

課題名 (タイトル) :

## レプリカ交換法による生体分子系の構造サンプリング

利用者氏名 :

○森 貴治

新津 藍

Marta Kulik

理研での所属研究室名 :

杉田理論分子科学研究室

細胞内における生体分子は主にタンパク質や脂質、核酸などにより構成されており、分子が構造変化することにより、酵素反応や物質輸送、情報伝達などの機能を発揮している。特に、細胞膜中に存在する膜タンパク質は創薬の重要なターゲットでもあるため、その立体構造と機能メカニズムの解明が盛んに行われている。近年、X線結晶構造解析や核磁気共鳴分光法などの構造解析技術の発展により、膜タンパク質のような結晶化が困難な生体分子に対しても高解像度の立体構造情報が得られるようになってきた。しかしながら、これらの実験手法から得られる構造はあくまでタンパク質の静止像であり、反応サイクルにおけるタンパク質のダイナミックな構造変化と機能発現の相関を調べることは未だ難しい。また、従来のタンパク質構造解析法に加えて、タンパク質の結晶化を必要としない極低温電子顕微鏡 (クライオ EM) が近年注目されており、低解像度の電子密度マップから原子解像度での構造をモデリングする新たな技術が必要となっている。

### 効率の良いクライオ電顕像フィッティングシミュレーションのための新規並列計算法の開発 (森)

#### 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、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法によるタンパク質の立体構造解析が大きな注目を集めている。クライオ電子顕微鏡とは、精製したタンパク質を含む溶液を極低温にまで冷却し、電子線を照射することにより、タンパク質の溶液中での2次元画像を観察する方法である。得られた画像には、タンパク質がランダムな配向で写っているため、これらの2次元画像を分類、重ね合わせをすることにより、最終的に3次元密度マップを得る。単粒子解析法は、タンパク質

試料の結晶化を必要としないため、従来、X線結晶構造解析で解くことが困難であったリボソームなどの巨大な生体分子や膜タンパク質複合体の構造を、近原子分解能で決定することができ、構造生物学において **Resolution revolution** と呼ばれるほどの急速な発展が続いている。

#### 2. 具体的な利用内容、計算方法

電子顕微鏡により得られた近原子分解能の3次元密度マップからタンパク質の原子構造をモデリングするためには、既知の X線結晶構造や NMR 構造を密度マップに合理的にフィッティングする方法が有効である。このとき、分子動力学計算を用いた方法がよく用いられ、エネルギー関数に、密度マップを再現するようなバイアスポテンシャルを加えて MD 計算を実行する。バイアスポテンシャルには、実験により得られた密度マップと原子座標から理論的に計算される密度マップとの相関係数がよく用いられ、理論密度マップは各原子にガウス関数を置き、各ボックス内ですべての原子からの寄与を積算することで求められる。しかしながら、この方法では、全ボックス内の密度を計算しなければならないため、計算コストが膨大になる。

そこで本研究では、このような問題を解決することを目的として、電顕像フィッティングの新しい並列計算法を提案する。我々の基本的なアイデアは、電顕密度マップをローカル領域に分割し、各領域の密度マップは分散メモリ型並列を用いて各 MPI プロセスが計算し、領域内は共有メモリ型並列を用いて計算する。

本研究では、①空間分割 MD 法において、各 MPI プロセスがローカル密度マップを計算する方法 (SD 法)、②空間分割 MD 法において、2つの MPI プロセスがローカル密度マップを計算する方法 (DD 法)、③原子

分割 MD 法において、kd-tree 法を用いてローカル密度マップを計算する方法、の3つを提案し、これらを分子動力学計算プログラム GENESIS へ導入した。また、バイアスポテンシャルの力の定数を交換できるレプリカ交換法 (O. Miyashita et al., J. Comput. Chem., 2017) においても本並列計算ができるように導入した。

