

課題名 (タイトル) :

生体分子の粗視化シミュレーション技術の開発

サブテーマ 1 :

生体分子粗視化モデルの開発と応用

利用者氏名 : ○木寺 詔紀*, 高田 彰二**

所属 : *社会知創成事業 次世代計算科学研究開発プログラム

次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ 分子スケール研究開発チーム

**京都大学理学研究科生物科学専攻生物物理学教室

報告内容

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

背景 : 次世代計算科学研究開発プログラム分子スケール研究開発チームにおいて我々は、様々な生体分子系の粗視化シミュレーションを可能とするソフトウェア“CafeMol”を開発してきた。しかし、昨年までにリリースされた CafeMol (ver 1.0) [2010/12/27 release]はまだ開発途中の段階にあった為、以下の様な問題が存在した。

ダイナミクス : CafeMol(ver 1.0) では Langevin-dynamics もしくは、Newtonian-dynamics(with Berendsen thermostat)の選択肢を提供していた。しかし、これらのダイナミクスでは生体内(水溶液中)という環境において重要となる流体力学的効果を正確に反映する事ができないという問題があった。

モデル : (i) CafeMol(ver 1.0)では蛋白質系の folding や大規模な構造変化シミュレーションを可能とする off-lattice Go-model や Multiple-basin model (switching-potential)を提供していた。しかし、CafeMol の最終的な目標は、単に蛋白だけでなく DNA/RNA もしくはその複合体のシミュレーションを遂行することにある。(ver 1.0 では RNA/蛋白複合体のシミュレーションができなかった。) (ii) CafeMol(ver 1.0)では原子的な相互作用に基づいて構築された AICG モデルを提供した。このモデルにより蛋白の 2 次構造毎に適切なパラメータを利用しての(より現実的な)粗視化シミュレーションが可能となる。しかし、AICG モデルは Disordered な末端[N 末/C 末]や柔らかいリンカー領域に適用する事はできなかった。

実行モード : CafeMol(ver 1.0)では、エネルギー最小化や焼き鈍し(Annealing)、Restart 機能といったユーザーにとって基本的な機能が幾つか実装されていなかった。

目的 : 上記背景の問題を解決する為に新しいダイナミクス、モデル、実行モードを実装し、CafeMol (ver 2.0)を開発する。具体的に、次の実装を目指す: ダイナミクスに関しては、簡便に流体力学的な効果を実現できる MPC(Multi-Particle Collision) dynamics[Gompper et al., 2009]を実装する。DNA モデルに関しては Pablo グループ(2009)のモデル/エネルギー関数(3SPN.1force-field)を実装する。RNA モデルに関しては、同開発チームの堀(2012)が新しいモデルを独自に開発/実装する。(RNA モデルのデフォルトのパラメータの評価/同定も行う。) 蛋白の Disordered な末端[N 末/C 末]や flexible なリンカー領域に対応可能な AICG2 モデルを開発/実装する(W. Li et. al 2012)。

2. 具体的な利用内容、計算方法

新しく実装されたダイナミクス、モデル、モード(機能)を実際に RICC 環境で計算実行し、その定性的な結果をチェック(調査)する。そうする事で、実装されたモデル/機能の動作確認を遂行し妥当性の検討をする。

3. 結果

RICC システムを用いる事で得られた結果の内、主なものを幾つか以下に記載する。

ダイナミクス : CafeMol に新しく実装した MPC

dynamics の動作確認をする為に様々な長さ(慣性半径)のランダムポリマーや、球状蛋白の拡散係数をシミュレーション(MSD)から評価した。その結果、MPC により評価された拡散係数は Zimm 理論に従い慣性半径の逆数にほぼ比例するのに対して、Langevin-dynamics で評価した拡散係数は、Zimm 理論で予測された値から大きく逸脱し、非常に低く見積もられる事が確認された。この事は、CafeMol に実装された MPC-dynamics が流体力学的な効果を正しく実現している事を意味する。

DNA モデル：CafeMol に実装した DNA モデルが B 型-DNA の melting のイオン強度依存性や stiffness といった基本的な力学的性質を定性的に再現する事を確認した。更にこの DNA モデルを蛋白/DNA 複合体であるヌクレオソームに適用する事で unwrapping 等の現象を調査した(詳細は同開発チーム：検崎の結果報告(2012)を参照の事。)

