

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2013～2017

課題番号：25104002

研究課題名（和文）原子解像度で探る巨大分子・分子集合体の柔らかさと機能の関係

研究課題名（英文）Softness-function relationship in large molecules and molecular assemblies investigated at atomic resolution

研究代表者

北尾 彰朗（KITAO, Akio）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：30252422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 93,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では柔らかさの特徴を織り込んだ理論開発と柔らかさと機能の関係解明を行った。柔らかさの特徴を織り込んだ理論開発と柔らかさと機能の関係解明においては、MuSTAR MD法とPaCS-MD法を開発し、タンパク質の柔らかな構造変化と機能の関係を明らかにした。理論と実験の比較に基づく理論計算の改良と柔らかさの統合的な理解では、A02計測項目の研究者と協力し、DNAおよびRNAヘアピンの構造形成と安定性の根本的な違いを明らかにするなど、様々な研究が展開できた。柔らかさを考慮した立体構造・分子機能の予測と設計に関しては、DNA光修復酵素の反応機構の解明など、A03項目研究者と共同研究を推進した。

研究成果の概要（英文）：We have investigated softness of complex molecular systems by developing simulation methods, and applying them to investigate softness-function relationship. To investigate relationship between softness and function, we developed simulation methods, MuSTAR MD and PaCS-MD, by considering features of soft molecular systems. In collaboration with the researchers in A02, we carefully compared computational and theoretical results as seen in the study of DNA and RNA hairpin structure formation and stability. In collaboration with the researchers in A03, we predicted and designed protein structure and function as seen in the case of DNA photolyase studies.

研究分野：理論化学、生物物理学、計算生物学

キーワード：柔らかさ ダイナミクス 巨大分子 分子集合体 機能

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のような巨大分子やそれらの分子集合体が機能を発揮するために柔らかさは不可欠であり、柔らかさと機能の関係を明らかにすることは、高度な機能性を理解するための鍵である。柔らかい分子系を研究するための理論計算は、計算機の高速化と共に発展を続け、理想系・モデル系⇒複雑な実在系⇒巨大な超分子系へと研究対象を広げてきた。しかし、最先端の計算機を持ってしても、従来の理論だけでは広い時空間をまたぐ現象の解明には未だ不十分である。

柔らかい分子系の振る舞いはエンタルピーとエントロピーの絶妙なバランスの上に成り立っている。ポテンシャルエネルギー計算精度が改善している中、理論に柔らかさの本質を取り込むことが重要課題であった。研究開始当初、分子系の柔らかさを誘起させる TRS 法(Kitao, 2011)によって更に効率的な計算を実現した。また、独立な多数のシミュレーションを統合して自由エネルギー面を計算する MMMM 法(Sakuraba & Kitao, 2009)・MSFEL 法(Harada & Kitao, 2011-2)などで超並列向けの計算法を開発するなど、解決の方向性が見え始めていた。

理論計算の進化にも関わらず、時系列・スペクトル・エネルギーいずれにおいても実験との対応はまだ不十分であった。とはいえ、実験との直接的比較による改良が可能な状況になっていた。より多面的な理論-実験の比較からモデルや理論計算を改良していくことが当初の課題となっていた。

## 2. 研究の目的

このような背景を踏まえ、本研究課題では下記の3項目を目的として研究を行った。

(1) 柔らかさの特徴を織り込んだ理論開発と柔らかさと機能の関係解明

原子解像度の分子力学モデルおよびマルチスケールモデルを用いて系を取扱い、分子系の柔らかさの特徴を織り込んだ新たな理論とシミュレーション法を開発する。これらを用い、巨大分子や分子集合体の立体構造形成・分子認識・化学反応などにおいて、柔らかさと機能の関係を原子解像度で明らかし、従来の時間スケールの制約を打破することを目指した研究を行う。

