

# 研究報告書

## 「緩和モード解析によるタンパク質構造ダイナミクスの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 光武 亜代理

### 1. 研究のねらい

原子レベルでの分子間の相互作用の機構やダイナミクスを研究するのに分子シミュレーションは強力な手法の1つである。分子シミュレーションは、分子間に作用する力を計算し、運動方程式を数値的に解き、タンパク質や溶媒の動きを追うことができる。よって、構造変化に伴う機能の出現や、水和や脱水和などの溶媒の影響などを分子レベルで調べることができる。近年、並列計算機、GPU や専用ハードウェアの発展により、急激にマイクロ秒からミリ秒程度の長時間シミュレーションが可能となってきた。長時間シミュレーションにより、タンパク質が大きく構造変化することが可能になってきたが、シミュレーション中の構造変化を見るだけでは、協同的な動きが分からず、どのような構造変化(揺らぎ)が機能に重要か調べることは難しい。シミュレーション結果から、特徴的な動き(構造揺らぎ)を抜き出す方法を開発することは、重要な課題である。

シミュレーション分野において、これまで十分な時間(サンプリング)のシミュレーションができなかったこともあり、ダイナミクスを調べる解析手法は世界的にも多くない。長時間シミュレーションが可能になってきていることから、先駆けて動的な解析手法である緩和モード解析の開発を進めてきた。緩和モード解析は、シミュレーションの結果から近似的に緩和の遅いモードとそれに対応する緩和率を求めることができる。複雑なタンパク質の動きから、原子レベルで遅い動きを抜き出すことができる新規の独創的な構造機能解析手法である。これまで、ホモポリマーである高分子系に適用されていたが、我々は、ヘテロポリマーであるタンパク質系にいくつかの技術的な困難を解決して、緩和モード解析の開発を進めてきた。

本研究では、タンパク質系の緩和モード解析の開発を進めるとともに、この手法を広く確立させる。まず、フォールディングなどの大きな構造変化を起こす系に対して、この手法を適用して有効性を調べる。この際、多自由度を取り扱うために開発した主成分緩和モード解析の評価や関連の方法であるマルコフ鎖モデルとの比較を行う。次に、非調和型の構造揺らぎを持つタンパク質系に適用し、大きな構造揺らぎに対して、この手法が有効であるか調べる。これらの研究から、方法論を洗練し、本手法の有効性について調べる。また、実験家と共同研究を進め、中性子散乱やNMRなどから得られる動的な情報と本解析で得られる動的な情報との関係を明らかにし、タンパク質のダイナミクスの解明を試みる。タンパク質構造のダイナミクスに加えて、タンパク質周りの水の動的性質についても調べる。会合系などのシステムで、2つのタンパク質の協同的な遅い動きなどを抜き出せるかについても検討する。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究では、緩和モード解析の方法論の開発を進め、タンパク質に関する動的性質の特徴について調べる。まず、いくつかの具体的な系に緩和モード解析を適用し、そこで生じる問題を解決する。さらに、方法論の開発を行う。

#### ● 研究テーマ A

自由度が小さく、大きく構造変化が生じる系に関して緩和モード解析を行う。具体的には 10 残基からなるペプチドの遷移温度でのシミュレーションを行ない、複数の安定構造、準安定構造、伸びた構造の遷移を生じたトラジェクトリーに関して従来の方法である主成分解析と緩和モード解析を行ない、得られた結果を比較する。また、動的解析手法としてマイルストーン法やマルコフ鎖モデルという方法があるので、これらの方法との比較を行う。

#### ● 研究テーマ B

非調和型のタンパク質に緩和モード解析を行う。具体的には、数百残基からなるタンパク質系に関して、天然構造を初期構造としたシミュレーション系に関して、緩和モード解析を行う。マイクロ秒程度の有限のシミュレーションのトラジェクトリーから緩和モード解析を用いるとどのような情報が得られるか調べる。また、ANTON などの 100 残基以下のフォールディングのトラジェクトリーに関して、解析を行ない、フォールディング過程について調べる。

#### ● 研究テーマ C

中性子散乱や NMR から得られる動的実験データとの比較を行う。具体的には、中性子散乱や NMR から得られる動的データと分子シミュレーションから得られる動的データの間関係を明らかにして比較を行う。また、緩和モード解析から得られた動的データとの関係も明らかにする。数百ナノ秒からマイクロ秒のタンパク質のダイナミクスに関する分子レベルでの知見を得る。

#### ● 研究テーマ D

構造安定性などの側面からも研究を進めるための GPGPU を用いた計算機システムの構築を行う。具体的には溶媒和自由エネルギーを計算できる 3D-RISM 理論を用いて、構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーを計算することによりタンパク質の安定性について調べる。