RNA モデル：新しく構築した RNA モデル(堀 2012)のローカル/ノンローカルのモデルパラメーターを fluctuation matching methods によって評価した。更にそのパラメータを用いてリボソームの translocation 機構に迫る調査を行った(詳細は同開発チーム：堀の結果報告書を参照のこと)。

4. まとめ

5. 今後の計画・展望

今年度までの RICC 利用により、生体粗視化シミュレーションの実現の為に必要な機能を CafeMol(ver 2)に実装する事に成功した。しかし、CafeMol には他にも開発/実装すべき機能/モデルが存在する。例えば、MPC-dynamics は流体力学的効果を再現する事ができるが、その計算コストが高い。そこで、Stokesian Dynamics や Brownian dynamics with HI (McCammon 等)といった別のダイナミクスを実装する必要があると考えられる。また、脂質/蛋白の複合体モデルのシミュレーションをする為に lipid モデル(Noguchi 等)を実装しなくてはならない。

6. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由 なし

課題名 (タイトル) :

生体分子の粗視化シミュレーション技術の開発

サブテーマ 2 :

キネシン分子モーターの一方向性の運動発現機構の粗視化シミュレーションによる研究

利用者氏名 : ○木寺 詔紀*, 金田 亮**

所属 : *社会知創成事業 次世代計算科学研究開発プログラム

次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ 分子スケール研究開発チーム

**京都大学理学研究科生物科学専攻生物物理学教室

報告内容

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

背景 : キネシンは ATP 加水分解反応で得られた化学的なエネルギーを効率良く利用して、微小管上に沿った processive でかつ一方向性のある運動を実現する分子モーターである。特に双頭キネシンモーター(Kinesin-1)は、二つのヘッドを交互に動かす事であたかも人間が歩くようにして 1 方向に進み、タイトな化学-力学カップリングを実現する。このキネシンの代表的な歩行モデルの一つとして、Haward 等(2001)によって提唱された“hand-over-hand”モデルがある。このモデルでは、双頭キネシンを構成する 2 つのヘッドが互いに協調性のある運動を実現すると考えられている。例えば、片方のヘッドがレール(微小管)に結合し、もう片方のヘッド(ADP 結合ヘッド)がレールから解離している状況では、微小管に結合しているヘッドのヌクレオチド状態に依存して解離ヘッドの微小管への再結合過程が大きく異なる : すなわち、結合ヘッドのヌクレオチド状態がフリーである場合に比べて、結合ヘッドのヌクレオチド状態が ATP である場合の方が解離ヘッドの再結合過程(ADP 放出を伴う)が早くなる。他にも 2 つのヘッド間で実現される協調性として、片方のヘッドのみがレールに結合している場合([ヌクレオチドフリー])の方が、両方のヘッドがレールに結合している場合(前足[ヌクレオチドフリー]-後足[ATP])に比べて、レールに結合しているヌクレオチドフリー状態のヘッドが ATP 分子を結合する過程(遷移)が起こり易くなるというものがある。特にこ

の現象は front-gate メカニズムと呼ばれているが、一体、どのような機構でこのような協調性が発現しているのかその詳細は不明である

目的 : 本研究の目的は hand-over-hand モデルの歩行様式で提唱されている双頭キネシンの二つのヘッド間の協調性発現機構に粗視化シミュレータ : Cafemol を用いて迫る事である。その手始めとして、原子スケールの MD シミュレーションを行う事で front-gate メカニズムの発現機構を調査する。

2. 具体的な利用内容、計算方法

全原子 MD シミュレーションにより front-gate メカニズムの協調性発現機構に迫るために、初期構造として次の二つの系(A, B)を用意した :

- A. on-pathway[前足(ヌクレオチドフリー)-後足(ATP)]状態の双頭キネシンが微小管(2組の α β チューブリン)上に強結合した複合体モデル
- B. モノマーのキネシン(ヌクレオチドフリー状態)が微小管(1組の α β チューブリン)上に強結合した複合体モデル

