

課題名 (タイトル) :

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 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

[背景] ロドプシンは G 蛋白質共役型受容体であり、光受容体である。ロドプシンは、アポ蛋白質であるオプシンと、色中心であるレチナールから成る。暗黒状態において、レチナールは 11-*cis* 構造を取り、光を吸収すると all-*trans* 構造に異性化する。ロドプシンはレチナールの光異性化により、G 蛋白質を活性化する能力を得る (活性状態)。ロドプシンが活性化することにより、細胞外側から細胞質側への情報伝達が行われる。G 蛋白質共役型受容体は細胞外側から細胞質側への情報伝達を行う蛋白質であり、その代表としてロドプシンの活性化機構の詳細が注目されている。

[目的] 全原子モデルエネルギー関数に基づく粗視化モデルの導出と精密化の研究開発を行うに、G 蛋白質共役型受容体であるロドプシンについて、全原子モデルによる分子動力学シミュレーションを行い、その構造、ゆらぎ、エネルギーの情報を取得する。

[関係するプロジェクトとの関係] 全原子モデルによる分子動力学シミュレーションを行うことによって、その構造、ゆらぎ、エネルギーの情報を取得でき、粗視化モデルの導出と精密化が可能となる。ロドプシンは、多くの薬の標的として注目されている G 蛋白質共役型受容体のひとつであり、その活性化機構の詳細が注目されている。詳細な粗視化モデルを作ることはロドプシンの活性化機構を理解するために重要である。

2. 具体的な利用内容、計算方法

G 蛋白質共役型受容体であり、光受容を行う蛋白

質であるロドプシンの分子動力学計算を行った。ロドプシンはアポ蛋白質であるオプシンと、色中心であるレチナールから成り、膜蛋白質である。脂質二重膜としては SDPC を用いた。計算ソフトウェアとしては NAMD を使い、水分子を頭わに用いた全原子計算を行った。粒子数は約 5 万原子であり、各中間状態に対して 100ns、500ns、1350ns の計算を行った。

3. 結果

長時間の全原子計算により、レチナール周辺の十分な緩和を行うことができ、各中間状態のモデリングを行うことができた。

4. まとめ

長時間の全原子計算により、ゆらぎ、エネルギーの情報を取得する準備ができ、全原子モデルエネルギー関数に基づく粗視化モデルの導出への道筋ができた。

5. 今後の計画・展望

6. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況 (どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか) や、継続して利用する際に行う具体的な内容

長時間の全原子計算により、ロドプシンの各中間状態のモデリングを行うことができたが、それはロドプシンの活性化機構を理解するために十分ではなかった。より詳細な活性化機構を理解するには、活性化過程を精密に表現する粗視化モデルが必要であり、それを作り出すためにその経路を全原子計算によってサンプリングする必要があ

る。従って、それを実現するために、パスサンプリング等の全原子計算手法を用いてロドプシン活性化過程の経路をサンプリングし、粗視化モデルの導出と精密化に用いる。

7. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由
8. 利用研究成果が無かった場合の理由
なし

課題名 (タイトル) :

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 : 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

研究協力協定の名称 : 「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」プロジェクトの業務参加者へのスーパーコンピュータ利用承認のお願いに関わる利用です。

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 : 近年の一分子計測技術の発展により、キネシンモーターは ATP 加水分解反応で得られた化学的エネルギーを利用する事で微小管の上を一方向に動く事ができる分子機械である事が明らかになった。このキネシンモーターには、2つのヘッドを交互に動かす事であったかも人間が歩くようにして進む双頭キネシンと、単頭でありながらバイアスの掛かったブラウン運動により一方向性の運動を実現する KIF1A 分子モーターが存在する。しかし、これらのキネシンモーターが一体どのようなメカニズムで化学的エネルギー(ATP 加水分解反応)を力学的な仕事(運動)に変換しているのか、その詳細は分かっていない。

目的 : そこで、本研究においては、まず、単頭キネシン KIF1A に注目し、KIF1A が化学反応サイクル(ATP 加水分解サイクル)から一方向性の運動(バイアスの掛かったブラウン運動)をどのように実現しているのか、粗視化シミュレーター Cafemol の Multiple-basin energy landscapes を用いて明らかにする。一方、双頭キネシンモーターに関しては、粗視化シミュレーションによる解析を行う上で必須となる双頭キネシン-微小管の複合体構造(x 線解析データ)が依然として存在しない為、実験グループと共同で微小管上に結合した双頭キネシンのモデル構造の構築を目指す。

