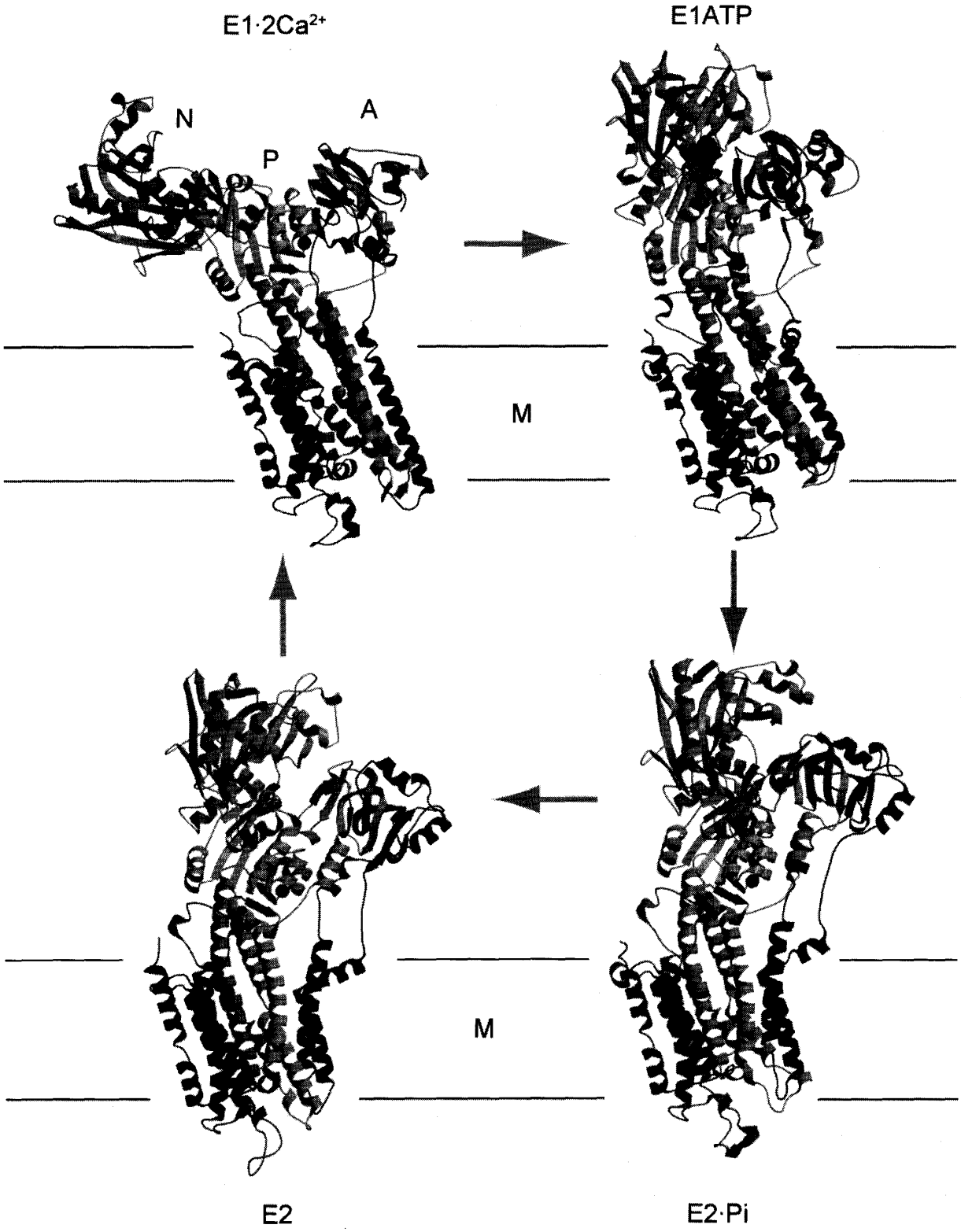


図 3-1 に示した反応中間体の中で、四角で囲まれた 5 つの中間体に相当する立体構造[28, 64-68]が、豊島らによる X 線結晶構造解析により解かれた。このうち、E1·ATP と E1P·ADP に相当する立体構造はほとんど同一であったため、構造的には反応サイクルは図 3-2 に示す 4 つの基本状態からなると考えて良い。この図を見てまず気がつくことは、反応サイクル中でカルシウムポンプがその立体構造を大きく変化させていることであろう。このような大きな構造変化が Ca^{2+}を能動輸送するために果している役割は、原子レベルでの立体構造解析が行われて初めて明らかになった。その詳細に関しては、原論文[28, 64-68]および最近の総説[69, 70]を参照されたい。

筋小胞体カルシウムポンプは、994 残基のアミノ酸からなる 1 本鎖の分子量 11 万の比較的大きな膜蛋白質であり、10 本の膜貫通ヘリックス（M1－M10）と 3 つの大きな細胞質ドメインからなる（図 3-2 参照）。細胞質ドメインには、その役割から、A (actuator)、N (nucleotide-binding)、P (phosphorylation)という名前がついている。P ドメインはリン酸化部位である Asp351 を、N ドメインは ATP の塩基部分が結合する部位を含む。一方、A ドメインは βシートを多く含む小さなドメインであり、その役割は最近まで明らかではなかった。しかし、このドメインが、膜内イオン通路のゲート開閉の作動装置(actuator)として重要な役割をしていることが 4 つの結晶構造の比較により明らかになった。

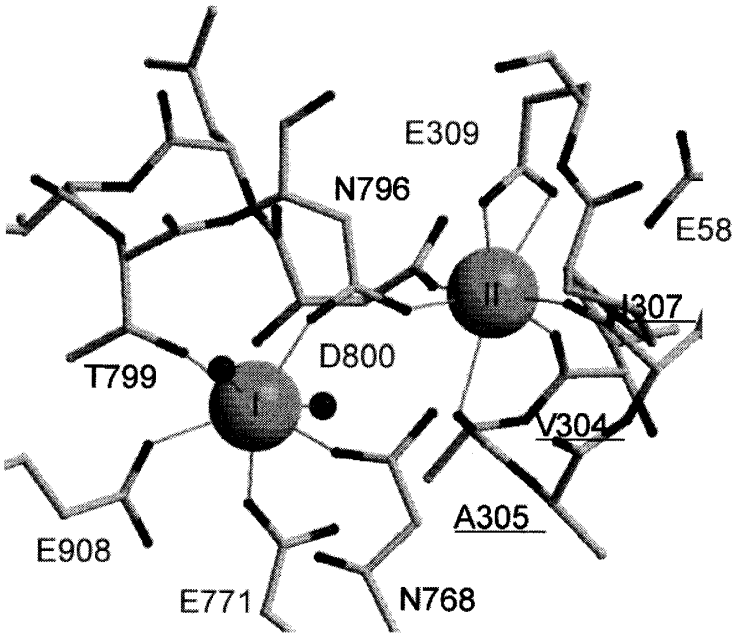
図 3-2. 筋小胞体カルシウムポンプの反応サイクルにおける 4 つの基本構造 [28, 64-66]



A, N, P はそれぞれ、Actuator, Nucleotide-binding, Phosphorylation domain を示す。また、脂質二重膜に相当する領域 (M) を 2 本の直線で表現してある。E1·2Ca^{2+}、E1·ATP, E2·P_i, E2 などは図 3-1 の反応中間体に相当する。

X 線結晶構造解析は、さらに、カルシウムポンプに結合する基質（Ca^{2+}、ATP、ADP、Pi）の結合様式を原子レベルで明らかにした。ここでは、次節以降で関係するため、膜貫通ドメイン内に存在する 2 つの Ca^{2+}結合部位の構造に関してのみ紹介する（図 3-3）。この 2 つの結合部位には、それぞれ、Site I と Site II という名前がついている。Site I は、最初に結合する Ca^{2+}の結合部位であり、Asn768 (M5)、Glu771 (M5)、Thr799 (M6)、Asp800 (M6)、Glu908 (M8)の側鎖の酸素原子と、2 つの水分子によって形成されている。2 個目の Ca^{2+}が結合する Site II は、Val304 (M4)、Ala305 (M4)、Ile307 (M4)の主鎖のカルボニル酸素原子と、Glu309 (M4)、Asn796 (M6)、Asp800 (M6)の側鎖の酸素原子によって構成され、Ca^{2+}結合蛋白質によく見られる EF-hand 構造とよく似た配置をしている。Glu309 の 2 つの酸素原子が Site II で Ca^{2+}に配位していることを考慮すると、Site I と Site II のいずれも Ca^{2+}結合蛋白質で最もよく見られる 7 配位[71]をとっていることがわかった。また、これらの Ca^{2+}結合アミノ酸残基は、既に報告されている部位特異的アミノ酸置換の結果[72, 73]を完全に説明できるものであった。

