

令和4年度高性能汎用計算機高度利用事業

「富岳」成果創出加速プログラム

「全原子・粗視化分子動力学による細胞内分子動態の解明」

成果報告書

令和5年5月30日

国立研究開発法人理化学研究所

杉田 有治

目次

1. 補助事業の目的	1-
2. 令和4年度（報告年度）の実施内容	2-
2-1. 当該年度（令和4年度）の事業実施計画	2-
(1) 全原子・粗視化分子力学の最適化と並列化	2-
① GENESISの最適化と並列化（理研・杉田）	2-
② 粗視化モデル SPICA-FFの開発（岡山大・篠田渉）	2-
(2) データ科学的手法による粗視化モデルパラメーターの最適化	2-
① データ同化によるシミュレーションと実験データの統合（埼玉大・松永）	2-
② 粗視化モデル CafeMolのパラメーター最適化（京大・高田）	2-
(3) 生体分子系のモデリングと「富岳」を用いたシミュレーション	3-
① 細胞内分子混雑と液液相分離（理研・杉田）	3-
② 遺伝子転写機構の解明（京大・高田）	3-
③ 核内蛋白質・核酸複合体の動的モデリング（量研機構・河野）	3-
④ ウイルス（岡山大・篠田渉）	3-
⑤ 多剤排出トランスポータの分子力学シミュレーション（東大・篠田恵子）	3-
(4) プロジェクトの総合推進	3-
2-2. 実施内容（成果）	4-
(1) 全原子・粗視化分子力学の最適化と並列化	4-
① GENESISの最適化と並列化（理研・杉田）	4-
② 粗視化モデル SPICA-FFの開発（岡山大・篠田渉）	6-
(2) データ科学的手法による粗視化モデルパラメーターの最適化	11-
① データ同化によるシミュレーションと実験データの統合（埼玉大・松永）	11-
② 粗視化モデル CafeMolのパラメーター最適化（京大・高田）	16-
(3) 生体分子系のモデリングと「富岳」を用いたシミュレーション	18-
① 細胞内分子混雑と液液相分離（理研・杉田）	18-
② 遺伝子転写機構の解明（京大・高田）	21-
③ 核内蛋白質・核酸複合体の動的モデリング（量研機構・河野）	25-
④ ウイルス（岡山大・篠田渉）	28-
⑤ 多剤排出トランスポータの分子力学シミュレーション（東大・篠田恵子）	34-
(4) プロジェクトの総合推進	40-
2-3. 活動（研究会の活動等）	41-
2-4. 実施体制	42-

補助事業の名称

「富岳」成果創出加速プログラム

全原子・粗視化分子動力学による細胞内分子動態の解明

1. 補助事業の目的

細胞はバクテリアから人に至るあらゆる生命における基本要素である。細胞内で働く蛋白質や核酸などの生体高分子の機能を理解することは基礎生命科学における重要な課題であるだけでなく、疾患の原因解明や薬剤開発などにおいても必要である。X線結晶構造解析やNMR（核磁気共鳴）、クライオ電子顕微鏡などの構造生物学によって生体高分子の立体構造の理解は着実に進む一方で、細胞内環境においてこれらの生体高分子が機能を発現する詳細については未解明の問題が多い。例えば、iPS細胞などの多能性幹細胞は再生医療などに重要な役割を果たすことが期待されており、その作製には数多くの遺伝子の中から4つの遺伝子を細胞に導入する必要があることが京都大学の山中教授らによって発見された。しかし、この4つの遺伝子によって発現される転写因子（蛋白質）がどのように遺伝子発現を制御しているのか、その実態は未解明である。すなわち、生命科学における多くの基本的な問題がブラックボックスとして放置されたまま、医療や創薬などへの応用が議論されている。

このような基本的な問題を解決する方法のひとつとして、計算科学・データ科学・実験科学を融合した新しい科学によって、原子・分子からボトムアップ的に生命現象を理解する試みが発展しつつある。この試みは、単純な構造を持つ原核細胞（バクテリアなど）について「細胞まるごと」の理解を深めるために、ヒト細胞などの複雑な真核細胞においては「細胞環境（細胞質・細胞膜・細胞核）を考慮した分子機能」を理解するために有効である。我々は「京」を用いることで、バクテリア細胞質に存在する非常に多くの蛋白質や核酸を含む系の全原子分子動力学 (Molecular Dynamics, MD)シミュレーションを実現した。この計算は1億個以上の原子を含む2016年当時世界最大級の計算であった。また、蛋白質間に働く弱い相互作用が蛋白質の構造安定性や分子間相互作用に与える影響を予測したことで高く評価されている。また、米国ロスアラモス研究所のスーパーコンピュータTrinityを用いた国際共同研究によって、染色体の一部を含む10億原子を超える世界最大の系のMD計算も行なった。これらの計算は理研で開発しているMDソフトウェアGENESISを用いて実行されたものであり、非常に大規模な生体分子系の全原子MDシミュレーションを行う上では世界的にも優位な立場を築いている。

全原子MDシミュレーションでは各分子に含まれる分子運動を正確に解く必要があるため、スーパーコンピュータを用いたとしても計算できる時間はナノ秒 (ns: nanosecond, 10^{-9} 秒) からマイクロ秒 (μ s: microsecond, 10^{-6} 秒) 程度に限定されており、遺伝子発現など生命科学における本質的な問いに答える計算を行うことは困難であった。本研究では、「京」などで実績のある全原子MDシミュレーションに加えて、複数の原子を束ねた粗視化分子モデルを用いた超大規模MDシミュレーションを「富岳」上でGENESISを用いて行うことにより、 μ mスケールの生体分子系に関するミリ秒 (ms: millisecond, 10^{-3} 秒) 以上の遅い生命現象の解明を目指す。大規模な生体分子系の粗視化MDシミュレーションは過去にほとんど例がなく「富岳」の優れた計算性能とGENESISを用いて可能になる超並列計算を組み合わせることで初めて実現する。このプロジェクトのメンバーである高田彰二（京都大学）らが開発しているCafeMolや篠田渉（岡山大学）らが開発しているSPICAなどの生体高分子の粗視化分子モデルは、世界的

にも優位性の高いものであり、実際、既に多くの成果を挙げている。本プロジェクトではこれらのモデルをGENESISに導入し、「富岳」上で大規模粗視化MDシミュレーションを行うとともに、分子構造と相互作用の詳細については、全原子MDシミュレーションの知見と組み合わせる。粗視化MDシミュレーションで用いられる分子内および分子間相互作用を記述するパラメーターは、立体構造データベースを用いて経験的に決定されてきた。このパラメーターの信頼性を改善するために、機械学習などのデータ科学の方法を用いて最適化する。さらに、別プロジェクトなどで連携している実験科学の結果を取り込み、計算結果と比較していくことで分野融合を行い新しい研究分野を創生する。

2. 令和4年度（報告年度）の実施内容

2-1. 当該年度（令和4年度）の事業実施計画

(1) 全原子・粗視化分子動力学の最適化と並列化

① GENESIS の最適化と並列化（理研・杉田）

分子動力学ソフトウェア GENESIS に導入された粗視化分子モデル SPICA と CafeMol を、岡山大篠田渉や京大高田らと協力して、「富岳」に対して最適化・並列化を進める。また、量研機構の河野らと協力して、蛋白質・核酸等の効率的な構造探索を実現するアルゴリズムを導入する。このような新機能やマルチスケールモデルを含む新しいバージョンの GENESIS をフリーソフトウェアとして公開する。

② 粗視化モデル SPICA-FF の開発（岡山大・篠田渉）

粗視化 SPICA 力場の分子ライブラリの充実、特にウイルス感染初期過程で重要な役割を担う糖鎖のライブラリ追加を行う。糖鎖分子のモデリング及び力場開発は全原子力場を参照し、さらに熱物性の再現をもとに行う。さらに、GENESIS で糖鎖+脂質+タンパク質からなる大規模系の粗視化シミュレーションを高効率に実行可能にする。

(2) データ科学的手法による粗視化モデルパラメーターの最適化

① データ同化によるシミュレーションと実験データの統合（埼玉大・松永）

昨年度に引き続き FRET や原子間力顕微鏡の 1 分子計測データに対するマルコフ状態モデルを介したデータ同化による応用研究を推進する。これまでに整備・公開したソフトウェアを用いて計測データからマルコフ状態モデルのパラメーターを高速に推定し、計測データの動態を反映したモデルを得る。得られたマルコフ状態モデルを解析することで、中間状態や遷移状態、構造変化のパスウェイを明らかにし、構造変化を引き起こす相互作用の因果関係を調べる。

② 粗視化モデル CafeMol のパラメーター最適化（京大・高田）

粗視化分子モデル CafeMol は、蛋白質・核酸・脂質膜の計算を行うために必要なアミノ酸・塩基・リン脂質それらの相互作用などについてのパラメーターが求められている。昨年度のテスト計算の結果を踏まえて、分子・細胞レベルのシミュレーションに必要な非特異的蛋白質・蛋白質相互作用、および DNA・蛋白質相互作用の粗視化パラメーターのさらなる改良を行い、より精度の高い分子動力学シミュレーションの実現に向けて研究を推進する。岡山大篠田渉や埼玉大松永と連携して、全原子シミュレーションの結果を参照とした機械学習による分子内・分子間相互作用の検証と最適化を試みる。

(3) 生体分子系のモデリングと「富岳」を用いたシミュレーション

① 細胞内分子混雑と液液相分離 (理研・杉田)

細胞質内分子混雑と液液相分離、細菌べん毛などの大きなシステムのマルチスケール分子動力学シミュレーションを「富岳」を用いて大規模に実行する。生命科学の視点として、ATP などの基質が分子混雑環境で凝集を防ぐメカニズムや蛋白質と核酸が含まれる液液相分離の三次元構造モデルの構築、細菌べん毛を構築する蛋白質群の動的構造などを理解するための研究を推進する。

② 遺伝子転写機構の解明 (京大・高田)

昨年度までに構築した染色体の高スループット実験から得られる Hi-C/Micro-C/MNase-seq 等の実験情報、およびリンカーヒストンおよび転写因子の結合情報を用いた三次元クロマチン構造粗視化分子モデルについて、粗視化分子モデル CafeMol を用いて、ソフトウェア GENESIS による大規模動態シミュレーションを実施し、結果を解析し、遺伝子座における転写活性、染色体高次構造、および液液相分離に関する知見を得る。

③ 核内蛋白質・核酸複合体の動的モデリング (量研機構・河野)

GENESIS に実装した蛋白質・核酸等の効率的な構造探索方法を用いて得られた構造データを初期構造として、蛋白質-核酸の複合体にさらに結合因子が結合したシミュレーションを実施する。蛋白質間相互作用や蛋白質-DNA 間相互作用を調べ、構造変化の仕組みを調べることで、結合因子の役割を明らかにする。

④ ウイルス (岡山大・篠田渉)

B 型肝炎ウイルス(HBV)ビリオンのモデリング及び GENESIS を用いた分子シミュレーションにより、ビリオンの動態と相互作用の解明を目指す。昨年度までに作成したビリオンモデルの膜タンパクを置換し、L,M,S 三種の膜タンパク質を持つビリオンを完成させる。さらにエンベロープ膜外領域に糖鎖修飾をしたビリオンをモデリングし、膜外領域とモデル細胞膜との接近過程の分子シミュレーションを実施し、ウイルス感染初期過程におけるビリオン粒子の動態と相互作用を明らかにする。

⑤ 多剤排出トランスポーターの分子動力学シミュレーション (東大・篠田恵子)

今年度は大腸菌モデル膜 (LM301 株) に埋め込まれた AcrABZ-TolC 複合体のタンパク質-タンパク質相互作用、脂質分子とタンパク質の相互作用を詳細に解析し、これらの相互作用と複合体におけるタンパク質各ドメインのダイナミクスとの関わりを調べる。

また、昨年度新たに構築したカルジオリピンを含む大腸菌モデル膜 (W3110S 株) を用いて、膜に埋め込まれた AcrABZ-TolC 複合体系を構築し、その安定なシミュレーションを実現する。

(4) プロジェクトの総合推進

プロジェクト全体の連携を密としつつ円滑に運営していくための研究成果報告会・シンポジウムを適宜、オンラインまたはオンサイトで開催する。プロジェクト内の研究の進捗状況および成果の発表のた

めのワークショップ・セミナー等を開催する。プロジェクトで得られた成果については学会発表等により、積極的に公表する。また、他のプロジェクトとの連携などにより、効率的・効果的な研究の推進を行う。

2-2. 実施内容 (成果)

(1) 全原子・粗視化分子力学の最適化と並列化

① GENESIS の最適化と並列化 (理研・杉田)

昨年度までに GENESIS に導入した粗視化モデル SPICA と CafeMol (AICG2+) などについての最適化と並列化を進めた。SPICA については、溶媒分子についても露わに考慮する粗視化モデルであり GENESIS/SPDYN に導入済みであるため、今年度は細かいバグの修正等を実施した。一方、CafeMol のような粗視化モデルでは、陰溶媒モデルを用いているためドメイン分割を行った場合に不均一な粒子密度を持つドメインが生じてしまい、並列化を行った場合に負荷分散を効率的に行うことができなかった。そこで、昨年度にひきつづき、Cell-Based kd-Tree Method と呼ぶ並列化スキームに基づく粗視化分子力学プログラム GENESIS/CGDYN を開発した。この方式では、シミュレーションする系をドメインとセルに階層的に分割する。セルは最小の空間分割単位であり、ドメインはセルの集合である。粒子密度が比較的均一な溶媒分子を露わに考慮する分子力学では、各ドメインのサイズは同じである。陰溶媒モデルを用いる粗視化分子力学においては、まず非結合相互作用範囲の閾値に基づいて単位領域 (セル) を生成する。次に、セル中の粒子数をカウントし、境界の下部と上部で粒子数が同程度になるようにセルの境界を決定する (図 1-1-1 左)。ドメイン数が並列化における MPI プロセス数と同じになるまで、このプロセスを繰り返し実行する。この方式は、プロセス全体の負荷バランスを改善することができるが、分子力学計算が進むと粒子の位置が変化するため、計算性能が劣化する。そこで、今年度は、分子力学計算を実行しながら、ある頻度で各ドメインへのセルの割り当てを再調整することで性能を向上させた (図 1-1-1 右)。これによって、特に非共有結合相互作用のパフォーマンスが大幅に向上した。

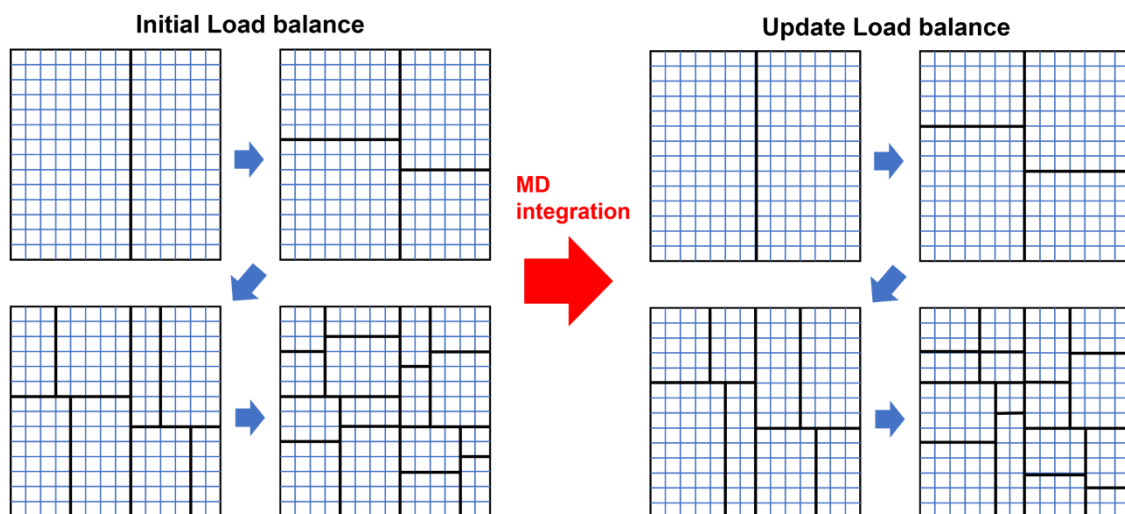


図 1-1-1: Cell-Based kd-Tree Method によるドメイン分割の仕組み (二次元版)。左図にあるように、境界の上部と下部で粒子数が同じになるようにドメインを分割する。このプロセスを、ドメイン数が並列化

における MPI プロセス数と同じになるまで繰り返す。分子動力学計算の途中で、粒子の位置が変化するため、このドメイン分割を繰り返すことで常にプロセス全体の負荷バランスを均一に近づける。

蛋白質、核酸、それらの複合体に関する陰溶媒粗視化分子モデルを用いた分子動力学計算が GENESIS で可能であった。今年度はさらに脂質分子に関する粗視化モデルを利用可能とした。ベースとなる脂質力場は京大高田研究室で開発された iSoLF である (Ugarte La Torre et al. *J. Chem. Phys.* 2020)。この力場に静電相互作用を追加し、約 30 種類の脂質分子について分子間相互作用をパラメーター化した。この新しいモデル (iSoLFv2) は、全原子モデルを用いた分子動力学シミュレーションから計算された脂質 1 分子の表面積 (図 1-1-2a) と膜の厚さ (図 1-1-2b) を再現することができる。さらに、iSoLFv2 力場を用いて分子動力学シミュレーションを行った結果は、Dry Martini や Martini 3 といった他の粗視化モデルで観察された挙動とよく一致していた。DOPC と DPPC の混合膜を計算したところ、2 つの脂質分子の成分の相対濃度によって異なる相が存在することが確認された (図 1-1-1c)。この相は、オーダーパラメーターを投影することで特徴づけることが可能である。DPPC を低濃度含む系では、ほぼ単一の液体秩序相が、DPPC と DOPC を同程度含む系では液体秩序相とゲル相の共存が、そして、DPPC を高濃度で含む系では、単一のゲル相が存在していた (図 1-1-2d,e,f)。この結果は、文献に掲載された過去の報告とよく一致していた。iSoLFv2 力場は GENESIS 開発バージョンに実装されており、今後、正式版に含めて一般に公開することで、生体膜を大規模に研究するための貴重なモデルになると考えられる。

