

課題名 (タイトル) :

## 膜蛋白質のマルチスケール分子シミュレーション

利用者氏名 : ○杉田 有治, 李 秀榮, Andrei Pislakov, 岩橋-小林 千草, 二島 渉, Pai-chi Li,  
小串 典子, 小室 靖明\*, 渡部 茂久\*

所属 : 和光研究所 基幹研究所 杉田理論分子科学研究室

\* 中央大学大学院 理工研究科 物理学専攻

## 報告内容

本グループ利用では下記 8 つの課題について RICC を利用した研究を行った。

- 1) 分子シミュレーションによる糖鎖の立体構造予測 (担当 : 李)
- 2) Computer simulation of cbb3 oxidase (担当 : Pislakov)
- 3) イオンポンプの反応機能についての理論的研究 (担当 : 小林)
- 4) 多剤排出トランスポータの動作機構 (担当 : 二島)
- 5) Structure prediction of transmembrane proteins palmitoylated MIR2, and the complex formation between MIR2 and immune recognition-related protein MHC-I (担当 : Li)
- 6) 構成要素の異なる脂質二重膜の分子動力学計算 (担当 : 小串)
- 7) 膜タンパク質の分子動力学計算 (担当 : 小室・杉田)
- 8) レプリカ交換分子動力学計算による糖鎖の立体構造予測 (担当 : 渡部)

以下、各課題について述べる。書く項目中の課題に付けられた番号は、上記の課題ごとの番号に対応する。

## 1) 分子シミュレーションによる

## 糖鎖の立体構造予測

(担当 : 李)

## 1. (本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係)

糖鎖は、細胞内や細胞表面に多く存在し、細胞分化、免疫、癌、ウイルス感染など多様な生命現象・疾患と深く関わっている。近年、糖鎖機能が急速に解明される一方で、糖鎖の構造解析は困難を極めている。その理由の一端は糖鎖構造の高い柔軟

性にある。本研究では、拡張アンサンブル法を用いた分子シミュレーションにより、溶液や細胞環境での糖鎖の立体構造ダイナミクスを解明し、創薬・診断応用に役立つ新たな糖鎖機能の開拓を目指す。

## 2. (具体的な利用内容、計算方法)

これまで我々は、レプリカ交換分子動力学 (REMD) 法を用いて、水中 N 型糖鎖のコンフォメーション予測に成功した。今年度は、同手法によりイオンモビリティ質量分析 (IMMS) データの予測を行った。IMMS は、従来困難であった、糖鎖の構造異性体分離を可能にする。糖鎖構造を精密に同定する有力な手段として期待される。我々は、REMD 法により得られた糖鎖コンフォメーションとその分布を用いて、IMMS の衝突断面積を予測するプロトコルを構築した。具体例として、典型的な N 型糖鎖の構造異性体に対し衝突断面積を計算した。REMD 計算には、QBiC の宮下らが開発した REIN (Replica Exchange Interface) を用いた。各糖鎖について、気相条件下で  $\sim \mu\text{s}$  の計算を行った後、クラスタ解析により代表構造を抽出、各々の衝突断面積を計算した。

## 3. (結果)

今回具体例として、構造異性体関係にある 8 残基 N 型分岐型糖鎖 (G1(3)と G1(6)) の IMMS 計算を行った。REMD 計算から得たトラジェクトリをクラスタ解析した結果、G1(3)と G1(6)は各々 3 つと 5 つのコンフォマーをとっていることが分かった。構造的には、前者 (globular) が後者 (rod-like) に比べてコンパクトである。G1(3)と G1(6)について計算した衝突断面積は、各々  $263 \pm 5\text{Å}^2$  と  $270 \pm 2\text{Å}^2$  で、実験値 ( $181\text{Å}^2$  and  $199\text{Å}^2$ ) の傾向と良

く一致する。以上の結果は、IMMS の糖鎖構造異性体分離が、微細なコンフォメーションの違いに起因することを示す。

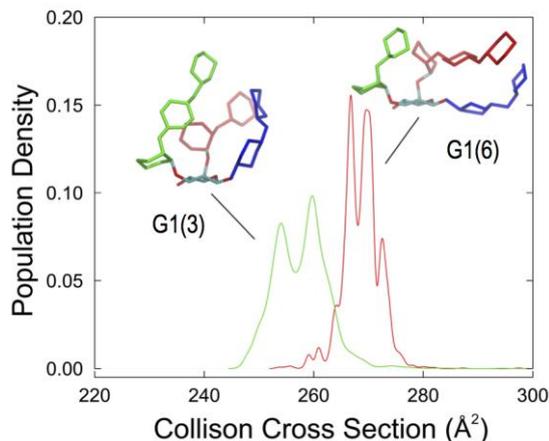


図 1. REMD 計算から得た糖鎖構造異性体の衝突断面積

#### 4. (まとめ)

柔軟性の高い糖鎖の立体構造解析は現在でも困難であり、原子・分子解像度での糖鎖機能解析を妨げている。本研究では、REMD 法を用いて IMMS データを予測するプロトコルを構築した。これを N 型分岐型糖鎖に応用し、実験値と良く一致する結果を得た。