図 3-3. カルシウムポンプ (E1·2Ca^{2+}) における Ca^{2+}結合部位の立体構造



2 つの大きな球は配位された 2 つの Ca^{2+}を示し、2 つの小さな球は Site I の Ca^{2+}に結合している 2 つの水分子を示す。

3.2. カルシウムポンプの分子動力学計算

3.2.1. 膜蛋白質・脂質二重膜複合体の作成

脂質二重膜と溶媒を露に含む膜蛋白質の分子動力学計算を実行するためには、まず、X 線結晶構造解析により決定された膜蛋白質の立体構造を、分子動力学計算で平衡化された脂質二重膜に埋めこむ必要がある。この際、できるだけエネルギー的に安定な初期モデルを作成することが望ましい。我々が最も初期に行ったカルシウムポンプの分子動力学計算では、この初期モデルの構築が上手くいかなかった為に、計算の初期で脂質二重膜が大きくゆがみ、カルシウムポンプの構造も X 線結晶構造から大きくずれてしまった。その後、様々な試行錯誤を経て、一定の手順を踏むことにより、長時間の分子動力学計算に耐えうる信頼性の高い初期モデルを構築できるようになった。この手法は、他の膜蛋白質の分子動力学計算にも有効であると考えられるため、ここで紹介したい。また、この手法は B. Roux らによって提案されていた手法を参考に、我々独自のソフトウェアを開発することにより実現させた。

まず、初めに考慮することは、計算で用いる脂質分子の選択である。既に述べたように、生体膜の構造や物性は脂質分子の化学的な性質によって異なっている。そのため、膜蛋白質の構造安定性や機能の効率も周囲の脂質分子の構成に依存する。特に、カルシウムポンプに関しては、その生理的機能は脂質分子に含まれる脂肪酸の長さに大きく依存し、DOPC を用いた脂質二重膜中で最も高い活性を示す [13] ことが知られていた。そこで、我々は、カルシウムポンプの立体構造を、NPAT アンサンブルを用いた分子動力学計算によって平衡化された DOPC 二重膜中に埋め込むことにした。その際に重要だったのは以下の 3 点である。

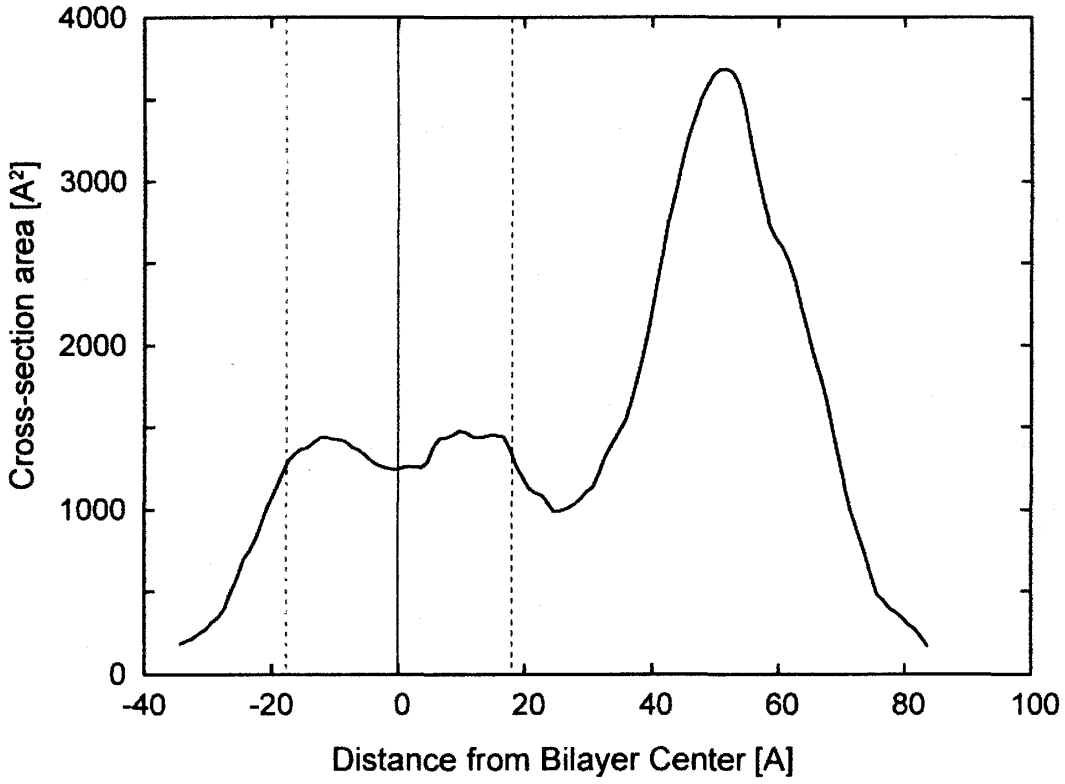
(1) 膜蛋白質の膜貫通部位を正しい位置と配向で脂質二重膜に挿入すること。

一般に、膜蛋白質における膜貫通部位は脂質分子の脂肪酸部分と安定に相互作用するために、疎水性のアミノ酸を数多く含んでいる。また、溶媒と脂質分子が接する界面近傍には、芳香族アミノ酸(Tyr と Trp)や正に帯電したアミノ酸(Arg と Lys)を多く含む特徴的なアミノ酸配列が存在すること [74] も指摘されている。このようなアミノ酸配列の特徴と立体構造の情報を元に、多くの膜蛋白質における膜貫通部位の位置と配向は容易に予測できる。しかし、カルシウムポンプの場合の場合には、アミノ酸配列や構造からは膜貫通部位の位置を正確に予測することは困難であり [75]、複数の候補が存在していた。そこで、我々は、複数の初期モデルを実際に試した上で、複数の結晶に見られる対称性を用いてカルシウムポンプの膜貫通部位の位置と配向を決定した。

(2) 膜蛋白質を脂質二重膜に挿入する前後で体積変化が生じないこと。

膜蛋白質を脂質二重膜に挿入したモデルを作成する際に、膜蛋白質の膜貫通部位と幾つかの脂質分子の原子位置に重なりが生じるため、重なった脂質分子（や溶媒）をモデルから取り除く必要がある。この時、取り除く脂質分子の数を決定するためには、何らかの指針が必要である。我々は、膜蛋白質の脂質二重膜への挿入の前後でできるだけ体積変化が生じないようにするという指針を用いた。その際、膜蛋白質に関しては、図 3-4 に示したように、脂質二重膜と平行な平面でスライスした面における断面積を二重膜の上層と下層に対応する領域に関して積分することにより体積を計算した。一方、脂質分子に関しては、既に分子動力学計算によって脂質 1 分子あたりの体積が得られているのでこの値を利用した。取り除く脂質分子は、カルシウムポンプとの原子の重なりの数が多い順番に決定した。