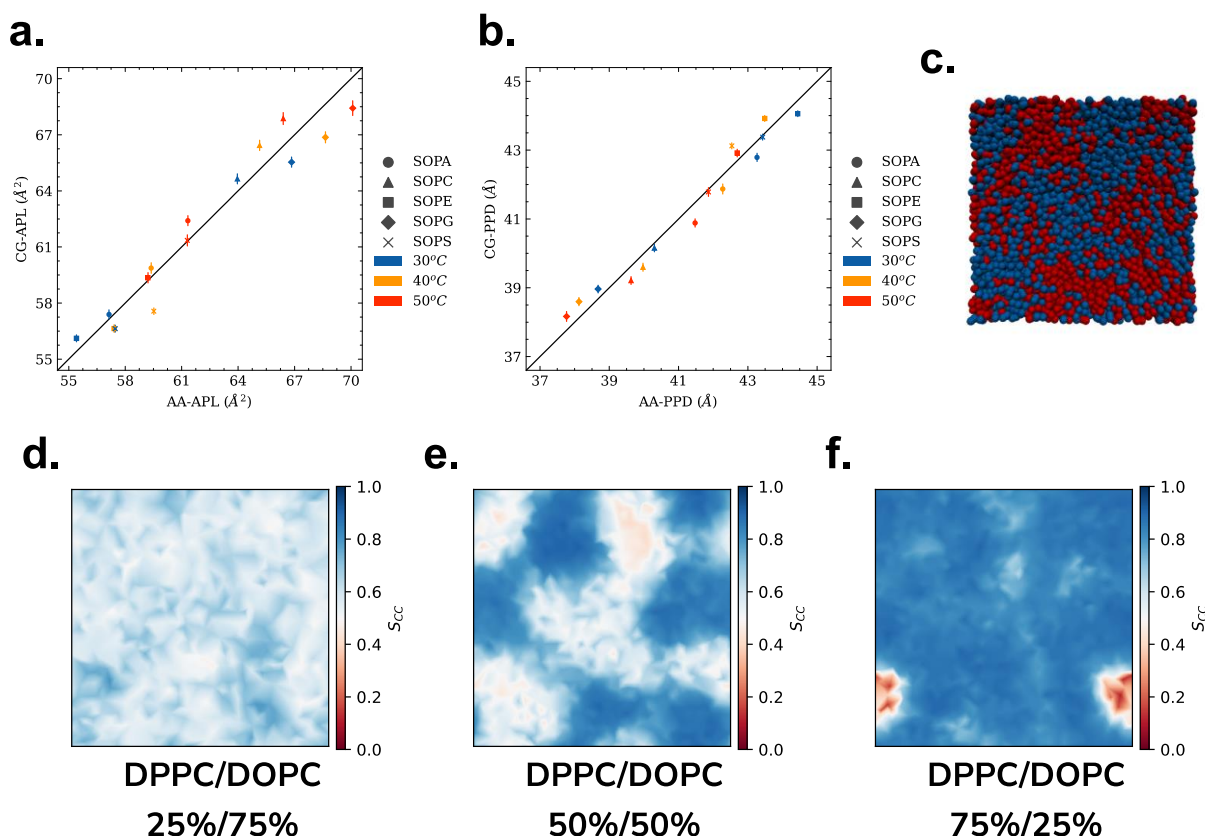


図 1-1-2: iSoLF 脂質力場の改良。(a-b) iSoLFv2 は、全原子シミュレーションから計算された脂質あたりの面積と膜厚を再現している。(c) DOPC と DPPC からなる脂質膜の位相挙動は、文献の実験結果と一致する。(d) DPPC が低濃度の場合、膜は単一の液体-分散相を示す。(e) DPPC と DOPC が等モル濃度の場合

合、液状分散相とゲル相が共存することが確認された。(f) DPPC の濃度を上げると、単一のゲル相が得られる。Sccは脂質分子の炭素鎖のオーダーパラメーターであり、1はもっとも秩序がある構造で0はランダムな構造を示す。

② 粗視化モデル SPICA-FF の開発 (岡山大・篠田渉)

SPICA 力場は重原子 3 つ程度を含むグループを一つの粗視化(CG)粒子(相互作用点)と見なす解像度を持つ粗視化力場であり、そのパラメーターは、熱力学量の実験データ、全原子(AA)-MD から得られる分子分布関数や溶媒和自由エネルギーを参照して最適化する。また、全原子力場のようにクロス相互作用パラメーターをコンビネーションルールによって決めることができないため、分子ライブラリの拡充には多大なコストを要するが、完成した力場モデルは、例えば脂質膜では、界面張力、密度、溶媒和自由エネルギーを再現し、粒子の分布関数(構造)もほぼ全原子モデルの結果を再現する精度を持つ。さらに、脂質膜系では膜弾性係数(膜面積圧縮係数、曲げ弾性係数、ガウス係数)も実験をよく再現すると同時に、膜の線張力もよい一致を示すため、メゾスコピックな脂質膜系の集合構造(モルフォロジー)を予測的に計算することができることが大きなメリットである。今年度は、糖鎖モデルの作成とパラメーター決定を行い、力場の汎用化を行った。

最初に、糖鎖モデルの作成にあたり、糖分子の選択手順について説明する。炭化水素化合物である単糖には可能な構造異性体が数多く存在するが、その中で自然界に実際に使われている構造は少数に限られる。また、それらの中には複数の構造異性体があり、区別されている。粗視化モデルでは構造異性体の区別を全原子と同様にはできないため、どのレベルで異性体を区別できる粗視化モデルを作成するかは最初に考慮する事項となる。立体異性体の分け方としては、炭素 1 位の不斉炭素原子による D-体と L-体、 α や β のアノマー分類、炭素 2, 3, 4 位の立体配置の違いによるエピマー、6 員環構造と 5 員環構造の違いであるピラノースとフラノースなどがある。この中で、D-体と L-体については、生体系で良く確認されるのがフコースを除き D-体のみなので、D-体のみを考慮することにした。エピマーとアノマーの分類については、複数の炭素原子を 1 つの CG 粒子にまとめるため、単糖では区別をつけることが出来ない。ピラノースとフラノースの違いは粒子タイプを分けることにより区別可能である。表 1-2-1 には今回作成した単糖の一覧を示す。アルドース系列とケトース系列、及びその誘導体がそれぞれ区別される解像度で CG モデルを作成した。各糖のエピマーの違いは CG モデルの単糖では区別がつかない。単糖の AA モデルとそれに対応する CG モデルを図 1-2-1 に示す。CG 粒子の定義は、必要な粒子タイプの数を最小限にするような選択とし、単糖モデルは 9 種類の CG 粒子で記述される。(図中ではそれぞれの粒子タイプを異なる色で表示。) 単糖モデルにおいて、分子内結合を結合長と結合角の関数のみで表現した。多糖モデルにおいては、追加でグリコシド結合まわりのコンフォメーションを正しく表現するため二面角の関数も導入した。

表 1-2-1: SPICA 力場で作成した単糖の一覧。表の中で()で表示されている分子は 1 つ上の糖の立体異性体であり、これらの異性体を SPICA 力場では区別できない。

アルドース系列	ケトース系列	誘導体
D-キシロース (D-リボース)	D-フルクトース	・ デオキシ糖 L-フコース

D-グルコース
 (D-マンノース)
 (D-ガラクトース)

・ アミノ糖
 D-N-アセチルグルコサミン (GlcNac)
 (D-N-アセチルガラクトサミン)
 D-N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)

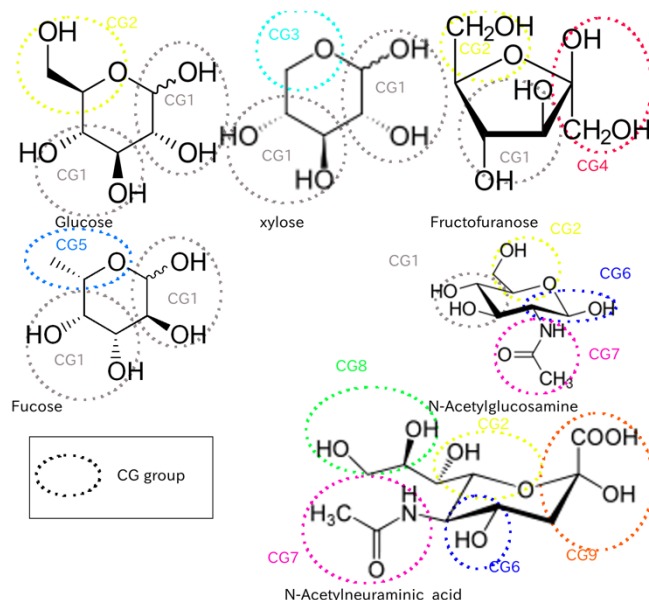


図 1-2-1: SPICA モデルで作成した単糖の全原子モデルの化学構造とその CG モデルへのマッピング。全原子モデルから CG 粒子へ射影する 1 つのマッピンググループは 1 つの丸領域と粒子タイプ (CGX: X=1-9) 毎の色が割り当てられている。

糖分子は単糖分子のみならず、蛋白質や DNA、RNA のように単糖を結合した多糖構造を形成する。蛋白質ではアミノ酸分子が一次的にのみ結合するが、糖分子においては分岐構造が作成される。そのため、糖鎖構造は多様性を持ち、糖間の結合パターンは数多く存在する。そのため、今回の取り組みでは、最も基本的なグルコース二分子間の結合と N-glycan 蛋白質で生じる糖鎖の結合パターンについてモデルを作成することにした。グリコシド結合構造を持つ分子は、主に、グリコシド結合が行われる C 原子の位置と結合される糖それぞれのアノマー構造を表現する方法で略記されることが多い。例えば、 α -グルコース(Glc)二つが C1 と C3 で結合している場合の表記の一つが、Glc-13aa-Glc である。この表示法に従って、パラメーターを用意したグリコシド結合のリストが表 1-2-2 である。これらの結合により、グルカンのような一般的なグルコース多糖類と、N-glycan を表現できる。グリコシド結合まわりの構造は結合長、結合角や、二面角パラメーターにより表現されている。単糖では α と β のアノマー分子の違いを区別することは困難であったが、多糖ではグリコシド結合の分子長や分子角度が異なるため、これらのアノマーの違いを区別できる。したがって、特定のアノマー配列を持つ多糖分子と特異的な認識をもつ蛋白質の相互作用について調べる事が可能である。

表 1-2-2: SPICA-FF で用意したグリコシド結合で生じる多糖構造リスト。

Glc-11aa-Glc	Glc-12ab-Glc	Glc-12bb-Glc	Glc-13ab-Glc
Glc-13bb-Glc	Glc-14ab-Glc	Glc-14bb-Glc	Glc-16bb-Glc

GlcNac-14-GlcNac	Man-14-GlcNac	GlcNac-14-Man	GlcNac-16-Man
GlcNac-14-GlcNac	Man-12-Man	Man-(a13-Man)-a16-Man	
Fuc-a16-GlcNac	GlcNac-b12-Man	Neu5Ac-a23-Galac	Man-b14-GlcNac
Galac-b14-GlcNac	GlcNac-b14-Man	GlcNac-b16-Man	

次にパラメーター決定の手順について述べる。最初に分子内ポテンシャルのパラメーターの決定手順を述べる。分子内相互作用は基本的に調和関数ポテンシャルで表現し、結合ポテンシャル $E_{bond} = k(r - r_0)^2$ 、結合角ポテンシャル $E_{angle} = k(\theta - \theta_0)^2$ を用いた。二糖モデルにおいては、グリコシド結合まわりの二面角に関してねじれポテンシャル $E_{torsion} = k[1 + \cos(n\phi - \phi_0)]$ を導入した。ここで、粗視化パラメーター k 、 r_0 、 θ_0 、 n 、 ϕ_0 は、それぞれ対応する分布関数を AA-MD の配置を CG マッピングして計算し、それを参照して最適化を行った。

次に糖と水分子の間の非結合相互作用は Lennard-Jones(LJ) 12-4 型の関数

$$U_{LJ12-4}(r) = \frac{3\sqrt{3}}{2} \varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^4 \right]$$

で表現しており、相互作用パラメーター ε と σ をそれぞれの粒子ペアについて決定する必要がある。糖分子は水溶性であるため、その水和自由エネルギーの再現は重要である。水和自由エネルギー計算は、水のスラブ系において、糖鎖を真空から水中に移動した際の自由エネルギー差を Adaptive Biasing Force(ABF)法により算出した。バルク水中と界面から離れた真空中における自由エネルギーのプラトー領域の自由エネルギー鎖が水和エネルギーを与える。表 1-2-3 に CHARMM36 力場を用いた AA-MD からの水和自由エネルギーの結果と、最適化の結果、最終的に得られた CG パラメーターを用いた CG-MD の結果を比較している。この最適化では CG パラメーターを変えて自由エネルギー計算を繰り返し行う必要があり、最終的に AA モデルの値を 1 kcal/mol 程度の誤差で再現するパラメーターが得ることができた。

表 1-2-3: All atom model (CHARMM36) と CG の溶媒和自由エネルギー ΔG [kJ/mol] の比較。

	AA (CHARMM36)	CG (SPICA)
Glucose	-71.4	-74.7
Fructose	-67.2	-66.9
GlcNac	-77.6	-77.3
Fucose	-59.0	-57.3
Xylose	-60.5	-61.6
Neu5Ac	-131.9	-132.2

糖分子同士や糖分子と水分子以外との非結合相互作用は次のような LJ9-6 関数によって表現される。

$$U_{LJ9-6}(r) = \frac{27}{4} \varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^9 - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

脂質分子として DOPC 分子を採用し、水和自由エネルギーのときと同様に、脂質二重層膜系に対して単糖分子が水中から膜中心へと移動した際の自由エネルギープロファイルを計算し、AA-MD の結果を CG-MD で再現するようにパラメーターを決めている。図 1-2-2 にはグルコースの DOPC 膜垂直軸に沿っての自由エネルギープロファイルの結果を示している。グルコースの膜侵入の自由エネルギーの立ち上がりは CG-MD の方がやや早くなっているが、膜内部の疎水領域での自由エネルギー値を優先して合わ

せた結果である。しかし、この調整により水と油に対する相対的な親和性は正しく表現できる CG モデルになっていると言える。水と油の間の親和性の差については求めた自由エネルギープロファイルの両端の差により表現でき、これはどの単糖に対しても表 1-2-4 にあるように 1 kcal/mol 未満で精度よく再現できている。したがって、この粗視化糖モデルは水溶液から脂質膜内部への糖が持つ分布・分配をよく再現できると期待される。

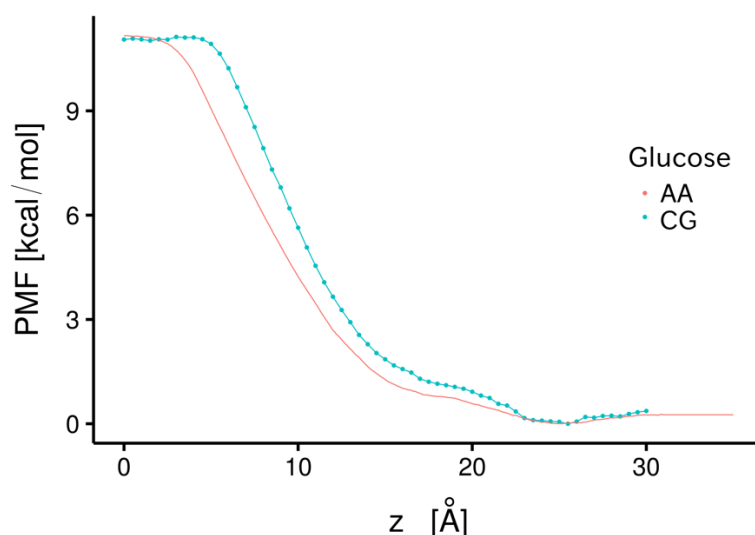


図 1-2-2: グルコースの DOPC 脂質膜の垂直軸に沿っての自由エネルギープロファイル。z = 0Å が膜中心を表し、z > ~25Å がバルク水領域となる。

表 1-2-4: DOPC 膜系における各糖の PMF プロファイル計算の水バルク領域と膜中心の間の自由エネルギー差 ΔG [kJ/mol] の比較。

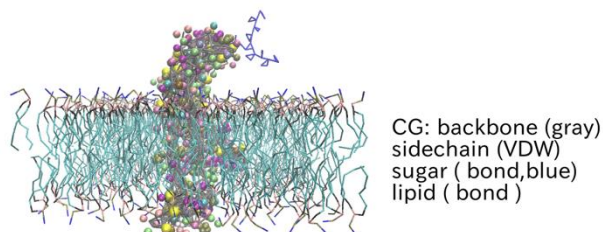
	AA (CHARMM36)	CG (SPICA)
Glucose	10.9	10.7
Fructose	9.5	9.5
GlcNac	9.0	8.4
Fucose	9.1	8.8
Xylose	9.5	9.5
Neu5Ac	21.2	21.0