#### 5. (今後の計画・展望)

今回の計算結果は実験値の傾向を良く再現するが、簡単なモデル化合物を用いたため、絶対値のズレは大きい。今後、アミノピリジンによる蛍光標識 (PA 化) や糖鎖プロトン化の影響を考慮するために新たな力場の開発を行い、定量性・予測性の向上を目指す。将来的には、IMMS と理論計算による相補的な予測基盤を確立し、細胞表面上の糖鎖を正確に同定するだけでなく、その立体構造を原子レベルで明らかにしたい。

### 2) Computer simulation of cbb3 oxidase

(担当 : Pislakov)

#### 1. (本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係)

Sarco(endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump (SERCA) transports two  $\text{Ca}^{2+}$  ions across the

membrane and against the concentration gradient, and is a prototype system for the P-type ATPases. Although a number of crystal structures in different states of the SERCA enzymatic cycle are now available, many details of its functioning at the molecular level are still missing. In particular, the pathways and mechanisms of transport of  $\text{Ca}^{2+}$  ions and counter-transport of protons remain largely unknown. Recent molecular dynamics (MD) simulations, in several states and at different protonations, showed formation of water channels, which might serve as proton pathways. Our objective is to verify these pathways by performing explicit proton transfer (PT) simulations with the empirical valence bond (EVB) method. Currently we focus on the E2-to-E1 transition.

#### 2. (具体的な利用内容、計算方法)

Empirical valence bond (EVB) calculations were carried out for multiple PT steps in the SERCA E2 state using the Molaris program.

#### 3. (結果)

By taking multiple snapshots from MD simulations at different protonations (by Dr. C. Kobayashi) as the initial configurations, we performed the EVB calculations for proton translocations along the hydrogen-bonded networks of water molecules and protonatable amino acid residues. Two proton pathways (in the N-terminal and C-terminal regions) were studied. We obtained the barriers for multiple individual PT steps between proton sites and, as a combined result, the overall free energy profiles for exit of protons from the metal

binding sites (in the middle of membrane) to the cytoplasm.

#### 4. (まとめ)

Our EVB results, together with the results of MD simulations, yield a consistent picture of the proton exits from the metal binding sites during the E2-to-E1 transition in SERCA.

#### 5. (今後の計画・展望)

The methodology will be applied to describe the coupled  $\text{Ca}^{2+}$  and proton transport in all intermediate states of SERCA, and also can be used for other similar enzymes.

### 3) イオンポンプの反応機能についての

#### 理論的研究

(担当：小林)

#### 1. (本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係)

カルシウムイオンポンプ(SERCA)は筋小胞体膜中に存在する代表的な膜輸送タンパク質である。 $10^4$ 倍の濃度差に逆らって、筋細胞中から小胞体内部へと  $\text{Ca}^{2+}$ を輸送する。SERCA の反応サイクルでは、プロトンの対抗輸送、ATP の結合、加水分解などいくつかの反応が輸送に重要な役割を果たすことが知られている。本研究は、各反応機構を明らかにし、膜輸送タンパク質に共通なモデルを作成することを目的としている。今年度は SERCA のプロトン対抗輸送がどのような役割を果たすのかを理論的に明らかにした。

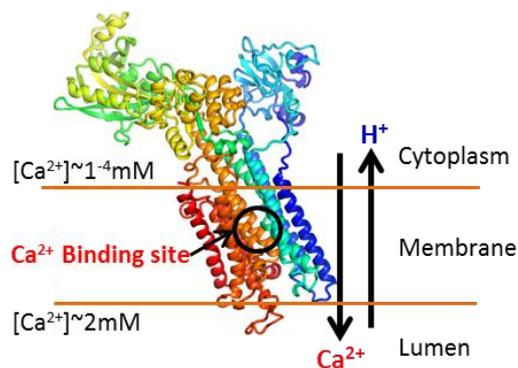


図 2 SERCA の  $\text{Ca}^{2+}$ 、プロトン輸送

#### 2. (具体的な利用内容、計算方法)

E2 状態の  $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位では4つの酸性残基がプロトン化されており、 $\text{Ca}^{2+}$ が結合していない結合部位を安定化している。E2 状態から E1 状態への反応において、それらのプロトンのうち 3 つが cytoplasm 側に脱離することが実験的に示唆されているが、その詳しい過程は未だ明らかにされていない。本研究は、E2 状態において、4 つの酸性残基のプロトン状態を変化させた 11 個の中間状態候補に対して、分子動力学ソフトウェア NAMD を用いた SERCA の全原子モデル計算を行った。系の原子数は約 37 万個であり、温度は 310K に設定し、それぞれの候補に対して 50-100ns の計算をおこなった。