図 3-4. 脂質二重膜と平行な平面でスライスしたカルシウムポンプ (E1·2Ca^{2+}) の断面積



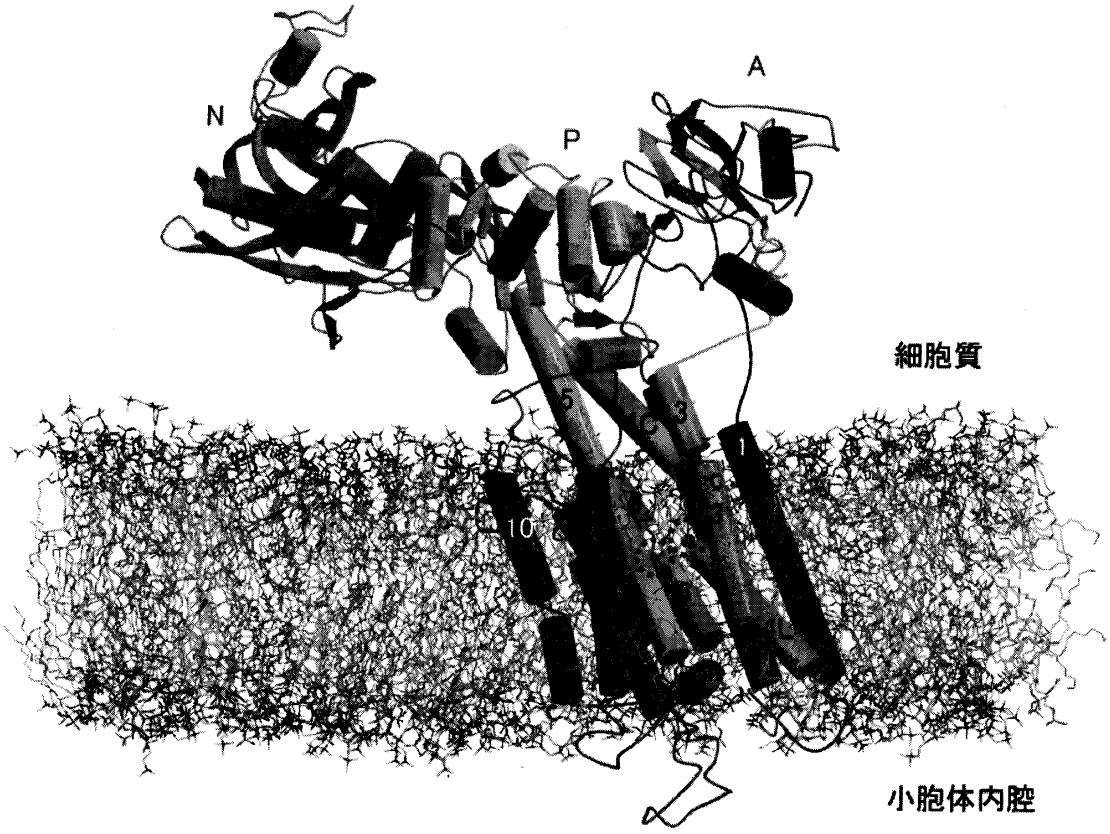
DOPC の X 線散乱プロファイルにおける 2 つのピークに点線を、脂質二重膜の中心(Z=0) に実線を引いた。

(3) エネルギー的にできるだけ安定な脂質二重膜・膜蛋白質複合体を作成すること。

上記のようにして作成した脂質二重膜・膜蛋白質複合体には実はまだかなり多くの原子の重なりが残っている。そこで我々は、カルシウムポンプの近傍の脂質分子につ

いて、分子全体を剛体としてみなして、その位置の最適化を実行した。次に、それ以外の原子に関しては強い拘束条件をかけてエネルギー極小化を実行し、膜蛋白質近傍の脂質分子の構造に関して最適化した。この後さらにもう一度、膜蛋白質近傍の脂質分子の位置を最適化することにより、初期モデルに含まれる原子の重なりをほぼゼロにすることができた。図 3-5 にこのようにして得られた初期モデルを示す。

図 3-5. 脂質二重膜中におけるカルシウムポンプ (E1·2Ca^{2+})

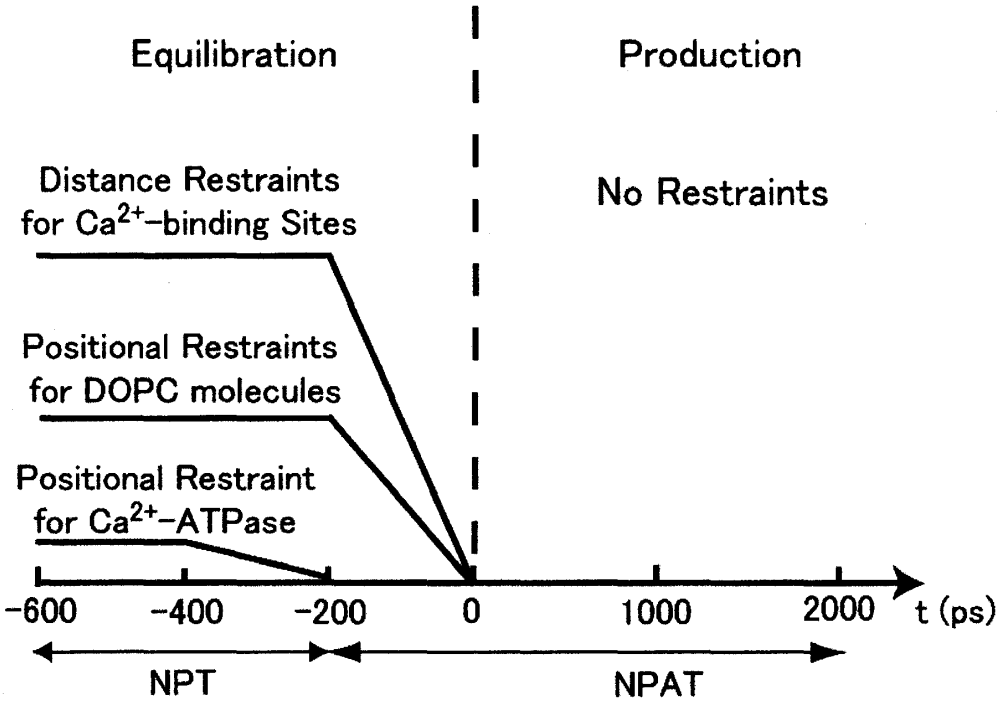


Ca^{2+}は点線で囲んであり、A、 P、 N はそれぞれ細胞質ドメインの名称である。分子動力学計算では周期境界条件を用いているため、カルシウムポンプと DOPC 二重膜を含む直方体は溶媒分子で満たされているが、図では省略してある。

3.2.2. カルシウムポンプの動力学

こうして得られた初期モデルを用いて、カルシウムポンプの分子動力学計算を実行した。この系が熱平衡に達するまでの間に、カルシウムポンプや脂質二重膜の構造に急激な変化が生じないように、図 3-6 に示したような拘束条件を用いた。また、計算の初期には、NPAT アンサンブルではなく NPT アンサンブルを用いた。その理由は、膜蛋白質を加えたことで、脂質分子の表面積に若干の変化が生じる可能性があるからである。実際には、NPT アンサンブルを用いた 400 ピコ秒の間には、脂質分子の表面積には約 2 (Å^2) 程度の小さな変化しかみられなかった。