次に糖分子-糖分子間の非結合相互作用の調整を行った。糖分子は結合して多糖構造を作ると共に、水中で単糖同士の間にも親和性のある相互作用があり、溶液中でそれらの凝集性が重要な因子として分子機構に関わると考えられる。これらのパラメーターについては、糖水溶液中における単糖分子間の動径分布関数、累積粒子配位数、密度をそれぞれ AA-MD の結果と一致させるような CG パラメーターを調整することで決定した。これにより、水溶液中に存在する分子間の相対的な配置が再現できる CG モデルを得ることができる。結果としては、特に単純な三角形で表現される単糖分子であるグルコース、フルクトース、フコース、キシロースに所属する粒子ペアは高い精度で溶媒和配置を再現できている。他方で、三角形構造に加えて付与した粒子をもつ GlcNac や Neu5Ac については、その突起部分の動径分布関数にややずれが見られたが、他の多くのペアで累積配位数のずれは一個未満の精度であっており、

分子間の配位構造は概ね再現できている。異なる糖分子間のパラメーター生成には、混合則から初期値の推定を行い、それをスケールリングして最適パラメーターを探索した。多くの場合、初期推定から 0.9 – 1.1 倍程度の範囲が最も再現がよいことがわかった。これにより、溶液中に一定濃度で糖が存在するような系にも CG モデルが利用できることが期待できる。最後に、糖分子と蛋白質に対する相互作用については、今回は混合則による初期値をそのまま用いている。糖分子-糖分子の例が示すように、混合則による初期値推定は、概ね適切な結果を与えることが期待できるからである。

SPICA 力場に糖鎖のライブラリを導入したことにより、**図 1-2-3**に示すような糖鎖修飾入りの蛋白質の系の CG-MD が実行可能となった。例の中の B 型肝炎ウイルス(HBV)の M 蛋白質系は、課題(3)-④ウイルスで応用計算に使用した構造であり、糖鎖修飾したエンベロープ膜蛋白質が宿主細胞膜と相互作用する。また、Cyanovirin-N(CVN) 蛋白質は HIV ウイルスなどのエンベロープ型ウイルスの侵入阻害機能をもつシアノバクテリア型蛋白質であり、その結晶構造が報告されている。このような糖鎖修飾を持つ蛋白質に SPICA-FF は一般に適用可能となり、その他のエンベロープ型のウイルス系の CG-MD が実行可能となった。GENESIS ソフトウェアで糖鎖を含む SPICA による CG-MD の「富岳」上でのパフォーマンスについて、**図 1-2-4**に示すように以前と変わらない計算速度が得られる。これは、糖鎖モデルに硬い共有結合がなくより小さな時間刻みを必要とするエネルギー項がないためである。糖鎖モデルを、これまでの SPICA-FF におけるモデル最適化法と適合した形で作成できたことにより、ある一定の熱力学的性質や構造分布の再現性を保証する CG-MD の適用範囲を拡大し、今後の分子シミュレーションの発展に大いに役立つと期待される。

(A) HBV M protein monomer in lipid bilayer



(B) Cyanovirin-N (CVN)

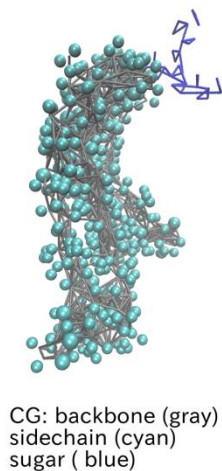


図 1-2-3: SPICA モデルで糖を含むことにより取り扱えるようになった糖鎖修飾蛋白質の例。(A)HBV エンベロープ膜蛋白質である M protein とその CG モデル。(B)HIV などのエンベロープ型ウイルスの侵入阻害機能を持つ Cyanovirin-N (CVN)蛋白質の粗視化モデル。

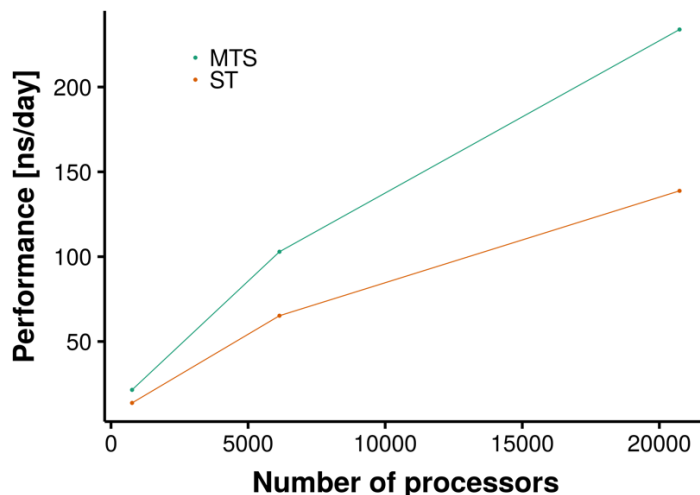


図 1-2-4: 「富岳」上で GENESIS を用いて、B 型肝炎ウイルスのエンベロープ粒子系、約 300 万原子系において、倍精度計算を用いて、10 fs 刻みの Single-Time-Step 法と 10 fs と 50 fs 刻みの Multiple-Time-Step 法を用いて、使用するプロセス数と 1 日当たりの MD 時間の計測値。

(2) データ科学的手法による粗視化モデルパラメーターの最適化

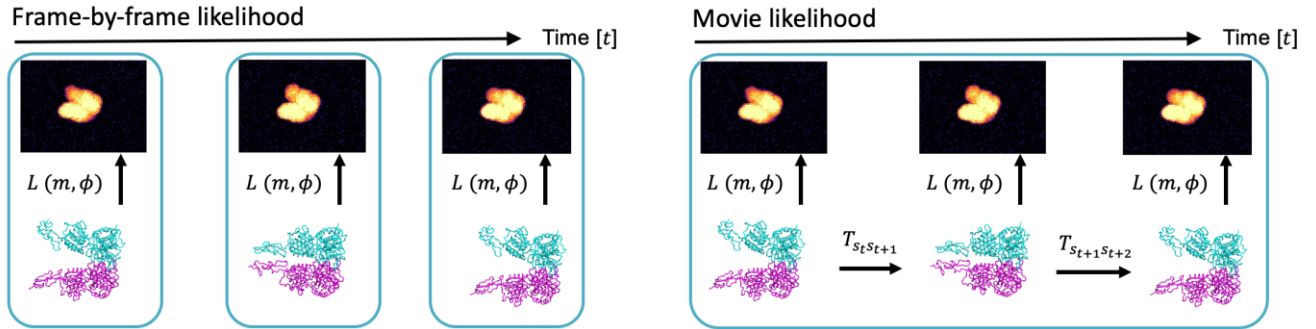
① データ同化によるシミュレーションと実験データの統合 (埼玉大・松永)

生体分子のアンサンブルやダイナミクスを原子解像度で観測する手法として MD シミュレーションは強力である。しかし、用いる力場パラメーターの精度が不十分な場合に、MD シミュレーションを行って得られるアンサンブル/ダイナミクス情報が不正確で実験とも整合的でなくなってしまうという弱点がある。それに対して、1 分子計測などの実験計測は、分子構造のアンサンブル/ダイナミクスを直接観測できるという強みがある一方で、計測のために用いるプローブなどを経由した不完全な構造情報しか得ることができないという弱点がある。そこで近年盛んに研究されているのが、MD データと実験計測データを統合してより高精度・高解像度の構造アンサンブル/ダイナミクスをモデリングするためのデータ解析手法である。これまでに我々は、統計数理のデータ同化手法に対して、MD のデータ解析で用いられるマルコフ状態モデルを導入して、生体分子向けのデータ同化手法を開発・応用してきたが (Matsunaga and Sugita, *JCP, eLife* 2018)、未だ種類の計測データについてのみの対応で、小蛋白質のフォールディングに 응용が留まっている。そこでデータ同化手法を他の実験計測手法でも取り扱えるように範囲を拡大すること、またより大きなサイズの細胞内現象へ関わる蛋白質へ応用可能にすることが求められている。

昨年度までに、データ同化に必要な機械学習 (隠れマルコフモデル) に必要なツール群を整備し、さらに高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) データへの適用できるように手法開発を行い、応用研究として開発したツールと手法を用いて、味覚受容体の HS-AFM データに対する応用研究を行い蛋白質機能にとって

重要な構造ダイナミクスやアンサンブルを解析してきた。今年度は開発した手法の論文化のための追加解析や、応用結果の検証を主に進めた。

From frame-by-frame likelihood to movie likelihood



$$L(m, \phi, dx, dy, dz, \beta, r, \lambda) = p(I^{ref} | m, \phi, dx, dy, dz, \beta, r, \lambda)$$

$$= \prod_i^{N_{\text{pixel}}} (2\pi\lambda)^{-1/2} e^{-\frac{[I_i^{ref} - I_i^{\text{pseudo}}(m, \phi, dx, dy, dz, \beta, r)]^2}{2\lambda^2}}$$

$$L(m_1, \phi_1, dx_1, dy_1, \dots, m_T, \phi_T, dx_T, dy_T, r)$$

$$= \sum_{s_1=1}^M \dots \sum_{s_T=1}^M p(s_1) L(m_1, \phi_1, dx_1, dy_1, r) \prod_{t=2}^T \underbrace{T_{s_{t-1} s_t}}_{\text{transition probabilities}} L(m_t, \phi_t, dx_t, dy_t, r)$$

T. Ogane, D. Noshiro, T. Ando, A. Yamashita, Y. Sugita, and Y. Matsunaga*,
PLoS Computational Biology **18**, e1010384 (2022)

図2-1-1: 高速原子間力顕微鏡データの隠れマルコフモデル解析の概念図。左図は各フレームを1枚1枚独立に計算する場合の尤度を示す。右図は複数フレームをまとめて時系列データとしてみなした場合の尤度を示す。

我々のデータ同化手法では、まずターゲット分子の分子動力学シミュレーションを行い、その後で実験データを用いてマルコフ状態モデルのパラメーターを学習することで分子のアンサンブル/ダイナミクスを補正するという手続きをとる。これまでに、HS-AFMデータを用いてマルコフ状態モデルを高精度に補正するため、**図2-1-1**に示すように隠れマルコフモデルを用いたパラメーター推定手法を開発してきた。隠れマルコフモデリングでは、HS-AFM計測で得られる一連の画像を独立に解析するのではなく、時系列データと見なすことでモデルからその時系列が得られる確率(尤度)が最大化するように遷移確率を補正する。ここで、マルコフ状態モデルの各状態は3次元構造である一方で、HS-AFMデータは2次元画像であるので、両者を比較して分子構造だけでなく分子の向きや並進も推定する必要がある。結果として、隠れマルコフモデルを用いたHS-AFM画像の時系列データ(フレーム1~ T)に対する尤度は以下のように定義される:

$$L(m_1, \phi_1, dx_1, dy_1, \dots, m_T, \phi_T, dx_T, dy_T)$$

$$= \sum_{s_1=1}^M \dots \sum_{s_T=1}^M p(s_1) L(I_t | m_1, \phi_1, dx_1, dy_1) \prod_{t=2}^T T_{s_{t-1} s_t} L(I_t | m_t, \phi_t, dx_t, dy_t)$$

ここで、 I_t は t フレーム目のAFM像、 m_t, ϕ_t, dx_t, dy_t はそれぞれ t フレーム目のマルコフ状態モデルの状態の構造、向き、 x 座標と y 座標の並進である。更に、 $T_{s_{t-1} s_t}$ は構造と向きとで定義された状態 s_{t-1} から s_t への遷移確率である。 $L(I_t | m_t, \phi_t, dx_t, dy_t)$ は、 t フレーム目のAFM像 I_t に対する尤度である。HS-AFM画

像には分子の向きと並進の情報があるので、マルコフ状態モデルの状態が構造だけでなく向き並進との直積で拡張されている。ただしHS-AFM計測では、一般に計測対象の分子は基盤と相互作用しているので、回転の緩和は遅く、隣接したフレーム間では似た回転方向をとっていることが多い。そこで昨年度までの開発によって、あらかじめ回転角度が離れた状態間の遷移確率をゼロとして、大きな回転が生じないように拘束を遷移確率へ課したViterbiアルゴリズムによる構造シーケンスの最尤推定法や、Baum-Welchアルゴリズムによる遷移確率推定法を提案してきた。しかし、HS-AFMデータを時系列データとみなす隠れマルコフモデルによる推定が、従来のHS-AFMデータの画像1枚1枚を独立に解析した推定と比べて、どれほど精度を改善することができるのかは明確ではなかった。

そこで今年度は、HS-AFMデータを時系列データとみなすことでどのように推定精度が改善されるのかを調べるため、1フレーム、10フレーム、100フレームからなる疑似AFMデータを作成し、1枚1枚独立に解析する場合と、隠れマルコフモデルで解析する場合とで、分子の向きに関する尤度分布がどのように変化するかを調べた。図2-1-2は各フレームを1枚1枚独立に解析した場合の尤度分布を示す。図2-1-3は隠れマルコフモデルの尤度分布を示す。隠れマルコフモデルの計算では、計算量を削減するために、各向きについて最も尤度の高い構造の値のみをプロットしている。これは向きを固定したViterbiアルゴリズムによって計算した。両プロットともに、疑似AFMデータを作成した際の探針半径と同じ2.5 nmを用いた場合と、敢えて異なる半径1.8 nmを用いた場合を示す。正解の半径となる2.5 nmを用いた場合は、どちらの手法でもフレーム数によらずに正しい向き(quaternion distanceでゼロに相当)を最尤な向きとして推定できていることがわかる。一方、異なる半径1.8 nmを用いて推定した場合、1枚1枚独立に解析した結果を見ると、quaternion distanceで1に近い外れた方向が最尤となっている。これは疑似AFMデータで用いている味覚レセプタがヘテロダイマーでquasi-symmetricな構造をもっており、それぞれのダイマーを区別できずに180度ひっくり返った向きを誤って推定していることが原因である。

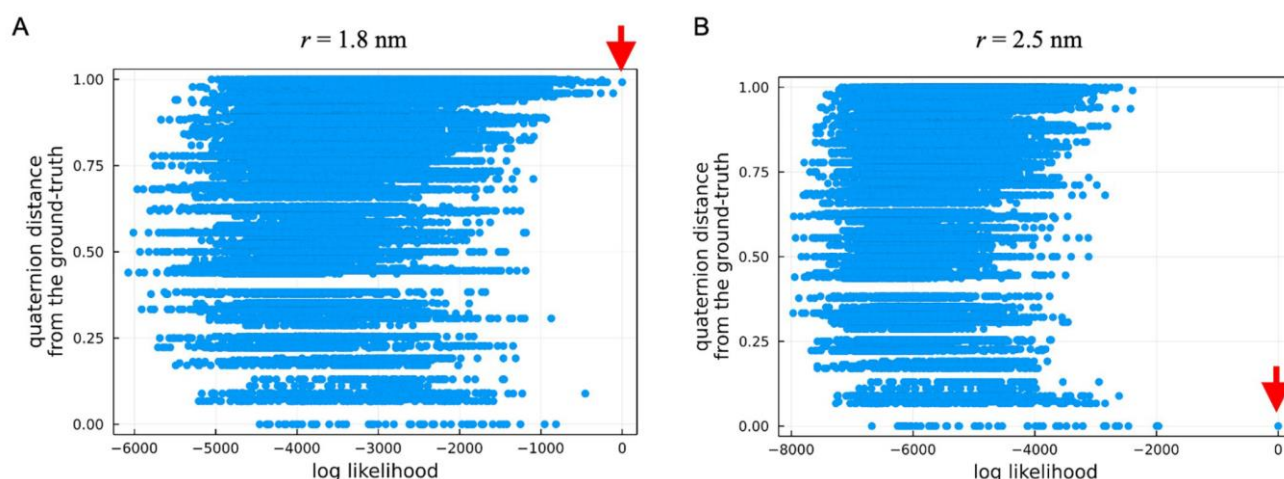


図2-1-2: 疑似AFMデータを各フレーム毎に1枚1枚独立に解析した分子向きに関する尤度分布。疑似AFMデータの作成に用いた探針半径2.5 nmと同じ半径を用いた結果(右)と異なる半径1.8 nmを用いた結果(左)。参考のために最尤値の点を赤矢印で示す。Ogone et al. *PLoS Comput. Biol.* (2022)よりCCライセンスで転載。