上記二つの複合体構造(モデル)を得る為にまず、牧野、富重等によって得られたキネシンの単体構造(ヌクレオチドフリー)と微小管(α 、 β チューブリン)の結晶構造をキネシン-微小管の複合体の cryo-EM map (Sindelar, 2010)に rigid-body フィッティングした。その際、A. ダイマーモデルの系に関しては、二つのヘッドの間を繋ぐネックリンカーと呼ばれる disordered 領域の構造を数 10ns の全原子 MD シミュレーションをする事で緩和

した。全原子 MD のシミュレーション設定に関しては、次の様にした：力場は amber99sb force field を、シミュレータとしては GROMACS (4.55) を用いた。水は陽に取り扱い、温度 300K 圧力 1atm の NPT アンサンブルを適用した。イオン強度に関しては、実際のキネシンの運動特性の一分子計測実験等で良く適用される 80mM とした。微小管の構造を安定させる為に微小管に対して位置拘束のポテンシャルを適用した。また、ヘッドと微小管の界面に存在する残基(キネシンの α 4-helix)に対しても、ヘッドと微小管の複合体構造を安定化させる為に位置拘束のポテンシャルを適用した。

3. 結果

まず、A), B) の 2 つのモデル構造全体の安定性を調べる為に、初期構造からの RMSD の時間発展を調べた。その結果、ヘッド全体の RMSD 値はモデル A), B) 共に $\sim 0.3\text{nm}$ で収束しており、剛体フィッティングで得られた初期構造複合体モデルは安定でかつ妥当性がある事が確かめられた。次に、A) ダイマーモデルと B) モノマーモデルで、apo 状態のヘッドのヌクレオチド結合部位の構造(や揺らぎ)に焦点を当てて比較調査した。その結果、ヌクレオチド結合部位の構造は、B) モノマーの方が A) ダイマーよりも開いた構造で保持されている事が判明した。具体的に、キネシンのヌクレオチド結合部位を構成している switch-I ループと p-ループの幾つかの代表的な残基間距離の時系列を調べた。その結果、サンプルによって多少のばらつきはあるものの、B) モノマーにおける switch-I と p-loop の残基間距離の方が A) ダイマーにおける対応する残基間距離に比べて大きいことが見出された。

4. まとめ

全原子 MD で得られた定性的な傾向は、実験で観測されている front-gate メカニズムの協調性と整合性があると考えられる：キネシンが A) のモデルの様に両方のヘッドが微小管に結合している場合には、ヌクレオチド結合部位の構造が閉じている傾向を取る為に、ATP の結合の遷移率が遅い。一方、キネシンが B) のモデルの様に片足

のみが微小管に結合している場合には、ヌクレオチド結合部位の構造が開いている傾向を取る為にリガンド結合の遷移率が低下しないと考えられる。

5. 今後の計画・展望

全原子 MD を用いた調査により、キネシンの二つのヘッド間の front-gate メカニズムの可能性について示すことが出来た。しかし、この様なヘッド間の協調性がどのようなメカニズムで発現するかについてはまだ十分理解が進んでいない。(協調性は二つのヘッド間の内部張力が起因となって発現するという考えがあるが定かではない。)そこで、今後の研究ではヘッド間の様々な協調性が双頭キネシンの内部張力に起因して発現するという立場にたち、Cafemol を用いた Multiple-basin の粗視化シミュレーションによりそれを検証する。

6. 利用がなかった場合の理由

なし

課題名 (タイトル) :

生体分子の粗視化シミュレーション技術の開発

サブテーマ 3 :

DNA-タンパク質複合体の粗視化シミュレーション:ヌクレオソームのダイナミクス

利用者氏名 : ○木寺 詔紀*, 検崎博生**

所属 : *社会知創成事業 次世代計算科学研究開発プログラム

次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ 分子スケール研究開発チーム

**情報基盤センター

報告内容

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

生物の遺伝情報を担っている染色体は非常に長い DNA とタンパク質の複合体であり、階層構造を取ることによって、狭い核内にコンパクトに格納されている。この染色体の基本ユニットがヌクレオソームであり、ヒストン八量体の周りを DNA がおよそ 2 回転程巻きついている構造となっている。ヌクレオソームは互いに集まって高次構造を取るが、DNA の複製や遺伝子の発現の際には解かれる必要がある。このようにヌクレオソームの構造変化は生体の機能に直結しており、近年非常に興味を持たれて調べられている。