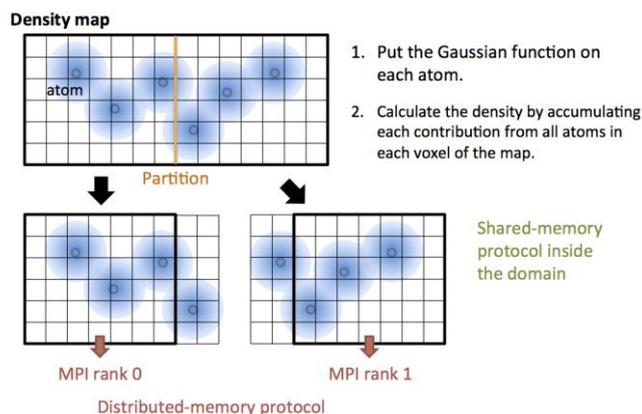


図 1 クライオ電子顕微鏡像フィッティング計算の並列化法

### 3. 結果

全原子型郷モデルを用い、Ca<sup>2+</sup>-ATPase (7,671 原子)、AMPA 受容体 (24,100 原子)、リボソーム (149,234 原子) の計算を実行した。図 2 にベンチマーク結果を示す。原子分割法ベースの方法は Ca<sup>2+</sup>-ATPase のような比較的小さな系に有効であり、空間分割法ベースの方法は AMPA やリボソームなどの大きな系に有効であることが分かった。また、DD 法は SD 法よりも高速に計算でき、これは MPI プロセス間でのロードバランスが上手く調整されていることに起因していることが分かった。

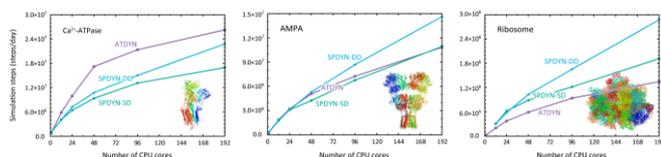


図 2 GENESIS による全原子型郷モデルを用いた flexible fitting のベンチマーク結果

### 4. まとめ

本研究では、タンパク質の単粒子解析において必要不可欠なフィッティングシミュレーションに対して、効率の良い並列計算法を提案し、GENESIS に導入した。本手法はレプリカ交換 MD 内でも利用することができ、

電顕像からの効率の良いタンパク質構造モデリングが可能となった。

### 5. 今後の計画・展望

本研究では粗視化モデルの1つである全原子型郷モデルに対して、最適な並列計算法を提案した。今後さらに、溶媒を露に含んだ全原子モデルでの並列計算法についても検討し、最終的には、GENESIS を基盤とする精密なタンパク質構造モデリングプラットフォームの構築を目指す。

### チャンネル形成ペプチド cWza の会合過程の解明 (担当: 新津)

#### 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

チャンネルタンパク質は細胞膜内外のイオンや生物活性分子を輸送・伝達する重要な役割を持つ。タンパク質の機能はその立体構造によって決定される。したがってチャンネルタンパク質の折り畳み機構を理解することは、分子生物学におけるタンパク質の理解に欠かせない。しかしながら疎水性膜タンパク質であるチャンネルタンパク質の折り畳みに関する研究は、水溶性タンパク質に比べ、高解像度の構造情報が少ないことに起因して遅れている。そこで我々は単純化されたタンパク質であるペプチド会合体を設計・合成し、その会合機構を調べることでこの問題に取り組むこととした。設計で標的としたのは膜タンパク質構造において最も基礎的な膜貫通  $\alpha$  ヘリックス- $\alpha$  ヘリックス相互作用である。これに関して、これまでに本課題担当者は脂質二重膜中で  $\alpha$  ヘリックス 8 量体を形成する cWza ペプチドを作製した。(Mahendran et al., Nat. Chem., 2017)。しかしながら 8 量体形成機構については電気生理実験をもとにしたモデルが提唱されているにとどまり、詳細な機構はわかっていない。そこで本課題では実験では観測できない動的なペプチドの構造変化、会合体形成を、分子動力学計算により解析し、会合機構を明らかにすることを目的とする。

