

令和元年6月11日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05526

研究課題名(和文) 生体反応とカップルする大規模構造変化のためのマルチレゾリューション法構築

研究課題名(英文) Development of multi-resolution methods for large conformational changes coupling with biological reactions

研究代表者

岩橋 千草(小林千草)(IWAHASHI, Chigusa)

国立研究開発法人理化学研究所・計算科学研究センター・研究員

研究者番号：30442528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、生体機能に重要な役割を持つタンパク質の大規模な構造変化の解析手法の開発を目的とする。代表者はドメイン運動を効率的にサンプル可能な粗視化モデルを開発し、様々なタンパク質に適用可能なモデルへと発展させた。また、レアイベントサンプリング手法を使い、単体の分子動力学法(MD)計算では計算困難な長時間過程の反応経路を解析可能とした。粗視化モデルとレアイベントサンプリングを組み合わせる手法も開発した。これらの結果は国際的な学術誌に発表(一部準備中)し、発表済みの部分は所属チームで開発中のMDプログラムの新機能としてフリーソフトとして公開した。その他の部分も発表後公開予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の大規模な構造変化は様々な生体機能の発現に利用されており、重要な研究課題の一つである。本研究課題は、従来のシミュレーションにおける空間・時間的困難を克服し、タンパク質の大規模構造変化とカップルする生体内化学反応の解析を可能とする。この課題で開発されたシミュレーション手法を用いる事で、重要な生体機能に関わるタンパク質の反応解析を可能とする。開発された手法や手順の多くをフリーウェアとして一般に公開し、他の研究者にも利用可能とした。生体機能に関わるタンパク質の反応の解析は、薬剤やタンパク質変異体の生体機能への影響の理解に繋がり、医学、薬学分野への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：I aimed to develop analysis methods for large conformational changes of proteins that play important roles in biological functions. I have developed a coarse-grained (CG) model capable of efficiently sampling domain motion and extended the model to be applicable in membrane proteins and multi-domain proteins. In addition, a rare event sampling method is introduced to analyze a reaction pathway of a long-time process that is difficult to calculate by single molecular dynamics (MD) simulation. I have also developed a scheme to calculate the rare event sampling using the CG model. These results were published (partly in preparation) in international journals. Furthermore, it was released to the public as new functions of MD software developed by the team that I belong to.

研究分野：生物物理

キーワード：分子動力学法(MD) 粗視化モデル レアイベントサンプリング ドメイン運動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分光実験の発展により、生体反応においてタンパク質の大規模な構造変化が重要であることが明らかになりつつある。タンパク質は硬いドメインと、ドメインを繋ぐ柔らかいリンカーからなり、その大規模な構造変化はドメイン運動である。しかし、複数のドメインを持つ大規模なタンパク質では、反応中間体や反応中途の詳細な構造情報を得ることは実験的に困難である。そこで、近年では、分子動力学(MD)法計算によりタンパク質の運動を計算機により直接観測する研究が広く行われている。特に、超並列計算機や GPGPU(General-purpose computing on graphics processing units)の利用により、MD で適用可能な時間範囲が飛躍的に増加している。また、米国の D. Shaw らが開発した専用 MD 計算機 Anton はシングルドメインの小さなタンパク質の folding などミリ秒レベルの計算が可能となった。しかし、その一方で、マルチドメインタンパク質の大規模構造変化は 10 ミリ秒以上の遅い運動であり、溶媒や生体膜などをあらわに取り扱った全原子モデル MD 計算で直接的に観測することは未だに不可能である。代表者は、従来の方法では困難であった遅いドメイン運動を解析するシミュレーション手法を開発することを目的としている。主には(1) ドメイン運動解析によるマルチドメインの膜タンパク質の解析 (2) (1)の手法を用いて得られたドメイン運動の情報を力場パラメータに用いるを粗視化モデルの開発を行った。これらの研究を進展させ、マルチドメインタンパク質の大規模構造変化を解析するマルチレゾリューション法の構築を目的とする。

2. 研究の目的

タンパク質が関わる生体機能の多くでは、反応による大規模な構造変化が重要な役割を持つ。本課題は、従来の MD 計算では観測が不可能である膜タンパク質やマルチドメインタンパク質の大規模構造変化を解析するシミュレーション手法の構築を目的とする。特に、生体機能に重要な生体内反応のメカニズムを解明することを目的とする。特に異なる化学条件で、反応経路にそった構造変化を解析することにより、化学反応が引き起こす局所的な配位の変化がどのように大規模なタンパク質のドメイン運動へと伝達していくのかを明らかにする。化学反応が生体機能へと統合されるモデルの作成を目指す。代表者は、以前の研究で、ドメイン運動解析ツールから得られたドメイン分けやドメイン運動の大きさをを用いて粗視化モデルのパラメータを決定する手法を開発した。このモデルを進展させ、生体反応における反応状態間の構造遷移を解析可能な粗視化モデルを開発する。更に、これらのモデルを利用したサンプリング手法を開発し、反応状態間を繋ぐ大規模構造変化を解析可能とする。