#### 3. (結果)

プロトン状態の変化によって、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位の水素結合ネットワークが大きく変化した。その結果、プロトン移動の中間状態を決定した。D800, E908 の二つの残基からプロトンが解離した状態では、C 末端側のチャネルが開き、水分子の挿入が見られた。また、更に E309 からプロトンが解離した状態では E309 の側鎖の構造変化が起き、その結果、N 末端側のチャネルが開き、水分子と正電荷イオンの挿入が見られた。この E309 の構造変化は実験からも示唆されており、今回の MD 計算の結果と一致する。このようにプロトンの対向輸送は水チャ

ネルを開くような SERCA の構造変化を引き起こし、Ca<sup>2+</sup>結合部位への取り込みを促すことが明らかになった。

#### 4. (まとめ)

SERCA の Ca<sup>2+</sup>結合部位のプロトン状態を変化した中間状態候補の全原子モデルによる分子動力学計算を行い、プロトン移動の重要な中間体を決定した。その結果、プロトン移動によりイオンの輸送経路であるチャネルを開く構造変化が見られた。本研究はプロトン対抗輸送が、膜輸送に果たす役割を明らかにした。

#### 5. (今後の計画・展望)

今後は SERCA の反応サイクルの中で、リガンド結合・解離によって引き起こされる構造変化を、粗視化モデルによる分子動力学計算によって解析する。

##### 4) 多剤排出トランスポータの動作機構

(担当：二島)

##### 1. (本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係)

病原菌の多剤耐性化は、多剤排出トランスポーターが原因の一つと考えられている。多剤排出トランスポーターの一つである MATE は、近年になり X 線構造解析により立体構造が解かれ、その基質輸送機構が明らかになりつつある。しかしながら、原子レベルの構造変化やダイナミクスなど詳細はまだわかっていない。本研究の目的は、MATE の分子動力学シミュレーションを行い、その基質認識機構や輸送メカニズムについての知見を深めることにある。

#### 2. (具体的な利用内容、計算方法)

2 つの結晶構造(straight,kink)が解かれており、また、2 つの残基 (ASP41,ASP184) についてプロトン化している可能性がある。そのため、表 1 に示す 4 つの場合に対し、平衡状態のシミュレーションをそれぞれ行った。また、力を加えて straight から kink 構造へ強制的に構造遷移させるシミュレーション(steeredMD)も行った。

それぞれの系は約 14 万原子の膜、タンパク質、水、イオンから構成される。

名称	構造	ASP41	ASP184	時間(ns)
st41	straight	プロトン化	なし	100
st184	straight	なし	プロトン化	100
st41-184	straight	プロトン化	プロトン化	100
ki41-184	kink	プロトン化	プロトン化	200

表 1. 平衡状態シミュレーション条件一覧

#### 3. (結果)

膜貫通ヘリックス(TM1)がまっすぐな状態(straight)では TM1-TM2 間にポケットが存在するが、TM1 が曲がること(kink)でそのポケットはなくなる。(図 3)その過程で近接する ASP41 と ASP184 は、2 つの膜貫通ヘリックス(TM1, TM5)との相互作用で重要な位置(図 3 赤丸)にあり、構造変化において重要な役割があると考えられている。

st41,st184,st41-184 のシミュレーションを比較すると、st184 のみ水がポケットに入り、st41 と st41-184 の場合には、ポケットに脂質が入り込むことがわかった。(図 4)また、ki41-184 のシミュレーションでは、TM1 の kink 状態を維持しコンパクトな構造を保ち(図 4)、その結果、脂質分子の足がドメイン間の cavity の外に排出されることがわかった。これらの結果と構造の特徴から、straight の状態で、st41,st184,st41-184 と順番にプロトン状態が変わり、TM1 が kink して、ki41-184 に移るといったシナリオが仮定できる。

さらに、そのシナリオどおりにプロトン状態を変えながら SteeredMD シミュレーションを行うと、同様な効果が強調され、脂質分子 1 つが cavity の外へ排出された。

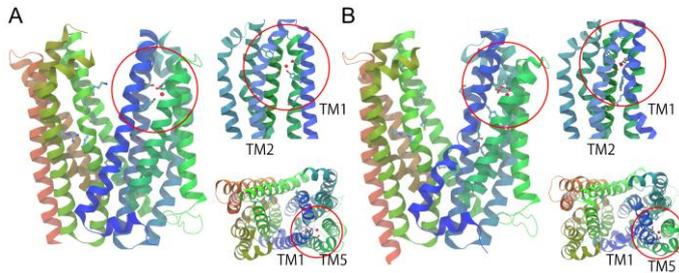


図 3 構造の特徴(横から,内側から,上から;  
A:straight,B:kink)