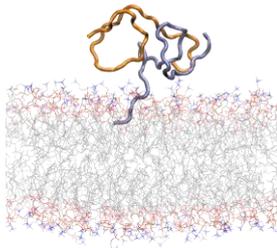
#### 2. 具体的な利用内容、計算方法

注目する現象について最適な計算手法を用いるため、会合体形成の過程を 1) 水中→膜結合、2)

膜結合→膜挿入、3) 膜貫通→ポア形成の三つに分ける。本年度は1) と3) についての準備段階の計算を行った。まず1) について、伸長ペプチドを水中に配置して脂質二重膜存在下での全原子分子動力学計算を行い、ペプチドの初期構造のサンプリングを行った。ここで得た初期構造は、膜表面近辺での二次構造の形成過程を明らかにするための、レプリカ交換 *solute-tempering* (REST) 法を用いた計算に使うことができる。3) については、cWza ペプチドと cWza ペプチド変異体の 2 種のペプチドについて、8 量体ポアのモデルを初期構造とし、2 種類の脂質二重膜中でそれぞれ全原子分子動力学計算を行った。すべての計算は分子動力学計算プログラム GENESIS を用い、力場は CHARMM36、水モデルは TIP3P を用いて行った。

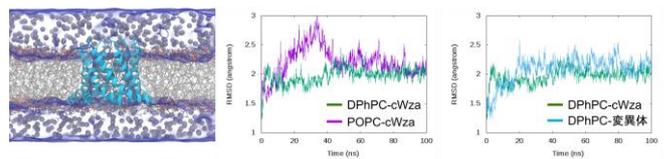
### 3. 結果

1) では、実験条件に則って脂質 DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 160 分子からなる二重膜、ペプチド鎖 2 本、1M KCl (計 74,000 原子) の全原子分子動力学計算を実行した。200 ns 後のスナップショットを下図に示す。



ペプチド鎖同士の相互作用、ペプチド-脂質間の相互作用が見られる。今後ペプチドの配置など初期構造を変えて同様の相互作用が見られるか検討を要するが、この結果は今後の、より効率的なレプリカ交換法による構造サンプリング計算の初期構造のひとつとして利用できると思われる。

3) では、脂質 DPhPC もしくは POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 396 分子からなる二重膜、ペプチド  $\alpha$  ヘリックス 8 本、1 M KCl (計 134,000 原子) の全原子分子動力学計算を実行した。ペプチドは cWza ペプチドおよび変異体の 2 種を用いた。それぞれ 100 ns の計算を行った。構造スナップショット (左) とペプチド 8 量体の C $\alpha$  の RMSD プロット (中央、右) を下図に示す。



POPC 中では構造のゆらぎが見られたが、DPhPC、POPC 中どちらにおいてもチャネル構造は壊れることなく保持された。以前に異なるプログラム (Gromacs)、力場 (OPLS/AA) を用いて行った同様の計算と矛盾しない結果が得られた。

### 4. まとめ

本課題では、cWza ペプチドの水中、膜表面近辺での挙動、および膜貫通ペプチド 8 量体チャネルの構造モデルの挙動を全原子分子動力学計算により確認した。これらの計算結果から、今後ペプチド会合過程の計算に用いるための初期構造が得られた。

### 6. 今後の計画・展望

本課題で得た初期構造から、1) ではレプリカ交換法を用いて膜表面のペプチドの 2 次構造形成を、2) はアンブレラサンプリングを用いてペプチド膜挿入の自由エネルギーを、3) では自由エネルギー摂動法などを用い、cWza ペプチドの  $\alpha$  ヘリックス- $\alpha$  ヘリックス相互作用に最適なアミノ酸配列を、それぞれ解析する予定である。これらの結果を合わせてペプチドチャネルの会合機構を明らかにして行く。