3. 研究の方法

(1) 大規模構造変化観測のための粗視化モデル

代表者は、大規模構造変化を観測するため、以下の粗視化モデルの開発、または既存のモデルを所属チームで開発中の MD プログラム GENESIS に導入した。

反応状態間をサンプリングする粗視化モデル

代表者はドメイン運動解析ツールから得られた情報から粗視化モデルのパラメータを決定する Domain Motion Enhanced (DoME) モデルを開発した。(Kobayashi *et al. J. Phys. Chem. B* 2015) このモデルはドメイン運動の大きさによりドメイン間の相互作用の大きさを決めるものである。このモデルは、従来の粗視化モデルよりドメイン運動をよりサンプリングできることが利点である。ある状態のポテンシャルを基に別の状態を安定化する相互作用を加える micro-mixing(図 1 上)を行うことで、2 状態間の遷移を記述可能となった。しかし、相互作用の交代を伴うような複雑な構造変化や、3 状態以上の構造変化を扱うことが出来なかった。そのため、それぞれの反応状態をリファレンスに取るポテンシャル同士を exponential で平均化する macro-mixing (Best *et al. Structure* 2005)を DoME モデルに適用した。(図 1 下) DoME モデルやその mixing スキームでは、残基 1 つを最小単位とするものであり、水などの溶媒分子を粒子として MD 計算では露わに考慮にいれない。

macro-mixing パラメータ精製手法

複数のポテンシャルを混ぜ合わせる macro-mixing では、パラメータによって状態間のバリアの高さ、エネルギー差が変化する。その結果、得られる構造変化の様相が依存する。そこで、目指す構造変化の時間スケールや状態間のエネルギー差を与えるモデルを得るためのパラメータ精製手法を開発した。この手法は、Multistate Benette Acceptance Ratio (MBAR)を用いることで、複数のパラメータでの自由エネルギー差を求め、得られた重みから別のパラメータでの自由エネルギー面を推測するものである。

膜ポテンシャル

、で記載したモデルでは、膜タンパク質における膜分子との相互作用は、露に膜分子を考慮に入れず、膜タンパク質の各残基・原子に対して相互作用を陰に取り込んだポテンシャル関

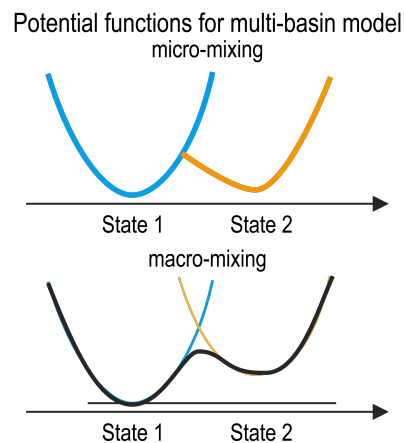


図 1 複数の構造状態を記述するポテンシャル関数

数によって計算する。ポテンシャルは膜面に対して垂直方向と平行方向に分けられている。垂直方向は、膜タンパク質の残基性向（疎水性、位置）から得られた既存の knowledge-base 関数を利用した。平行方向は中心からの距離に対しての平底な形をとったポテンシャルとしている。

全原子粗視化モデル

全原子粗視化モデルは、MARTINI モデルを MD プログラム GENESIS に導入した。

(2) 反応経路の自由エネルギー解析手法
 溶媒も含まれる全原子粗視化モデルや全原子モデルにおいては、単体の MD 計算では反応状態間遷移の観測は不可能である。そこで、最も可能性の高い自由エネルギー経路を直接求める string 法を GENESIS に導入した。この手法は、複数のシミュレーションシステムのコピーを形成し、それぞれを MD 計算により自由エネルギー面上で最適化する。異なるコピーの情報は、経路を更新する時ののみ必要となるため、高い並列効率を示す。反応経路を示す集団変数は、比較的小さな水溶性のマルチドメインタンパク質を用いて、DoME モデルでの試行を行い決定した。主成分解析で得られる固有ベクトルまたは、原子の座標(Cartesian coordinate)が能く構造空間をサンプルすることが分かり、それらを用いた。