### (2) 詳細

#### ● 研究テーマ A

「大きく構造変化する系に関する緩和モード解析の有効性と新規手法の開発」

はじめにフォールディングなど大きな構造変化のある系に関して、本手法を適用して有効性を調べた。10 残基のシニヨリンはシミュレーションでよく研究されているペプチドである。安定構造の他に準安定構造があることが知られており、本方法の有効性を確認するのに適している。水中で数百ナノ程度のシミュレーションを行うと本システムが伸びた構造から天然構造や準安定構造に巻き戻すことを確認した。しかし、天然構造や準安定構造はエネルギー的に安定なため、一度巻き戻ると他の状態に遷移するのに長時間がかかる。よって、遷移温度でのシミュレーションを行った。遷移温度でシミュレーションを行うことにより、安定構造、準安定構造、伸びた構造を複数回遷移するトラジェクトリーを得ることができた。このトラジェクトリーに関して、構造揺らぎの大きなモードを抜き出す静的な解析手法である主成分解析と、緩和の遅いモードを

抜き出す動的解析手法である緩和モード解析を行ない、自由エネルギー曲面の比較を行った。緩和モード解析で得られた自由エネルギー曲面は主成分解析よりも特徴的な構造を分類することができ、また自由エネルギーからフォールディングプロセスを明確に説明できることが分かった。図1は緩和モード解析から得られた自由エネルギー曲面である。安定構造、準安定構造を区別するばかりか、共通のターン構造を持つ中間構造や完全に伸びた構造を明確に分類することができた。緩和モード解析は遅いモードを抜き出すため、エネルギー的に安定な安定構造や準安定構造間の遷移が緩和の遅いモードに対応するため、安定構造や準安定構造間の遷移が緩和の遅いモードに対応していた。また、遅い動きに注目するため、末端の早い動きを取り除いたターンの固まった特徴的な構造を持つ中間構造を抜き出すことができた。この自由エネルギー曲面から、先に真ん中のターン構造が形成され、天然構造や準安定構造に巻き戻ることが分かった。大きな構造揺らぎを持つ系に有効な方法であることが分かった。

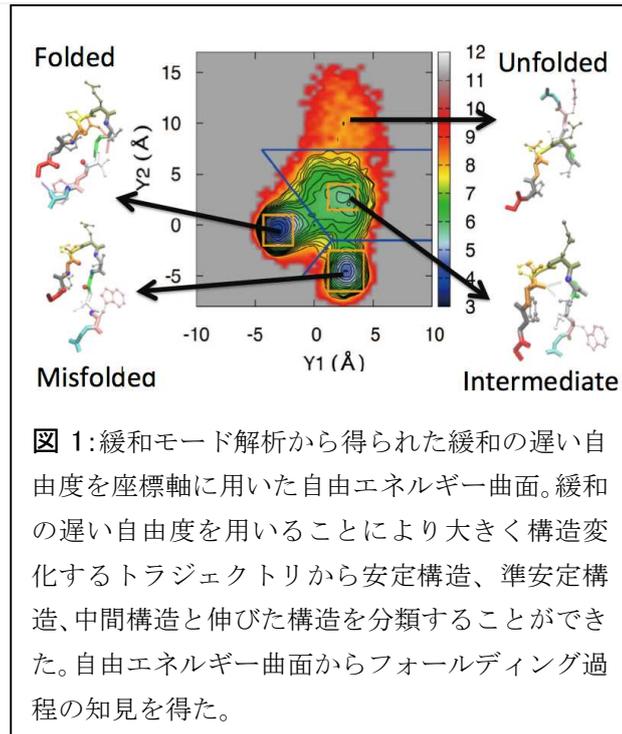


図1: 緩和モード解析から得られた緩和の遅い自由度を座標軸に用いた自由エネルギー曲面。緩和の遅い自由度を用いることにより大きく構造変化するトラジェクトリから安定構造、準安定構造、中間構造と伸びた構造を分類することができた。自由エネルギー曲面からフォールディング過程の知見を得た。

また、緩和モードは理論的には、マスター方程式の時間発展演算子の左固有値と固有ベクトルに対応する。この点から、タンパク質系で広く使われている動的解析手法であるマルコフステイトモデルと関係がある。マルコフステイトモデルとの関係を明らかにして、マルコフステイトモデルを修正する方法であるマルコフステイト緩和モード解析という方法の開発も行った。シニョリンの自由エネルギー曲面を用いて状態を定義して、本方法の有効性を調べた。

他新規手法の開発としては、より良い緩和モードと緩和時間を得るために、2段階緩和モード解析という方法が高分子の分野で開発されたので、これをタンパク質系へも適用して、有効性を調べた。この際、緩和モード解析で用いる  $t_0$  という変数を複数の変数にする方法の開発も行った。