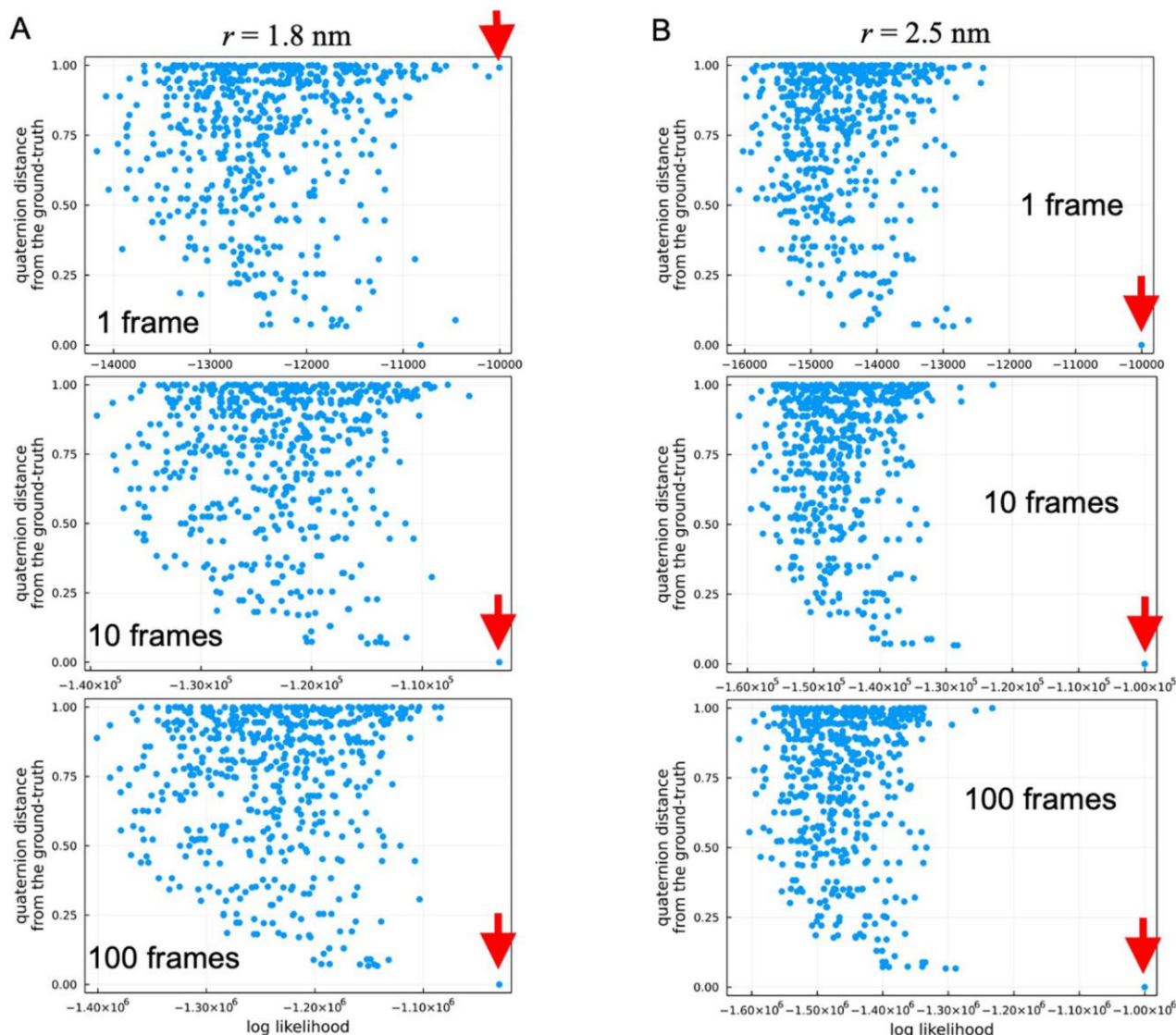


図2-1-3: 1フレーム、10フレーム、100フレームからなる疑似AFMデータを隠れマルコフモデルで解析した分子向きに関する尤度分布。疑似AFMデータの作成に用いた探針半径2.5 nmと同じ半径を用いた結果(右)と異なる半径1.8 nmを用いた結果(左)。参考のために最尤値の点を赤矢印で示す。Ogane et al. *PLoS Comput. Biol.* (2022)よりCCライセンスで転載。

一方で隠れマルコフモデルの結果では、1フレームの場合では1枚1枚独立な解析の結果と同じだが、フレーム数が増えるとともに、正解の向き(quaternion distanceでゼロに相当)が最尤として選ばれるようになり、2番目の最尤値との差が広がっていることがわかる。このようにフレーム数を増やすことで正しい向きを安定して推定できる理由としては、アンサンブル学習と同じ機構が働いていると考えられる。アンサンブル学習では、独立な複数の推定値の多数決をとることで精度の高い推定を行うことができる。ここでは回転の向きの大きな変化の制限を加えることでフレーム毎の向きの対数尤度の和がフレーム全体の尤度として選ばれる仕組みになっており、結果としてアンサンブル学習と同じ理由で精度が改善されていると解釈できる。更に、向きだけではなく遷移確率の推定に関して追加検証を行い、隠れマルコフモデリングでは探針半径が数nmずれていても十分な精度でパラメーター推定できることを示し、論

文として発表した(Ogane et al. *PLoS Comput. Biol.* 2022)。

データ同化の応用では、昨年度までに得られた味覚受容体の結果を更に検証した。味覚受容体はClass-C G蛋白質共役型受容体(GPCR)ファミリーに属する蛋白質であり、脊椎動物において様々な味覚の感知を担っている。味覚受容体は、ヘテロ二量体から成り、細胞外に各500アミノ酸残基ほどのLigand-binding domains (LBDs)を持つ。最近、Nuemketらによってメダカ由来の味覚受容体のLBDsの結晶構造が得られている(Nuemket et al. *Nat. Commun.* 2017)。LBDsは味覚物質を結合し、結合に伴って細胞膜側のドメインであるCysteine-richドメインが構造変化を起こし、下流へとシグナルが伝達されると考えられている。しかしながら、どのように構造変化を引き起こして活性化状態へと至るのか？途中の中間状態はあるか？なぜヘテロなのか、非対称性がどのようにリガンド認識に使われるのか？などの具体的な問題が分かっていない。そこで、昨年度までに高速AFMデータと粗視化モデル(Karanicolas-Brooks Goモデルを基にしたQuad-basinモデル)のMDシミュレーションの同化を行い、構造アンサンブル/ダイナミクスや中間状態構造を詳しく解析してきた。

昨年度までに、高速AFMデータが同化することで得られたマルコフ状態モデルを解析した結果、リガンドあり条件ではリガンド結合状態の結晶構造であるCCA状態が安定化しており、活性化状態として選ばれていることがわかった。更に、リガンドあり条件では、他の非活性化状態と予想される状態(CCR状態、OOR状態)はシミュレーションデータのみから作成したマルコフ状態モデルに比べて不安定化していた。一方で、リガンドなし条件では、不活性化状態の一つであるOOR状態や中間状態である非対称構造が安定化するが、もう一つの不活性化状態の候補であるCCR状態は安定化しないことがわかった。以上のことより、味覚受容体の活性化へ至る構造変化パスウェイとして、不活性化状態であるOOR状態においてリガンドが結合し、途中の非対称な中間状態を経由して、活性化状態であるCCA状態へ至るといった描像を得ることが得られた。しかし不活性化状態であるOOR状態はホモロジーモデリングとターゲットMDを用いて作成した構造を基に作成したものであり、全原子の相互作用レベルで安定化されたものではない。特にダイマー間のインタフェース構造もふくめてOOR状態がリガンドなし条件で本当に安定化するのかを検証するために、活性化状態のCCA状態を初期構造として長時間の全原子MDシミュレーションを行うことで、OOR構造に近い構造がサンプルできるかを検証した。

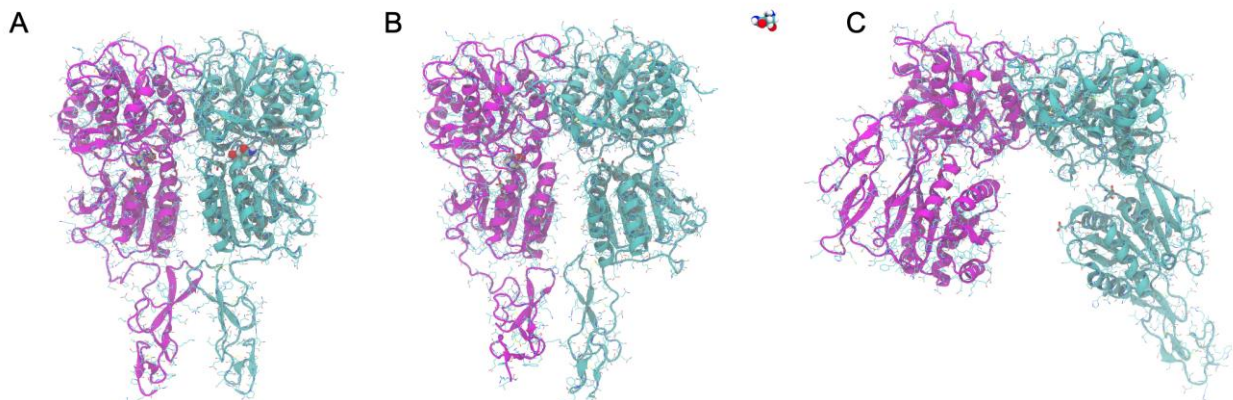


図 2-1-4: 味覚受容体の Ligand-binding domains (LBDs)と Cysteine-rich ドメインの構造。A. LBDs の結晶構造。リガンド(L-GLN)が双方の LBDs に結合している。B. リガンドあり条件の MD シミュレーションのスナップショット。C. リガンドなし条件の MD シミュレーションのスナップショット。

全原子 MD シミュレーションのセットアップには、リガンド(L-GLN)が結合した CCCA 状態の結晶構造(PDB ID: 5X2M)へ Cysteine-rich ドメインを付けた構造を初期構造として、CHARMM-GUI を用いて水和、イオン付加を行って作成した。Water box 作成には 17 Å の edge distance をとり、最終的に作成されたボックスサイズは 148 Å³、原子数はおおよそ 30 万となった。水分子として TIP3P、力場には CHARMM36m を用いて GENESIS を用いて「富岳」でシミュレーションを行った。リガンドが有る条件と、リガンドがない条件の 2 通りで、独立なシミュレーションを 100 本ずつ行った。最初の数 ns のシミュレーション結果を解析したところ、2 つのモノマーへ付加した Cysteine-rich ドメイン同士が sticky であり、互いに絡まるように相互しやすいことがわかった。Cysteine-rich ドメインの細胞側には本来は膜貫通ドメインがつながっており、この互いに絡まる相互作用は artifact である。そこで、Cysteine-rich ドメイン同士が絡まっていないデータを増やす bias を課すことにした。具体的には、100 本の短い MD を行ったあとで、Cysteine-rich ドメイン間の距離が大きなものから 20 本を残して、次の 100 本の MD の初期条件とするようにした。これは resampling 法の一つであり、同じ構造が選ばれた場合は温度制御に使う乱数のシードを変更した。

図 2-1-4 は全原子 MD シミュレーションから得られた LBDs 構造のスナップショットと結晶構造(CCA 状態)を示す。リガンドを結合させたシミュレーションでは、基本的にはリガンドは結合したままであったが、T1r3 の LBD がオープン構造をとってリガンドが外れやすいことがわかった。これは昨年度までの粗視化モデルのシミュレーションでも観察された非対称性であり、T1r3 の LBD がオープン構造をとって、T1r2a の LBD がクローズド構造をとる中間状態が観察されていた。今回の全原子レベルのシミュレーションでもこの中間状態が存在することが支持された。また、リガンドなし条件のシミュレーション結果を解析すると、粗視化モデルの結果と同様に、T1r2a と T1r3 の LBDs 同士が互いに離れる R 型の構造が一定割合で観察された。このとき、どちらの LBDs もオープン構造をとっており、粗視化モデルと高速 AFM のデータ同化で観察された OOR 状態に近いことが示唆された。ただし未だ定性的な解析にとどまっており今後定量的な構造比較を行ってこれらの構造がどれほど OOR 状態に近いかを解析する予定である。

② 粗視化モデル CafeMol のパラメーター最適化 (京大・高田)

粗視化分子モデル CafeMol は、蛋白質・核酸・脂質膜の計算を行うために必要なアミノ酸・塩基・リン脂質それらの相互作用などについてのパラメーターが求められている。昨年度のテスト計算の結果を踏まえて、分子・細胞レベルのシミュレーションに必要な非特異的蛋白質・蛋白質相互作用、および DNA・蛋白質相互作用の粗視化パラメーターのさらなる改良を行い、より精度の高い分子動力学シミュレーションの実現に向けて研究を推進した。特に DNA・蛋白質間相互作用における電荷の取り扱いを改訂して精度の向上に成功した。

本課題の (3) ②の標的となるクロマチン系はヌクレオソームを 1000 個程度含む巨大分子系である。これは、従来、粗視化分子モデル CafeMol で主に行われてきた 1 個から 3 個程度のヌクレオソームを含む系と全く異なる規模である。従来規模では問題にならなかった蛋白質・DNA 間の相互作用、特に長距離で支配的な静電相互作用、の小さな誤差が巨大系では致命的な問題を生じる。昨年度、カギを握ると考えられるヌクレオソーム-ヌクレオソーム間のスタッキング強度を実験値と比較し、それをもとに粗

視化分子モデルの DNA のリン酸基の電荷パラメーターの精細チューニングを行った。今年度、このパラメーターで、ヌクレオソーム 3~12 個を含むモデルクロマチンを用いて、その沈降係数およびその塩濃度依存性、さらに利用できる場合にはクライオ電子顕微鏡の構造モデルと比較し検証を行ったところ、塩濃度依存性など一部に無視できない差異を見出した。そこでこれらすべての実験データとの比較を踏まえてパラメーターの再最適化を実施した。最適化するパラメーター数を昨年度より広げ、より広範囲な実験値との整合性を指標として再最適化を行うことによってより高精度なパラメーターを得ることに成功した。具体的に、従来の DNA モデル 3SPN.2c においてリン酸基の電荷を対イオン凝集の効果を加味して-0.6e としてきたものを、素の電荷である-1.0e に戻すことで、全体の整合性が高まった (図 2-2-1)。また、この変更は広く用いられてきた従来の DNA モデルを改変するものであるため、それが 2 本鎖 DNA の物性に与える負の影響も慎重に検討する必要があったが、少なくとも生理活性な温度における物性には負の影響がみられなかった。新しいパラメーター設定は、ヌクレオソーム 3~12 個のクロマチン構造およびその塩濃度依存性について概ね実験と整合的な傾向を示すものとなった。

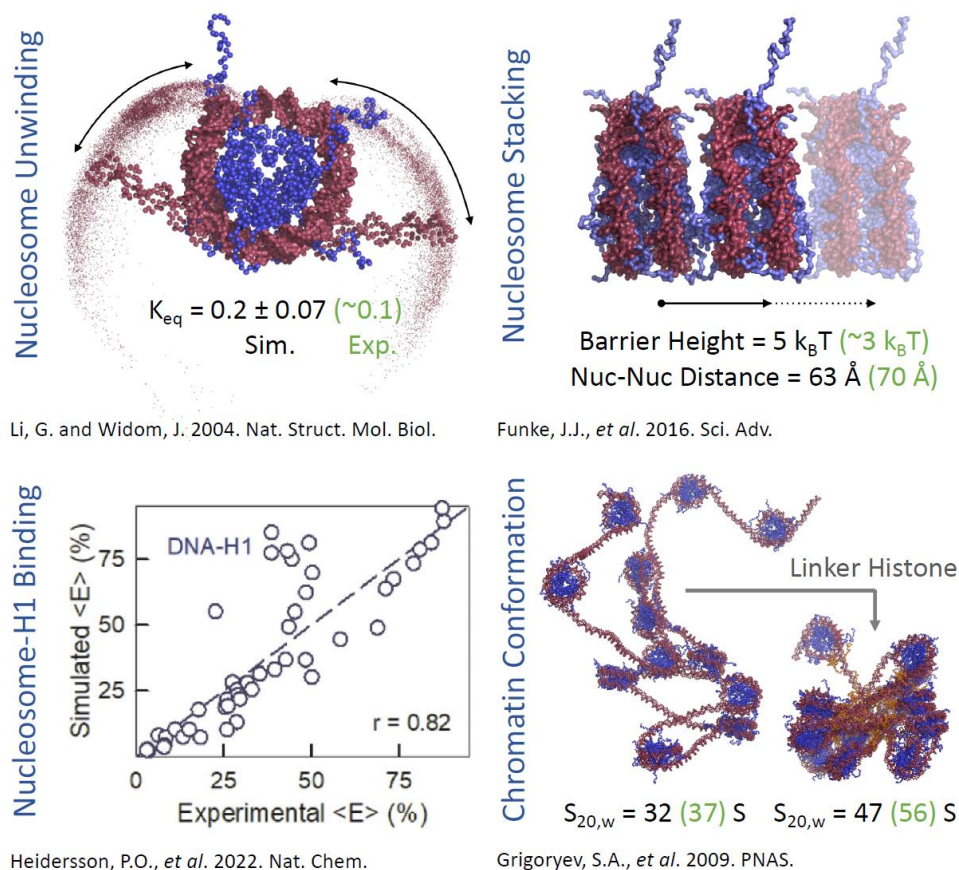


図 2-2-1: 実験値との比較による蛋白質・DNA 相互作用パラメーターの再チューニング。(左上) モノヌクレオソームの DNA アンラッピング平衡定数の比較。(右上) ヌクレオソーム同士の結合自由エネルギーの比較。

また、理研・杉田、岡山大・篠田渉および埼玉大・松永と連携して、全原子シミュレーションの結果を参照とした機械学習による生体膜のリン脂質の分子内・分子間相互作用の検証と最適化を試みた。最適化は着実に進み、30個以上のリン脂質分子についてのパラメーターを最適化することに成功していた。

(3) 生体分子系のモデリングと「富岳」を用いたシミュレーション

① 細胞内分子混雑と液液相分離 (理研・杉田)