図 3-6. 系を平衡化するためのスケジュール

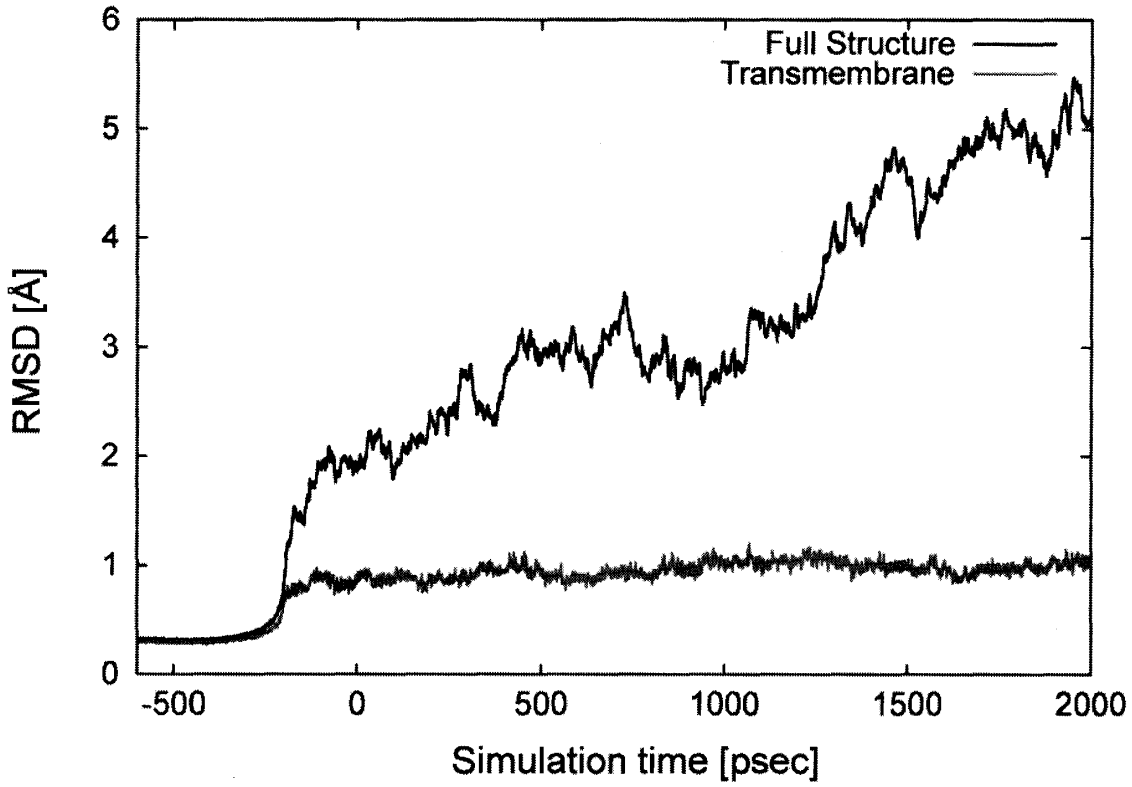


平衡化においては、カルシウムポンプの原子位置に関する拘束、カルシウムの配位に関する距離の拘束、脂質分子の頭部の Z 座標に関する拘束を課した。

この計算におけるカルシウムポンプの Cα原子の初期構造（X 線結晶構造）からの構造変化(RMSD)の時間変化を図 3-7 に、全体構造と各構造要素（ドメイン）の RMSD の平均値を表 3-2 に示した。図 3-7 から分かるように、カルシウムポンプの全体構造は、2 ナノ秒では平衡に達しておらず初期構造から大きく変化し続けている。しかし、膜貫通ヘリックスの構造は初期構造から 1(Å) 程度しかずれておらず、分子動力学計算の間非常に安定であったことがわかった。また、各膜貫通ヘリックスの Z 軸に対する角度は初期構造からほとんど変わっていなかった。また、表 3-2 からわかるように、

3 つの水溶性ドメイン(A、 N、 P) の構造に関しても、表 3-2 に示したように 2 ナノ秒の動力学計算の間、安定に存在していた。

図 3-7. X 線結晶構造からの Cα原子の RMSD の変化



黒線はカルシウムポンプ全体の、灰色の実線はカルシウムポンプの膜貫通部位のみの RMSD を示す。

表 3-2.　X 線結晶構造からの Cα原子の RMSD の平均値*

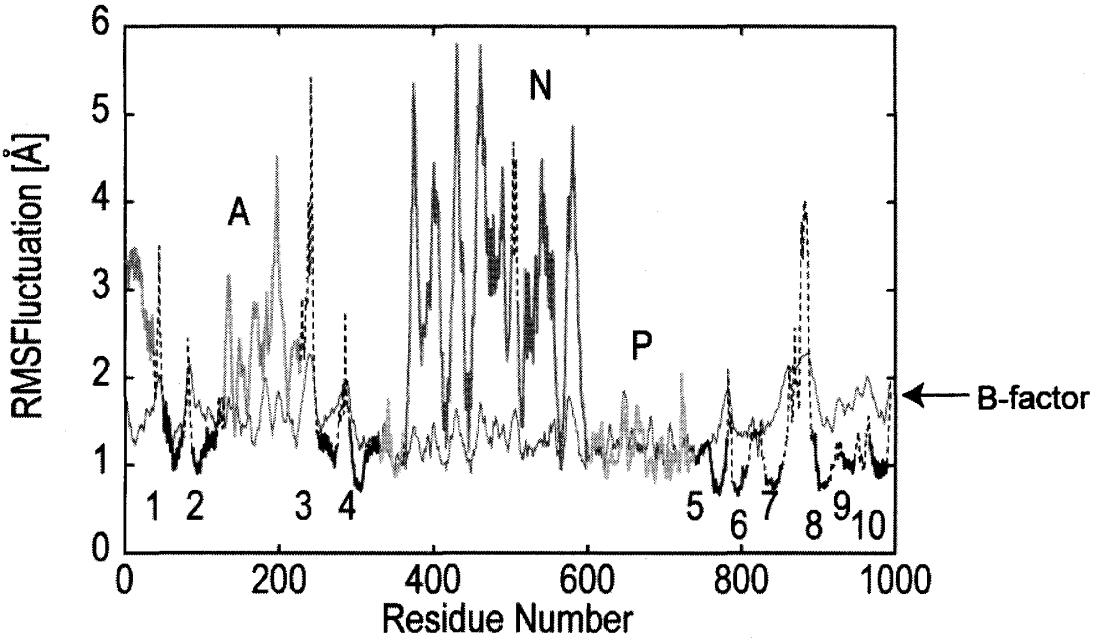
	水溶性ドメイン			膜貫通ドメイン		
Full Structure	A-domain	N-domain	P-domain	M1-M10	M4-M6、M8	M7-M10
3.46± 0.99	1.39± 0.15	1.51± 0.11	1.18± 0.17	0.96± 0.07	0.78± 0.09	0.70± 0.07

* 平衡化後の 2 ナノ秒間の構造スナップショットに関する平均

次に各アミノ酸残基の原子揺らぎ (RMS fluctuation) を調べてみよう。　図 3-7 に

示したように、10 本の膜貫通ヘリックスと、P ドメインに含まれる残基の原子揺らぎは非常に小さい。既に示した表 3-2 と合わせて考えると、これらの構造要素は分子動力学計算中も非常に硬く、あまり初期構造から動いていないことがわかる。一方、A ドメインと N ドメインは、ドメイン内の構造は初期構造から変化していないにも関わらず（表 3-2)、原子揺らぎは非常に大きかった。A ドメインと P ドメインは、ドメイン内の構造を保持したまま剛体として大きな相対運動をしているのである。さらに、詳しいカルシウムポンプの分子運動に関する研究は現在も進行中である。

図 3-8. 分子動力学計算で得られたカルシウムポンプの Cα原子の揺らぎ



太線は分子動力学計算により得られた Cα原子の揺らぎ(RMS fluctuation)を示す。一方、細線は結晶構造解析による B-factor である。A、 N、 P は各水溶性ドメインのアミノ酸配列における位置を、1-10 の数字は、10 本の膜貫通ヘリックスの位置を示す。

3.2.3. カルシウムポンプのプロトン対抗輸送

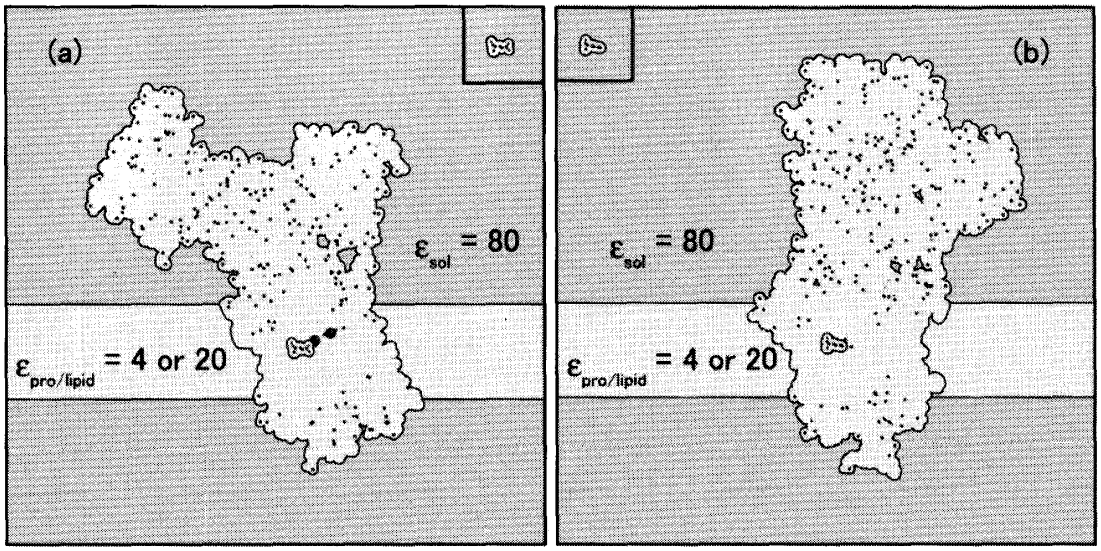
最後にこれまでの理論計算によって明らかになってきたカルシウムポンプの機能に関する新しい知見を紹介する。ここでもう一度、カルシウムポンプの反応サイクル（図 3-1）に戻ってみよう。この図に示すように、カルシウムポンプは、ATP1 分子の加水分解のエネルギーを利用して、細胞質中の 2 個の Ca^{2+}を取り込み筋小胞体内腔へと放出する。一方、この酵素反応サイクルの中で、筋小胞体中のプロトンを細胞質中へと逆輸送する（プロトン対抗輸送）[76, 77]。カルシウムポンプの立体構造が X 線結晶構造解析によって解かれたことにより、その Ca^{2+}の結合に関しては原子レベルで