(2) 理論と実験の比較に基づく理論計算の改良と柔らかさの統合的な理解

巨大分子や分子集合体のシミュレーション結果を、A02 項目の最先端の計測結果と比較することで、モデルやシミュレーション法の改良を行い、より定量性の高い理論研究を実現する。また、理論-実験両面から柔らかさが関わる現象の統合的理解を目指す。

(3) 柔らかさを考慮した立体構造・分子機能の予測と設計

巨大分子や分子集合体の立体構造や機能の予測を行い、また新規システムの設計を行う。これを現実の分子系創成に用いるべく、

A03 項目の研究者と協力した研究を展開する。

## 3. 研究の方法

(1) 柔らかさの特徴を織り込んだ理論開発と柔らかさと機能の関係解明においては、これまで開発してきたシミュレーション法の応用・改良を進めると共に、いくつかの巨大分子・分子集合体に関して柔らかさと機能の関係解明を進める。これには異なる初期条件から同時に多数の分子動力学シミュレーションを行い、適当なものを選択していくことで、バイアスをかけることなくターゲット構造に向かうパスウェイを探索することができる PaCS-MD (Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics)法等を改良して用いた。

**(2) 理論と実験の比較に基づく理論計算の改良と柔らかさの統合的な理解**では、A02 項目の田原グループをはじめとする、最先端の計測結果との比較解析をおこなった。これには REMD (Replica Exchange Molecular Dynamics) 法などの大規模な構造サンプリングシミュレーションを用いた。

(3) 柔らかさを考慮した立体構造・分子機能の予測と設計では、A03 神取グループとの共同研究による、光を利用して DNA を修復する DNA 光修復酵素など、柔らかさが分子機能に密接に関係したタンパク質の改変による機能変化の研究を行った。このために MD 計算やそれを応用した結合自由エネルギー計算、QM/MM 法による反応経路解析を駆使して解析をおこなった。

## 4. 研究成果

(1) 柔らかさの特徴を織り込んだ理論開発と柔らかさと機能の関係解明

柔らかい構造変化を効率的にサンプリングするシミュレーション法としては、集団座標の関数として自由エネルギー地形を高効率で計算する MuSTAR MD (Multi-scale Sampling using Temperature Accelerated and Replica exchange Molecular Dynamics)を開発した(J Chem. Phys. 2013)。このシミュレーションでは従来の方法より効率的にエネルギーが高い構造空間も探索できることを実証した。

また、構造遷移パスウェイを効率的に探索する Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD)を開発した。ミニタンパク質シニョリンのフォールディング・アンフォールディングや T4 リゾチームのオープン・クローズ遷移を効率的に観察できることを示した(J Chem. Phys. 2013)。

更に PaCS-MD 法を改良し、標的を設定することなくより柔らかい方向を探索する non-targeted の PaCS-MD を開発した。その結果、従来と同様にタンパク質のフォールディングやドメイン運動を効率的に観察できることが示された(J Chem. Theory Comput. 2015)。PaCS-MD)を応用した研究では、細菌べん毛

繊維の超らせん構造変化の解明に取り組み、320万原子からなる細菌べん毛繊維を左巻き超らせんから右巻き超らせんに構造変化させるシミュレーションを行い、マルコフ状態モデルで解析して自由エネルギー面を明らかにした(AIP Conf. Proc. 2016)。さらに、PaCS-MD法はタンパク質の結合自由エネルギーを計算することや、解離経路を探索にも有効であることを明らかにできた(J. Chem. Theory Comput. 2018)。具体的には、PaCS-MDを用いて蛋白質複合体を解離させ、マルコフ状態モデルで解析することで、解離経路上のマイクロ状態の存在確率を計算して、これを用いた解離自由エネルギーを求め、実験値に対応する値を得ることができるとを示すことができた。