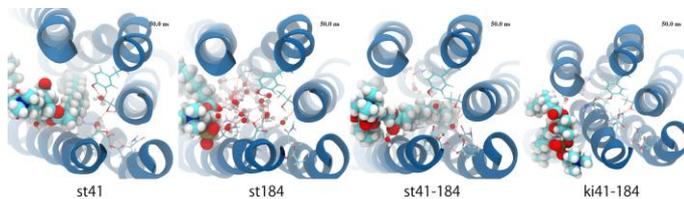


図 4 それぞれの条件でのスナップショット

#### 4. (まとめ)

複数の構造(straight, kink)、プロトン状態の個々の条件の組み合わせを計算することで、構造に対応するプロトン状態を推定することができた。また、straight から kink 状態に移ることで、脂質が cavity から排出された。排出の流れは、プロトンの状態変化→水の状態変化→タンパク質の構造変化という順番で起こっている。薬剤を排出する場合もこのような機構で行われていると考えられる。

#### 5. (今後の計画・展望)

これまで、MATE で排出される薬剤の力場がないために、直接、薬剤を排出する過程のシミュレーションができなかった。今後、MATE に排出される薬剤の一つである norfloxacin の力場を作成し、シミュレーションを行うことで、直接、薬剤の排出過程の理解を目指す。

#### 5) Structure prediction of transmembrane proteins palmitoylated MIR2, and the complex formation between MIR2 and immune recognition-related protein MHC-I

(担当 : Li)

##### 1. (本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係)

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, a human tumor virus, encodes two membrane-bound E3 ubiquitin ligases, modulator of immune recognition 1 (MIR1) and MIR2, to evade host immune system through the ubiquitination-mediated endocytosis and lysosomal degradation of the proteins involved in immune recognition. MIR2 downregulates the surface expression of MHC I (major histocompatibility complex class I), co-stimulatory proteins (B7-2, ICAM-1), and platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1). Recent experimental results have shown that the palmitoylation of MIR2 Cys146 is essential for MHC I and PECAM-1 downregulation, but not for B7-2, ICAM-1. This observation raises questions about the function of palmitoyl Cys146 (Cyp146) in the MHC-I downregulation. To gain insight into the molecular basis of MHC-1 recognition by MIR2 and the role of Cyp146 of MIR2, we performed a series of molecular dynamic simulations.

##### 2. (具体的な利用内容、計算方法)

A temperature replica-exchange molecular dynamics method with the GBSW implicit membrane model is employed to predict the complex structure of palmitoylated MIR2/MHC-I.

### 3. (結果)

We have predicted the complex structure of palmitoylated MIR2 and MHC-I and found out that the palmitoylated Cys146 of MIR2 is important for the complex formation. The simulation results suggest that the palmitoylation of MIR2 enhances the complex formation through the interaction between the palmitoyl chain and MHC-I (Fig. 1), thus promotes the downregulation of MHC-I.

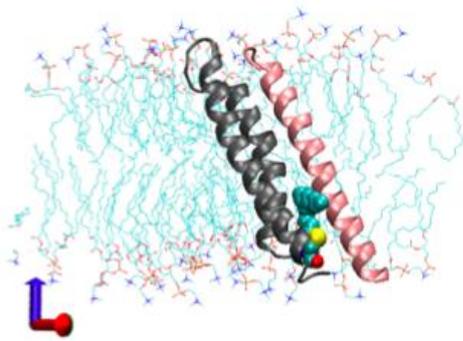


Fig. 5. Simulated three-dimensional structures of MIR2 and MHC-I in membrane. Overall structure of simulated MHC-I (JM + TM regions) and MIR2 (TM1 + ITM + TM2 regions) in the membrane environment. Main chains are depicted as a cartoon model; pink and gray show MHC-I and MIR2, respectively. Palmitoylated Cys146 involved in MIR2-mediated MHC-I downregulation are represented by spheres; cyan, red, and yellow show carbon, oxygen and sulfur, respectively.

### 4. (まとめ)

We have predicted the complex structure of palmitoyl MIR2/MHC-I, which clarified that the palmitoylated C146 is involved in the complex formation. Simulation results suggested that the palmitoylated C146 is located at the complex binding interface and contacts A320, V321, G324, and A325 of MHC-I (HLA-A2). Therefore, the interaction between palmitoylated C146 and

HLA-A2 is expectedly dominated by the hydrophobic interactions. We also found out that mutation of these four contact residues of HLA-A2 to hydrophobic residue do increase the MIR2's function experimentally, and it further support the reliability of complex model.

### 5. (今後の計画・展望)

In the next year, we will calculate the association energy for the complex structure of MIR2/MHC-I and MIR2(palmitoyl)/MHC-I and compare the results with the mutant experiment.