昨年度に引き続き、細胞内分子混雑環境における ATP の役割について大規模な全原子分子動力学シミュレーションを用いて解析した。この系には水分子を含めて約 100 万原子が含まれており、32 個の蛋白質が含まれている。昨年度までの研究で、ATP を加えた場合とそうでない場合で蛋白質同士の凝集に関して大きな違いがあることが見出された。ATP を加えていない場合にはより強く凝集するのに対して、ATP を加えることでその凝集度合いはかなり低下する。興味深いことは、ATP を加えずに大量のイオンを加えた場合でも凝集はあまり抑えられないことである。ATP は負電荷をもち、蛋白質と ATP の静電相互作用が凝集抑制に重要な役割を果たしていると考えられるが、それだけでは不十分であり、疎水的な相互作用も重要であることが示唆された。今年度は、「富岳」を用いて新たな分子動力学シミュレーションを行い、2 μ s まで計算時間を伸ばすとともに独立な計算も追加することによって、統計的に信頼性の高い結果が得られた。ATP の凝集抑制効果は実験的にもよく調べられており、今回の計算はその結果とよく一致するものであるだけでなく、凝集抑制効果の分子メカニズムを解明することに貢献できた。

さらに我々は、蛋白質の液液相分離とその抑制に関する分子機構をマルチスケール分子動力学シミュレーションによって解析した。Hero 蛋白質は正または負に帯電した一群の天然変性蛋白質である。細胞内実験によって、Hero 蛋白質は固有の蛋白質の相分離 (あるいは凝縮体形成) を阻害することが知られている (Tsuboyama et al. *PLoS Biol.* 2020)。たとえば、Hero-11 は TDP-43 の凝縮体を阻害するために重要な役割を果たしている (図 3-1-1A)。Hero-11 の立体構造については、天然変性蛋白質の立体構造予測サーバーを用いた場合、 α ヘリックスなどの二次構造をもたないと予測される。しかし、AlphaFold2 を用いて立体構造を予測すると α ヘリックスを形成する部分があることがわかった。そこで本研究では、Hero-11 の局所構造については全原子モデルを用いて、TDP-43 単独あるいは TDP-43・Hero-11 複合体による凝縮体形成については粗視化分子モデルを用いて分子動力学シミュレーションを行った。いずれの計算においても、GENESIS ソフトウェアを用いた。

Hero-11 の二次構造を調べるために、全原子分子動力学シミュレーションを効率の良い計算手法の一つである gREST 法と組み合わせて計算した。この計算の結果は分子力場ポテンシャルに強く依存するため、複数の力場を用いて結果を比較した。その結果、Hero-11 は多くの変性領域をもつ天然変性蛋白質であるが、力場や計算条件によっては一部、 α ヘリックスを形成することがわかってきた。そのため、粗視化モデルを用いた凝縮体の分子動力学シミュレーションでは、 α ヘリックスあり・なしの 2 つの構造モデルを用いて解析することにした。なお、TDP-43 については先行する研究において、一部、 α ヘリックスを持つ部位が明らかになっている。

TDP-43 の相挙動を調べるために、大規模な粗視化分子動力学シミュレーションを実施した。その結果、Hero-11 が TDP-43 凝縮体の挙動を制御する上で重要な役割を果たし、コンフォメーション、分子間相互作用、ダイナミクスに顕著な変化を引き起こすことが明らかになった (図 3-1-1A)。また、原子論的および粗視化 MD シミュレーションにより、無秩序領域の割合が高い Hero-11 分子は凝縮体の表面で集合する傾向があることを明らかにしました (図 3-1-1B)。シミュレーション結果に基づき、我々は Hero-11 の制御機能のメカニズムとして、以下の 3 つの可能性を提唱した：(i) 反発性の Hero-11-Hero-11 相互作用

により、濃厚相における TDP-43 分子間の接触が減少し、より速い拡散と脱凝縮をもたらす。(ii) 引力性の Hero-11-TDP-43 相互作用により希薄相における TDP-43 の飽和濃度が高まり、TDP-43 がより拡張し変型したコンフォメーションとなる。(iii) 小さな TDP-43 凝縮体の表面に Hero-11 が存在して、反発相互作用によりそれらの融合を防止しうる (図 3-1-1C)。これらの知見は、Hero-11 と TDP-43 の複雑な相互作用の理解における重要なブレイクスルーとなるものである (Tan et al. *JACS au.* 2023)。

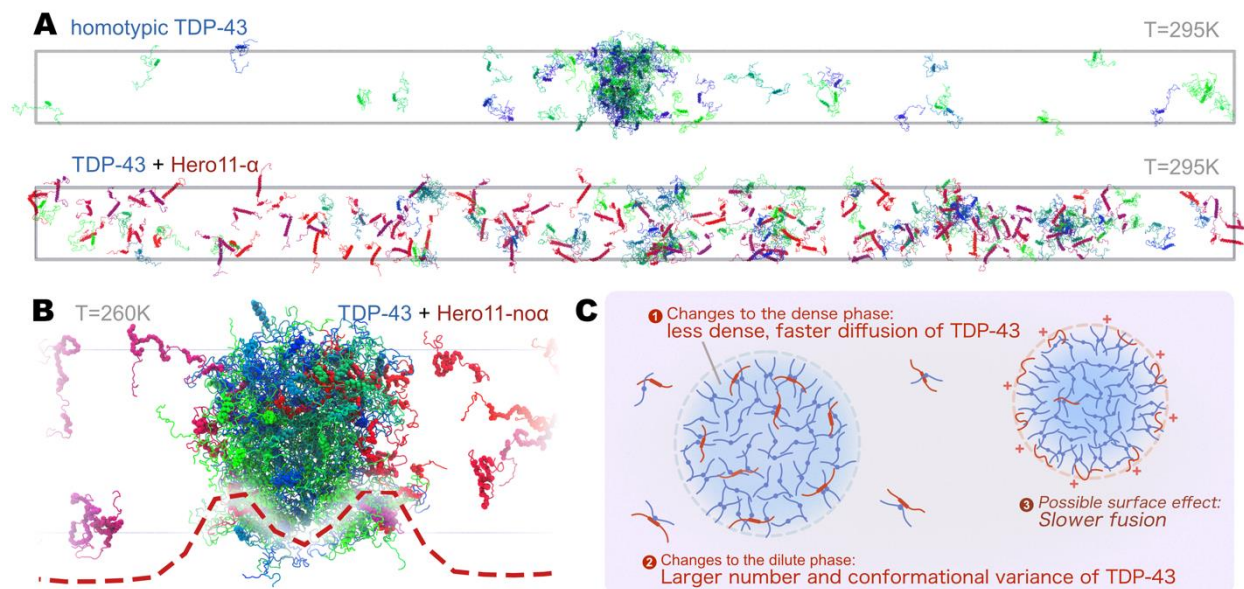


図 3-1-1: Hero11 と TDP-43 の多段階分子動力学シミュレーション。(A)295K における同型 TDP-43 凝縮体と溶解した TDP-43 + Hero11 α のシミュレーション構造の比較。(B)Hero11 に内在的に無秩序領域が多い場合(Hero11-no α)、TDP-43 凝縮体の表面により多く集積する。(C)Hero11 が TDP-43 の凝縮を防ぐ 3 つの分子機構。

連携研究者である東工大・北尾は今年度も細菌べん毛の研究をおこなった。細菌べん毛の回転モーターは細胞内外のプロトンまたはナトリウムイオン勾配を用いて駆動され、巨大な回転子の周りに 7~8 個程度の固定子が配置された複雑な超分子構造体である。細菌べん毛の回転はシグナル蛋白質によって反転可能であるがその分子機構はまだ明らかになっていない。固定子 MotAB には MotA の 5 分子が MotB の 2 分子を取り巻くようにして固定子の 1 ユニットが形成されることが明らかになっている。今年度は、昨年度実施した *Aquifex aeolicus* (*A. aeolicus*) の MotA5 量体の立体構造とモデリングに MotB を挿入したときの立体構造変化の研究成果を含めた論文発表を行うことができた (Nishikino et al., *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 631, 78-85, 2022)。

また今年度は、*A. aeolicus* に加えて、既に MotA 5 分子と Mot B 2 分子からなる複合体立体構造が決定されている 3 種類の細菌の MotAB 固定子についても研究を行った。具体的には、*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, PDB ID: 6YSL)、*Campilobacter Jejuni* (*C. Jejuni*, PDB ID: 6YKM) と *Clostridium sporogenes* (*C. sporogenes*, PDB ID: 6YSF) の MotAB 複合体を対象とした。これらの固定子がプロトン透過をエネルギー源とするのか、ナトリウムイオンを用いているのかはまだ実験的に十分確かめられていない。これら系の MD シミュレーションを実行すべく、細胞膜中で溶媒分子も含めた全原子モデルを構築したところ、全原子数はそれぞれ 191,195 原子、198,776 原子と 191,999 原子であった。それぞれのシステムについて

独立な 1 μ s の MD シミュレーションを 10 回ずつ行った。代表的な立体構造を図 3-1-2 上に示す。得られたトラジェクトリを詳しく調べたところ、サブユニット間の相互作用の強さには有意な違いが見られた (図 3-1-2 下)。また水やイオンが通過可能なチャンネルは定常的には存在しなかった。しかし、実際にはイオンやプロトンが透過することから、瞬間的なゆらぎのうちに透過が起こっていると考えられる。

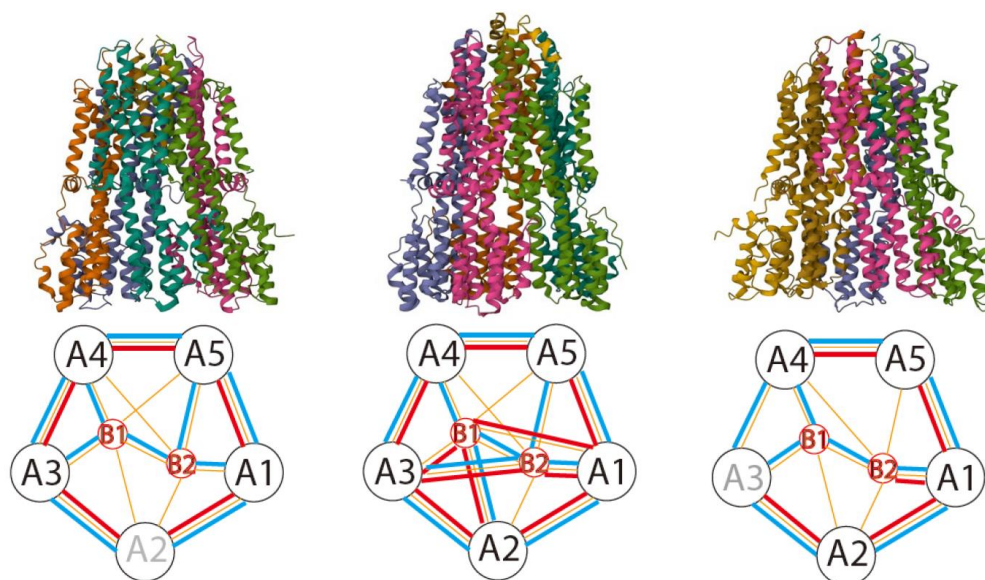


図 3-1-2: MD 計算で得られた固定子複合体 (上) と複合体中のサブユニット間相互作用 (下)。上: *B. subtilis* (左)、*C. Jejuni* (中) と *C. sporogenes* (右) の立体構造。下: 上に対応するサブユニット間の相互作用。線は水素結合 (青)、塩橋 (赤) とコンタクト (オレンジ) を表し、相互作用数が多いほど線が太い。

3 種類の固定子のうち、*B. subtilis* に関しては比較内部にできるポアが大きかった。そこで次に、この固定子に最初に注目し、内部にナトリウムイオンが透過すると仮定した場合に必要な自由エネルギーコストを全原子分子シミュレーションで計算することにした。イオンが透過する際には、イオン勾配に応じてペリプラズム側 (図 3-1-2 の上方向) から細胞質側 (図 3-1-2 の下方向) に透過することが期待される。しかし、細胞質側でプロトンやナトリウムイオンが結合すると考えられているアスパラギン酸残基は同定されているものの、ペリプラズム側から最初にイオンが侵入する位置については情報が十分得られていない。そこで前述の MD の瞬間構造を初期構造とした Steered MD (SMD) シミュレーションを用いて、細胞質側のアスパラギン酸に配位しているナトリウムイオンをペリプラズム側に移動させる試行を 10 回おこない、移動距離 d とイオンを移動させるために必要な力 F の関係を得た (図 3-1-3 上)。さらに Jarzynski 等式、

$$\Delta G = -k_B T \log \left(e^{\frac{-W}{k_B T}} \right) = -k_B T \log \left(e^{\frac{-dF \cdot d}{k_B T}} \right)$$

を用いて自由エネルギー変化 ΔG の計算を行った。その結果、図 3-1-3 下で示す自由エネルギー変化が得られた。10 回の試行を平均すると、ナトリウムイオン透過に関して、 $\Delta G = 8.3 \pm 0.4 \text{ kcal/mol}$ であった。これはイオン透過速度から想定される自由エネルギーよりもかなり大きい。このことから、*B. subtilis* の

固定子はプロトン勾配をエネルギー源としている可能性が高いと考えられる。これはナトリウムイオン型・プロトン型の MotAB との配列比較からの予測と一致している。

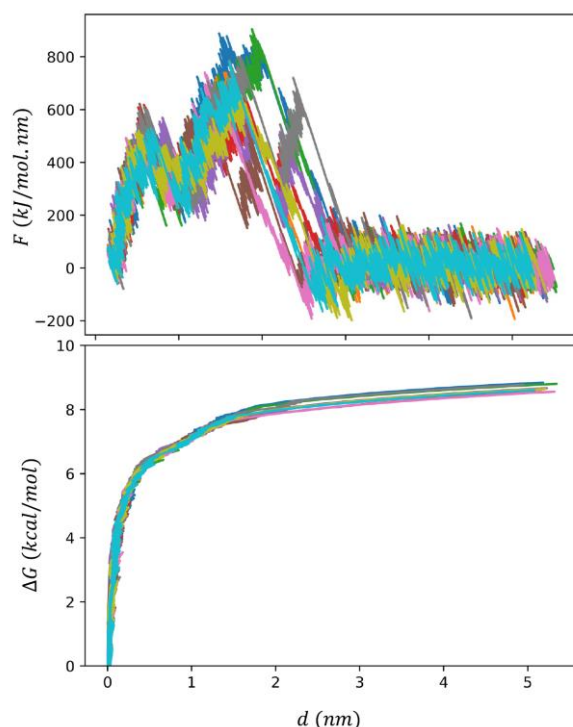


図 3-1-3: 10回のナトリウムイオンの移動シミュレーション (SMD) から得られた、移動に要する力 F と自由エネルギー変化 ΔG 。上: SMD によって移動したナトリウムイオンの位置と引っ張りの力 F 。下: Jarzynski 等式で計算したナトリウムイオン移動距離に対する自由エネルギー変化 ΔG 。

② 遺伝子転写機構の解明 (京大・高田)

昨年度までに構築した染色体の高スループット実験から得られる Hi-C/Micro-C/MNase-seq 等の実験情報、およびリンカーヒストンおよび転写因子の結合情報を用いた三次元クロマチン構造粗視化分子モデルについてその解析を進めるとともに、粗視化分子モデル CafeMol を用いて、「富岳」上でソフトウェア GENESIS による大規模動態シミュレーションを実施し、結果を解析し、遺伝子座における転写活性、染色体高次構造、および液液相分離に関する知見を得た。特にリンカーヒストンの動態とコアクティベータ BRD4 のネットワークの大きな役割を見出した。

多細胞生物は多様な細胞種をもち、多様性は細胞種ごとに異なる遺伝子発現に起因する。これが高次生命現象の基礎となっている。細胞種依存的な転写制御において、エピゲノム制御およびそれと密接に関連したクロマチンの 3 次元折りたたみ構造の変化が主要な役割を果たす。異常クロマチン 3 次元構造は発現異常を引き起こし致死あるいは疾患の原因となる。ここでは哺乳類の胚性幹(ES)細胞に着目し、幹細胞とその分化で主要な機能を果たす遺伝子群の転写制御とクロマチン構造の関係を、細胞スケールの MD シミュレーションによって明らかにする。哺乳類 ES 細胞のコア遺伝子ネットワークは 3 つの遺伝子、*Oct4*, *Sox2*, *Nanog* で構成される。*Oct4*, *Sox2* は、いわゆる山中因子に含まれる。3 つの遺伝子はお

互いに協同的に転写を活性化しあう関係にあり、それが ES 細胞の多能性と自己複製能の維持に必須である。

そのなかで、複雑で興味深い転写制御が実現されていると考えられているマウス *Nanog* 遺伝子座を本研究の標的とした (図 3-2-1)。*Nanog* 遺伝子座の制御領域には遺伝子本体のすぐ上流にあるプロモータと、そこから 45kb 上流、5kb 上流および 60kb 下流に合計 3つのスーパーエンハンサ(SE)が存在する。プロモータおよび 3つの SE には、Oct4, Sox2, および *Nanog* 蛋白質の結合モチーフが多数存在し、これら蛋白質の結合が *Nanog* 遺伝子の転写を活性化する。プロモータと 3つの SE が物理的に近距離に存在する可能性をもつことは、近年の Hi-C 法、micro-C 法などの実験から明らかになっている。また、近距離になった状態で、コアクティベータと呼ばれるメディエータや BRD4 などが、プロモータと SE との相互作用を介助することが想定されている。転写マシナリである RNA 合成酵素および基本転写因子は、エンハンサあるいはプロモータ近傍に存在すると考えられる。しかし、これら、転写制御因子、コアクティベータ、転写マシナリなどの分子群が実際にどのような 3次元構造で、どのような相互作用によって、転写制御を実現するのか、ほとんど分かっていないのが現状である。本研究では、メソスコピックモデル、粗視化 (残基レベル) モデルの階層をつなぐマルチスケールのモデリング、MD シミュレーションの方法を確立し、その適用によってこの分子機構解明に取り組んだ。