の理解が進んだ。しかし、X 線結晶構造解析ではプロトンの位置は決定することができないため、プロトン対抗輸送に関する知見を得ることはできなかった。一方、我々が行っている全原子モデルでの分子動力学計算では、水素原子も露に取り扱っているため、この問題を直接議論できるのではないかと考えた[31, 34]。

しかし、我々が行っているのは古典力学に基づく分子動力学計算であるため、第一原理的にカルシウムポンプに結合しているプロトンの数を計算することはできない。そこで、我々は連続体モデルを用いた静電エネルギー計算[78-81]をまず初めに実行することによって、カルシウムポンプに結合するプロトンの数を推定した。複数のプロトンの配置を仮定した個々の場合について分子動力学計算を実行し、その構造安定性を調べるという方針を用いた。

図 3-9 に、静電エネルギー計算で用いた連続体モデルを示す。このモデルでは、蛋白質の原子に関してのみ全原子モデルを用い、周囲の溶媒や脂質二重膜に関しては一定の誘電率を仮定した連続体として取り扱う。この計算では、揺らぎの大きい溶媒に関しては通常 80 という大きな誘電率が用いられるが、蛋白質や脂質分子の揺らぎは溶媒分子と比較してやや小さいため、通常 4 から 20 までの様々な誘電率が仮定されていた。そこで、カルシウムポンプと脂質二重膜に関しては 4 と 20 の 2 つの異なる誘電率を仮定して計算した。

図 3-9. 連続体モデルによる取り扱い

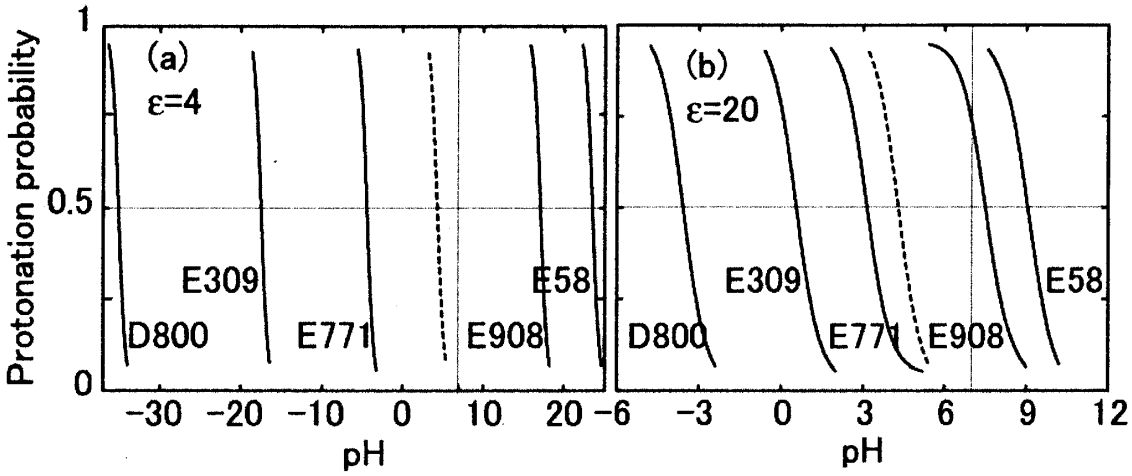


静電エネルギー計算で用いた連続体モデル ((a) カルシウムポンプの E1·2Ca^{2+}状態、(b) カルシウムポンプの E2 状態)。溶媒と脂質二重膜は固有の誘電率を持つ連続体として近似した。

図 3-10 に、連続体モデルを用いた静電エネルギー計算を行うことによって得られたカルシウムポンプの Ca^{2+} 結合部位近傍にある 5 つの荷電アミノ酸残基の滴定曲線を示す。蛋白質と脂質二重膜に関して仮定した誘電率によって見かけの p*K*a 値（プロトン化率が 50%になる pH の値）が大きく異なっているものの、水溶液中の Glu の滴定曲線と比較すると、Glu58 と Glu908 の 2 つのアミノ酸残基の滴定曲線のみが大きく右にシフトしていることがわかる。すなわち、pH が中性の付近では、この 2 つのアミノ酸残基のみがプロトン化しており、他の 3 つのアミノ酸はプロトン化していないことがわかる。

この結果を図 3-4 に示した Ca^{2+}結合部位の結晶構造を用いて考察する。この立体構造で、Glu58 と Glu309 の側鎖の酸素原子同士と、Glu771 と Glu908 の側鎖の酸素原子と非常に近い位置に存在していた。これは、2 価の正の電荷を持つ Ca^{2+}を疎水的な環境である膜貫通領域内で結合するために、多くの負の電荷を帯びた酸素原子が Ca^{2+}の周りに凝集する必要が生じていたからである。Glu58 と Glu908 がプロトン化することによりさらに側鎖の間にも水素結合ができ、Ca^{2+}結合部位の構造はより安定になると予想される。

図 3-10. 静電エネルギー計算によって得られたカルシウムポンプ (E1·2Ca^{2+}) に含まれる 5 つの荷電アミノ酸残基の滴定曲線



(a) カルシウムポンプと脂質二重膜の誘電率を 4、溶媒の誘電率を 80 と仮定した静電エネルギー計算の結果、(b) カルシウムポンプと脂質二重膜の誘電率を 20、溶媒の誘電率を 80 と仮定した計算結果。点線は、水溶液中での Glu の滴定曲線を示す。

