

課題名(タイトル):

Computational design and molecular dynamics simulations of biomolecules

利用者氏名:○新津藍(1)、吉川晏矢(1)、Sayeesh Pooppadin Maxin(1)、中嶋悠人(1)

理研における所属研究室名:

(1) 生命医科学研究センター 生体分子動態デザイン研究チーム

TDP-43CTD ペプチドの膜結合メカニズムの解明(吉川)

1. 本課題の研究の背景、目的、関係する課題との関係
筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭型認知症(FTD)などの神経変性疾患における原因物質として知られる TAR DNA 結合タンパク質 43 kDa(TDP-43)は通常、核内に局在している。一方、ALS/FTD では核内 TDP-43 が喪失して細胞質内における異常凝集を起こし、この凝集体形成が病理学的特徴であるとされている。ALS 疾患において TDP43 はミトコンドリア内膜に集積することが知られており、ミトコンドリア内膜の特徴としてはカルジオリピン脂質が多く含まれることが挙げられる。TDP-43 の C 末端ドメイン(CTD)は凝集体形成に重要とされる天然変性領域であり、CTD 内の残基 307-347 に対応する合成ペプチド(CTD ペプチド)を用いた実験では、カルジオリピン含有膜に対して CTD ペプチドが結合しやすいことが確認された。また、最近のモデル膜を用いた実験では負電荷脂質が TDP-43 の凝集に関与することが示されているが、TDP-43 と脂質膜の相互作用メカニズムの解明には至っていない。そこで、本研究では CTD ペプチドと脂質膜との相互作用を原子レベルで解明することを目的として分子動力学計算を行った。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究では TDP-43 CTD ペプチド 1 本を用いて実験と同条件の脂質膜で計算を行った。使用した膜組成は脂質 POPC, DOPE, TOCL を組み合わせた 4 種類で、ペプチドの初期配置は横向き、縦向き、上下を反転させたものの 3 種類を設定した。力場には CHARMM36m、水モデルには TIP3P、膜のモデルには HMMM モデルを用いて、初期構造として脂質二重膜から約 20 Å の位置にペプチドを置いたボックスを CHARMM-GUI で作成した。計算は 300 K、1 atm の条件で 210 ns 間、各系で 3 回のリピートを行い、合計 36 回の独立した計算を実施した。

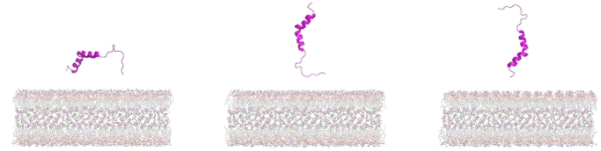


図 ペプチドの初期配置ごとのスナップショット

3. 結果

MD の結果として出力された各トラジェクトリについて、脂質ヘッドグループ原子とペプチド残基の原子の最短距離を算出することでペプチドが膜に結合しているか否かを判定した。結果として、結合の頻度は一般的な POPC 膜に比べて CL 含有膜の方が高くなった。

4. まとめ

本研究の計算結果はペプチドを用いた膜結合実験の結果、および構造解析の結果を支持した。実験チームと共同して国際誌への論文投稿準備中である。

5. 今後の計画・展望

本研究結果を元に、今後は結合に特徴的であった残基に変異を入れることで結合の有無や様式に変化があるかを調べていく。

Molecular dynamics simulations for membrane protein design pipeline (Sayeesh)

1. Background and purpose of the project

Protein design, encompassing both de novo and redesign strategies, has emerged as a powerful approach to investigating protein evolution structure and has broad applications in biology and medicine. Recent advances in AI-based design tools and high-accuracy structure prediction methods such as AlphaFold and Chai-1 have significantly improved the generation of reliable protein design candidates. However, membrane protein design remains

challenging due to their hydrophobic nature, structural complexity, dynamic behavior, and interactions with lipid bilayers and aqueous environments. This project aims to develop a computational pipeline for membrane protein design and to generate a dataset to support benchmark design tools. In this pipeline, a step involves evaluating dynamic stability using all-atom molecular dynamics (MD) simulations to assess whether the designed membrane protein decoys maintain structural stability under physiologically relevant conditions.

2. Specific usage status of the system and calculation method

In this project, the development of the design pipeline began with constructing a dataset comprising four membrane protein classes selected for redesign: Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC), G-Protein Coupled Receptors (GPCRs), Water transport (Aquaporins), and the Translocator Protein (TSPO). Membrane protein decoys were redesigned using the LigandMPNN, and their structures were subsequently predicted using AlphaFold. Top-scoring decoys were evaluated using MD simulations in GENESIS 2.1.5.

The initial simulation input was constructed using the CHARMM-GUI Membrane Builder with the CHARMM36m force field, embedding the proteins in a POPC lipid bilayer with 100 mM KCl. MD simulations were then performed for 105 ns at 365 K.

3. Results

Sequence redesign was performed using LigandMPNN, with optimization of design parameters to enhance sequence diversity and structural compatibility. Structural stability was evaluated using MD simulations by calculating the C α backbone RMSD relative to the initial structure. The available design and prediction scores were correlated with RMSD values to investigate the relationship between computational confidence

metrics and structural stability.

4. Conclusion

A dataset comprising four classes of membrane proteins was successfully constructed, and the Ligandmpnn AI-tool was parameterized for membrane protein design. The analysis revealed that conventional prediction confidence scores alone are insufficient to reliably rank or select membrane protein decoys. Therefore, further computational evaluation and experimental validation are currently underway to improve the assessment and selection strategy.