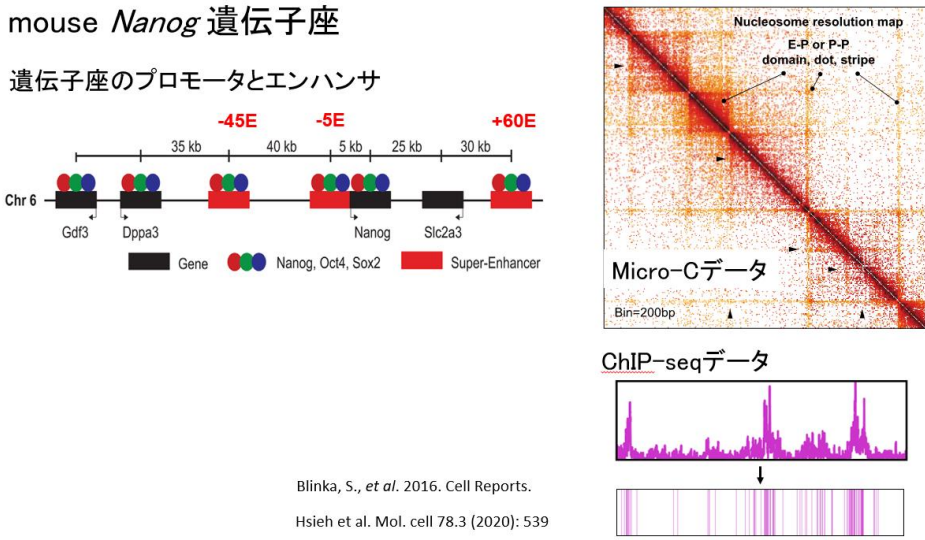


図3-2-1: 対象としたマウス *Nanog* 遺伝子座の特徴と主な実験データ

本研究課題で試行錯誤の末に確立したワークフローの模式図を図 3-2-2 に示す。まず、ゲノム DNA のコンタクト情報を間接的に計測した Micro-C 法のデータから、最先端のベイズ推定法である Metainference 法を用いて分解能 1kb のメソスコピックポリマーモデルの 3次元構造アンサンブルを構築した (図 3-2-2 左上)。次に、配列上に MNase-seq や ChIP-seq データに基づき、ヌクレオソーム及び RNA 合成酵素を配置した (図 3-2-2 左下)。分解能 1kb のメソスコピックポリマーモデル構造とヌクレオソームおよび RNA 合成酵素の配置情報をもとに、新たに開発したバックマッピング法によって残基分解能モデルを構築した (図 3-2-2 中央)。粒子同士の重なりや絡まりを除去したあとで「富岳」上で GENESIS による MD シミュレーションを実施し、分子動態を解析した (図 3-2-2)。

ワークフロー: クロマチンのモデリング & シミュレーション

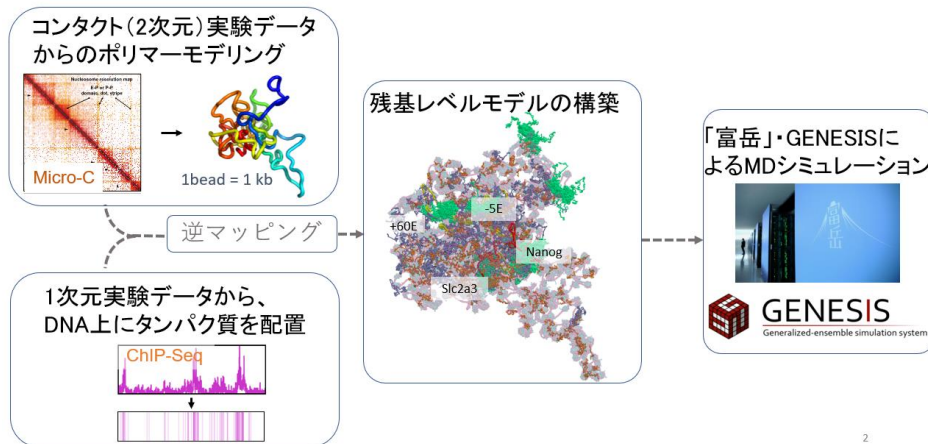


図3-2-2: 本研究課題で確立したマルチスケールモデリングのワークフロー。

本研究課題においてこれまでに、*Nanog* 遺伝子座 200kb 領域について micro-C 法に基づくメタ推定法をクロマチン構造モデリングに適用し、1kb を 1 粒子で表現したメゾスコピックポリマーモデルによりレプリカ数 $n=128$ を用いて多様なクロマチン構造をモデリングすることに成功した。今年度、ハイパーパラメーターのチューニングによりモデリングの精度を高めるとともに、得られた多様な構造アンサンブルのクラスタリングを行い、クラスタ間の遷移速度を定量化することによりマルコフ状態モデルを得た (図 3-2-3)。得られた 5 つのクラスタは、プロモータと 2 つの遠位のエンハンサの解離および接近の組合せからなり、それぞれが異なる遺伝子発現特性を持っていることが予想できるものである。さらにクラスタ間の遷移率は、遺伝子発現ダイナミクスモデル化につながる貴重なデータとなった (図 3-2-3 右下)。

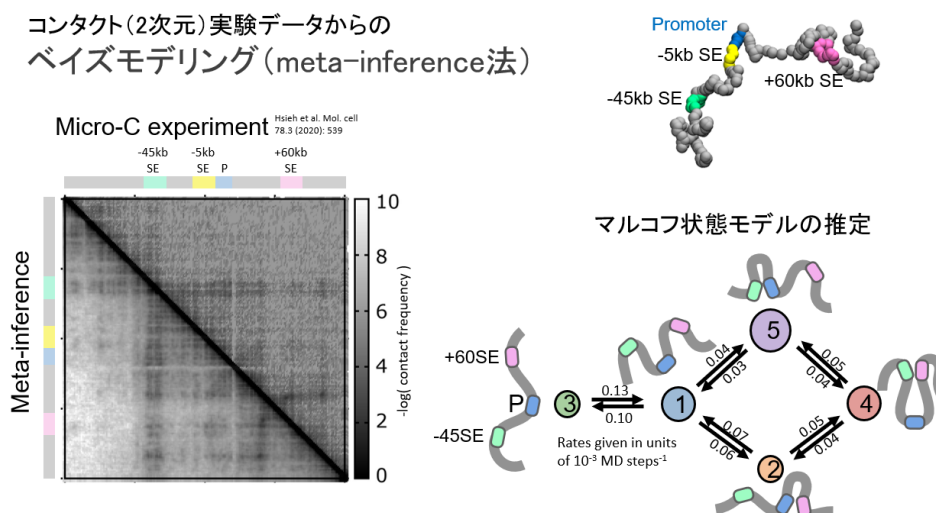
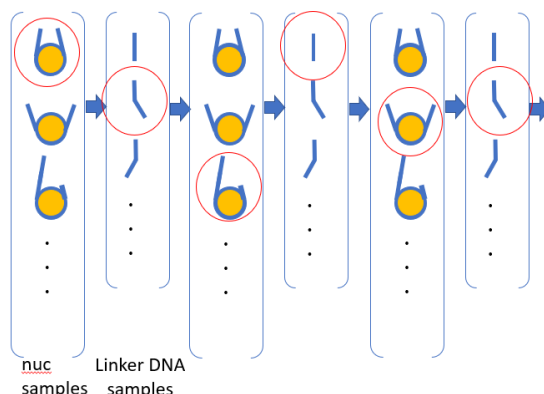


図3-2-3: Meta-inference法によるMicro-Cコンタクトデータからのメゾスコピックポリマーモデル構造の推定とマルコフ状態モデル

次に、メゾスコピックポリマーモデルから残基粒度の粗視化分子モデル CafeMol への変換、いわゆるバックマッピング法についても、昨年度からプロトコルを改良した（図 3-2-4）。バックマッピングではヌクレオソーム 1 個程度の構築ブロックについて構造アンサンブルを用意し、一端から順次、メゾスコピックポリマーモデルと適合する残基モデルの再構築を進めていく。バックマッピングにおける大きな課題は、残基レベルの構造を構築した際に、粒子同士の重なりや高分子のからまりが生じうることである。とくに、プロモータと 2 つの遠位エンハンサが接近した構造においては、中心部に膨大な数の分子が集積し、それら分子を粒子間の重なりを一つも作らない形で構成するのは困難である。今年度、従来のプロトコルをいくつかの点で改良した。巨大な複合体である RNA 合成酵素およびメディエータは、バックマッピングの段階で構築ブロックに含めることとした。また、一端から順次再構築を進める際に、構築ブロック間の粒子の重なりをより高精度にチェックし重なりを取り除くこととした。さらに、各構築ブロックにおいて準備する構造をより多様なものとした。これらの改良により、もっともコンパクトなメゾスコピックポリマーモデル構造においても粒子間の重なりを生じないモデルを構築することが出来た。プロトコルは一般性があり、今後、さまざまなゲノム領域でも同じ方法で残基レベルの構造モデルを構築できると考えられる。

ポリマーモデルから残基レベルモデルへの逆マッピング

残基レベルモデルのDNA上流から下流への鎖成長
 コスト関数(衝突とポリマーモデルからのずれと)を最小化



RNAP+Mediator samples used, in addition

図 3-2-4: メゾスコピックポリマーモデルから、残基粒度の粗視化分子モデルへのバックマッピング法の概念図。

次に、メゾスコピックポリマーモデルで得られた複数のクラスター構造について、バックマッピングにより得られた残基レベルモデルに、ChIP-seq データをもとに、BRD4、リンカーヒストン、コア転写因子等を付加し、Nanog 遺伝子座の全体にわたる近原子（残基）分解能の構造モデルを得ることに成功した。このうち、代表的で全体がもっともコンパクトに集積した構造モデルについて、「富岳」上で GENESIS を用いて大規模な MD シミュレーションを実施した（図 3-2-5）。リンカーヒストンがクロマチン中のヌクレオソーム結合を促進すること、およびコアアクティベータ BRD4 の過渡的なネットワークが遺伝子座の広範囲に届きうる可能性を見出した。後者については引き続き詳細な分析が必要である。

Nanog 遺伝子座 (200 kb)

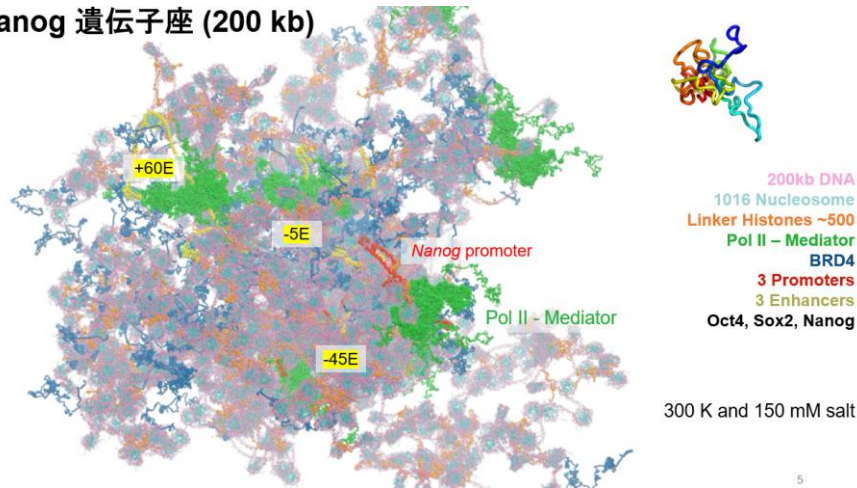


図 3-2-5: マウス Nanog 遺伝子座全体の「富岳」上での GENESIS を用いた大規模 MD シミュレーション。Nanog プロモータ領域と 3 つのエンハンサーが比較的接近している構造モデル。

③ 核内蛋白質・核酸複合体の動的モデリング (量研機構・河野)

我々ヒトを含む真核生物のゲノム DNA は、蛋白質と複合体を形成 (ヌクレオソームと呼ばれる構造体) し、コンパクトに核内に収納されている。遺伝子が発現するには、その収納状態のゲノム DNA の配列情報を読み取り、その情報を RNA にコピー (転写) する必要がある。本研究では、その収納状態であるヌクレオソームに直接結合する GATA3 転写因子の働きを調べた。転写因子は、一般にヌクレオソーム構造をとっていない裸の DNA 配列に結合し、遺伝子の発現を制御する。しかし、GATA3 に代表される一群の転写因子は、ヌクレオソーム構造の DNA に結合し、遺伝子の収納状態を変えるとされている。しかし、GATA3 の結合がヌクレオソーム構造に与えるインパクト、つまり、結合によってヌクレオソームの構造、運動、安定性といった物性がどのように変化するかはわかっていない。そこで、GENESIS を用いて GATA3 とヌクレオソーム複合体の全原子 MD シミュレーションを行った。

昨年度は、研究代表者が理研杉田グループと協力して蛋白質・核酸等の効率的な構造探索方法 (Adaptively Biased Molecular Dynamics 法) を GENESIS 2.0beta に実装し、単粒子クライオ電子顕微像を参照しつつ、GATA3-ヌクレオソーム複合体の原子モデルを作成した。そして、MD シミュレーションを実施して、さまざまな構造をサンプリングした。得られた構造アンサンブルの個々の構造を、X 線溶液散乱データと比較し、溶液での構造を推定した。GATA3 は、2 つの DNA 結合ドメイン (N 末フィンガーと C 末フィンガーと呼ぶ) を持つ。当初、クライオ電子顕微像にもとづき、2 つのフィンガーがそれぞれヌクレオソーム構造の DNA に結合していると考えていた。しかし、X 線溶液散乱データに最もよく合致する構造は、2 つのフィンガーの片方しか結合していない構造モデルであった。

今年度は、昨年度に引き続き、GATA3 の 2 つのフィンガーそれぞれが結合すると、ヌクレオソームにどんな変化が起こるかを詳細に調べた (C 末または N 末フィンガーが離脱した構造: 図 3-3-1)。

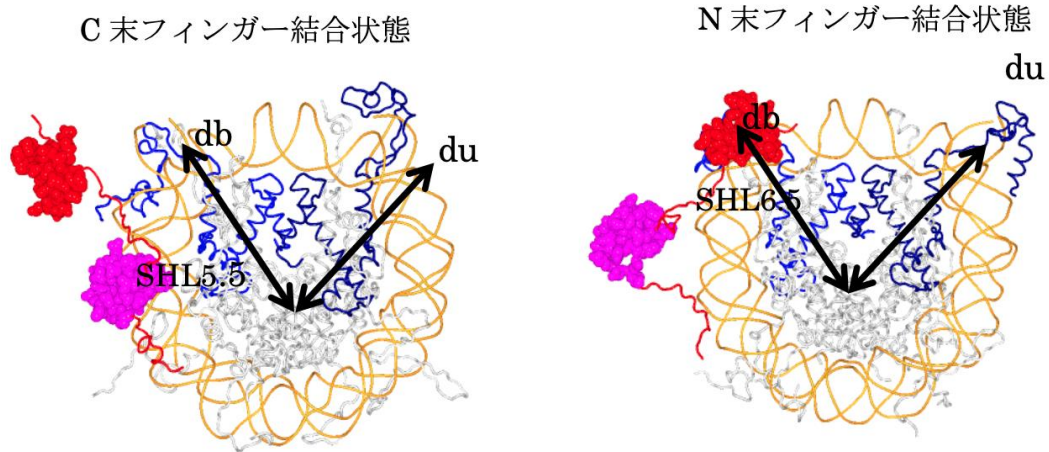


図 3-3-1: 全原子 MD シミュレーションにより得られた構造のうち、X線小角散乱データに合う GATA3 とヌクレオソームの結合状態。C 末フィンガー (マゼンタ) が結合し、N 末フィンガー (赤) が解離した構造 (左)。C 末フィンガーはヌクレオソーム DNA の SHL5.5 (ヒストン H2A の L2 ループの DNA 結合箇所付近) に結合している。ヒストン H3 を青、紺色で示す。N 末フィンガーが結合し C 末フィンガーが解離した構造。d_b はヒストン蛋白質の重心とフィンガー結合部位と同じ側の DNA 末端の重心の間の距離、d_u はヒストン蛋白質の重心とフィンガー結合部位と反対側の DNA 末端の重心の間の距離 (右) N 末フィンガーはヌクレオソーム DNA のスーパーヘリックスローテーション (SHL)6.5 (ヒストン H3 α N および H3N 末テールの DNA 結合箇所付近) に結合している。

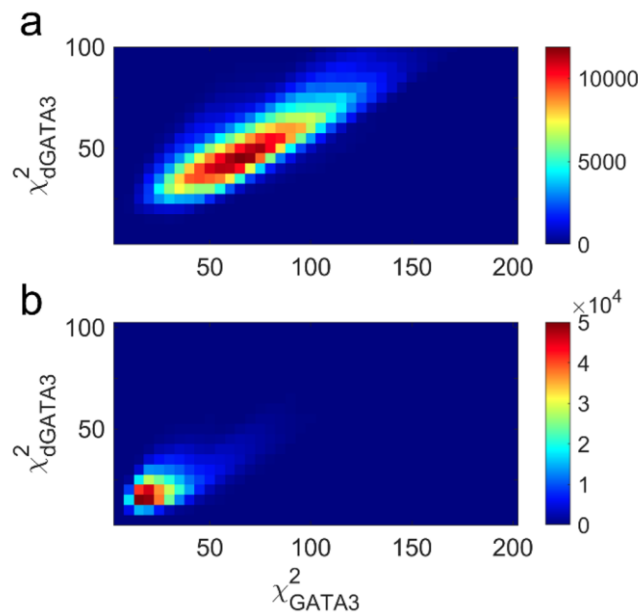


図 3-3-2: 全原子 MD シミュレーションから計算された X 線小角散乱データと実験の X 線小角散乱データの違い。C 末フィンガー結合状態 (a)、N 末フィンガー結合状態 (b)。色は、構造の数を表す。c²_{GATA3} はヌクレオソームと GATA3 の構造から計算された X 線小角散乱データと、ヌクレオソーム-GATA3 結合状態における X 線小角散乱データとの違いを表す。c²_{dGATA3} は GATA3 を除いたヌクレオソームの構造だけから計算された X 線小角散乱データと、ヌクレオソーム単体状態における X 線小角散乱データとの違いを表す。