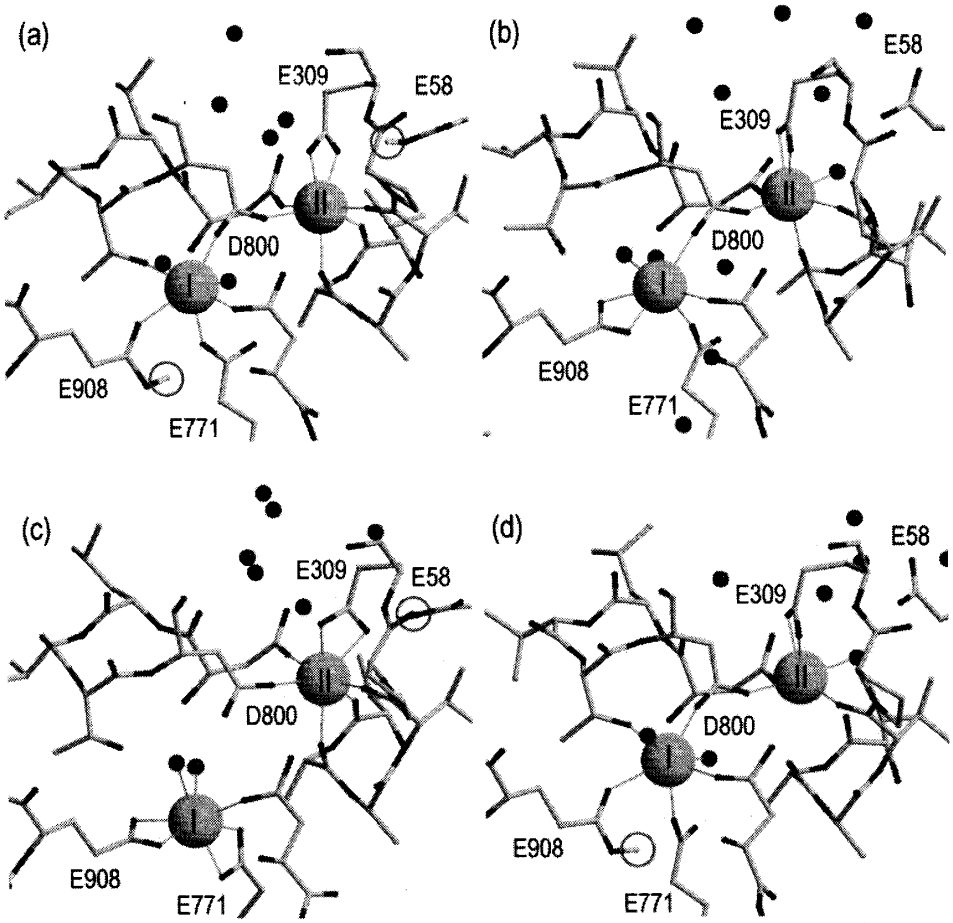
そこで、我々は実際に以下に示す 4 つの異なるプロトン化状態を持つ構造を作成し、それぞれに関する全原子分子動力学計算を実行した。

(a) Glu58 と Glu908 をプロトン化する

(b) いずれの残基もプロトン化しない。
(c) Glu58 のみをプロトン化する
(d) Glu908 のみをプロトン化する

600 ピコ秒の平衡化の後で 2 ナノ秒の分子動力学計算を実行した結果得られた最終構造を図 3-11 に示す。まずモデル(a) では 2 つの Ca^{2+}結合部位の構造は、X 線結晶構造解析によって得られたものとほとんど同一であった。この結果は、既に述べた連続体モデルを用いた静電エネルギー計算の結果と一致している。一方、モデル(b)では高々2 ナノ秒の分子動力学計算の間に 2 つの結合部位の Ca^{2+}配位が大きく変化した。図 3-11 では Site II の変化はそれほど大きなものには見えないが、Glu58 がプロトン化されていないため、細胞質側から進入した水分子が結合部位を攻撃していることに注意されたい。

図 3-11. 分子動力学計算で得られた Ca^{2+}結合部位の最終構造 (E1·2Ca^{2+}状態)



2 ナノ秒後の Ca^{2+}結合部位の構造。(a)-(d)はそれぞれ本文中の 4 つのモデルに対応する。プロトンに関しては○で囲った。

さらに、モデル(c)やモデル(d)などのように一つの残基しかプロトン化していないモデルでは、モデル(c)における Site I やモデル(d)における Site II のようにプロトン化されていない残基を含む結合部位が初期構造から大きく変化していた。これらの結果をまとめると、Glu58 と Glu908 の両方のアミノ酸残基のプロトン化が、Ca^{2+}結合部位の構造安定性に重要な役割を果していることが結論される。

それでは、カルシウムが結合していない E2 状態におけるアミノ酸残基のプロトン化状態はどうであろうか？E2 状態に関しては、既に膜貫通部位に結合するカルシウムポンプの強い阻害剤である thapsigargin (TG)を結合した E2(TG)状態に関する X 線結晶構造[64]が得られていたが、分解能がやや低くカルシウムポンプの周囲に存在する水分子に関する構造情報が得られていなかった。しかし、近年、TG と BHQ(2,5-di-tert-butyl-1,4-dihydroxylbenzene)の２つの阻害剤を加えることによって、より分解能の高い X 線結晶構造[34]が解かれ、原子レベルでの理論解析が可能になった。

そこで、我々は新しい E2 構造（E2·(TG+BHQ) 状態）に関しても、E1·2Ca^{2+}状態に関して行ったのと同様の計算手法を試みた[34]。表 3-3 に静電エネルギー計算によって得られた結果を示す。E2 状態では明らかに Glu309、Glu771、Asp800、そして Glu908 の 4 つのアミノ酸残基がプロトン化することにより構造安定性を保っている。このプロトン化状態を持つカルシウムポンプの分子動力学計算によっても、E2 構造における膜貫通部位の立体構造は非常に安定であった。

表 3-3. 静電エネルギー計算によって得られた pH=7 における荷電アミノ酸残基のプロトン化率

Dielectric constant	ε = 4		ε = 20	
State	E1	E2	E1	E2
E58	1.00	0.37	0.97	0.24
E309	0.00	1.00	0.00	1.00
E771	0.00	1.00	0.04	1.00
D800	0.00	1.00	0.00	0.85
E908	1.00	1.00	0.74	0.35

誘電率に関しては、図 3-10 を参照。

それでは、これらの計算結果からカルシウムポンプの機能に関して新しく何がわかったのだろうか？以下の 2 つの点にまとめることができると考えている。

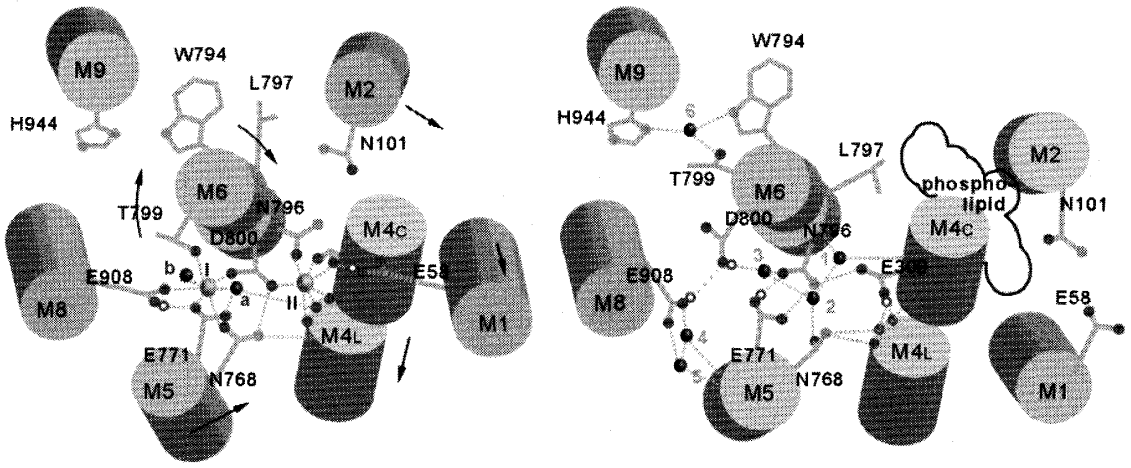
(1) Ca^{2+}脱離後の膜貫通部位の構造安定化機構

従来、カルシウムポンプによる Ca^{2+}の結合と脱離の分子機構は、Ca^{2+}結合状態（E1·2Ca^{2+}）と非結合状態(E2·TG)の膜貫通ヘリックスの立体構造を比較することによって説明されてきた [64]。すなわち、Ca^{2+}の脱離に伴い、図 3-12 に示すように M5 が M1 側にわん曲し、M4 ヘリックスが下がり、M6 ヘリックスが時計回りに回転する。これによって、Ca^{2+}と結合する酸性アミノ酸残基の側鎖間の相対配置を大きく変化させ、カルシウムポンプの Ca^{2+}結合能を低下させている。この解釈は現在でももちろん正しいのであるが、高解像度の E2 構造を用いた理論解析により、この構造変化だけではカルシウムが脱離した後の膜貫通部位の構造安定性を維持することができず、さらに多くプロトン（と水分子）の膜貫通部位への結合が必要であることが分子レベルで明らかになった。

(2) プロトン対抗輸送の生理的意義

我々の解析で示されたカルシウムポンプの酸性アミノ酸残基のプロトン化は、図 3-1 に既に示されている対抗輸送されるプロトンと深い関係があると考えられる。実際、予想されたプロトン化数は E1·2Ca^{2+}状態よりも E2 状態の方が多い。プロトン対抗輸送の詳細を調べるためには、その輸送経路や pH 依存性などまだまだ未知の課題がたくさんあるのだが、我々の解析はそこへの第一歩を示したものといえる。