ヌクレオソームの構造変化については、近年、一分子実験などによりさまざまなことが明らかにされつつある。本研究では、ヌクレオソームの粗視化シミュレーションを行うことによって、ヌクレオソームの分子レベルでの構造ゆらぎを調べることを目的とする。

また、この課題は「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発」プロジェクトの一環として行われているが、ここでのヌクレオソーム単体での成果を踏まえて、次世代スーパーコンピュータ「京」ではヌクレオソーム多数の系での計算を行っていく予定である。

2. 具体的な利用内容、計算方法

シミュレーションは、我々のグループで開発している生体分子粗視化シミュレータ CafeMol を用いて行った。今年度は、DNA がヒストンに巻きつく過程であるヌクレオソームのラッピングについてさまざまな条件で調べた。また、ヌクレオソームの両端の DNA 二本鎖を両端から引っ張るアンラッピング実験に対応するシミュレーションも行った。

3. 結果

ヌクレオソームのラッピング過程については、塩濃度を変えた複数の条件でシミュレーションを行った。in vitro の実験で、ヌクレオソームは非常に高い塩濃度では、DNA とヒストンが解離しており、塩濃度を下げていくとヌクレオソーム構造を取ることが知られているが、シミュレーションでも同じふるまいがみられた。

生理条件下よりも低い塩濃度では、ほとんどの場合、DNA が X 線結晶構造とは異なる構造に巻きくという結果が得られた。そして、塩濃度が上がると、正しくラッピングする割合が増え、ラッピングが起こる上限程度の塩濃度では、間違ったらラッピング構造に巻きつくことはなくなった。これは、in vitro の実験でヌクレオソームを精製するためには、塩濃度を最初高塩濃度にしてから徐々に下げていく必要があるという事実と、対応していると考えられる。

ラッピングシミュレーションの結果から、生理条件のような塩濃度では、ヌクレオソームは自

由エネルギー最小でないさまざまな構造を取ることが示唆される。実際の生体内では、ヒストンシャペロンやクロマチン再構成複合体によって、ヌクレオソーム構造を制御し、さまざまな遺伝子の発現の調節を行っていると考えられる。

ヌクレオソームのアンラッピングシミュレーションについては、一定速度で DNA 二本鎖の両端を引っ張るというシミュレーションを行った。DNA はヒストンの周りをほぼ二巻きしているが、シミュレーションの結果は、外側の一巻きについてはエネルギー障壁がなく、内側の一巻きを解き始めるところに大きな障壁が存在した。これは力学的なアンラッピングの一分子実験の結果と一致している。この大きな障壁の存在は、ヌクレオソームの構造ゆらぎの性質を強く規定するものと考えられる。

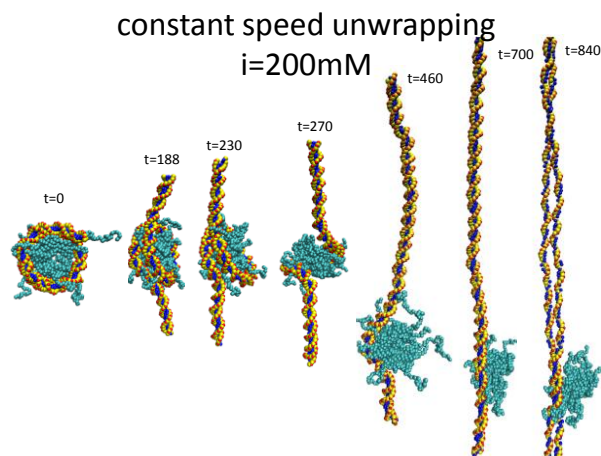


Figure 1. ヌクレオソームのアンラッピングシミュレーションのスナップショット

4. まとめ

ヌクレオソームのラッピングや力学的なアンラッピングについて調べた。シミュレーションの結果は、実験と一致しており、ヌクレオソームの構造とそのゆらぎについてさまざまな示唆が与えられた。