研究テーマAについては、論文化も行ない(論文2)、また2つの新しい方法の提案もできたので、十分本テーマを達成できたと考えている。

● 研究テーマB、C

「非調和型のタンパク質に緩和モード解析」

「中性子散乱やNMRから得られる動的実験データとの比較」

研究テーマBとCはともに関係している。領域内の中性子散乱実験とNMRの実験家と共同研究を進めていて、数百残基程度のタンパク質の水中のシミュレーションを実行中である。NMRに関しては200残基程度のタンパク質の5マイクロ秒程度のシミュレーション4本を行ない、解析を行っている。マイクロ秒程度の時間スケールは側鎖の運動に対応しているため、側

鎖の自由度も含めて緩和モード解析を行った。緩和モード解析は理論的には状態間の十分な遷移のあるトラジェクトリーを必要とするが、有限時間のシミュレーション中のレアイベントを効率良く抜きだせることが分かった。マイクロ秒程度のトラジェクトリーで起こる構造揺らぎの少ない側鎖のまれな動きを自動的に見つけることができた。現在得られた側鎖の動きと、NMR の実験データとの間に関係があるか、考察中である。また、この系は低分子を結合するがそのシミュレーションも行ない解析を進める予定である。

緩和モード解析を用いるとレアイベントを抜き出せることができることは分かったが、GPGPU を用いてもマイクロ秒のシミュレーションでも数ヶ月程度かかるため、期間中に解析や結果の解釈も含めた論文化を行うことはできなかった。実験と理論の物理量の関係についても明らかにしていき、得られたダイナミクスの情報と機能との関係について明らかにしていきたい。

#### ● 研究テーマ D

「構造安定性の側面からも研究を進めるための GPGPU を用いた計算機システムの構築」

GPGPU を用いた 3D-RISM 理論の計算を行ない、構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーに基づくタンパク質の安定性についての知見を得た。まずは、全エネルギーをタンパク質の構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーの和と考え定義した。常温のシニョリンの分子動力学シミュレーションから安定構造と準安定構造が得られたので、これらの構造に関して 3D-RISM 理論を用いて溶媒和自由エネルギーを計算し、全エネルギーを求めた。現理化学研究所の丸山博士の 3D-RISM 理論は GPGPU を用いて高速に計算を行えるため、複数のサンプルで計算をし、平均値を求めた。図 2 に、横軸天然構造からの RMSD、縦軸全エネルギーの図を示す。安定構造と準安定構造は伸びた構造よりも安定なエネルギーを持つことがわかった。このことから全エネルギーは安定性の指標によりエネルギー関数であることがわかった。また、安定構造と準安定構造は安定性の機構が違っており、安定構造は構造エネルギーがより安定で、準安定構造は水和自由エネルギーがより安定であることが分かった。現在、論文作成中である。また、溶媒和自由エネルギーの理論的構築の妥当性を確認するのに本計算で得られた構造を用いた。(論文 4)

他タンパク質のトラジェクトリーに関しても、このシステムを用いて安定性の議論をした。

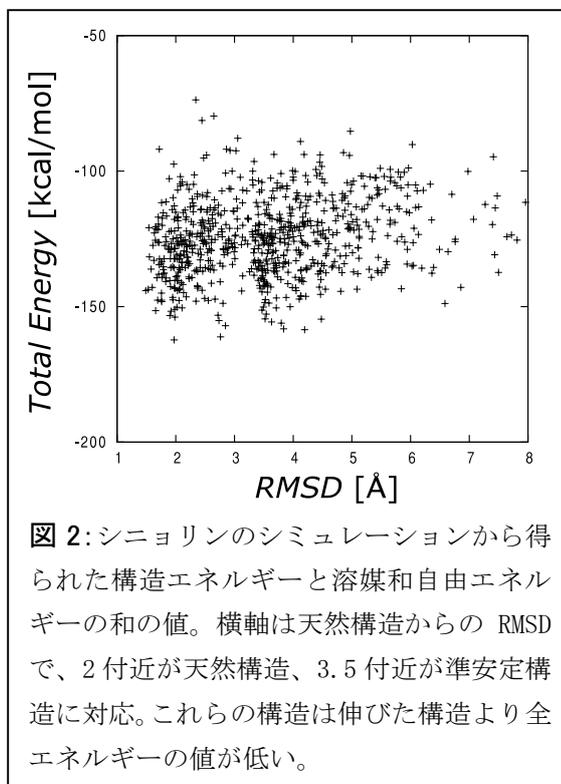


図 2: シニョリンのシミュレーションから得られた構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーの和の値。横軸は天然構造からの RMSD で、2 付近が天然構造、3.5 付近が準安定構造に対応。これらの構造は伸びた構造より全エネルギーの値が低い。