図 3-12. E1·2Ca^{2+}から E2 への Ca^{2+}の脱離に伴う変化の概念図



膜貫通ヘリックス（シリンダー）と重要なアミノ酸残基を示した。Ca^{2+} (I, II)、水分子 (a-b, 1-6)、プロトンを、薄い球、濃い球、白抜きの球で示した。

4. おわりに

本稿では、主に、脂質二重膜や溶媒分子を露に含んだ全原子モデルを用いた膜蛋白質の分子動力学計算に関して、我々が最近研究している筋小胞体カルシウムポンプを例にとり紹介した。しかし、本文中にも述べたように、脂質二重膜および膜蛋白質の分子動力学計算は、その分子力場パラメタの精度も含めて、まだまだ改良が必要な発展途上の分野である。従って、将来に渡って、ここで我々が紹介した計算手法が使われ続けるかどうかは定かではない。我々はこれまで既に（主に米国のグループによって）開発済みの計算手法を用いてきたが、今後はむしろ我々独自の方法論を発展させることによって、この分野に貢献していきたいと考えている。

また、カルシウムポンプの機能に関する研究に関しても、我々はまだ出発点に立ったところであり、未解決の問題は多い。既に我々は、本文中に述べた計算の数十倍の計算を実行し終えており、長時間の分子動力学計算中のカルシウムポンプの各反応中間体における熱運動の振る舞いに注目している。そして、その熱運動が異なる反応中間体への構造変化とどのように結びついているかを理解していきたいと考えている。イオン自身の輸送を分子動力学計算によって実時間で観測できるチャネルと比較すると、蛋白質の大きな構造変化を伴うポンプのイオン輸送機構の解明は本質的に困難なものではある。しかし、それゆえに残された研究課題もまだまだ多く存在し、その解明には新しい理論的な枠組みの開発も含む様々な研究が必要であろう。我々もその解明に貢献していきたいと考えているが、さらに多くの研究者が全く新しいアイデアを持ちこんで参入してくることがその理解を深めるためには欠かせないと思う。

謝辞

本稿で紹介した脂質二重膜およびカルシウムポンプの分子動力学計算に関する研究は、東京大学分子細胞生物学研究所豊島近教授ならびに横浜市立大学大学院総合理学研究科木寺詔紀教授らと共に行われた。また、カルシウムポンプに関する p*Ka* 計算は、東京大学分子細胞生物学研究所の宮下尚之博士（現ボストン大学）によって行われた。これらの方々に、この場をお借りして御礼申し上げたい。

文献

1. White, S. H. The progress of membrane protein structure determination. Protein Sci. 13, 1948-9 (2004).
2. Agre, P. & Kozono, D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. FEBS Lett. 555, 72-8 (2003).
3. MacKinnon, R. Potassium channels. FEBS Lett. 555, 62-5 (2003).
4. Schmitt, J. P. et al. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. Science 299, 1410-3 (2003).
5. Hopkins, A. L. & Groom, C. R. The druggable genome. Nat. Rev. Drug. Discov. 1, 727-30 (2002).
6. Drews, J. Drug discovery: a historical perspective. Science 287, 1960-4 (2000).
7. Nagle, J. F. & Tristram-Nagle, S. Structure of lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta 1469, 159-195 (2000).
8. Hristova, K. & White, S. H. Determination of the hydrocarbon core structure of fluid dioleoylphosphocholine (DOPC) bilayers by x-ray diffraction using specific bromination of the double-bonds: effect of hydration. Biophys. J. 74, 2419-33 (1998).
9. Nagle, J. F. & Tristram-Nagle, S. Lipid bilayer structure. Curr. Opin. Struct. Biol. 10, 474-480 (2000).
10. Seelig, A. & Seelig, J. The dynamic structure of fatty acyl chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance. Biochemistry 13, 4839-45 (1974).
11. Douliez, J. P., Leonard, A. & Dufourc, E. J. Restatement of order parameters in biomembranes: calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splittings. Biophys. J. 68, 1727-39 (1995).
12. Eldho, N. V., Feller, S. E., Tristram-Nagle, S., Polozov, I. V. & Gawrisch, K. Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acid-differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. J. Am. Chem. Soc. 125, 6409-21 (2003).
13. Lee, A. G. How lipids interact with an intrinsic membrane protein: the case of the calcium pump. Biochim. Biophys. Acta 1376, 381-390 (1998).
14. McCammon, J. A., Gelin, B. R. & Karplus, M. Dynamics of folded proteins. Nature 267, 585-90 (1977).
15. Levitt, M. & Sharon, R. Accurate simulation of protein dynamics in solution. Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 85, 7557-61 (1988).
16. Duan, Y. & Kollman, P. A. Pathways to a protein folding intermediate observed

in a 1-microsecond simulation in aqueous solution. Science 282, 740-4 (1998).
17. Ploeg, v. d. & Berendsen, H. J. Molecular dynamics simulation of a bilayer membrane. J. Chem. Phys. 76, 3271-3276 (1982).
18. Pastor, R. W., Venable, R. M. & Karplus, M. Brownian Dynamics Simulation of a Lipid Chain in a Membrane Bilayer. J. Chem. Phys. 89, 1112-1127 (1998).
19. Venable, R. M., Zhang, Y., Hardy, B. J. & Pastor, R. W. Molecular dynamics simulations of a lipid bilayer and of hexadecane: An investigation of membrane fluidity. Science 262, 223-226 (1993).
20. Anezo, C., Vries, A. H. d., Holtje, H.-D., Tieleman, D. P. & Marrink, S.-J. Methodlogical Issues in Lipid Bilayer Simulations. J. Phys. Chem. B 107, 9424-9433 (2003).
21. Lindahl, E. & Edholm, O. Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers from molecular dynamics simulations. Biophys. J. 79, 426-33 (2000).
22. Berneche, S. & Roux, B. Energetics of ion conduction through the K^+ channel. Nature 414, 73-7 (2001).
23. de Groot, B. L. & Grubmuller, H. Water permeation across biological membranes: Mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. Science 294, 2353-2357 (2001).
24. Doyle, D. A. et al. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. Science 280, 69-77 (1998).
25. Cowan, S. W. et al. Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. Nature 358, 727-33 (1992).
26. Palczewski, K. et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science 289, 739-45 (2000).
27. Ren, G., Reddy, V. S., Cheng, A., Melnyk, P. & Mitra, A. K. Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice. Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 98, 1398-403 (2001).
28. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. & Ogawa, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 A resolution. Nature 405, 647-655 (2000).
29. Locher, K. P., Lee, A. T. & Rees, D. C. The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. Science 296, 1091-8 (2002).
30. Im, W. & Roux, B. Ions and counterions in a biological channel: a molecular dynamics simulation of OmpF porin from E. coli in an explicit membrane with 1 M KCl aqueous salt solution. J Mol Biol 319, 1177-97 (2002).
31. Sugita, Y., Miyashita, N., Ikeguchi, M., Kidera, A. & Toyoshima, C. Protonation

of the acidic residues in the transmembrane cation-binding sites of the ca^{2+} pump. J. Am. Chem. Soc. 127, 6150-1 (2005).