5. Schedule and prospect for the future

The datasets are currently maintained in-house. The design workflows and analysis scripts are available for collaborative use upon request, with ongoing efforts to broaden access to the framework.

β ヘリックスペプチドチャネルの安定性評価(中嶋)

1. 本課題の研究の背景、目的、関係する課題との関係

ペプチドによって脂質二重膜中に形成される膜貫通チャネルは、生命現象の理解や創薬・分離技術への応用を目指して数多く開発されてきた。特に、これまでにない構造モチーフを基盤とした、サイズやイオン選択性の制御が可能な膜貫通チャネルの開発が求められている。本研究は独自のポア特性を示す可能性がある β ヘリックスペプチドを構造モチーフとした。しかしながらその構造データの少なさゆえに β ヘリックスペプチドのAI構造予測は挑戦的である。そこで、 β ヘリックス型膜貫通チャネルの膜中での構造安定性を評価することを目的として、分子動力学計算による評価を行った。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本課題では平面脂質二重膜を用いたチャネル電流計測でチャネルの形成が確認されている膜貫通ペプチドについて計算を実施した。分子動力学計算による構造安定性の評価によって取りうる可能性の高い会合数を推定することを目的として、同じアミノ酸配列を持つペプチドの会合数を4~8量体としたペプチド会合体の構造モデルをPyMOLで対照的に並べることで作成した(図)。ペプチドのモノマーはPyMOL上でアミノ酸残基の側鎖を変異させることでPDBを作成した。力場はCHARMM36を用い、実

験条件と同様条件の脂質 DPhPC とイオン 1M KCl、水は TIP3P モデルを用い、ペプチド会合体が脂質二重膜中に配置された計算ボックスを CHARMM-GUI を利用して作成した。MD 計算ソフトウェアは GENESIS を用いた。計算は外部電場を用いた膜電位+125 mV 存在下での計算で 300K でそれぞれ 210 ns 実施した。



図 本研究で計算した 4~8 量体の初期構造モデル

3. 結果

4 量体から 8 量体まで計 5 個の会合体構造モデルについて、正の膜電位存在下での MD 計算を行い、ペプチド間の静電相互作用を時間に対して追うことで安定性を評価した。その結果、6 量体が相互作用の形成率が最も高く、Ca の RMSD 値やヘリックスの傾き角度の解析からも安定性が高いことが明らかとなった。したがって、実験で確認されたチャネルは 6 量体が最も有力な候補であることが考えられる。

4. まとめ

ペプチドの 4~8 量体の膜貫通チャネルモデルの計算を行い、その構造安定性を評価した。相対的に有力な候補を得ることはできたが、実験の再現を行うためにはより長い計算時間や、外部電場の値を変えて行う必要がある。本研究結果は、国内外の学会で発表を行った。

5. 今後の計画・展望

さらに定量的な解析を行うため、より長時間の計算を行う。またその構造安定性を基に配列の最適化を行うことで、 β ヘリックス型膜貫通チャネルの設計基盤を確立することが期待される。

2025 年度 利用研究成果リスト

【口頭発表】

1. “Analysis of the association state of amphiphilic β -helical peptides with channel activity in lipid bilayers”

Haruto Nakajima

第 63 回日本生物物理学会年会, 奈良県コンベンションセンター, 2025 年 9 月 24 日

2. “膜タンパク質をつくる”

新津藍

第一回生体分子設計研究会、東京科学大学、2025 年 12 月 10 日

2. “Towards dynamics-driven designs of membrane alpha-helix assemblies: peptide-based barrels and beyond”

Ai Niitsu

Pacificchem 2025, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2025

3. “Rational design principles for peptide-based ion channels”

Ai Niitsu

The 55th NIPS International Symposium, Okazaki, Japan, December 1-4, 2025

4. “Designer membrane proteins towards engineering the signalling frontier”

Ai Niitsu

9th Alpbach Workshop coiled-coil, fibrous and repeat proteins, Alpbach, Austria, September 10, 2025

5. “Exploring membrane protein structures and dynamics through design”

Ai Niitsu

Tsukuba Conference, Tsukuba, Japan, October 2, 2025

【ポスター発表】

国内会議

1. “Sequence-dependent association states of amphiphilic β -helix peptides with ion channel activity”

Haruto Nakajima

学術変革領域研究(A)「生物を凌駕する無細胞分子システムのボトムアップ構築学」第 5 回領域会議, 東京科学大学, 2025 年 4 月 3 日

2. “Rational design and synthesis of transmembrane β -helical bundles”,

Haruto Nakajima

第 62 回ペプチド討論会, 福岡国際会議場, 2025 年 10 月 21 日

3. “Rational design and synthesis of transmembrane β -helical bundles”

Haruto Nakajima

International Conference of Bottom-up Biotechnology for Understanding and Engineering Living System 2025, 沖縄科学技術大学院大学, 2025 年 11 月 4 日

4. “Exploring TDP-43 Binding to Lipid Membranes via MD Simulations”

Haruya Yoshikawa,

International Conference of Bottom-up Biotechnology for Understanding and Engineering Living System 2025, 沖縄科学技術大学院大学, 2025 年 11 月 5 日

国際会議

1. A Unified Computational Pipeline for the Design and Prioritization of Membrane Protein Candidates

Pooppadi Maxin Sayeesh, Ai Niitsu

Pacificchem 2025, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20

2. “Sequence-dependent association states of unnatural amino acid-containing β -helix peptides with ion channel activity”

Haruto Nakajima

Pacificchem 2025, Hawaii Convention Center, 2025 年 12 月 16 日