### 3. 今後の展開

さらに、方法論の改良を考えており、この開発を行う。

中性子散乱実験と NMR の実験データとの比較を行う。中性子散乱実験に関しては、スピエン

コーで得られるデータとの比較を行う。また、NMR で得られる実験データとの比較を行う。

ANTON などの 100 残基程度のフォールディングのトラジェクトリーの解析を行う。

膜タンパク質はいろいろな機能を有するため、膜タンパク質のシミュレーションを行ない、解析手法を適用していきたい。低分子力場なども作成し、低分子とタンパク質の会合系についても研究を進めたい。

これまで開発してきたダイナミクスと安定性に関するアルゴリズムを駆使して、低分子とタンパク質の会合の機構について原子レベルでの知見を得る。また、応用として、アミノ酸置換などによる機能予測を行う。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

研究目的に沿って研究を進めてきた。研究テーマ A に関しては、達成できたと考える。また、加えて新しい方法論の開発も行うことができた。本期間中に、緩和モード解析に関する手法の開発、プログラムの蓄積ができた。実験との比較に関しては、まだ時間が必要である。大きなタンパク質系に対してもう少し早い段階で計画を進めることができたらよかったと考えている。力場の作成や膜タンパク質系も取り組めればよかったと考えている。

研究実施体制に関しては、研究補助者を雇用することにより、研究内容に広がりがあった。新規プログラムの開発も行えた。また、博士課程の学生を含めて、新規手法の開発につながった。研究費に関しては、研究補助者雇用費用以外に関しては、GPGPU 計算機とファイルサーバに主に費やし、大規模な計算や解析をスムーズに行うことができた。また、旅費に関して、共同研究や成果発表を行うことができた。

期間中では主に理論の有効性を示した段階であるが、今後科学技術及び社会・経済への波及効果に努めたい。これまで開発してきた手法を駆使して、実験家と共同研究を進めることにより具体的なタンパク質に関する機能の予測を進めていきたい。現在行っている研究に関して機能に関して予測をしていきたい。

なるべく研究に時間を費やすようにと考えて、全力で頑張ったつもりだが、時間配分が難しかった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

シミュレーションでよく研究されているペプチドであるシニョリンの分子動力学トラジェジェクトリ(時系列データ)を用い、緩和モード解析結果と主成分解析等の他の解析法による結果を比較することにより、緩和モード解析の有用性を示唆した。また、さきがけ研究者も含めた多くの研究者と精力的に共同研究を行ったことは高く評価できる。

今後は、更に実験系との融合を進めて、実験との相補的な解析となっていることをもっとアピールして欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. T. Sumi, Y. Maruyama, A. Mitsutake, and K. Koga, <i>J. Chem. Phys.</i> , <b>144</b> , 224104 (2016).
2. A. Mitsutake and H. Takano, <i>J. Chem. Phys.</i> , <b>143</b> , 124111 (2015).
3. 光武重代理、日本物理学会学会誌、 <b>70</b> (3), 194 (2015).(総説)
4. T. Sumi, A. Mitsutake, and Y. Maruyama, <i>J. Compt. Chem.</i> , <b>36</b> , 1359 (2015).

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### ● 主要な招待講演

1. A. Mitsutake, "Investigating Dynamics and Kinetics of Proteins by using Relaxation Mode Analysis", The Third Korean-Polish Conference on "Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches" High-1 Resort, Korea, February 2017.
2. A. Mitsutake, "Exploring Dynamics and Kinetics of Proteins using Relaxation Mode Analysis", The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Kanazawa, Japan, September 2015.
3. A. Mitsutake, "Exploring Free Energy Surfaces with Generalized-Ensemble Algorithms", International Symposium on Extended Molecular Dynamics and Enhanced Sampling: Nose Dynamics 30 Years (NOSE30), Tokyo, Japan, November 2014.
4. A. Mitsutake, "Effective Sampling Algorithms and Analysis Methods for Protein Simulations", The 14th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul, Korea, September 2014.
5. A. Mitsutake, "Effective Sampling Algorithms and Analysis Methods for Protein Simulations", 3rd International Conference on Molecular Simulation, Kobe, Japan, November 2013.(受賞講演)

#### ● 分子シミュレーション研究会 学術賞(2013年11月)

「多次元焼き戻し法の開発及び緩和モード解析と WHAM 法の一般化による構造解析法の開発」

#### ● 国際会議の副実行委員

International Symposium on Extended Molecular Dynamics and Enhanced Sampling: Nose Dynamics 30 Years (NOSE30), Keio Univ., Tokyo, Japan, November 2014.