理論計算を用いた柔らかな分子の機能解明には様々な成果があった。深海魚のアクチンが圧力耐性圧力耐性をもつ仕組みを分子動力学によって解明した(PLOS ONE 2014)。深海魚はわずか2つのアミノ酸の変化によって、分子内の塩橋のパターンを組み替えて、ATPの結合とサブドメイン間の相互作用を高圧力環境においても安定化していることを明らかにした。また、時間依存の線型応答理論を定式化し、リガンド結合によるタンパク質応答のダイナミクス研究を可能にした。CO結合時のミオグロビンの立体構造変化を調べることで、2段階の緩和があることが観察できた。摂動に速くレスポンスするアミノ酸残基保存性も明らかにした(Biophys. J. 2014)。イオンチャネルTRPV4のアンキリンリピートドメイン(ARD)と脂質膜の結合をドッキング計算や分子動力学計算からは、ARDが脂質膜に安定に結合することを示した。また、TRPV1の4量体の分子動力学計算からは、TRPV1と脂質膜はある程度の柔軟性を有し、ARDは脂質膜中のPI(4,5)P2と十分に相互作用し得ることを示した(Nature Communication 2014)。生物が持つ柔らかな多燃料エンジンの仕組みについても明らかにすることができた(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015)。具体的には、細菌べん毛のイオン透過過程に関して、複数種類のイオンを透過してモーター固定子として機能するMotA/Bの立体構造をモデリングし、分子シミュレーションによってそのイオン透過機構を明らかにし、更にラチェット的な運動を誘起できる可能性についても明らかにした。ダイナミクス駆動のアロステリックサイトの研究においても柔らかさとアロステリーの関係を解明することができた(Biophys. Physicobiol. 2016)。偶然発見された構造変化を伴わない単量体のアロステリックサイトを系統的に探し出し、粗視化モデルと基準振動解析を用いてアロステリックサイトとのそれ以外のポケットにリガンドが結合した際の効果の違いを明らかにした。これらのアロステリック効果は、その周りの蛋白質揺らぎを大きく変化させるものであることが明らかになった。I-BARドメ

インによる膜変形機構の研究も、タンパク質の柔らかさと機能を明らかにした典型的な成功例である(Sci. Rep. 2017)。我々はI-BARドメインが膜に結合し、曲率を変化させるメカニズムを分子動力学計算で調べた。その結果I-BARと膜間の塩橋形成が脂質の局所密度を増加させ、膜を凹形に変形させることが示された。また、I-BARの剛性は膜変形にとって重要であるが、I-BARは完全に剛体的なテンプレートとしては機能しないことが明らかになった。

## (2) 理論と実験の比較に基づく理論計算の改良と柔らかさの統合的な理解

A02 計測項目の研究者と協力することで、様々な研究が展開できた。A02 田原グループとの共同研究では、DNAおよびRNAヘアピンの構造形成と安定性の根本的な違いを理解するための研究を行った(Phys. Chem. Chem. Phys. 2018)。その結果、室温でRNAがコンパクトな構造をとっているのに対して、DNAはヘアピン構造だけでなく大きく広がった構造を形成していることが明らかになった。

A02 藤井グループとの共同研究では、気相中のペプチドが取りうる構造をREMD法でサンプリングし、QM計算でスペクトルを計算し、実験との比較を行っている。A02 水谷グループとの共同研究では、変異によるタンパク質構造を予測することで、水谷グループが計測したエネルギー緩和データ解析の基礎データとすることができた。

## (3) 柔らかさを考慮した立体構造・分子機能の予測と設計

A03 項目の研究者と共同研究にも成果があった。特にA03 神取グループとの共同研究によってDNA光修復酵素の反応機構を明らかにすることができた。

まず、CPDおよび(6-4)DNA光修復酵素の研究では、これらの機能転換の非対称性に関して、MD計算から複合体安定性を予測し、またQM/MM計算から変異体の触媒メカニズムを明らかにした(Biochemistry 2016)。

次に、(6-4)損傷DNA光修復酵素の触媒メカニズムを明らかにするため、活性部位にあるヒスチジン残基が取りうるすべてのプロトン状態の組み合わせを作ってそれぞれの立体構造と安定性をMD計算を用いて調べ、最も可能性の高いプロトン状態の組み合わせを明らかにした(ACS Catalysis 2016)。