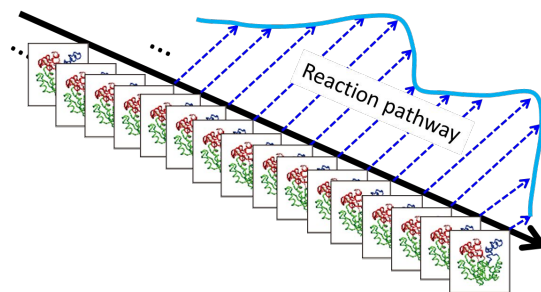


図 2 String method の概念図

更に、得られた反応経路上に沿ってレプリカ交換アンブレラポテンシャル法(REUS)、またはアンブレラサンプリング法(US)を適用することで、反応経路上の自由エネルギー面を求めた。

(3) 脂質二重膜、膜タンパク質の MD 計算

膜分子モデルのポテンシャル関数形は、既存の関数を用いる。力の係数などのパラメータを決定するため、脂質二重膜、脂質二重膜内の膜タンパク質の溶媒を含む全原子モデルの MD 計算を行った。全原子モデルは CHARMM36 力場を用いた。膜タンパク質は、代表的な膜輸送タンパク質であるカルシウムインポンプ(Sarcoplasmic reticulum- Ca^{2+} ATPase)を用いた。カルシウムイオンポンプは、反応サイクル上の 7 つの反応状態について計算を行った。

4. 研究成果

(1) 粗視化モデルによる反応経路の自由エネルギー解析手法

粗視化モデルを用いて、2 つの反応状態間の反応経路を探索し、更に自由エネルギー面を求める手法を GENESIS に導入した。この手法の有効性を確認するために、比較的小さな水溶性のマルチドメインタンパク質である Adenylate kinase の反応状態間の構造変化を解析した。このタンパク質は LID, NMP, CORE という 3 つのドメインを有し、リガンドの結合によって LID と NMP のドメインも開いた Open, 全て閉じた Closed 状態の結晶構造が知られている。(図 3(a)) Open と Close 状態という二つの安定状態間の遷移では 3 つのドメインの構造変化が関わること、マルチドメインタンパク質としてはサイズが小さいことから、これまで多くの理論・実験研究が行われてきた。このことから、タンパク質の反応状態遷移の解析手法の開発において、多く取り上げられているタンパク質である。

反応経路探索とその経路上の自由エネルギー面はそれぞれ string 法と REUS を用いて計算を行った。集団座標は固有ベクトルを用いた。(図 3) また、長時間の MD から得られた自由エネルギー面との比較も行った。その結果、反応経路上の自由エネルギー面は長時間の MD の結果とほぼ同等であった。(図 3(b)) 全計算時間は今回の開発された手法の方が短く、更に複数のレプリカを用いるため、実際の時間も非常に短く結果が得られることが分かった。この一連の反応経路上の自由エネルギー解析の手法が記載された論文を代表者が筆頭筆者として 2017 年に発表した。

主成分解析で得られる固有ベクトルを集団座標として用いる方法は水溶性タンパク質では適切である。しかし、膜タンパク質においては、主成分解

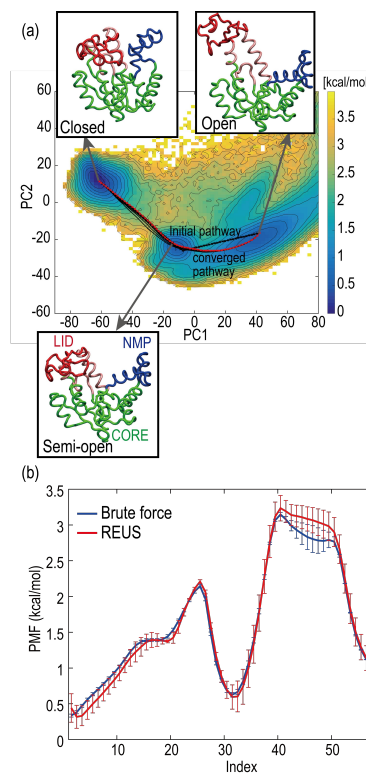


図 3 粗視化モデルによる自由エネルギー解析 (a) string 法計算 (b) string 法で求めた経路に沿った自由エネルギー面 (赤: REUS, 青: MD)

析で行われる構造重ね合わせによって固有ベクトルが実際の運動と対応しない可能性があった。そのため、Cartesian coordinate を集団座標として用いる方法に対して、シミュレーションパラメータやプロトコルの確立を行った。水溶性タンパク質を用いたテストにおいて、Cartesian coordinate を集団座標として求めた自由エネルギー面が固有ベクトルを集団座標としてものと同様の結果を示すことを確認した。