5. 今後の計画・展望

ヌクレオソーム単体については、さまざまな事

が分ってきたが、今まで簡単化のために無視してきたヒストン八量体自身の分離などを考慮したシミュレーションを行いたいと考えている。また、ヌクレオソーム多数の系での計算も行っていく予定である。

6. 利用がなかった場合の理由

なし

課題名 (タイトル) :

生体分子の粗視化シミュレーション技術の開発

サブテーマ 4 :

Functionally rotating mechanism of a multidrug transporter studied by coarse-grained simulation

利用者氏名 : 〇木寺 詔紀*, Xin-Qiu Yao**

所属 : *社会知創成事業 次世代計算科学研究開発プログラム

次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ 分子スケール研究開発チーム

**京都大学理学研究科生物科学専攻生物物理学教室

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

Multidrug resistance is a serious problem in current chemotherapy. The efflux system largely responsible for the resistance in *E. coli* contains the drug transporter, AcrB. The crystallographic studies displayed an asymmetric conformation of AcrB, suggesting the functionally rotating mechanism. However, the drug uptake pathways are somewhat controversial because at least two possible pathways, the vestibule and the cleft paths, were suggested. In previous work, we have characterized the free energy of drug uptake in AcrB, and suggested a drug-dependent binding mechanism. In this work, to confirm the findings of the free energy analysis, we have performed large-scale coarse-grained molecular dynamics simulations of drug uptake in AcrB. The study covers a broad spectrum of drugs, with various hydrophobicity, lipophilicity, and molecular sizes. The results are largely consistent to the free energy analysis, confirming the drug-dependent uptake. In addition, direct simulations identified an alternative uptake path which is not visible in the crystal structure. The newly found pathway was also supported by site-directed mutagenesis of AcrB in *E. coli*.

2. 具体的な利用内容、計算方法

Structure-based two-bead model of protein was employed, with model parameters assigned by the

atomic-interaction-based coarse-grained (AICG) method. The drug was essentially considered a rigid linear chain, associated with two adjustable parameters indicating the strength of interaction between drug and protein (c_P) and between drug and membrane (c_M), respectively. The same hydrophobic interaction and membrane model as before were employed. The dynamics of drug uptake in AcrB was investigated by a large set of dynamic simulations surveying a broad range of values (0.0~1.4) for parameters c_P and c_M . In addition, we considered three drug models with different molecular sizes, acriflavine, minocycline, and novobiocin. For each set of parameters, at least 100 trajectories were sampled with each guided by Langevin dynamics at the temperature $T=300\text{K}$ and carried out in a $230\times 230\times 250(\text{\AA}^3)$ box. The conformational change of AcrB was realized by switching the reference states of the AICG potential obeying the order defined by the functionally rotating mechanism: 1) Starting with ABE state, we 2) first switched the reference state to BEA, and then 3) switched to EAB. For each state, 1.0×10^6 steps of time integration were performed with a step-size 0.1τ and structures saved every 1000 steps, where τ is the CafeMol time unit. All the calculations mentioned above were performed by the CafeMol package with slight modification of the source codes.

3. 結果

Statistics of uptake events in the dynamic simulations is largely consistent with the conclusion of the free energy analysis. As illustrated by Fig. 1, the vestibule pathway was dominant when both c_P and c_M are large, whereas the cleft pathway was dominant otherwise.

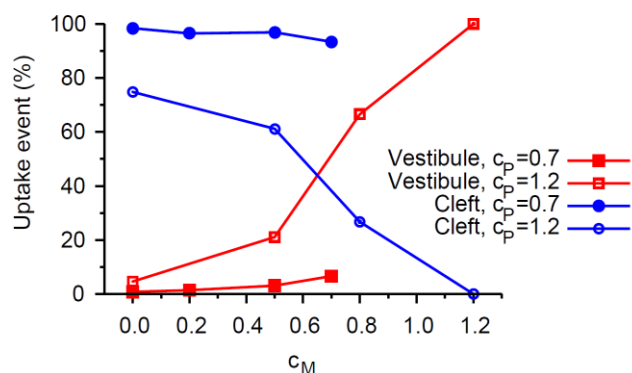


Figure 1. Drug uptake pathway switches depending on the property of the drug.