さらに、A03 神取グループとの共同研究で、(6-4)損傷DNA光修復酵素によるT(6-4)T損傷修復の触媒メカニズムをMDおよびQM/MMを用いて研究し、そのメカニズムを明らかにした(ACS Catalysis 2017)。現在T(6-4)C損傷修復の触媒メカニズムに関する論文も投稿中である。

上述のように、本研究の期間のうちに、目標としていた、柔らかさの特徴を織り込んだ理論開発と柔らかさと機能の関係解明、理論と実験の比較に基づく理論計算の改良と柔らかさの統合的な理解、柔らかさを考慮した立体構造・分子機能の予測と設計を期待通りに進展させることができ、大きな成果が得られた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

Kazuhiro Takemura, Nobuyuki Matubayasi, and [Akio Kitao](#)  
"Binding free energy analysis of protein-protein docking model structures by evERdock"  
J. Chem. Phys., 査読有, 148(10), 105101(1-11) (2018)  
[Doi: 10.1063/1.5019864]  
Jacob B. Swadling, Kunihiko Ishii, Tahei Tahara and [Akio Kitao](#)  
"Origins of biological function in DNA and RNA hairpin loop motifs from replica exchange molecular dynamics simulation"  
Phys. Chem. Chem. Phys., 査読有, 20, 2990-3001 (2018)  
[Doi: 10.1039/c7cp06355e]  
Duy Phuoc Tran, Kazuhiro Takemura, Kazuo Kuwata and [Akio Kitao](#)  
"Protein-Ligand Dissociation Simulated by Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics"  
J. Chem. Theory Comput., 査読有, 14, 404-417 (2018)  
[Doi: 10.1021/acs.jctc.7b00504]  
Nick Matthews, Robert Easdon, [Akio Kitao](#), Steven Hayward and Stephen Laycock  
"High quality rendering of protein dynamics in space filling mode"  
J. Mol. Graph. Model., 査読有, 78, 158-167 (2017)  
[Doi: 10.1016/j.jmglm.2017.09.017]  
Kazuhiro Takemura, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Shiro Suetsugu and [Akio Kitao](#)  
"Salt Bridge Formation between the I-BAR Domain and Lipids Increases Lipid Density and Membrane Curvature"  
Scientific Reports, 査読有, 7, 6808(1-10) (2017)  
[Doi:10.1038/s41598-017-06334-5]  
Hisham M. Dokainish, Daichi Yamada, Tatsuya Iwata, Hideki Kandori and [Akio Kitao](#)  
"Electron Fate and Mutational Robustness in the Mechanism of (6-4) Photolyase-Mediated DNA Repair"  
ACS Catalysis, 査読有, 7(7), 4835-4845 (2017)