まず、N 末フィンガーまたは C 末フィンガーが解離した状態にそれぞれについて、MD で構造アンサンブルを得た。次に、得られたそれぞれのアンサンブルの各構造について、どの程度 X 線小角散乱データと合致しているのかを解析した。図 3-3-2 に示すように、N 末フィンガー結合状態では多くの構造が散乱データに合致しているのに対し（図 3-3-2b の横軸）、C 末フィンガー結合状態の構造はごく少数の構造のみが溶液散乱データに合致していた（図 3-3-2a の横軸）。これらから、溶液状態では、N 末フィンガー結合状態では溶液中に安定な結合構造を保っていると推定される。

次に、GATA3 がヌクレオソームに結合したとき、ヌクレオソーム単体の構造はどの程度変わるかを調べた。そのため、GATA3 が結合していない溶液散乱データ、つまりヌクレオソーム単体の実験データと GATA3 が結合した構造のうちヌクレオソーム部分のみから計算した溶液散乱データ（計算データ）を比較した。図 3-3-2 の縦軸が、構造の違いを表している。図からわかるように、N 末フィンガーが結合したヌクレオソームの c^2_{dGATA3} の値は小さく、ヌクレオソーム単体の構造に近い。一方、C 末フィンガーが結合したヌクレオソームは、 c^2_{dGATA3} の値は大きかった。つまり、構造が違うことを意味している。後で述べるように、N 末フィンガーが結合した構造では、結合していない側の DNA のみが解離している。その構造に単体のヌクレオソームの実験データに近いということは、ヌクレオソーム単体でも、溶液中で 2 つの DNA 末端のうち、どちらか一方が解離していることを示唆している。

次に、ヌクレオソームの重心と 2 つの DNA 末端までの距離、 d_b （GATA3 が結合している側）、 d_u （GATA3 が結合していない側）を解析した。N 末フィンガー結合状態（図 3-3-3a）では、GATA3 が結合している DNA 末端とは反対側の DNA 末端（以後 U-DNA 末端と呼ぶ）が大きく揺らいでいるのが観測された。一方、C 末フィンガーのみが結合している状態では、GATA3 が結合している DNA 末端とは同じ側の DNA 末端（以後 B-DNA 末端と呼ぶ）が大きく揺らいでいるのが観測された（図 3-3-3b）。いずれにせよ、X 線小角散乱データを再現する構造は、2 つの末端のうち、片側が解離して揺らいでいる構造であることが分かった。また、ヌクレオソーム単体の MD トラジェクトリーについても、DNA の片側が解離した構造のみがよく揺らいでいることが分かった（図 3-3-3c, d）。以上から、溶液中ではヌクレオソームの DNA は片側が揺らいでいる状態であること、GATA3 の N 末フィンガーが結合すると結合した側の反対側の DNA が揺らぐことが示唆された。

さらに、DNA 解離の程度の分布をみると N 末フィンガー結合状態のヌクレオソーム-GATA3 複合体（図 3-3-3a）では、その複合体から GATA3 を除いたヌクレオソーム単体（図 3-3-3c）と比べて、U サイトの DNA 末端が解離しやすい（ d_u が多くなる方に分布が移動する）ことがわかった。

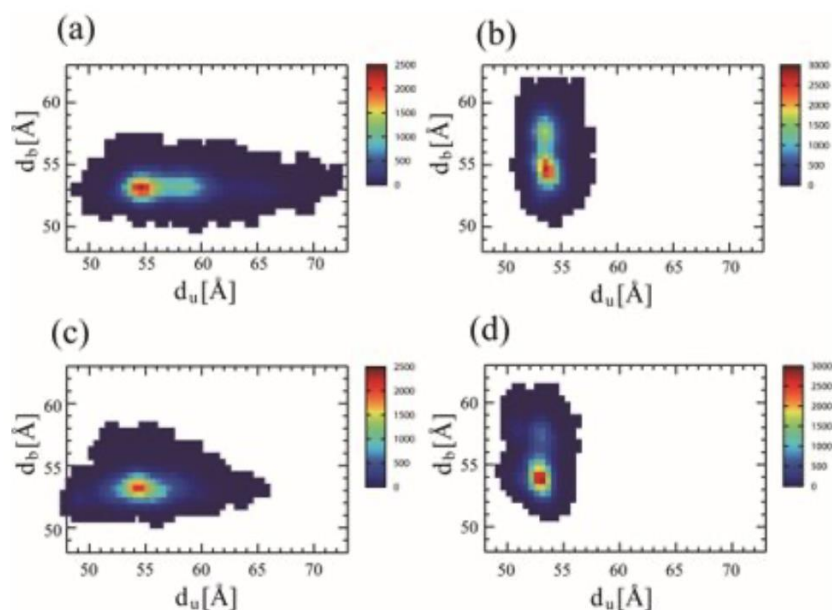


図 3-3-3: 全原子 MD シミュレーションから計算された DNA 解離状態の分布図。(a) N 末フィンガー結合状態でのヌクレオソームと GATA3 の複合体。(b) C 末フィンガー結合状態でのヌクレオソームと GATA3 の複合体。(c) N 末フィンガー結合構造から GATA3 を除いた構造を初期構造としたヌクレオソーム単体での MD。(d) C 末フィンガー結合構造から GATA3 を除いた構造を初期構造としたヌクレオソーム単体での MD。

また、C 末フィンガー結合状態のヌクレオソーム-GATA3 複合体(図 3-3-3b)では、その複合体から GATA3 を除いたヌクレオソーム単体(図 3-3-3d)と比べて B サイトの DNA 末端が解離しやすい(d_b が大きくなる方向に分布が広がる)ことがわかった。単体のヌクレオソームでは、U サイトでも B サイトでも DNA の解離をブロックする GATA3 が結合していないため、U サイト、B サイトのどちら側でも DNA は解離できる状態にある。これに対して、N 末フィンガー結合状態のヌクレオソームでは、N 末フィンガーの結合が U サイトの DNA 末端の解離と揺らぎを大きくし、かつ、N 末フィンガーが B サイトの DNA 末端の解離をブロックしていた。つまり、GATA3 の N 末フィンガーの結合は、結合とは反対側の DNA 末端の解離を促進することが示唆された。一方、C 末フィンガーの結合は、結合側の DNA の解離を若干大きくする傾向にあることが示され、2 つのフィンガーの結合は、異なるインパクトをヌクレオソームに与えることが示された。

以上、「富岳」を用いたシミュレーションと協力研究者からのX線溶液散乱実験データを統合的に解析することにより、GATA3結合がヌクレオソームに与えるインパクトについて調べることができ、今年度の計画を達成することができた。このようなヌクレオソームとの相互作用様式や結合による構造や運動の変化は、実験的に調べるのが非常に困難であり、現状シミュレーション研究によってしか得ることができない知見である。

④ ウイルス (岡山大・篠田渉)

昨年度までに、B 型肝炎ウイルス(HBV)のビリオン粒子のモデリングを行い、SPICA 力場を用いた粗視化分子動力学(CG-MD)シミュレーションにより、その分子構造とダイナミクスを調べた。それにより、

HBV ビリオン粒子の構造とその安定性を分子分解能で理解し、また、HBV ビリオンエンベロープ中の脂質ダイナミクスが、通常の脂質ベシクルよりも膜タンパクの存在によってかなり制限を受けることなどがわかった。HBV ビリオン粒子は、蛋白質の自己集合構造であるカプシドをエンベロープが覆った構造を取っているが、カプシドはエンベロープ中の脂質分子よりも膜蛋白質と強く相互作用していることが、CG-MD より判明した。これにより、ウイルス粒子構造の安定化において、脂質分子は補助的な役割を担うのみであり、ウイルス由来のカプシド蛋白質とエンベロープ膜蛋白質の相互作用が重要な役割をもつことがわかった。今年度は、さらにカプシドとエンベロープの相互作用の重要性を調査するため、エンベロープメント(カプシドがエンベロープを獲得するプロセス)について調べた。また、昨年度までに考慮できていなかったエンベロープ膜蛋白質(一部糖修飾された膜蛋白質 M 蛋白質を含む)を考慮した実際に感染機構に寄与する機能性をもつ完全な HBV ビリオン粒子のモデル作成を行った。

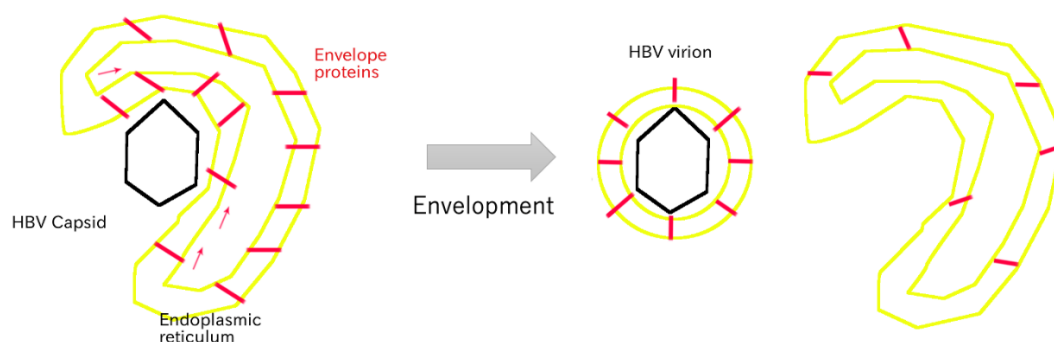


図 3-4-1: HBV エンベロープメント過程の模式図。HBV カプシド分子がエンベロープ膜蛋白質を含む ER 膜と相互作用することで、最終的に脂質分子と蛋白質を獲得し、高密度の膜蛋白質を含んだエンベロープ入りの HBV ビリオン粒子となる。

エンベロープメント過程の CG-MD シミュレーションを行った。図 3-4-1 に示すように、エンベロープメントは、HBV の複製サイクルにおいて、細胞内で形成されたカプシド分子が小胞体(ER)膜と相互作用して、エンベロープ膜を獲得する過程のことである。この過程については、分子レベルの詳細な情報が乏しく、どのような相互作用によって引き起こされる現象なのか不明である。昨年度までの HBV ビリオンモデルのシミュレーションにより、カプシド蛋白質とエンベロープ膜蛋白質の間に強い相互作用があることがわかった。この相互作用は、形成されたビリオン粒子の安定化のみならず、エンベロープメントの起源となるのではないかと考えられる。また、エンベロープ膜は ER 由来の脂質と高濃度のウイルス由来の膜蛋白質からなる。しかし、そのような高濃度な膜蛋白質が最初から ER 膜中に存在する訳ではない。したがって、カプシド蛋白質の接近によって誘起される膜蛋白質の局所的な高濃度化(蛋白質ソーティング)が引き起こされるのではないかとこの予測が成り立つ。また、エンベロープ膜蛋白質の局所的な集積は、膜物性を変化させるものと考えられ、特に膜の自発曲率を変える可能性について検討すべきである。これは小胞体が大きな細胞内器官であり、ER 膜の大部分はほぼ曲率ゼロの平坦な膜構造と近似できるのに対し、エンベロープは直径 20 nm 程度のカプシドを包む大きな曲率を持つ球状膜構

造をもつためである。これらを検証するために、3つの膜系についてCG-MDを用いて検討を行った。1) エンベロープ膜のCG-MD。この計算系を用いてエンベロープ膜蛋白質が複数存在する膜の構造と自発曲率を確認した。2) カプシドのスパイク蛋白質を平面エンベロープ膜に最短距離が10 Å程度になる状態に配置した系のCG-MD。この計算系では、近接したカプシドが平面エンベロープ膜中の膜蛋白質と相互作用をし、膜蛋白質の配置への影響を起すかどうかを検証した。3) 2)の系の500 ns後の配置を用いて、エンベロープ膜が自由端点を持つ場合の計算である。すなわち、エンベロープはバイセルのように膜端点を持ち、相互作用に応じてエンベロープ膜の変形を許している。これらのCG-MDには、SPICA力場を用いており、10 fsの時間刻み幅を用いて、静電相互作用はParticle mesh Ewald法により計算した。エンベロープ膜は膜蛋白質以外にはPOPC (palmitoyloleoyl phosphatidylcholine)脂質分子により構成されている。150 mMのNaCl水溶液中で計算した。

図3-4-2は、1)の系、すなわちエンベロープ膜のみからなる平面膜系で0.5 μsのCG-MDシミュレーションによって観測された構造変化を示す。初期配置では平坦なエンベロープ膜を作成したが、膜蛋白質の存在により、0.5 μs後には大きな曲率が誘起されていることがわかる。この系では、膜タンパク/脂質=1/87の割合で膜タンパクが存在し、実際のエンベロープよりやや膜蛋白質の数は少ない。より高い膜蛋白質濃度のエンベロープ膜では、より大きな曲率が誘起されるものと考えられる。参照までに、エンベロープ膜蛋白質を除いた純粋POPC脂質膜について同様の条件でCG-MDを行っても、この程度の時間では平面膜構造を保っており、上記の曲率の誘起はエンベロープ膜蛋白質の存在による影響であることが分かる。すなわち、エンベロープ膜蛋白質が膜中に存在することで、脂質膜の曲率を変え、高い曲率の膜を安定化することがわかった。

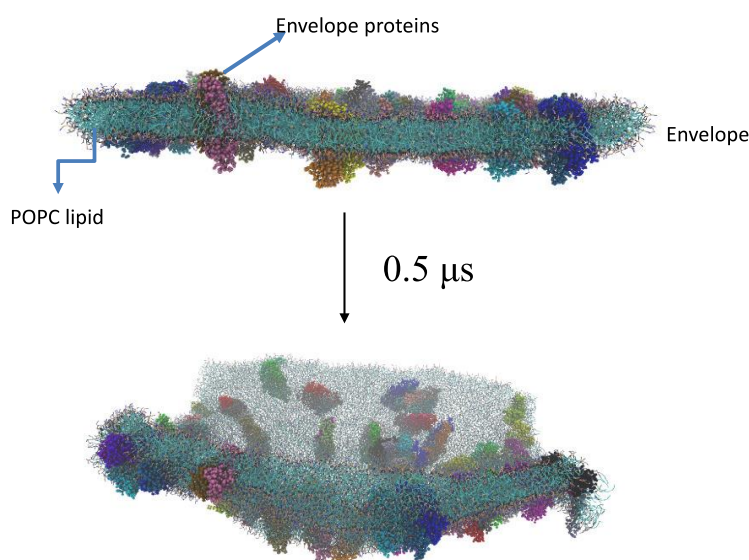


図 3-4-2: S 蛋白質(VDW 表示)と POPC 脂質(Ball-and-Stick 表示)からなる平面エンベロープ膜のみの系で 310 K, 1 bar の定温定圧 CG-MD 計算を行ったときの膜構造変化。0.5 μs 後には膜が大きな曲率を示した。水やイオンは非表示。

さらに、2)では近接するカプシド蛋白質の存在が、平面エンベロープ膜構造にどのように影響するかを検証している。図 3-4-3 には、カプシド蛋白質と平面エンベロープ膜系の 1 μ s の CG-MD 計算前後の構造のスナップショットを示している。カプシド蛋白質はエンベロープ膜蛋白質との相互作用によりほぼ接触し、この接触ペアを増やすように膜構造が湾曲した。このような膜の湾曲は周期境界条件でサポートされたエンベロープ膜だけでは起こらず、カプシドとの相互作用が原因である。カプシド蛋白質と接触する膜蛋白質の数は時間とともに 5 個から 9 個へと増加した。より小さな膜系で同様の計算をした際には、エンベロープ中の膜蛋白質が近接するカプシド付近に集合する蛋白質ソーティングが見られており、今回の大規模系では、蛋白質ソーティングに加えて膜の湾曲も同時に起こり、カプシドと膜蛋白質の相互作用に有利な構造が取られることが示された。これは、ER 膜において、低濃度で存在するエンベロープ膜蛋白質がカプシドとの相互作用によってリクルートされて集積し、最終的に HBV ビリオン粒子のエンベロープのような濃厚な膜蛋白質を持つ膜をエンベロープとして獲得する初期の分子機構であると考えられる。