In the uptake events from near the vestibule, unexpectedly, we noticed that the route is further split into two sub-pathways, named the vestibule pathways a and b. Whereas the former is the pathway discovered in the structural analysis, the latter is a kind of “missing” pathway, not visible in the crystal structure. The sub-pathway b goes along the bottom of the porter domain in a direction towards PC1. Site-directed mutagenesis of AcrB in *E. coli* verified that mutations of residues located along the newly identified path significantly reduce the efflux efficiency, supporting its relevance in *in vivo* function.

We also investigated the effect of molecular size of the drug on the selection of uptake pathway. The simulations showed that the smallest drug, acriflavine, took mostly the vestibule path as the dominant drug uptake pathway. Both minocycline and novobiocin, with similar c_P to acriflavine but larger molecular sizes, favored the cleft path instead. The results imply that, in addition to the hydrophobicity and lipophilicity, the molecular size could have an effect on the uptake pathway taking by drugs.

4. まとめ

Both the free energy analysis and the dynamic simulations suggest a drug-dependent binding mechanism in AcrB. Both the vestibule and the cleft pathways are available for drug uptake, and which is dominant is largely dependent on the physiochemical property of the drug. Drugs that are both sufficiently hydrophobic and lipophilic favor the vestibule path, while other drugs favor the cleft pathway. In addition, with similar hydrophobicity and lipophilicity, smaller drugs tend to utilize the vestibule pathway whereas larger drugs prefer the cleft pathway.

5. 今後の計画・展望

The present work was performed based on a system containing the naked AcrB. We should note, however, how the AcrB partners, i.e. AcrA and TolC molecules, affect the conclusion is still obscure due to the lack of the structure of AcrAB-TolC tri-complex. One important question to raise here is: What does our work imply if the cleft pathway is really blocked? To answer this question, we need to do molecular modeling of the complex structure, which is still quite challenging in the field.

課題名 (タイトル) :

生体分子の粗視化シミュレーション技術の開発

サブテーマ 5 :

タンパク質-RNA 複合体の粗視化分子シミュレーション手法の開発

利用者氏名 : ○木寺 詔紀, 堀 直人

所属 : 社会知創成事業 次世代計算科学研究開発プログラム

次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ 分子スケール研究開発チーム

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

近年、様々な機能性 RNA 分子やタンパク質-RNA 複合体の細胞内での重要な役割が明らかになりつつある。タンパク質と同様、これらのダイナミクスを調べるには分子動力学計算が適しているが、広範囲な時間/空間スケールに対する計算を行うためには、全原子モデルと粗視化モデルを組み合わせるマルチスケールな計算手法が必要である。申請者は、生体分子粗視化シミュレーションソフトウェア CafeMol の開発に携わっており、RNA の粗視化モデルを開発することで、大規模なタンパク質-RNA 複合体構造・機能相関を明らかにすることを目指している。

機能を持つ大規模タンパク質-RNA 複合体の好例はリボソームである。リボソームは因子結合状態や構造を様々に変化させながら遺伝情報翻訳を行うことが分かっている。近年それら機能的な中間状態に対応する結晶構造がいくつか報告されているが、“動き”に関しては未解明な点が多く、分子シミュレーションの適用が期待される。本研究では、特にトランスロケーションと呼ばれる反応に着目した。翻訳中に、新しいアミノ酸のペプチド転移反応が終わると、次のアミノ酸付加サイクルへ進むために、A および P サイトにある二つの tRNA が、P および E サイトへとそれぞれ移動しなければならない。メカニズムの詳細は未解明であるが、リボソームが回転運動することや、tRNA が二つのサイトにまたがった“ハイブリッド状態”をとることが実験から示唆されている。

本年度は、前年度からはじめたサンプリング計算を進め、リボソーム構造の変化に依存して tRNA の挙動がどのように変化するか研究を行った。

2. 具体的な利用内容、計算方法

リボソームサブユニットの回転前後に対応する 2 つの異なる結晶構造を用い、1 個または 2 個の tRNA 結合サイト(A サイト・P サイト)に tRNA を配置する。サブユニット回転と tRNA アクセプターシステム部分の挙動の関係性について調べるため、各配置での温度一定の MD 計算、および独自に定義した座標軸に沿ったアンブレラサンプリング法による自由エネルギー計算を行う。