## REMD simulations of RNA-aminoglycoside complexes (Kulik)

### 1. Background and purpose of the project, relationship of the project with other projects

Riboswitches are non-coding fragments of mRNA that are able to affect expression of genes located in the coding part by binding small ligands. N1 riboswitch is an interesting case because it binds ligands from neomycin family and is able to recognize even small structural differences between them. The *in vivo* studies in yeast system showed that aminoglycosides neomycin and ribostamycin bind the riboswitch and inhibit translation, whereas another aminoglycoside paromomycin binds but does not affect gene expression. In this study, we aimed to investigate the

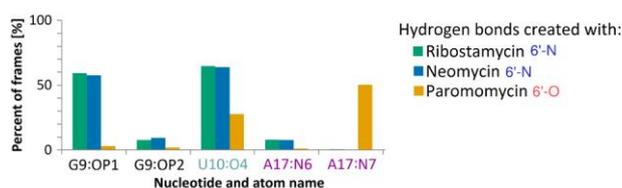
dynamics of the riboswitch complexes with ribostamycin, neomycin and paromomycin, using Replica Exchange Molecular Dynamics Simulations.

## 2. Specific usage status of the system and calculation method

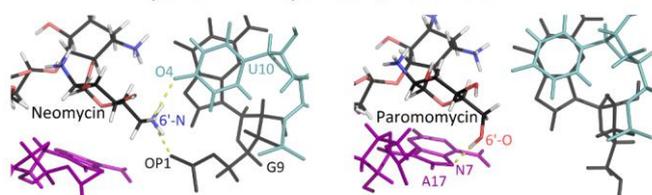
The starting structures and force field parameters were taken from previous simulations of the same system. Total number of atoms in each system was around 37 000. The temperature Replica Exchange Molecular Dynamics Simulations were performed up to 100 ns for each system using GENESIS suite of programs. Only the last 50 ns of every trajectory was analyzed.

## 3. Result

The dynamics of the complexes with ribostamycin and neomycin and the interactions between those ligands and riboswitch were very similar to each other. However, the dynamics of the paromomycin-riboswitch complex was slightly different in the region of bulge and apical loop of the riboswitch, which are the most flexible region of this RNA hairpin. We looked closer at the interactions between ligands and their binding site, especially at the 6' terminal group (hydroxyl group in paromomycin and ammonium group in ribostamycin and neomycin), which is shown below.

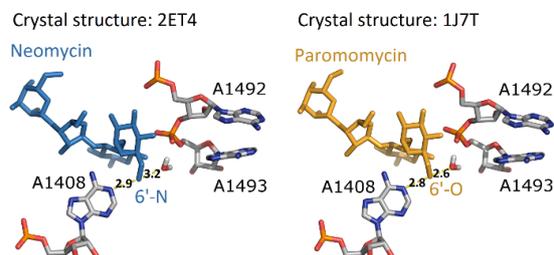


Representative snapshots from simulations:



We observed that in the complex with paromomycin, the hydrogen bond between group 6'-OH and phosphate G9, that is present in the NMR model PDB ID: 2MXS (starting structure for the simulations), breaks and a different hydrogen bond with base A17 is formed. In the neomycin and ribostamycin case, the bond with G9 phosphate is also present in the starting structure but it is also present most of the simulation time. In all complexes the hydrogen bond

between group 6' and base U10 was observed. We also compared these simulations with a structure of a different aminoglycoside binding site, A-site. The fragment of A-site crystal structure 1J7T containing neomycin (PDB ID: 2ET4) and paromomycin is shown in the following figure.



By comparing the snapshots from simulations and the crystal structures, we can see that the main difference between them is the neighborhood of the 6' group. The riboswitch is able to discriminate between neomycin and paromomycin because of the contact with the negatively charged phosphate. In the A-site, the contact with phosphate is not present and both aminoglycoside show similar binding and also similar antibacterial effect.

## 4. Conclusion

We were able to elucidate the reason of different dynamics of riboswitch complexes with ribostamycin, neomycin and paromomycin at the molecular level of detail.