関係するプロジェクトとの関係(プロジェクトにおける位置づけ) : 本研究は、開発したソフトウェア cafemol をキネシン系に適用する事で遂行する。(開発されたソフトウェアを利用しての応用的研究に相当する。)

2. 具体的な利用内容、計算方法

(ターゲット 1)
単頭キネシン KIF1A の一方向性の運動発現機構を明らかにする為に、cafemol の Multiple-basin energy landscapes を適用した。具体的には、シミュレーション中で ATP の加水分解サイクル(ATP→ADP*Pi, ADP 放出, ATP 結合等,,,)を擬似的に実現させる為に、次の 5 段階の energy landscape のスイッチングを行った。

- 1) ATP-ADP (2 basin energy landscape),
 - 2) ADP (single basin),
 - 3) ADP-nucleotide free (2 basin energy landscape),
 - 4) nucleotide-free (single basin),
 - 5) ATP (single basin)。
- このシミュレーションを 1-sample(1ATP 加水分解サイクル)につき、数億 time step 遂行した。そして、主として KIF1A の微小管の長軸方向に沿った並進運動の時系列を測定(観測)した。

(ターゲット 2)
微小管に結合した双頭キネシンの複合体モデルを構築する為に、まず、実験グループと共同で、様々なヌク

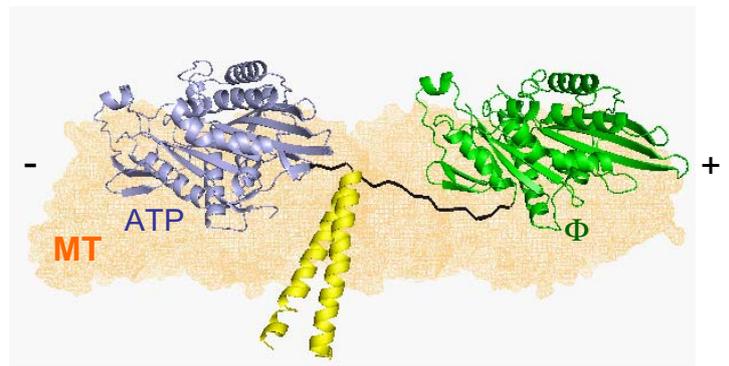
レオチド状態における電子顕微鏡像(キネシン-微小管複合体)へ単体のキネシンモノマーとチューブリン 2 量体の X 線解析構造を rigid-body fit させた。そして、そのモデルを初期構造として Gromacs により全原子 MD を行い、複合体モデルの Neck-linker 領域(disordered 領域)の refinement を遂行した。具体的には、次の 4 つのケースに対して緩和 MD を行った：1) 前足(apo 状態)-後足(ATP 状態)、2) 前足(ATP 状態)-後足(ATP 状態)、3) 前足(apo 状態)-後足(apo 状態)、4) 前足(ATP 状態)-後足(apo 状態)。更に、我々はこの 4 つのケースに対して各々~50ns 程度の全原子計算を行い、Neck-linker 領域に働く内部張力を評価した。

3. 結果

(ターゲット 1) KIF1A の一方向性の運動発現機構
はじめに、KIF1A と微小管の間の相互作用強度等の様々なパラメータを変更(調節)し、一方向性の有無を調査した。しかし、有意な一方向性の運動は発現されなかった。そこで、KIF1A の C 末(Neck-linker の先端)部位に摩擦係数(質量)の大きな Cargo(荷物)を取り付けてシミュレーションを行った。(この Cargo は、実際の生体内では神経伝達物質を詰め込んだ小胞、in vitro の実験系ではキネシンの変位を観測する為のビーズに相当する。)その結果、Cargo 無しの場合には発現しなかった微小管のプラス端方向への運動(バイアスの掛かったブラウン運動)が Cargo の存在により実現した。

(ターゲット 2) 双頭キネシン-MT の複合体モデル構築
Gromacs による全原子 MD により、微小管(MT)上に結合した双頭キネシンの Neck-Linker 領域(disordered 領域)の refinement に成功した。図は、双頭キネシンが 2 足歩行する際に実現するヌクレオチド状態：apo(前足)-ATP(後足)系の結果である。更に、得られた refinement 構造を基に、双頭キネシン間で働く内部張力を全原子 MD により評価した。その結果、apo-apo, ATP-ATP, ATP(前足)-apo(後足)系において Neck-Linker 領域に働く内部張力は、apo(前足)-ATP(後足)のヌクレオチド状態において働く内部張力に比べて極めて大きいことが分かった。これは実験グループによって主張されている以下の仮説を支持するものである。「双頭

キネシンキネシンの協調性のある 2 足歩行運動は、2 つのヘッド間の内部張力により制御されている。」



図：双頭キネシン-微小管(MT)の複合体モデル

4. まとめ

(ターゲット 1)

cafemol を用いた粗視化シミュレーションにより ATP 加水分解サイクルに伴う KIF1A の並進運動を調査した。結果として、バイアスの掛かったブラウン運動(1 方向性の運動)を実現する為には、摩擦係数の大きな Cargo(荷物)の果たす役割が重要である事が分かった。

(ターゲット 2)

Gromacs による全原子 MD により、微小管上に結合した双頭キネシンの Neck-Linker 領域(disordered 領域)の refinement に成功した。更に、得られた refinement 構造を基に、双頭キネシン間で働く内部張力を全原子 MD により評価する事ができた。

5. 今後の計画・展望

6. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況(どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか)や、継続して利用する際に行う具体的な内容

RICC の継続利用を希望する。

双頭キネシンの協調性のある 2 足歩行運動の発現メカニズムを化学-力学カップリング機構を含めて解明するのが、本研究における最終目標である。

これまでの RICC 利用により双頭キネシンの動作メカニズム解明の足掛かりとなる単頭キネシン KIF1A の動作

機構に迫った。また cafemol の Multiple-basin energy landscapes を適用してのシミュレーションを実現する上で必要となるダイマーキネシンモデル(Neck-linker 領域)の構築も行った。

しかし、最終目標を達成する為には、キネシン-微小管複合体の界面構造も特定(refinement)する必要がある。従って RICC を継続利用する際は、まず全原子 MD により様々なヌクレオチド状態におけるキネシン-微小管の複合体モデル(主として界面構造)を決定する。そして、その複合体構造に基づいて cafemol (Multiple-basin energy landscapes)により双頭キネシンの化学-力学カップリング機構に迫る。

7. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由

RICC の利用状況がビジーだった為、ジョブを投入しても殆どのケースで待ち状態となり、結果として自分達の計画通りに演算させる事が出来なかった。

8. 利用研究成果が無かった場合の理由なし。

課題名 (タイトル) : 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 : 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

研究協力協定の名称 : 「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」プロジェクトの業務参加者へのスーパーコンピュータ利用承認のお願いに関わる利用です。

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

DNA は、核内でヌクレオソームという、ヒストン 8 量体に DNA が 2 回転程巻きついた構造で格納されている。また、ヌクレオソームは集まってフィラメント状の構造を取ることが知られている。一方、遺伝子が発現する際には、これらの構造をほどこいて、DNA を RNA に転写する必要がある、その動的なふるまいを調べることは大変重要である。本課題では、DNA とタンパク質の粗視化モデルを用いて、ヌクレオソーム単体の構造ゆらぎを調べ、その後ヌクレオソームが複数集まったフィラメント構造について調べることを目的とする。

ヌクレオソーム単体のふるまいについては、近年、1 分子実験により、興味深い結果が得られており、シミュレーションでは、その実験結果を再現することによって、実験では分からないアミノ酸レベ

ルのダイナミクスを調べる。また、ヌクレオソームのフィラメント構造は、巨大な系であり、大規模な計算パワーが必要とされる系となっている。

2. 具体的な利用内容、計算方法

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 を使い、今年度は、ヌクレオソーム単体のシミュレーションを中心に行った。具体的には、(i)平衡状態でのヌクレオソームのゆらぎを調べる計算をレプリカ交換法を用いて行い、(ii)ヌクレオソームを力学的に引っ張りアンジッピングさせる、動的なシミュレーションを行った。

3. 結果

ヌクレオソームの単体の平衡シミュレーションの結果、DNA の両端が半回転ほどゆらぐことが分

平成 22 年度 RICC 利用報告書

かり、これは実験結果と対応していた。また、アンジッピングシミュレーションでは、DNA がほどこける過程で 2 ヶ所で大きなピークがあらわれるという実験結果を再現することができた。

4. まとめ

ヌクレオソーム単体の平衡的なゆらぎと、動的な構造変化のシミュレーションを行った。結果は、1 分子実験で得られているものと定性的に一致するものであった。

5. 今後の計画・展望

6. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況（どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか）や、継続して利用する際に行う具体的な内容

今年度はヌクレオソーム単体の系のシミュレーションを中心に行ったが、来年度は、ヌクレオソームが 20 個までのシミュレーションを行いたいと考えている。

7. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由

年度後半を中心に利用したが、計算機が非常に混んでおり、なかなかジョブが流れなかった。来年度は、年度前半から使っていきたいと考えている。

8. 利用研究成果が無かった場合の理由

なし。

課題名 (タイトル) : **Functionally rotating mechanism of a multidrug transporter studied by coarse-grained simulation**

利用者氏名 : 姚 新秋

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

研究協力協定の名称 : 「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」プロジェクトの業務参加者へのスーパーコンピュータ利用承認のお願いに関わる利用です。

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

1. The efflux-mediated multidrug resistance (MDR) of bacteria, catalyzed by multidrug transporters, has attracted increasing interest in recent years. AcrB is one of the best characterized multidrug transporters, which plays the major role in the drug resistance in *E. coli*. The crystal structures of AcrB were solved first in 2002 as a symmetric homotrimer and then in 2006 as an asymmetric homotrimer, the latter suggesting a functionally rotating mechanism. However, because of the difficulty of

in vitro experiment for AcrB, there is still little direct proof of such a mechanism. By computer simulation, we can study the dynamics of AcrB at high temporal resolution, and so to understand the functionally rotating mechanism in more details.

2. 具体的な利用内容、計算方法

For the protein, each amino acid was represented by one bead placed at the Ca position. The drug was represented by six beads distributed homogeneously on the molecule. The reference structures for both protein and drug come from the PDB database and a structure-based potential energy was

then constructed by multiple-basin model. Mainly two sets of simulations were performed for the purpose of this study. 1) For the trimer equilibrium simulations, 100 independent trajectories were run, with each having 2.0×10^6 steps for the equilibration followed by 1.9×10^7 steps for the production, and structures were saved every 2000 steps. 2) In the simulation of drug export dynamics, 10 trajectories were run for each type of “driving force”. Each trajectory has 2.0×10^5 steps before the switching of energy landscape and 6.0×10^6 steps afterwards. All the simulations were performed by CafeMol.

3. 結果

We have two major results. First, the equilibrium thermodynamics of the porter domain of AcrB is characterized by the phase diagram shown in Fig. 1. It indicates that with properly choosing a set of parameters for the allosteric coupling (δ_B , δ_E), the asymmetric “BEA” state can be the dominant conformation (see the green triangular region in Fig. 1), confirming our modeling. More importantly, starting from the BEA state, if we increase δ_B , which effectively corresponds to the drug dissociation, the system will be in the “AAA” phase (dominant by AAA conformation) with high probability. Therefore we unified the 2002’s symmetric structure and the 2006’s asymmetric structure by considering the effect of drug binding.

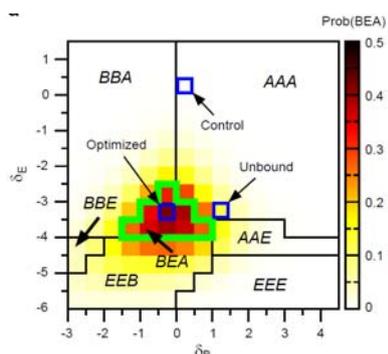


Figure 1. The phase diagram of the porter domain

Second, in dynamic study, we found that

among the three possible driving forces, only the $B \rightarrow E$ could realize the functional rotation and the drug export to the “exit” (see Fig. 2a). For the other two cases, $A \rightarrow B$ (Fig. 2b) and $E \rightarrow A$ (Fig. 2c), the functional rotation was generally trapped in an intermediate state. In addition, in these two cases, almost surely the drug was exported through the cleft that opens on the side-way of the porter domain. As a result, the drug returned to the periplasm and the transportation was unsuccessful.

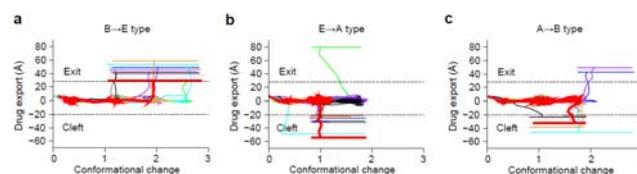


Figure 2. The functional rotation and the drug export

4. まとめ

Employing the structure-based coarse-grained (CG) modeling, we studied both the thermodynamics and the dynamics of the porter domain of the multidrug transporter AcrB. First, we succeeded in construction of the triple-basin model. Second, in the thermodynamic study, we found that a certain allosteric coupling results in the stable BEA state (the structure solved in 2006), and that, if the BEA state is the most stable with a drug molecule bound to the B state, the drug dissociation from it directly leads to the symmetric AAA structure (close to the structure solved in 2002). Third, in the dynamic study, our simulations suggested that only the $B \rightarrow E$ activation of the protomer I in the BEA state can lead to the successful drug export and the completion of the structural changes.

5. 今後の計画・展望

6. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況（どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか）や、継続して利用する際に行う具体的な内容

There are still many questions remained about the AcrB and the functionally rotating mechanism. One of the essential questions is: How does the drug bind to AcrB? Actually, there are two obvious tunnels in AcrB connecting the binding pocket to the periplasm: One opens at a position close to the surface of the membrane (denoted by Tunnel 1) and the other opens much farther away from the membrane (Tunnel 2). We have a plan to characterize the two tunnels by calculating the free energy profile of the drug moving within

them. To do so, we are developing new coarse-grained model for protein, which has higher resolution for the drug-protein interaction. Meanwhile, we are implementing the standard umbrella sampling method and the weighted histogram analysis method (WHAM) into the CafeMol.

7. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由
8. 利用研究成果が無かった場合の理由

課題名 (タイトル) : 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 : 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

研究協力協定の名称 : 「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」プロジェクトの業務参加者へのスーパーコンピュータ利用承認のお願いに関わる利用です。

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 複合体の構造・機能相関を明らかにすることを目指している。

2. 具体的な利用内容、計算方法

RNA および RNA-タンパク質複合体に適用できる粗視化パラメータを得るために、分子動力学計算ソフトウェア Amber を用いて全原子シミュレーションを行う。その結果から得られた揺らぎの情報をを用いて、CafeMol を用いた学習計算により

粗視化モデルのパラメータを算出する。

3. 結果

二重らせん形や tRNA などを含む 16 の RNA 分子および 4 つの RNA-タンパク質複合体をターゲットに決め、各々について 20ns、300K での全原子分子動力学計算を行った。その結果から、粗視化粒子の結合長・結合角などに対応する量の揺らぎ度合い(MSF; Mean square fluctuation)を求めた。

次に、CafeMol を用いて同じ分子に対する粗視化シミュレーションをおこない、MSF の値が全原子由来の値に一致するように粗視化力場パラメータの強度最適化を行った。

各分子に対して得られたパラメータを平均化し、汎用パラメータとした。得られたパラメータを用いた検証計算の結果、全原子シミュレーションまた X 線結晶構造の温度因子から見積もられる揺らぎ具合を概ねよく再現していることが確認された。しかしながら、転移温度など、分子全体の安定性に関しては不一致も見られた。

平成 22 年度 RICC 利用報告書

- | | |
|--|---|
| <p>4. 今後の計画・展望
得られた粗視化力場のパラメータは実用可能なレベルではあるが、精度の向上を行いたい。特に RNA 分子内の、塩基の水素結合ペアまたスタッキングの表現を改善することにより、分子全体の安定性がより正しく表現されるようになると考えている。</p> | <p>継続して利用する際に行う具体的な内容
上述の全原子シミュレーションの多くの部分は RICC を用いて行った。また粗視化計算の一部にも RICC を用いた</p> |
| <p>5. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況（どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか）や、</p> | <p>6. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由
混んでいてジョブが実行されない。</p> |

平成 22 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】

Xin-Qiu Yao, Hiroo Kenzaki, Satoshi Murakami, and Shoji Takada, **Drug export and allosteric coupling in a multidrug transporter revealed by molecular simulations**, *Nature Communications*, 1: 117(8 pages), 2010

【国際会議などの予稿集、proceeding】

【国際会議、学会などでの口頭発表】

【その他】ポスター発表

2010 年 6 月、第 10 回日本蛋白質科学会年会(札幌)

RNA-タンパク質複合体の粗視化シミュレーションモデル：全原子モデルに基づく導出

堀 直人, 李 文飛, 高田 彰二

2010 年 9 月 第 48 回日本生物物理学会 (仙台)

Kinesin internal tension for the coordinated walk estimated by all-atom MD simulation

Ryo Kanada, Tukasa Makino, Michio Tomishige, and Shoji Takada

2010 年 9 月 第 48 回日本生物物理学会 (仙台)

Coarse-grained simulation of protein-DNA complex: mechanical unzipping of nucleosome

Hiroo Kenzaki, and Shoji Takada

2010 年 9 月 第 48 回日本生物物理学会年会(仙台)

Coarse-grained model of RNA-protein complexes based on all-atom simulations

Naoto Hori, Wenfei Li, and Shoji Takada

2011 年 3 月 Biophysical Society 55th Annual Meeting (Baltimore)

Kinesin internal tension for the coordinated walk estimated by all-atom MD simulation

Ryo Kanada, Tukasa Makino, Michio Tomishige, and Shoji Takada

2011 年 3 月 Biophysical Society 55th Annual Meeting (Baltimore)

Coarse-grained simulation of protein-DNA complex: mechanical unzipping of nucleosome

Hiroo Kenzaki, and Shoji Takada