[Doi: 10.1021/acscatal.7b00751]  
Yuko Otani, Satoshi Watanabe, Tomohiko Ohwada, and [Akio Kitao](#)  
"Molecular Dynamics Study of Nitrogen-Pyramidalized Bicyclic beta-Proline Oligomers: Length-Dependent Convergence to Organized Structures"  
J. Phys. Chem. B, 査読有, 121, 10-109 (2017)  
[Doi: 10.1021/acs.jpcc.6b10668]  
[Akio Kitao](#), Ryuhei Harada, Yasutaka Nishihara, and Tran Phuoc Duy  
"Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics for Efficient Conformational Sampling and Free Energy Calculation of Proteins"  
AIP Conference Proceedings, 査読有, 1790, 020013(1-4) (2016)  
[Doi:10.1063/1.4968639]  
Hisham M. M. Dokainish, and [Akio Kitao](#)  
"Computational Assignment of the Histidine Protonation State in (6-4) Photolyase Enzyme and Its Effect on the Protonation Step"  
ACS Catalysis, 査読有, 6, 5500-5507 (2016)  
[Doi: 10.1021/acscatal.6b01094]  
Daichi Yamada, Hisham M. Dokainish, Tatsuya Iwata, Junpei Yamamoto, Tomoko Ishikawa, Takeshi Todo, Shigenori Iwai, Elizabeth D. Getzoff, [Akio Kitao](#), and Hideki Kandori  
"Functional Conversion of CPD and (6-4) Photolyases by Mutation"  
Biochemistry, 査読有, 55(20), 4173-4183 (2016)  
[Doi: 10.1021/acs.biochem.6b00361]  
Atsuko Deguchi, Takeshi Tomita, U Ohto, Kazuhiro Takemura, [Akio Kitao](#), S Akashi-Takamura, K Miyake, and Yoshiro Maru  
"Eritoran inhibits S100A8-mediated TLR4/MD-2 activation and tumor growth by changing the immune microenvironment"  
Oncogene, 査読有, 35(11), 1445-1456 (2016)  
[Doi: 10.1038/onc.2015.211]  
Junko Taguchi and [Akio Kitao](#)  
"Dynamic Profile Analysis to Characterize Dynamics-driven Allosteric Sites in Enzymes"  
Biophysics and Physicobiology, 査読有, 13, 117-126 (2016)  
[Doi: 10.2142/biophysico.13.0\_117]  
Yasutaka Nishihara and [Akio Kitao](#)  
"Gate-controlled proton diffusion and protonation-induced ratchet motion in the stator of the bacterial flagellar motor"

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 査読有, 112(25), 7737-7742 (2015)  
[Doi: 10.1073/pnas.1502991112]  
Yoshiro Maru, Takeshi Tomita, Atsuko Deguchi, Katsuaki Ieguchi, Morichuka Takita, Fujiko Tsukahara, Kazuhiro Takemura, Akio Kitao, and Fabian Gusovsky  
"Drug Targeting Based on a New Concept-Targeting Against TLR4 as an Example"  
Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets, 査読有, 15(2), 83-87 (2015)  
[Doi: 10.2174/187153031502150522123746]  
Steven Hayward and Akio Kitao  
"Monte Carlo Sampling with Linear Inverse Kinematics for Simulation of Protein Flexible Regions"  
J. Chem. Theor. Comput., 査読有, 11(8), 3895-3905 (2015)  
[Doi: 10.1021/acs.jctc.5b00215]  
Ryuhei Harada and Akio Kitao  
"Non-targeted parallel cascade selection molecular dynamics (nt-PaCS-MD) for enhancement of the conformational sampling of proteins"  
J. Chem. Theor. Comput., 査読有, 11(11), 5493-5502 (2015)  
[Doi: 10.1021/acs.jctc.5b00723]  
Taki Sakai, Yotaro Matsumoto, Minoru Ishikawa, Kazuyuki Sugita, Yuichi Hashimoto, Nobuhiko Wakai, Akio Kitao, Era Morishita, Chikashi Toyoshima, Tomoatsu Hayashi and Tetsu Akiyama  
"Design, synthesis and structure-activity relationship studies of novel sirtuin 2 (SIRT2) inhibitors with a benzamide skeleton"  
Bioorganic & Medicinal Chemistry, 査読有, 23(2), 328-339 (2015)  
[Doi: 10.1016/j.bmc.2014.11.027]  
Nobuaki Takahashi, Sayaka Hamada-Nakahara, Yuzuru Itoh, Kazuhiro Takemura, Atsushi Shimada, Yoshifumi Ueda, Manabu Kitamata, Rei Matsuoka, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Yosuke Senju, Masayuki X. Mori, Shigeki Kiyonaka, Daisuke Kohda, Akio Kitao, Yasuo Mori and Shiro Suetsugu  
"TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin domain to PI(4,5)P2"  
Nature Communications, 査読有, 5, 4994(1-15) (2014)  
[Doi: 10.1038/ncomms5994]  
Lee-Wei Yang, Akio Kitao, Bang-Chieh Huang and Nobuhiro Go  
"Ligand-Induced Protein Responses and