3. 結果

A サイトおよび P サイトに配置した tRNA の、リボソームサブユニットの回転前後での挙動の変化、特に tRNA の Elbow から CCA-end (Fig1 参照)にかけた部分が隣のサイトへ傾くかどうかを調べた。なお、tRNA の Anti-codon 側はほとんど動かなかった。サブユニットの回転前後それぞれで、50S axis 座標上の位置を変数としてアンブレラサンプリングすることで自由エネルギーを計算することができ、回転が起きると Elbow や CCA-end が一つ隣のサイトへ倒れこんだ“ハイブリッド状態”がより安定となることが分かった。拘束のない 300K の MD 計算でも、同様に、回転後において tRNA のハイブリッド状態形成が観察された。

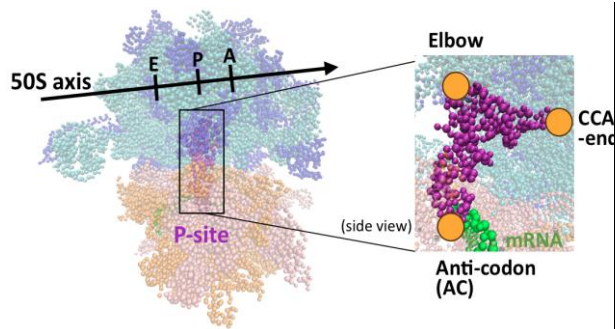


Fig. 1 リボソームのPサイトにtRNAを配置した初期状態の例。50S axis を図のようにリボソーム大サブユニット上に定義し、tRNA のElbowやCCA-endの軸方向の動きに着目した。(青：50S(大)サブユニット、赤：30S(小)サブユニット、紫：tRNA、緑：mRNA)

さらに、tRNA が1つだけの場合と、A, P 両サイトに存在する場合の自由エネルギー曲線を比べることで、隣のサイトの tRNA が及ぼす影響を調べた。結果として、A サイトに tRNA が存在する場合、P サイト tRNA はクラシカル状態がエントロピー的に不安定化されていた。

一連の計算結果は、A サイト tRNA がハイブリッド状態をとりにくいことを示していた。過去の生化学的実験から、リボソーム大サブユニットの一部である A-site finger (ASF) が、ハイブリッド状態への移行を妨げているという報告があった。そこで、シミュレーションでも、ASF を欠損させたリボソームを用いて計算を行って、変化が生じるか調べた。結果として、ASF を欠損させた場合は、野生型に比べてクラシカル状態からハイブリッド状態への自由エネルギー障壁が下がっており、ASF の A サイト tRNA のハイブリッド形成を阻害する役割を確認した。

4. まとめ

前年度までに構築してきた、計算効率の高い RNA-タンパク質複合体用粗視化モデルを実際の巨大複合体の系であるリボソームに適用し、特に翻訳伸長サイクルでの tRNA の振る舞いに着目して解析を行った。その結果、リボソームのサブユニット回転が tRNA のハイブリッド状態形成に寄与していることが分かった。ASF 変異体の計算などを通

して、これまで生化学的データにより議論されていた現象を、シミュレーションを通して構造に立脚した理解へと進めることができた。

5. 今後の計画・展望

リボソーム翻訳伸長メカニズムについては、tRNA のハイブリッド状態形成までは再現することが分かったので、その後、隣のサイトへの移動が完了するまでの過程を引き続き調べる必要がある。とりわけ、翻訳因子 EF-G の結合まで含めて計算することで、トランスロケーション反応の全体像を明らかにすることができると考える。

課題名 (タイトル) :

生体分子の粗視化シミュレーション技術の開発

サブテーマ 6 :