更に、macro-mixing 法については、目指す構造変化の時間スケールや状態間のエネルギー差を与えるモデルを得るためのパラメータ精製手法を開発した。この手法を Adenylate kinase や他のタンパク質に適用し、複数の状態間遷移の観測、解析を行った。macro-mixing 手法のパラメータ精製法とその結果については論文準備中である。

(2) 脂質二重膜、膜タンパク質の MD 計算

膜タンパク質において、タンパク質と膜分子の相互作用は、膜ポテンシャルによって記載される。関数形自体は knowledge-base の既存のポテンシャルを利用するが、相互作用の強さの定数や膜厚などのパラメータは膜分子の種類によって変更が可能となる。そこで、溶媒である水分子、膜分子をすべて考慮に入れた全原子モデルを用い、脂質二重膜や膜タンパクの MD 計算を行った。脂質二重膜の膜厚などのデータを取得した。また、カルシウムイオンポンプの MD シミュレーションでは、膜貫通部位と水溶性ドメインの揺らぎ、膜分子との相互作用などに注目し解析を行った。

(3) MD プログラム GENESIS としての公開

この研究課題で導入されたスキーム、ポテンシャル、方法は MD プログラム GENESIS の機能として、公開済み、もしくは公開準備中である。特に string 法、MARTINI モデルに関しては、GENESIS の新バージョン(GENESIS 1.1)を、2016 年にフリーソフトとして公開した。今課題で開発された macro-mixing 法計算モジュール、パラメータ精製法、膜ポテンシャルに対しては、現在準備中の論文の公開後に新バージョンとして公開予定である。

本課題で開発された手法は、これまででは詳細な全原子モデルを用いた MD 計算では不可能であったマルチドメインや膜タンパク質の構造変化の観測を可能としている。今後は、より巨大なタンパク質、複合体に適用し、よりタンパク質の構造変化を利用して進む反応についてモデルを与えることができると考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. J. Jung, C. Kobayashi, and Y. Sugita, “Optimal Temperature Evaluation in Molecular Dynamics Simulations with a Large Time Step”, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15, pp 84-94 (2019) DOI: 10.1021/acs.jctc.8b00874 (査読有)
2. J. Jung, C. Kobayashi, and Y. Sugita, “Kinetic energy definition in velocity Verlet integration for accurate pressure evaluation”, *The Journal of Chemical Physics*, 148, pp 164109-164109 (2018) DOI: 10.1063/1.5008438 (査読有)
3. C. Kobayashi, J. Jung, *et al.* “GENESIS 1.1: A hybrid-parallel molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms on multiple computational platforms”, *Journal of Computational Chemistry*, 38, pp2193-2206, (2017) DOI: 10.1002/jcc.24874 (査読有)

[学会発表](計 8 件)

1. 小林千草, “Conformational fluctuations and changes of SR-Ca²⁺-ATPase on the E1/E2 transition”, 63rd Annual meeting of the biophysical society (国際学会) (2019)
2. 小林千草, “Molecular dynamics simulations for dissociation of ligands in SR-Ca²⁺-ATPase”, 第 56 回日本生物物理学会年会 (2018)
3. 小林千草, “Molecular Dynamics simulations for conformational changes on a reaction step of Ca²⁺-ATPase”, The biophysical society 62th annual meeting (国際学会) (2018)
4. 小林千草, “Conformational changes of Ca²⁺-ATPase of depicted by hierarchical domain-motion analysis” The 15th International conference on NaK-ATPase and related transport ATPases (国際学会) (2017)
5. 小林千草, “コンピュータシミュレーションによる Ca²⁺-ATPase のリガンド解離に伴う構造変化解析” 日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会 (2017)
6. 小林千草, “Molecular dynamics simulations for conformational changes on E1/E2 transition of Ca²⁺-ATPase” 第 55 回日本生物物理学会年会シンポジウム (招待講演) (2017)
7. 小林千草, “コンピュータシミュレーションによるカルシウムイオンポンプの反応経路解析” 日本生体エネルギー研究会第 42 回討論会 (2016)
8. 小林千草, “P-type ATPaseの大規模構造変化を伴う反応メカニズム解析のためのマルチレゾリューション手法” 第89回日本生化学会大会 (招待講演) (2016)

[その他]

1. 岩橋千草 第 5 回「京」を中核とする HPCI システム利用課題 優秀成果賞 (2018/11/02)
2. GENESIS ウェブサイト <https://www.r-ccs.riken.jp/labs/cbrt/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松永 康佑

ローマ字氏名： (MATSUNAGA Yasuhiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。