### 6) 構成要素の異なる脂質二重膜の

#### 分子動力学計算

(担当：小串)

#### 1. (本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係)

細胞膜上での蛋白質の機能の発現には、細胞膜の組成、特に膜蛋白質近傍の膜の組成が重要な役割を担っている。また、生体膜の本質は組成の多様性と、脂質分布の不均一性にある。膜蛋白質の計算を実行するには、十分安定な初期構造を用意する必要があるが、脂質混合膜の構造は未だ明らかではないことが多い。そこで本研究では、膜蛋白質を含む系において、脂質が自己組織化により二重膜を形成する分子動力学計算を実行する。計算には、分子の化学組成を元に単純化した粗視化モデル(MARTINI)を用いる。

#### 2. (具体的な利用内容、計算方法)

膜蛋白質(APP)を含む異なる3種類の膜の自己組織化(APP周りでの二重膜形成)を分子動力学計算とMARTINIモデルを用いて行った。具体的には、2種類の単一脂質膜(POPC膜、DOPG膜)とPOPC、スフィンゴミエリン(SM)、コレステロール(CHOL)を含む1種類の混合膜(POPC:SM:CHOL=6:3:1)の4種類の膜を扱う。APPを1つ含む系で、脂質分子、水分子の数はい

ずれも 128 および 1000 とした。混合膜については APP を 9 つ含む系についても計算を行った。

### 3. (結果)

APP に対して水、および脂質分子をランダムに配置した初期構造から、およそ 10 ns でいずれの系も APP 周りに二重膜を形成した。更にその後 1  $\mu$ s の分子動力学計算を行った。平衡状態において、二重膜の上下層で非対称な CHOL の分布を得た。リン脂質は対称に分布しており、この膜の異方性は APP によるものである。

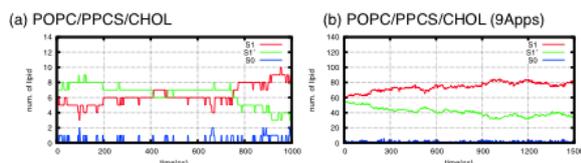


図 6. 混合膜におけるコレステロールの膜位置に対する個数

また、平衡状態における分子の拡散は、いずれの系でも短時間側では周りを別の分子に囲まれていることより subdiffusion( $msd \sim t^{0.5}$ )を、数 100 ns 以上の長時間側では正常拡散( $msd \sim t$ )の 2 つの運動を示す。単一脂質膜ではチャージを持つ DOPG が POPC に比べ拡散係数が小さい。一方、混合膜ではリン脂質が遅い拡散を示す領域が単一脂質膜に比べ広がっている。拡散の速さは、短時間側で POPC>SM>CHOL の順であり、正常拡散の領域では CHOL>SM>POPC である。

### 4. (まとめ)

粗視化モデルを用いて APP 周りに形成される脂質二重膜の構造について 2 種類の単一脂質膜と 1 種類の混合膜について解析を行った。計算結果から、混合膜では安定なドメイン形成は見られなかったが、二重膜上下層で CHOL が非対称に分布することがわかった。これは APP の機能と関係していることが示唆される。

### 5. (今後の計画・展望)

本研究で得られた粗視化モデルによる平衡構造を元に、全原子モデルでの構造を作成した。今後は得られた平衡構造を初期構造として用い、詳細な

膜と蛋白質の相互作用や APP の振る舞いについて全原子モデルを用いて調べる予定である。

## 7) 膜タンパク質の分子動力学計算

(担当：小室・杉田)

### 1. (本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係)

カルシウムポンプは筋小胞体膜の膜蛋白質であり、2 個の  $Ca^{2+}$  を輸送する P 型の ATP 加水分解酵素である。反応の詳細な機構を調べることは、ATP 加水分解酵素の構造的理解に重要である。我々は分子シミュレーションの方法を用いて、反応サイクルのモデリングに取り組んでいる。

### 2. (具体的な利用内容、計算方法)

平衡化した DOPC 脂質二重膜に、ATP と 2 個の  $Ca^{2+}$  が結合した E1 $\cdot$ ATP 状態 [PDB: 1VFP], ATP が加水分解し Asp351 がリン酸化され ADP と 2 個の  $Ca^{2+}$  が結合した E1P $\cdot$ ADP 状態 [PDB: 2ZBD] のカルシウムポンプを埋め込み、溶媒を露わに含む全原子分子動力学計算を分子動力学ソフトウェア NAMD によって実行した。力場は脂質二重膜には CHARMM36、蛋白質やリガンドには CHARMM27 を用いた。

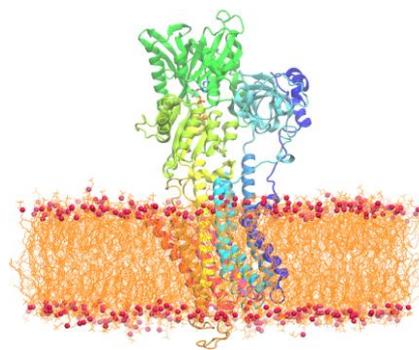


図 7. DOPC 脂質二重膜に埋め込んだカルシウムポンプの X 線結晶構造。

### 3. (結果)

ATP 結合サイトは、E1 $\cdot$ ATP 状態でのシミュレーションは開始直後から  $Mg^{2+}$  の配位が変化し、ATP のコンフォメーションが結晶構造から大きく変化した。 $Ca^{2+}$  結合サイトは両状態で 2 個の  $Ca^{2+}$  が安定に結合していた。ATP コンフォメーション