DNA-タンパク質複合体の粗視化シミュレーション:ヌクレオソームのダイナミクス

利用者氏名 : ○木寺 詔紀*, 坂井 冬樹**

所属 : *社会知創成事業 次世代計算科学研究開発プログラム

次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ 分子スケール研究開発チーム

**京都大学理学研究科生物科学専攻生物物理学教室

報告内容

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

ロドプシンは光受容体であり、吸収した光エネルギーを利用して不活性状態から活性状態への構造変化を引き起こしている。ロドプシンの構造変化は創薬の観点から注目されてきたが、活性状態の結晶構造を得ることができていなかった。2011 年、ロドプシン活性状態の結晶構造が解かれた。これにより、ロドプシンの不活性状態および活性状態の構造を得たが、その構造変化の詳細については未だ理解されていない。そこで、ロドプシン活性化過程における構造変化を、分子動力学シミュレーションを用いて十分サンプリングし、その詳細に迫った。

2. 具体的な利用内容、計算方法

Lumirhodopsin という不活性状態の結晶構造を初期構造として用いた。さらに、途中でプロトン移動を起こさせて MetaI 状態から MetaII 状態への構造変化のサンプリングを行った。約 3μ 秒程度の分子動力学シミュレーションを行った。

3. 結果

シミュレーション結果から、MetaI 状態から MetaII 状態への構造変化過程において、いくつかのサブステイトがあることが示唆された。また、結晶構造では観測されなかった、トリプトファングルスイッチの開閉の様子も観測された。これらの構造変化を重要なものかどうか判断するにははるかに長い計算が必要ではあるが、ロドプシン活性状態における構造変化を理解するきっかけとなると考えている。

4. まとめ

ロドプシン活性化における構造変化について詳しく分かっていない。そこで MetaI 状態から MetaII 状態への構造変化におけるサンプリングを分子動力学シミュレーションを用いて行い、その理解に迫った。初期構造変化における十分なサンプリングから、MetaI 状態から MetaII 状態への初期変化でトリプトファングルスイッチが働いている可能性を示唆した。

5. 今後の計画・展望

MetaI 状態から MetaII 状態への後期構造変化におけるダイナミックな動きを見れるよう、新たな手法を使用したい。

6. 利用がなかった場合の理由

なし

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】

Coarse-Grained Structure-Based Model for RNA-Protein Complexes Developed by Fluctuation Matching

Naoto Hori, and Shoji Takada

Journal of Chemical Theory and Computation (2012) 8(9): 3384-3394

【国際会議、学会などでの口頭発表】

2012 年 6 月, The 3rd International Workshop on "Multiscale Characterizations of Biological Systems: From Molecules to Networks", BI YU YUAN Hotel, 中国, 口頭発表

“Relation between ribosomal subunit rotation and tRNA hybrid state formation”, Naoto Hori and Shoji Takada

2012 年 7 月, 第 14 回日本 RNA 学会年会, 東北大学萩ホール, 口頭発表

“Mechanisms and Relation of Ribosomal Subunit Rotation and tRNA Hybrid State Formation Studied by Molecular Simulations”, 堀直人, 高田彰二

2012 年 9 月, 理研セミナー, 理化学研究所 横浜研究所, 口頭発表,

“粗視化分子動力学シミュレーションによるリボソーム翻訳伸長機構の研究”, 堀直人, 高田彰二

2012 年 9 月, 第 50 回日本生物物理学会年会, 名古屋大学, 口頭発表

Dynamical motions of tRNA and ribosome complex during translation elongation studied by coarse-grained molecular simulations”, Naoto Hori, Shoji Takada

2012 年 9 月, 生命情報科学研究セミナー(2012 年度第 20 回), 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター, 口頭発表

“粗視化分子動力学シミュレーションによるリボソーム翻訳伸長機構の研究”, 堀直人, 高田彰二

2012 年 11 月, Mini-Symposium on Modeling, Simulation and Function of Biomolecular Assemblies, 東京大学 伊藤国際学術研究センター, 口頭発表

“Molecular dynamics of tRNAs bound to ratcheting ribosome studied by coarse-grained simulations”, Naoto Hori and Shoji Takada

【その他】

2013 年 2 月, Biophysical Society 57th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, 米国, ポスター発表

“Molecular dynamics of tRNA bound to translating ribosome studied by coarse-grained simulations”, Naoto Hori and Shoji Takada