## 5. Schedule and prospect for the future

The simulations using Replica Exchange Molecular Dynamics Simulations with two dimensions and free energy calculations are currently performed and the results are not yet available.

平成 29 年度 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) Arata Furukawa, Kunihito Yoshikaie, Takaharu Mori, Hiroyuki Mori, Yusuke V. Morimoto, Yasunori Sugano, Shigehiro Iwaki, Tohru Minamino, Yuji Sugita, Yoshiki Tanaka, and Tomoya Tsukazaki, “Tunnel formation inferred from the I-form structures of the proton-driven protein secretion motor SecDF”, *Cell Reports*, **19**, 895-901 (2017).

【国際会議、学会などでの口頭発表】

- 1) 『クライオ電子顕微鏡像フィッティングシミュレーションの新規並列計算法の開発』○森貴治、Marta Kulik、宮下治、Florence Tama、杉田有治、第 31 回分子シミュレーション討論会（金沢）2017/12/1
- 2) 『新規連続体近似モデルを用いた膜タンパク質のシミュレーション』○森貴治、杉田有治、日本物理学会 2017 年秋季大会（岩手）2017/9/22
- 3) 『クライオ電子顕微鏡像フィッティングのための新規 MD 法の開発と応用』○森貴治、宮下治、Marta Kulik、Florence Tama、杉田有治、第 55 回日本生物物理学会（熊本）2017/9/20
- 4) 『ミセル連続体モデルの開発と膜タンパク質のシミュレーション』○森貴治、杉田有治、日本膜学会第 39 回年会（東京）2017/5/26
- 5) 『クライオ電子顕微鏡像フィッティングシミュレーションの新規並列計算法の開発』○森貴治、Marta Kulik、宮下治、Florence Tama、杉田有治、第 31 回分子シミュレーション討論会（金沢）2017/11/29
- 6) 『膜模倣環境の膜タンパク質構造への影響を評価する新規シミュレーション法の開発』○森貴治、杉田有治、第 17 回 日本蛋白質科学会年会（仙台）2017/6/22
- 7) 『プロトン駆動モーター SecDF の開閉とプロトン透過機構』○森貴治、理研シンポジウム“細胞システムの動態と論理 IX”（埼玉）、2017/4
- 8) “Efficient parallel computation for flexible fitting of cryo-EM density map”, Takaharu Mori, Osamu Miyashita, and Yuji Sugita, Biophysical Society Thematic Meeting “Conformational Ensembles from Experimental Data and Computer Simulations”, Berlin (Germany), 2017/8/27
- 9) “Molecular mechanisms of proton transfer in the protein secretion motor SecDF”, Takaharu Mori, Tomoya Tsukazaki, and Yuji Sugita, IUPAB & EBSA 2017, Edinburgh (UK), 2017/7/19
- 10) “Design and characterization of membrane-spanning alpha-helical peptide pores” Niitsu A., Mahendran K.R., Thomson A. R., Bayley H., Woolfson D.N. and Sugita Y., 17th annual meeting of Protein Science Society of Japan, Miyagi, 2017/6
- 11) “Designing autonomous peptide-based membrane pores”, Niitsu A., Mahendran K.R., Thomson A. R., Session B.R., Sugita Y. Bayley H. and Woolfson D.N. Alpbach Workshop coiled-coil, fibrous and repeat proteins, Alpbach (Austria), 2017/9
- 12) “Redesign and de novo design of transmembrane alpha-helical peptide barrels”, Niitsu A., Mahendran K.R., Thomson A. R., Bayley H., Sugita Y. and Woolfson D.N. 55th annual meeting of the biophysical society of Japan, Kumamoto, 2017/9
- 13) "How a small change in ligand functional groups can affect the dynamics of an aminoglycoside riboswitch?", Marta Kulik, Takaharu Mori, Yuji Sugita, Joanna Trylska, The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Kumamoto, 2017/9/20