の力場依存性を調べるため、CHARMM 力場と AMBER 力場を用いて (1) E1・ATP 状態の MD 計算, (2) 水溶液中においた ATP のレプリカ交換分子動力学計算を行った。両者の力場ではリン酸基部分の原子電荷に大きな違いがあった。(1) では電荷に起因する相互作用である ATP と正電荷アミノ酸との塩橋や、水分子との水素結合の形成が両者で明らかに異なった。(2) では二面角と角度の分布や、溶液中のカウンターイオンとの配位に違いが見られた。

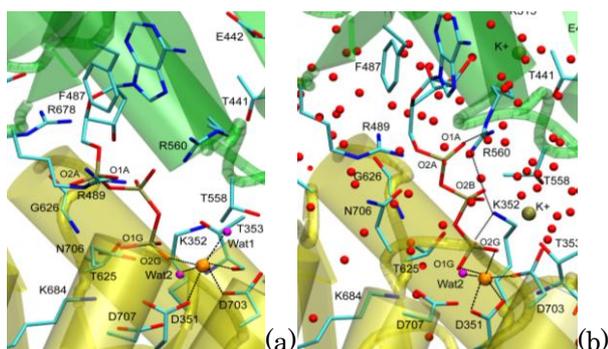


図 8. ATP 結合サイトの構造変化. (a) ATP 結合部位の X 線結晶構造. (b) CHARMM 力場を用いた 200 ns の MD シミュレーションの最終構造.

#### 4. (まとめ)

カルシウムポンプの結晶構造を DOPC 脂質二重膜に埋め込み 200 ns の MD シミュレーションを実行した。CHARMM 力場では ATP のコンフォメーションが結晶構造から大きく変化し、不安定であった。この結果から ATP 分子力場の精度に依存する問題が明らかになった。

#### 5. (今後の計画・展望)

ATP 分子力場の精度に依存する問題を克服すべく、今後は量子化学計算を用いて ATP 分子力場の改良に取り組んでいく。

#### 8) レプリカ交換分子動力学計算による

##### 糖鎖の立体構造予測

(担当：渡部)

#### 1. (本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係)

糖鎖は、細胞分化、免疫、癌、ウイルス感染など

多様な生命現象・疾患と深く関わっている。しかし、柔軟性の高い糖鎖の立体構造解析は現在でも困難であり、原子・分子解像度での糖鎖機能解析を妨げている。一方で、拡張アンサンブル法や分子力場の開発は急速な進歩を遂げており、分子動力学計算が糖鎖構造解析の有力な手段となりつつある。現在、糖鎖の計算には AMBER (GLYCAM) 力場や CHARMM 力場が広く用いられている。糖鎖に関しては前者が、膜や脂質分子に関しては後者の評価が高い。本研究では、既存の CHARMM 力場を再評価、改善し、細胞表面糖鎖に対する信頼性の高い構造計算を実現する。

#### 2. (具体的な利用内容、計算方法)

これまで我々は、AMBER 力場を用いたレプリカ交換分子動力学 (REMD) 計算により、水中 N 型糖鎖のコンフォメーション予測を行った。計算結果は NMR の実験データと良く一致した。今年度は、既存の CHARMM 力場を用いて同様の計算を行い、AMBER 力場の結果と比較し評価した。REMD 計算には、QBiC の宮下らが開発した REIN (Replica Exchange Interface) を用いた。2 種類の N 型糖鎖 (Bi9 と BiBF11) について、水中条件下で  $\sim 3 \mu\text{s}$  の計算を行い、各々の立体構造分布を求めた。

#### 3. (結果)

AMBER 力場を用いた REMD 計算では、Bi9 の溶液構造として、主に  $\alpha 1-6$  分岐鎖の配向が異なる、5 つの特徴的なコンフォマーが得られた。一方、CHARMM 力場を用いた計算結果は、AMBER の計算結果と著しく異なる。AMBER の結果に見られた構造多形性はなく、1 つのコンフォマーが安定に存在する結果となった。NMR の実験データとも一致しない。AMBER の結果は、 $\alpha 1,6$  グリコシド結合が糖鎖の構造多形性と密接に関わっていることを示す。既存の CHARMM 力場を用いた計算では、 $\alpha 1,6$  グリコシド結合近傍の糖鎖-水分子間相互作用がバランス良く表現出来ていないものと考えられる。