Mechanical Signal Propagation Described by Linear Response Theories"  
Biophysical Journal, 査読有, 107(6), 1415-1425 (2014)  
[Doi: 10.1016/j.bpj.2014.07.049]  
Nobuhiko Wakai, Kazuhiro Takemura, Takami Morita and Akio Kitao  
"Mechanism of Deep-sea Fish  $\alpha$ -Actin Pressure Tolerance Investigated by Molecular Dynamics Simulations"  
PLOS ONE, 査読有, 9(1), 85852(1-12) (2014)  
[Doi: 10.1371/journal.pone.0085852]

- ① Ryuhei Harada and Akio Kitao  
"Parallel cascade selection molecular dynamics (PaCS-MD) to generate conformational transition pathway"  
J. Chem. Phys., 査読有, 139(3), 035103(1-10) (2013)  
[Doi: 10.1063/1.4813023]
- ② Yu Yamamori and Akio Kitao  
"MuSTAR MD: Multi-scale sampling using temperature accelerated and replica exchange molecular dynamics"  
J. Chem. Phys., 査読有, 139(14), 145105(1-11) (2013)  
[Doi: 10.1063/1.4823743]

[学会発表](計13件)

Akio Kitao

"Dissociation and association dynamics of proteins"  
WS Protein Dynamics  
(Telluride/CO, USA, July 31 - Aug. 4, 2017)

Akio Kitao

"Dynamic structure of bacterial flagellar proteins observed in silico"  
Bacterial Flagella, Injectisomes and Type III Secretion Systems  
(Okinawa, Japan, Mar.1, 2017)

Akio Kitao

"Simulating biomolecular interactions and functions"  
1st International Symposium on Research and Education of Computational Science (RECS)  
(Tokyo, Japan, Nov. 29 - 30, 2016)

Akio Kitao

"Parallel cascade selection molecular dynamics for efficient conformational sampling of biomolecular systems"  
ICMS2016  
(Shanghai, China, Oct. 23 - 26, 2016)

Akio Kitao

"Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics for Efficient Conformational Sampling and Free Energy Calculation of Proteins"  
ICCMSE2016

( Athens, Greece, Mar. 17-20, 2016 )

Akio Kitao

“Structure, dynamics, and function of bacterial flagella investigated by molecular dynamics simulation”

The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015

(Hawaii, USA, December 15 - 20, 2015)

Akio Kitao

"Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD) to explore conformational spaces of proteins efficiently"

Workshop on Kinetics of Enzymes and Molecular Machines

(Beijing, China, August 18 - 19, 2015)

Akio Kitao

"Proton permeation mechanisms in the stator of bacterial flagellar motor"

Telluride Research Center Workshop on Protein Dynamics

(Telluride CO, USA, August 3 - 7, 2015)

Akio Kitao

"Dynamics and Function of Bacterial Flagella Investigated by Molecular Simulation"

The 20th Biophysics Conference

(Taipei, Taiwan, May 11 - 13, 2015)

Ryuhei Harada, Yasutaka Nishihara,

Nobuhiko Wakai and Akio Kitao

“Conformational Transition Pathway and Free Energy Analyses of Proteins by Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD)”

International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering (ICCMSE 2014)

(Athens, Greece, April 4-7, 2014)

Akio Kitao

"Analysis of soft molecular systems"

Workshop "What is soft molecular systems?"

(Nagano, Japan, March 10-11, 2014)

Akio Kitao

"Exploring protein conformational transition pathways with efficient molecular simulation method"

Telluride Science Research Center Protein Dynamics Workshop 2013

(Telluride, USA, August 1 - 5, 2013)

Akio Kitao

"How Can Soft Molecular Machinery Be Well-Regulated? Structure and Function of Bacterial Flagella"

第 15 回日韓分子科学シンポジウム

(Hyogo, Japan, July 3 - 5, 2013)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ ;

<http://www.kitao.bio.titech.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北尾 彰朗 (KITAO, Akio)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号 : 30252422

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし