様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：３４４１９
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５７０１８９

研究課題名（和文）拡張アンサンブル混合法による蛋白質フォールディング過程の研究

研究課題名（英文）A hybrid extended ensemble simulation study on the folding process of proteins

研究代表者
米澤　康滋（YONEZAWA, Yasushige）

近畿大学・先端技術総合研究所・教授

研究者番号：４０２４８７５３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,200,000円

研究成果の概要（和文）：　代表的な拡張アンサンブル法であるMETADとMCMDを効率良く融合したハイブリッド法によって蛋白質の複雑な構造空間を探索するアルゴリズムを,研究代表者が独自に開発した分子シミュレーションプログラムに実装した。さらに高速な分子動力学シミュレーションを実現しサンプリング能力を飛躍的に高める長距離相互作用ポテンシャルの開発に成功して独自開発プログラムに実装した。さらにこれらの手法を様々な生体高分子系に応用してその性能を詳細に検証した。その結果、特にMETADに代表されるタブーサーチ法などの構造空間探索能力は、予め設定された反応座標に強く依存することを明確に示した。

研究成果の概要（英文）：　We have applied our extended ensemble simulation, MCMD-METAD hybrid method to the several typical issues of protein simulations. Our method has a remarkable advantages against old similar methods, providing clear convergence property. We implemented the method to our molecular dynamics simulation program. Moreover, we then developed a novel long-range potential which significantly accelerates simulations. We implemented it to our simulation program, evaluating properties of several bio-systems. As a results, we found that the search ability of taboo like method, such as METAD, is strongly depend on the pre-determined reaction coordinate.　This suggests the good reaction coordinate determination is of paramount importance for protein simulation studies.

研究分野：生物物理

キーワード：蛋白質　分子シミュレーション　拡張アンサンブル法

１．研究開始当初の背景

現在、分子シミュレーションは様々な研究領域で実験と理論を橋渡しする有用な手段として活用されている。生命科学では、ハードとソフト両方の計算技術の進歩と相まって、複雑な膜蛋白質や蛋白質核酸複合体等にその対象が拡大されている。分子シミュレーションは、どのような環境下（温度、圧力、溶媒）でも系の全ての原子の位置速度及び存在確率分布を精密に解析できる利点があり、実験結果の解釈や新規な現象の予想に有用である。

一方、ごく特別な専用計算機を除いて、現在の標準的な計算技術と計算環境で解析できる蛋白質や核酸等の生命分子の時間スケールは高々μ秒程度時間の計算に留まっており、分子シミュレーションは生命分子がその機能を発揮する時間スケール（1msec から数 sec）には殆ど到達できない。このことは分子シミュレーションを単に行うだけでは生命分子の機能を発揮する過程の全般を追跡できず、その過程を十分に解明できないことを示している。

この困難は蛋白質や核酸等の生命分子のシミュレーション研究者が実験研究者と協同して生命分子科学を進展させるために克服しなければならない重要な問題である。

２．研究の目的

蛋白質や核酸等に関する分子シミュレーションの手法が持つ現在の困難を克服し、蛋白質実験研究者とより密接な連携研究を展開できるようにすることはシミュレーション研究者の一つの大きな使命である。

このために本申請では、“申請者が開発した「複数の拡張アンサンブル法を有効に組み合わせて分子シミュレーションの構造サンプリング能力を格段に向上させる手法」を、蛋白質の諸問題に適用してその有効性を検証しさらなる改良に向けた知見と情報を獲得することを目標とする。”

３．研究の方法

研究代表者が考案した拡張アンサンブル混合法であるマルチカノニカル-メタダイナミックス（MCMD-METAD）混合法は、プロリンペプチド系のシス－トランス異性化過程で大変効率よいサンプリング能力を発揮するのみならず、これに加えて明確な収束性判定ができる方法であることが申請者によるこれまでに研究で示されている。本研究では、この方法を代表的な蛋白質やペプチドに適用し、その有効性を様々な角度から検証する。シミュレーション解析において、折りたたみや、機能に関連する大きなコンフォメーション変化を適切に再現して解析し、実験との関連を明確にする為には適切な反応座標が不可欠であると考えられている。空間を均一に効率良く探索する目的でよく使われるタブーサーチ法の一種である METAD 法は、これまで多くの座標要素や物理量を組み合わせた集団変数を反応座標として蛋白質の諸性質の研究に活用されている。しかしその収束性は明らかではなく詳細な調査及び研究が求められている。

本研究で使用する MCMD-METAD 混合法では原理的に収束性が保証されたシミュレーション結果の解析が可能である。従ってこれまでに用いられた METAD 法の集団変数反応座標の精密な評価が可能となることが期待される。

本申請研究では拡張アンサンブル混合法を用いて様々な蛋白質の諸性質の詳細をより一層明らかにし、より大きな蛋白質の問題を解決する研究基盤を確立することを目指した。

４．研究成果

蛋白質の詳細な分子動的過程を記述し得る様々な集団反応座標に拡張アンサンブル混合法を対応可能にする改良をこれまでに申請者が開発してきた分子動力学プログラムに実装した。

まず始めに、系の時間空間的な履歴に応じて集団反応座標上にガウス型ポテンシャルを置くメタダイナミックス（METAD）用にサブルーチンプログラムを新規作成した。次にこのガウス型ポテンシャルがもたらす原子に係る力を計算して系がより多く訪れた反応座標領域から訪れたことがより少ない領域に、系の分布が統計力学的にシフトするように相互作用計算に関連するサブルーチンプログラム群を修正した。

プログラムの改良作業は、研究代表者が行い、研究分担者がクロスチェックした。その後、数残基のアラニンペプチドを対象にして代表者の機関が保有する高性能コンピュータと本研究費によって購入した高性能コンピュータで本改良分子動力学プログラムが正常に動作することを様々な条件で確認した。

次に、世界最小蛋白質の一つとして知られている Chignolin の N 末端と C 末端間の距離を反応座標とするメタダイナミックス法を実装した。プログラムの実施とデータ解析には共同研究者の協力を得た。さらに慣性半径 Rg を反応座標とする METAD 法を共同研究者の協力を得てプログラムに実装した。

これに加えて拡張アンサンブルのサンプリング効率を向上する事を目的として、分子動力学シミュレーションを高速に計算できる新規長距離相互作用ポテンシャルの開発を推進した。このポテンシャル関数は、Wolf

が 1999 年に提案した電荷中性条件に基づく理論形式に内在する物理的アーティファクトを取り除くように改良することで開発された。その結果、従来とは全く異なる視点からシンプルかつ計算速度及び並列性に優れるポテンシャル関数を開発することに成功した。そして様々な生体分子の系で計算を行いその性能を実証し、論文発表（単著：Journal of Chemical Physics,2012）を行った。以後の本研究における長距離相互作用の計算はこの新規ポテンシャル関数を用いて高速に実施されている。

次に拡張アンサンブル混合法を実装した分子動力学シミュレーションプログラムを代表的モデル蛋白質へ適用してその性能を詳細に調査した。具体的には、小蛋白質の N 末端と C 末端を仮の反応座標として MCMD・METAD 混合法を適用した。このシミュレーションから METAD の収束性と反応座標探索能力が反応座標とサンプリングに大きく依存する結果を得た。さらにこの点を異なる反応座標を使って確認するために慣性半径を反応座標とする METAD 分子動力学シミュレーションを実施してその収束性を検証した。その結果も、METAD による反応座標依存性とサンプリング依存性が大変大きな事を示した。これらの結果は METAD 法によって空間探索をラフに行う為にさえも予め十分に良い反応座標が必要であることを示している。

この新たな知見に基づいて研究を展開した。まず複雑な折り畳み仮定ではなく、ある程度良い反応座標が経験的に設定されている蛋白質の構造変化過程に注目した。モデル蛋白質として Adelylate Kinase（Adk、PDBID：４AKE-open 構造、1AKE-closed 構造）を用いた。さらに MCMD と混合する手法として METAD 以外の方法を試した。Adk の open 構造及び closed 構造をレファレンスとする RMSD 値を反応座標として、その時々のシミュレーションでまれに観測される反応座標空間領域にある点から MD シミュレーションを再スタートさせる反復 MD シミュレーションを METAD に変わる手法として実施した。この MD 手法は反応座標空間におけるタブーサーチ法の一種で METAD と類似の性質を持つ。

その結果、この MD シミュレーションでは、以前の研究で報告されている自由エネルギー地形をラフに再現するがその収束は非常に緩やかで平衡状態周辺で大きな揺らぎを伴う事が示された。すなわち複雑な系に関する応用に対しては、METAD を止めた時点で平衡状態からのずれが小さな時は MCMD との連携による最終収束計算シミュレーションが有効であるが、そのずれが大きな時は MCMD との混合によって収束判定を行うことは困難であることが確認された。

すなわち、タブーサーチ法はペプチドの主鎖トーション空間のような大変簡単な系を用いたシンプルな反応座標に対しては、非常に高速な探索をする事ができるが、大きな蛋白質過程や小さな蛋白質でも複雑な折り畳み仮定に関しては、一般に収束が大変不安定であり、適切な反応座標の設定が決定的に不可欠なことが明らかとなった。これらの知見は、MCMD を用いた RNA ポリメラーゼの構造不規則領域に関連する分子シミュレーションにも活用して複雑な構造空間の探索を効率良く行う事に役立てている。

本研究では拡張アンサンブル法である METAD と MCMD を混合して蛋白質の複雑な構造空間を探索する分子動力学シミュレーションを独自に開発したプログラムに実装した。さらに高速な分子動力学シミュレーションを可能としサンプリング能力を飛躍的に高める長距離相互作用ポテンシャルの開発に成功し申請者が独自開発するプログラムに実装して本研究で活用し、様々な蛋白質系に応用してその性能の詳細な検証を実施した。

我々は、本研究で METAD 法に代表されるタブーサーチ法の空間探索能力は、設定された反応座標に強く依存することを明確に示した。本研究の結果は、METAD と MCMD の混合手法は大変強力な計算シミュレーション手法であるが、拡張アンサンブル法を蛋白質のような複雑系において活用するためには、第一に良い反応座標系を構築する方法論の確立が必須でありその方向に研究を今後精力的に展開することが重要である事を明確に示している。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計４件）

1. Molecular Dynamics Study of the Phosphorylation Effect on the Conformational States of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II
Y. Yonezawa, *J. Phys. Chem.*, B118, 4471-4478, 2014（査読有）

2. Electrostatic properties of water models evaluated by a long-range potential based solely on the Wolf charge-neutral condition
Y. Yonezawa
Chemical Physic Letter, Vol. 556, p308-314, 2013 （査読有）

3. A long-range electrostatic potential based on the Wolf method charge-neutral condition
Y. Yonezawa
J. Chem. Phys. 136, 244103(8page), 2012

（査読有）

4. Simple and accurate scheme to compute electrostatic interaction: Zero-dipole summation technique for molecular system and application to bulk water
Ikuo Fukuda, Narutoshi Kamiya, Yasushige Yonezawa, and Haruki Nakamura
J. Chem. Phys. 137, 054314, 2012（査読有）

〔学会発表〕（計 15 件）
①米澤康滋
マルチカノニカル分子動力学法による RNA ポリメラーゼ II-C 末端領域の構造空間探索
2014 年 11 月 14 日、分子シミュレーション討論会、仙台市民会館（宮城県仙台市）

②米澤康滋
HPC と 蛋白質分子計算科学シミュレーション
2014 年 11 月 7 日、招待講演、筑波大学計算科学センター（茨城県つくば市）

③米澤康滋
RNA ポリメラーゼ C 末端領域構造の分子シミュレーション研究
2014 年 9 月 22 日、第 8 回分子科学討論会、広島大学（広島県東広島市）

③米澤康滋
分子シミュレーションによる RNA ポリメラーゼ II-C 末端領域コンセンサス配列の
構造空間探索とリン酸化の影響、及び非コンセンサス配列の構造空間との比較
2014 年 8 月 4 日、転写サイクル合同班会議 2014（山梨県笛吹市）

④米澤康滋
分子動力学シミュレーションによる真核生物 RNA ポリメラーゼ II の C 末端領域の構造特性の研究
2014 年 6 月 6-7 日、第 41 回生体分子科学討論会、九州大学西新プラザ（福岡県福岡市）

⑤米澤康滋
RNA ポリメラーゼ II の C 末端領域の分子シミュレーションによる構造空間解析
2014 年 5 月 22-24 日、第 17 回理論化学討論会、名古屋大学（愛知県名古屋市）

⑥米澤康滋
COMPUTATIONAL STUDY ON THE DYNAMIC CONFORMATIONAL CHANGE OF C-TERMINAL DOMAIN OF RNA POLRIMERASE II
2014 年 1 月 11-12 日、新学術領域研究「動的秩序と機能」第 2 回公開国際シンポジウム、キャンパスプラザ京都（京都府京都市）

⑦米澤康滋
Study on the C-terminal domain of eukaryotic RNA polymerase II by using a molecular dynamics simulation
2013 年 11 月 18 日、第 3 回分子シミュレーション国際学会（ICMS2013）、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

⑧米澤康滋
構造と機能に関わる蛋白質の自由エネルギー地形探索，
化学反応経路探索のニューフロンティア、招待講演
2013 年 9 月 28 日、福井謙一記念研究センター（京都府京都市）

⑨米澤康滋
マルチカノニカル法による RNA ポリメラーゼ C 末端領域の研究
2013 年 9 月 26 日、第 7 回分子科学討論会、京都テルサ（京都府京都市）

⑩米澤康滋
高圧力下における DHFR 蛋白質動態のシミュレーション研究
2013 年 6 月 13 日、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館（鳥取県鳥取市）

⑪米澤康滋
マルチカノニカル分子動力学法による RNA ポリメラーゼ C 末端領域の構造空間探索
2013 年 5 月 15 日、第 16 回理論化学討論会、福岡あいれふ（福岡県福岡市）

⑫米澤康滋
電荷中性条件のみを利用した静電ポテンシャルの開発と評価
2012 年 11 月 28 日、第 26 回分子シミュレーション討論会、九州大学西新プラザ（福岡県福岡市）

⑬米澤康滋
中性条件に基づく新規静電ポテンシャルの開発
2012 年 9 月 19 日、第 6 回分子科学討論会、東京大学（東京都文京区）

⑭米澤康滋
GPU を利用した Zero-dipole summation 法による静電相互作用の高速計算
2012 年 6 月 12 日、第 12 回　日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

⑮米澤康滋
リモネンエポキシド加水分解酵素の分子動態
2012 年 5 月 24 日、第 15 回理論化学討論会、仙台福祉プラザ（宮城県仙台市）

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等　なし

６．研究組織
(1)研究代表者
米澤 康滋　（YONEZAWA、Yasushige）
近畿大学・先端技術総合研究所・教授
研究者番号：40248753

(2)研究分担者
菊川 豪太（KIKUGAWA, Gouta）
東北大学・講師
研究者番号：90435644

藤澤 雅夫（FUJISAWA, Masao）
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：20258065

吉田 久（YOSHIDA, Hisashi）
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：50278735

(3)連携研究者
橘 秀樹（TACHIBANA、Hideki）
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：70126118

赤坂 一之（AKASAKA、Kazuyuki）
近畿大学・先端技術総合研究所・客員教授
研究者番号：50025368