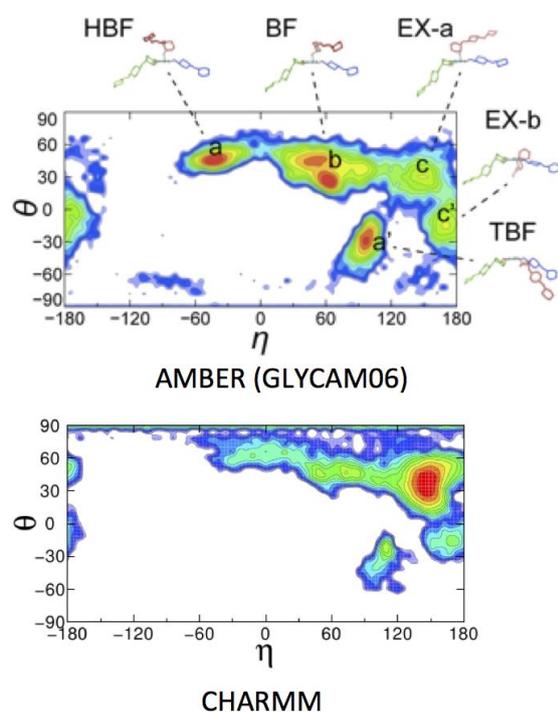


図 9. REMD 計算から得られた水中 Bi9 の自由エネルギーマップ

#### 4. (まとめ)

拡張アンサンブル法や分子力場の開発は急速な進歩を遂げている。分子動力学計算が糖鎖構造解析の有力な手段となるためにも、その信頼性を左右する力場の評価と改善は重要である。本研究では、N 型糖鎖の REMD 計算から CHARMM 力場の再評価を行い、その問題点を明らかにした。

#### 5. (今後の計画・展望)

今回の結果から、既存の CHARMM 力場は  $\alpha$  1,6 グリコシド結合周りの記述に問題があると分かった。今後、適切なモデル化合物を用いて関連パラメタを改善し、細胞表面糖鎖に対する信頼性の高い構造計算を実現する。

## 平成 24 年度 RICC 利用研究成果リスト

## 【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】

1. Lyons, J. A., Aragão, D., Slattery, O., Pislakov, A.V., Soulimane, T. and Caffrey, M., "Structural insights into electron transfer in *caa3*-type cytochrome oxidase", (2012) *Nature*, **487**, 514-518.
2. Kajikawa, M., Li, P., Goto, E., Miyashita, N., Aoki-Kawasumi, M., Mito-Yoshida, M., Ikegaya, M., Sugita, Y., Ishido, S., "The Intertransmembrane Region of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Modulator of Immune Recognition 2 Contributes to B7-2 Downregulation", (2012) *J. Virology*, **86**, 5288-5296.
3. Yamaguchi, Y., Nishima, W., Re, S., and Sugita, Y., "Confident identification of isomeric N-glycan structures by combined ion mobility mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography", (2012) *Rapid Commun Mass Spectrom*, **26**, 2877-2884.
4. Re, S., Nishima, W., Miyashita, N., Sugita, Y., "Conformational flexibility of N-glycans in solution studied by REMD simulations", (2012) *Bio. Phys. Rev.*, **4**, 179-187.
5. Ghosh, M., Re, S., Feig, M., Sugita, Y., Choi, C-H. "Interionic Hydration Structures of NaCl in Aqueous Solution: A Combined Study of Quantum Mechanical Cluster Calculations and QM/EFP-MD Simulations" (2012) *J. Phys. Chem. B*, **117**, 289-295.
6. Choi, C-H., Re, S., Feig, M., Sugita, Y. "Quantum Mechanical/Effective Fragment Potential Molecular Dynamics (QM/EFP-MD) Study on Intra-Molecular Proton Transfer of Glycine in Water" (2012) *Chem. Phys. Lett.*, **539-540**, 218-221.
7. Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y., Takagi, J. "Crystal structure of  $\alpha 5\beta 1$  integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor" (2012) *J. Cell. Biol.*, **197**, 131-140.
8. Sugita, Y., Miyashita, N., Li, P., Yoda, T., and Okamoto, Y., "Recent Applications of Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules" (2012) *Curr. Phys. Chem.*, **2**, 401-412.
9. Jung, J., Re, S., Sugita, Y., Ten-no, S. "Improved constrained optimization method for reaction-path determination in the generalized hybrid orbital quantum mechanical/molecular mechanical calculations" (2013) *J. Chem. Phys.*, **138**, 044106.
10. Komuro, Y., Miyashita, N., Mori, T., Muneyuki, E., Saitoh, T., Kohda, D., and Sugita, Y., "Energetics of the Presequence-Binding Poses in Mitochondrial Protein Import Through Tom20", (2013) *J. Phys. Chem. B* in press.