32. Stockner, T., Vogel, H. J. & Tieleman, D. P. A salt-bridge motif involved in ligand binding and large-scale domain motions of the maltose-binding protein. Biophys. J. 89, 3362-71 (2005).
33. Ash, W. L., Zlomislic, M. R., Oloo, E. O. & Tieleman, D. P. Computer simulations of membrane proteins. Biochim Biophys Acta 1666, 158-89 (2004).
34. Obara, K. et al. Inaugural Article: Structural role of countertransport revealed in Ca^{2+} pump crystal structure in the absence of Ca^{2+}. Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 102, 14489-96 (2005).
35. Wiener, M. C., King, G. I. & White, S. H. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. I. Scaling of neutron data and the distributions of double bonds and water. Biophys. J. 60, 568-76 (1991).
36. Wiener, M. C. & White, S. H. Fluid bilayer structure determination by the combined use of x-ray and neutron diffraction. I. Fluid bilayer models and the limits of resolution. Biophys. J. 59, 162-73 (1991).
37. Wiener, M. C. & White, S. H. Fluid bilayer structure determination by the combined use of x-ray and neutron diffraction. II. "Composition-space" refinement method. Biophys. J. 59, 174-85 (1991).
38. Wiener, M. C. & White, S. H. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups. Biophys. J. 61, 428-33 (1992).
39. Wiener, M. C. & White, S. H. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. Biophys. J. 61, 434-47 (1992).
40. Tristram-Nagle, S., Liu, Y., Legleiter, J. & Nagle, J. F. Structure of gel phase DMPC determined by X-ray diffraction. Biophys. J. 83, 3324-35 (2002).
41. Liu, Y. & Nagle, J. F. Diffuse scattering provides material parameters and electron density profiles of biomembranes. Phys. Rev. E 69, 040901 (2004).
42. Kucerka, N. et al. Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using X-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles. Biophys. J. 88, 2626-37 (2005).
43. Nagle, J. F. et al. X-ray structure determination of fully hydrated L alpha phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. Biophys. J. 70, 1419-31 (1996).
44. MacKerell, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and

dynamics studies of proteins. J. Phys. Chem. B 102, 3586-3616 (1998).

45. Feller, S. E. & MacKerell, A. D. An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. J. Phys. Chem. B 104, 7510-7515 (2000).
46. Feller, S. E., Gawrisch, K. & MacKerell, A. D. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: Intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. J. Am. Chem. Soc. 124, 318-326 (2002).
47. Jorgensen, W. L. & Tirado-Rives, J. The OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. J. Am. Chem. Soc. 110, 1657-1666. (1988).
48. Berger, O., Edholm, O. & Jahnig, F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. Biophys. J. 72, 2002-13 (1997).
49. Wang, J., Cieplak, P. & Kollman, P. A. J. Comp. Chem. 21, 1049-1074. (2000).
50. Feller, S. E., Zhang, Y. H. & Pastor, R. W. Computer-Simulation of Liquid/Liquid Interfaces.2. Surface-Tension Area Dependence of a Bilayer and Monolayer. J. Chem. Phys. 103, 10267-10276 (1995).
51. Feller, S. E., Zhang, Y. H., Pastor, R. W. & Brooks, B. R. Constant-Pressure Molecular-Dynamics Simulation - the Langevin Piston Method. J. Chem. Phys. 103, 4613-4621 (1995).
52. Zhang, Y. H., Feller, S. E., Brooks, B. R. & Pastor, R. W. Computer-Simulation of Liquid/Liquid Interfaces.1. Theory and Application to Octane/Water. J. Chem. Phys. 103, 10252-10266 (1995).
53. Ikeguchi, M. Partial rigid-body dynamics in NPT, NPAT and NPγT ensembles for proteins and membranes. J. Comp. Chem. 25, 529-541 (2004).
54. Feller, S. E., Yin, D. X., Pastor, R. W. & MacKerell, A. D. Molecular dynamics simulation of unsaturated lipid bilayers at low hydration: Parameterization and comparison with diffraction studies. Biophys. J. 73, 2269-2279 (1997).
55. Chiu, S. W., Jakobsson, E., Subramaniam, S. & Scott, H. L. Combined monte carlo and molecular dynamics simulation of fully hydrated dioleyl and palmitoyl-oleyl phosphatidylcholine lipid bilayers. Biophys. J. 77, 2462-9 (1999).
56. Feller, S. & Pastor, R. W. Constant surface tension simulations of lipid bilayers: The sensitivity of surface areas and compressibilities. J. Chem. Phys. 111, 1281-1287 (1999).
57. Schlenkrich, M., Brickman, J., MacKerell, A. D. & Karplus, M. in Biological Membranes: A Molecular Perspective from Computer and Experiment (eds.

Merz, K. M., Jr. & Roux, B.) 31-81 (Birkhauser, Boston, MA, 1996).

58. Klauda, J. B., Brooks, B. R., MacKerell, A. D., Venable, R. M. & Pastor, R. W. An ab Initio Study on the Tortional Surface of Alkanes and Its Effect on Molecular Simulations of Alkanes and a DPPC Bilayer. J. Phys. Chem. B 109, 5300-5311 (2005).
59. Benz, R. W., Castro-Roman, F., Tobias, D. J. & White, S. H. Experimental validation of molecular dynamics simulations of lipid bilayers: a new approach. Biophys. J. 88, 805-17 (2005).
60. Alberts, R. W. Biochemical aspects of active transport. Annu. Rev. Biochem. 36, 727-756 (1967).
61. Post, R. L., Hegyvary, C. & Kume, S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 247, 6530-40 (1972).
62. Inesi, G. Rapid kinetic characterization of active transport and passive release of calcium in vesicular fragments of longitudinal and junctional sarcoplasmic reticulum. Braz J Med Biol Res 21, 1241-9 (1988).
63. Møller, J. V., Juul, B. & le Maire, M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. Biochim. Biophys. Acta 1286, 1-51 (1996).
64. Toyoshima, C. & Nomura, H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. Nature 418, 605-611 (2002).
65. Toyoshima, C. & Mizutani, T. Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. Nature 430, 529-535 (2004).
66. Toyoshima, C., Nomura, H. & Tsuda, T. Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. Nature 432, 361-368 (2004).
67. Sørensen, T. L. M., Møller, J. V. & Nissen, P. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. Science 304, 1672-1675 (2004).
68. Olesen, C., Sørensen, T. L., Nielsen, R. C., Møller, J. V. & Nissen, P. Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. Science 306, 2251-5 (2004).
69. Toyoshima, C., Nomura, H. & Sugita, Y. Structural basis of ion pumping by Ca^{2+}ATPase of sarcoplasmic reticulum. FEBS Lett. 555, 106-110 (2003).
70. Toyoshima, C. & Inesi, G. Structural basis of ion pumping by Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Ann. Rev. Biochem. 73, 269-292 (2004).
71. Harding, M. M. Geometry of metal-ligand interactions in proteins. Acta. Crystallogr. D 57, 401-11 (2001).

72. Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G. & Maclennan, D. H. Location Of High-Affinity Ca^{2+}-Binding Sites Within The Predicted Transmembrane Domain Of The Sarcoplasmic-Reticulum Ca^{2+}-Atpase. Nature 339, 476-478 (1989).
73. Rice, W. J. & MacLennan, D. H. Scanning Mutagenesis Reveals a Similar Pattern of Mutation Sensitivity in Transmembrane Sequences M4, M5, and M6, but Not in M8, of the Ca^{2+}-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum (SERCA1a). J. Biol. Chem. 271, 31412-31419 (1996).
74. Killian, J. A. & von Heijne, G. How proteins adapt to a membrane-water interface. Trends Biochem. Sci. 25, 429-34 (2000).
75. Lee, A. G. Ca^{2+}-ATPase structure in the E1 and E2 conformations: mechanism, helix-helix and helix-lipid interactions. Biochim. Biophys. Acta 1565, 246-66 (2002).
76. Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J. L. & Inesi, G. H^+ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump in reconstituted proteoliposomes. Biophys. J. 64, 1232-42 (1993).
77. Yu, X., Hao, L. & Inesi, G. A pK change of acidic residues contributes to cation countertransport in the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Role of H^+ in Ca^{2+}-ATPase countertransport. J. Biol. Chem. 269, 16656-61 (1994).
78. Bashford, D., Karplus, M. & Canters, G. W. Electrostatic effects of charge perturbations introduced by metal oxidation in proteins. A theoretical analysis. J Mol Biol 203, 507-10 (1988).
79. Bashford, D. & Karplus, M. p*K*a's of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. Biochemistry 29, 10219-25 (1990).
80. You, T. J. & Bashford, D. Conformation and hydrogen ion titration of proteins: a continuum electrostatic model with conformational flexibility. Biophys. J. 69, 1721-33 (1995).
81. Bashford, D. Macroscopic electrostatic models for protonation states in proteins. Frontiers in Bioscience 9, 1082-1099 (2004).