## 【国際会議などの予稿集、proceeding】(proceeding)

なし

## 【国際会議、学会などでの口頭発表】

1. Komuro, Y., Miyashita, N., Mori, T., Muneyuki, E., Saitoh, T., Kohda, D., and Sugita, Y., "Free Energy Analysis of Recognition Mechanism of Mitochondrial Outer Membrane Protein Tom20-presequence Complex", SKYセミナー, 2012年4月, 東京
2. 小室靖明, 宮下尚之, 森貴治, 宗行英朗, 齊藤貴士, 神田大輔, 杉田有治, "タンパク質複合対形成の分子機構と自由エネルギー解析", 新学術領域研究「過渡的複合体」班会議, 2012年5月, 山梨県小淵沢リゾナーレ小淵沢
3. 小林千草, 杉田有治, "カルシウムイオンポンプ内の水素結合ネットワークに関する理論的研究", 第15回理論化学討論会, 2012年5月, 仙台

## 平成 24 年度 RICC 利用報告書

4. 小串典子, 小林俊秀, 杉田有治, “分子動力学計算を用いた生体膜研究”, 植物脂質シンポジウム, 2012年11月, 神戸
5. 李秀榮, 杉田有治 “レプリカ交換分子動力学計算による糖鎖-タンパク質相互作用の解析”, 第 26 回分子シミュレーション討論会, 2012年11月, 福岡

### 【その他】 (poster presentation)

1. 小串典子, 小林俊秀, 杉田有治, “Morphology changes of mixed lipid membranes”, 第二回 AICS 国際シンポジウム, 2012 年 3 月, 神戸
2. 小串典子, 小林俊秀, 杉田有治, “二成分脂質混合膜における膜の形態変化”, 日本物理学会第 67 回年次大会, 2012 年 3 月, 兵庫県西宮市
3. 小串典子, 小林俊秀, 杉田有治, “Morphology changes of DAPC/DAG/W membranes”, 理事長ファンド指定型「水科学」ワークショップ, 2012 年 5 月, 埼玉県和光市
4. Re, S., Nishima, W., Miyashita, N., Yamaguchi, Y., Sugita, Y. Conformational flexibility of N-glycan in water studied by replica-exchange molecular dynamics simulation. 26th International Carbohydrate Symposium, July 2012, Madrid, Spain.
5. Pisliakov, A. V., and Sugita, Y., “*In silico* mutants of nitric oxide reductases provide insights into development of proton pathways in the heme-copper oxidase superfamily”, at the *European Bioenergetics Conference*, Sep. 2012, Freiburg, Germany.
6. Pisliakov, A. V. and Sugita, Y., “Comparison of proton pathways in nitric oxide reductases and *cbb<sub>3</sub>* and *caa<sub>3</sub>* oxidases”, at the *International Workshop on Membrane Proteins*, Sep. 2012, Florence, Italy.
7. 小林千草, 小池亮太郎, 太田元規, 杉田有治, “Large-scale conformational changes of SERCA analyzed with Motion Tree method”, 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月, 名古屋
8. 二島渉, 宮下尚之, 山口芳樹, 杉田有治, 李秀榮, “バイセクティング GlcNAc とフコースの導入が水中N型糖鎖の構造多様性に及ぼす影響”, 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012 年 9 月, 名古屋
9. Komuro, Y., Kobayashi, C., Muneyuki, E., and Sugita, Y., “Molecular dynamics simulations of SR Ca<sup>2+</sup>-pump in the ATP/ADP bound forms”, 第50回日本生物物理学会, 2012年9月, 名古屋
10. Komuro, Y., Kobayashi, C., Muneyuki, E., and Sugita, Y., “Molecular dynamics simulations of SR Ca<sup>2+</sup>-pump in the ATP or ADP bound forms”, 野依サマースクール, 2012年9月, 島根県松江市
11. Komuro, Y., Kobayashi, C., Muneyuki, E., and Sugita, Y., “筋小胞体カルシウムポンプのATP/ADP結合状態の分子動力学計算”, 第26回分子シミュレーション討論会, 2012年11月, 福岡
12. 渡部茂久, 李秀榮, 二島渉, 宗行英朗, 杉田有治, “レプリカ交換分子動力学計算による糖鎖力場の検証”, 第 26 回分子シミュレーション討論会, 2012年11月, 福岡
13. Kobayashi, C., Koike, R., Ota, M., and Sugita, Y., “Different scale conformational changes of SERCA analyzed with Motion Tree method”, Biophysical Society 57th Annual Meeting, Feb. 2013, Philadelphia, USA
14. Nishima, W., Yamaguchi, Y., Sugita, Y., and Re, S., “Multiple conformers and their spectroscopic properties of N-Glycan predicted using replica-exchange simulations”, Biophysical Society 57th Annual Meeting, Feb. 2013, Philadelphia, USA
15. Komuro, Y., Miyashita, N., Mori, T., Muneyuki, E., Saitoh, T., Kohda, D., and Sugita, Y., “Free-energy analysis on the TOM20-presequence complex in solution for understanding a dynamic-equilibrium model”, Biophysical Society 57th Annual Meeting, Feb. 2013, Philadelphia, USA

16. Komuro, Y., Kobayashi, C., Muneyuki, E., and Sugita, Y., “Molecular dynamics simulations of SR Ca<sup>2+</sup>-pump in the ATP bound forms”, 5th HOPE MEETINGS, Feb. 2013, Tokyo