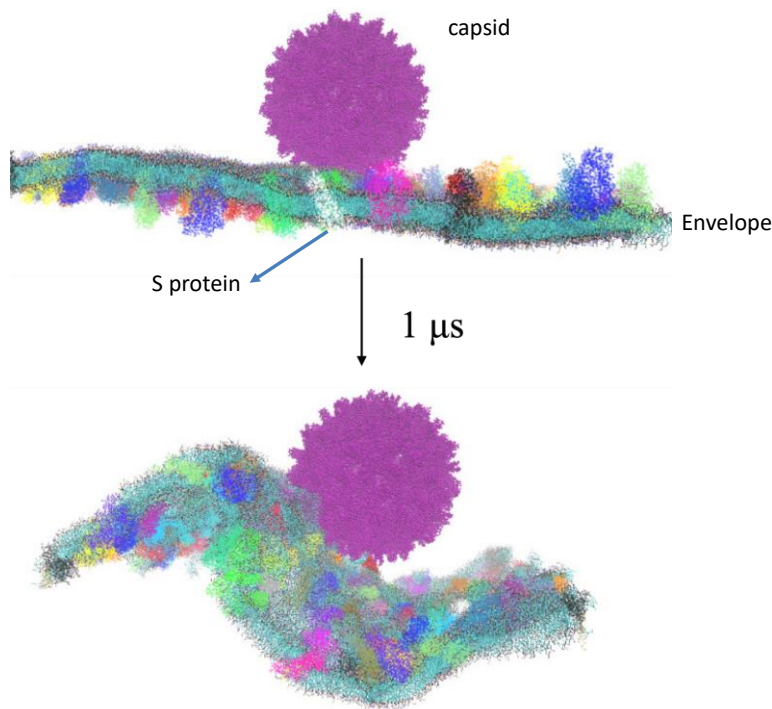


図 3-4-3: カプシド(紫)、膜蛋白質(VDW 表示)と POPC 脂質(Ball-and-Stick 表示)からなる系で 310 K, 1 bar の定温定圧 CG-MD を 1 μ s 行ったときの構造変化。膜は周期境界条件でサポートされている。水及びイオンは非表示。

さらに、3)の系として、カプシドスパイクとエンベロープ膜が十分に接触した状態を初期構造として、平面膜が周期境界条件でサポートされず水中に浮いた状態、すなわち膜端点を持つバイセルになっている膜系で CG-MD 計算を行った。この条件では、平面膜が周期境界条件でサポートされないために膜構造のより自由な変形が許される。図 3-4-4 に 3)の系の 1 μ s の CG-MD による構造変化を示す。カプシドの方向にエンベロープが曲がり、徐々にカプシドを覆う方向に大きく湾曲しており、不完全ではあるが、

エンベロープメントを引き起こす方向に構造が変化することを確認した。これらは先述の膜タンパクによる自発曲率の誘起やカプシド蛋白質とエンベロープ膜蛋白質の強い相互作用により期待される構造変化であるが、自由端点を持つエンベロープ膜の構造変化がカプシド蛋白質との接触数を増やす速度より速すぎたため、カプシド表面のスパイク蛋白質の多くが膜蛋白質と接触するような完全なエンベロープ化が達成できなかったと考えられる。ER 膜では自由端点はなく、今回の計算ではエンベロープ膜の自由端点に線張力が働いたために通常より速く湾曲し、さらに膜が閉じる際には内径側の体積が小さくなるため、その分の水溶液を押し除ける必要があり、その際にカプシドを外に追いやったものと推察される。また、CG-MD の都合上、実際のエンベロープよりも膜蛋白質の濃度を低く設定したため、カプシドと接触できる膜蛋白質が少なくなったことも部分的なエンベロープ化となった理由と考えられる。より完全なエンベロープメントを観測するには、さらに大規模系の長時間計算が必要であるが、これは将来の課題である。今回の CG-MD の結果は、エンベロープメントにおけるカプシドとウイルス由来の膜蛋白質の相互作用の重要性を示唆しており、さらに膜蛋白質による膜の自発曲率の変化もカプシドを包含するのによいサイズの曲率への膜構造変化を手助けするものと推察された。

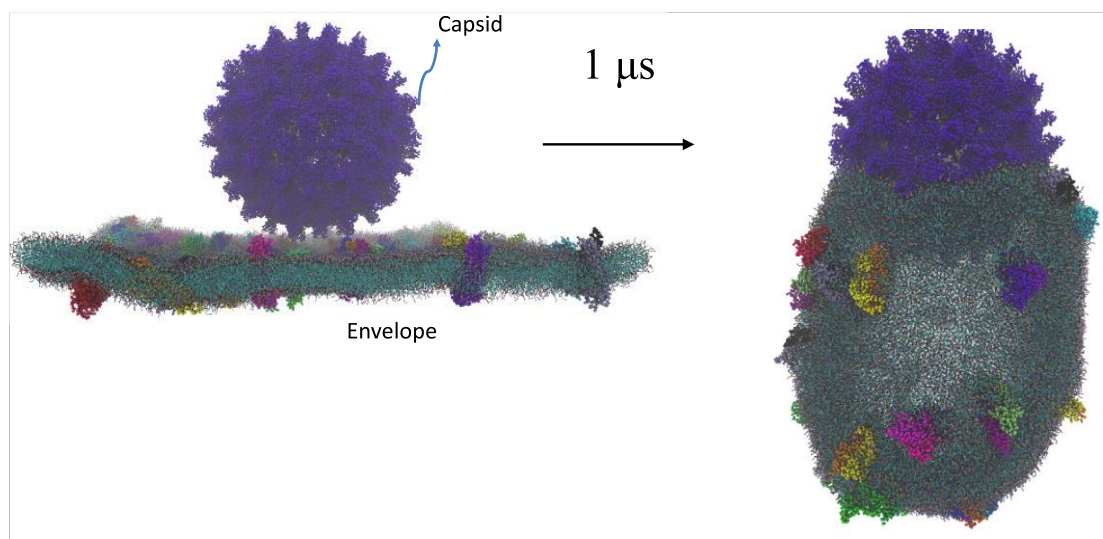


図 3-4-4: カプシド蛋白質(紫)、S 蛋白質(VDW 表示)と POPC 脂質(Ball-and-Stick 表示)からなる系で定温定圧 CG-MD を $1 \mu\text{s}$ 行ったときの構造変化。周期境界条件は適用されているが、エンベロープ膜は端点を持ち水中に浮いている状態として計算している。水イオンは非表示。

次に、よりネイティブ構造に近い HBV ビリオン粒子モデルの作成を試みた。昨年までは S 蛋白質のみで HBV ビリオン粒子を作成していた。S 蛋白質は、他の M と L 蛋白質と同じ膜貫通領域を持つため近似的に HBV ビリオンの良いモデルであった。今年度はこれまで考慮できていなかった糖修飾を持つ M 蛋白質や L 蛋白質を露わに含む HBV ビリオンをモデリングした。M 蛋白質の糖鎖修飾部位は細胞膜と相互作用し、この相互作用はウイルス複製サイクルにおける感染初期過程で重要な役割を持つと実験的に予測されている。そのため、糖鎖修飾部位を持つ HBV ビリオン粒子のモデル作成は重要な課題である。(1)-②の課題で記述した通り、SPICA 力場モデルに糖鎖ライブラリを追加し、特に M 蛋白質の糖鎖修飾に必要な N-glycan 型の糖鎖修飾構造モデルを用意した。M、L 蛋白質は S 蛋白質と同様に、その立体構造が実験的に決められていないため、構造モデリングを行う必要があった。図 3-4-5 は、S、M、

L の配列の比較と修飾部位を示したものである。M、L 蛋白質は S 蛋白質と共通のアミノ酸配列に、preS2、preS1 と呼ばれる配列を追加したものとなっている。さらに、これらの配列については、特定の 2 次構造を持っていないことが実験的に報告されている。したがって、これらのモデリングにおいては、M 蛋白質は preS2 の配列を、L 蛋白質に対しては、preS1 と preS2 を合わせた配列をそれぞれランダムコイルで作成し、S 蛋白質の構造末端に結合して配置した。それら M と L の初期構造を用いて 310K、1 bar の条件で 500 ns の MD 計算を行い、平衡構造を得た。その後、M 蛋白質に対して糖鎖修飾部位を結合した構造を作成した。結合させた糖鎖の鎖長については、質量分析により報告されている値を用いた。得られた M 蛋白質の構造について、特に糖鎖修飾部位は、水溶液中に露出しており、細胞膜に近づいたときに受容体や膜表面と接触しやすくなっていることが分かった。

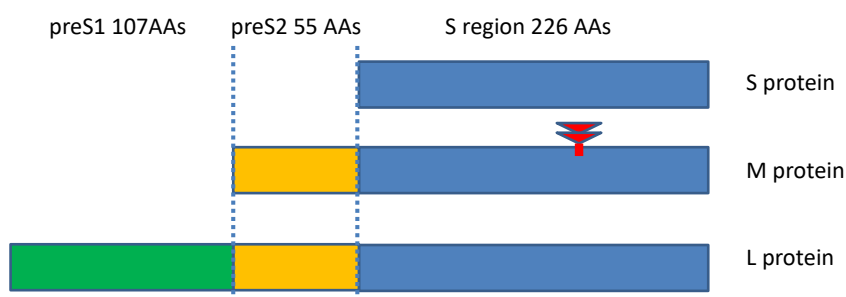


図 3-4-5: 3 種類の HBV 膜蛋白質のアミノ酸配列の関係比較。AA はアミノ酸残基の略。3 種類の蛋白質は共通のアミノ酸配列の S region を持っており、M 蛋白質は追加で preS2 をさらに、L 蛋白質は preS2 と preS1 を持っている。さらに M 蛋白質は S region 中で、膜貫通ヘリックス 2 と膜貫通ヘリックス 3 の間のアミノ酸が糖鎖修飾(赤色棒)を受けている。

最後に、作成した M、L 蛋白質構造を使用して、HBV ビリオンモデル粒子の構造をモデリングした。エンベロープ膜中には 3 種類の二量体 S-S、S-M、S-L 体が存在し、それらの存在比率が 5:3:1 程度と報告されている。これに従い、昨年度までに平衡化した S-S 二量体のみを含むビリオン構造を用いてその一部の二量体を S-M、S-L 体へと置換することに作成した。図 3-4-6 は作成後に構造緩和させた HBV ビリオン粒子の構造モデルである。水溶液中に向かってエンベロープ表面上に M タンパクの修飾糖鎖が露出する構造を取り、細胞膜との相互作用に有利な構造を示した。また、これらの糖鎖の露出により、糖鎖は細胞膜上の分子と相互作用するため、受容体を含む細胞膜に接近するときのアンカーや固着するのに使用できると考えられる。

HBV ビリオン粒子のモデルを作成し、エンベロープ蛋白質やカプシド蛋白質が分子分解能でどのような構造が形成されるか、ウイルス由来の蛋白質相互作用の重要性を明らかにした。さらに、蛋白質間相互作用がウイルス粒子構造の安定化のみならず、ウイルス粒子形成過程に主体的な役割をもっている可能性を示した。さらに、ビリオン粒子モデルを洗練させ、糖鎖を含んだよりネイティブウイルス粒子に近い構造を得た。このような分子モデルを用いることで、今回報告したウイルス粒子複製過程の途中過程であるエンベロープメントのみならず、今後、複製の初期過程である細胞膜との相互作用を調べることができると期待できる。本検討は、エンベロープ型ウイルス粒子に対する基礎的な知見を与え、今後のウイルスの分子論に立脚した研究展開に大きく寄与するものと考えられる。

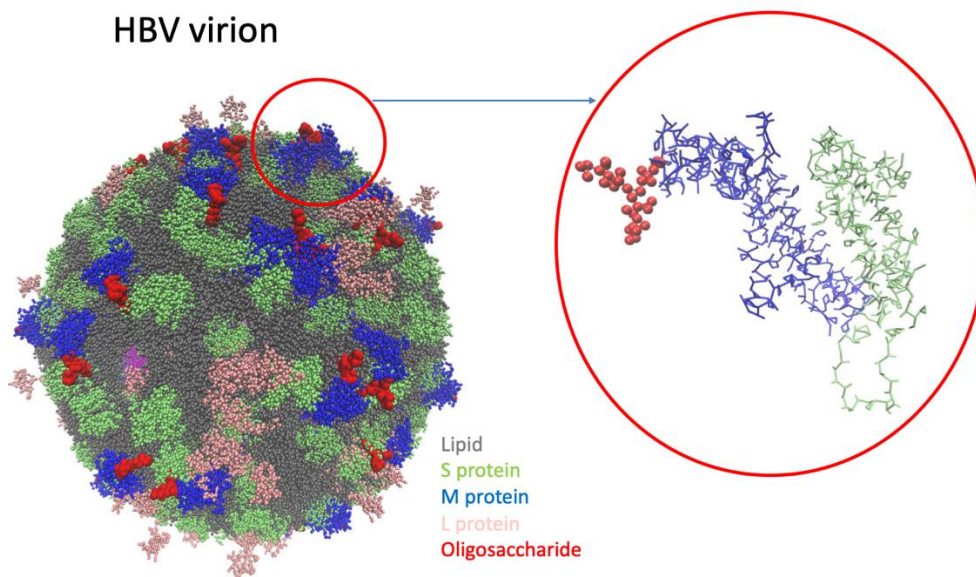


図 3-4-6: M (青)、L (ピンク) 蛋白質を含む HBV エンベロープのビリオン構造。脂質分子は半透明の灰色で表示されており、カプシドを内包している。S 蛋白質はライムで表示している。M 蛋白質は糖鎖 (赤、VDW 表示) 修飾を受けており、代表構造として赤線で囲んだ領域の S-M 体を拡大表示している。

⑤ 多剤排出トランスポーターの分子動力学シミュレーション (東大・篠田恵子)

グラム陰性菌による薬剤耐性化は社会問題になっている。主要な原因の一つとして、細胞膜に存在する多剤排出トランスポーターが薬を細胞外へ排出するためと考えられている。大腸菌多剤排出トランスポーター AcrA-AcrB-AcrZ-TolC (AcrABZ-TolC) は、ポンプ機能を担う AcrB、外部チャネルの TolC、AcrB と TolC をつなぐアダプタータンパクの AcrA、そして基質選択性に関与し排出を調整すると考えられている AcrZ のサブユニットから構成される約 800kDa の巨大な膜蛋白質複合体である(図 3-5-1)。各サブユニットはホモ多量体で、TolC、AcrA、AcrB、AcrZ はそれぞれ、三量体、六量体、三量体、三量体である。この複雑で巨大な膜蛋白質は、様々な脂質分子が含まれる混合膜内でその機能を発揮するため、蛋白質-蛋白質間相互作用のみならず、膜との相互作用が基質排出メカニズムを解析する上で非常に重要である。

一昨年度、昨年度とトランスポーター複合体-膜系について複数のトラジェクトリを取得してきたが、初期構造のモデリングについて一つ検討すべき重要なポイントが浮上してきた。ポンプ部分を担う三量体の AcrB の中央部分には空間 (図 3-5-2 左) があり、そこには脂質が充填されるが、これまでこの部分の脂質のモデリングは、AcrB のホモログ MexB において電子密度として観測されていた中央部分の脂質分子の数を基準としてマニュアルで充填してきた。しかし近年、cryo-EM による中央部の脂質を含んだ AcrB の結晶構造が得られた (図 3-5-2 右)。これまで初期構造において AcrB 三量体の中央部分に充填した脂質分子は 9 本であるが、結晶構造では 24 本だった。この領域は基質排出経路の一つの一部でもあり、脂質は直接 AcrB と相互作用するため、実験に基づいたこの脂質の構造を用いて一度きちんとモデリングし、これまでの計算結果と比較検討することにした。そこで今年度は、新たに AcrB 三量体の中央部分の脂質の結晶構造を取り入れて AcrABZ-TolC 複合体をモデリングし、一昨年度構築した LM301 株膜

(組成比率で上位 8 種類の脂質分子で構成)と昨年度構築した W3110S 株膜(実験値に基づいて 6 種類の脂質分子で構成。5%程しか存在しないが重要であることが知られるカルジオリピンを含む)に埋め込んだ系を構築し、2 種類の大腸菌膜における AcrABZ-ToC 複合体の MD シミュレーションを行なった。

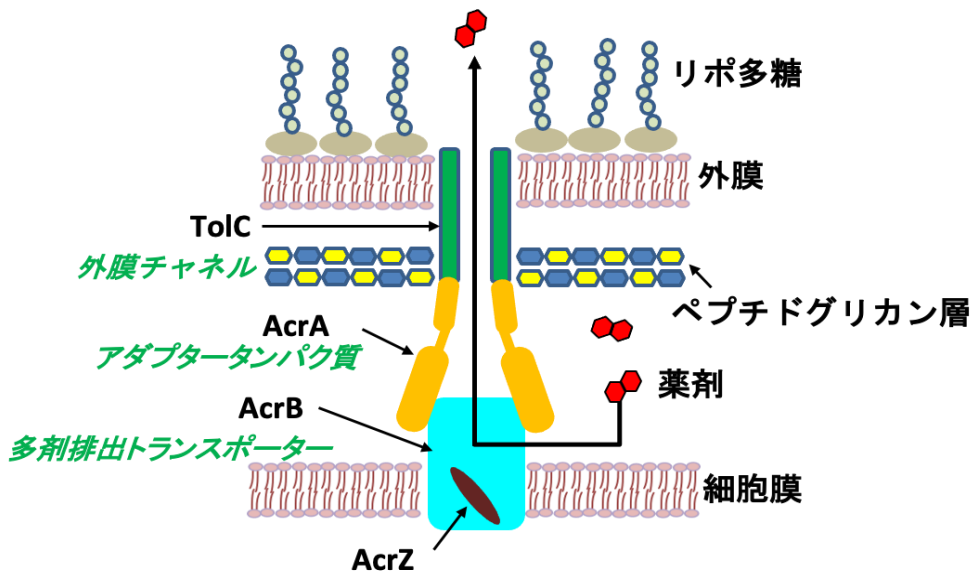


図 3-5-1: 細胞膜と外膜を持つ大腸菌膜に存在する多剤排出トランスポーター AcrA-AcrB-AcrZ-TolC(AcrABZ-ToC) 複合体。

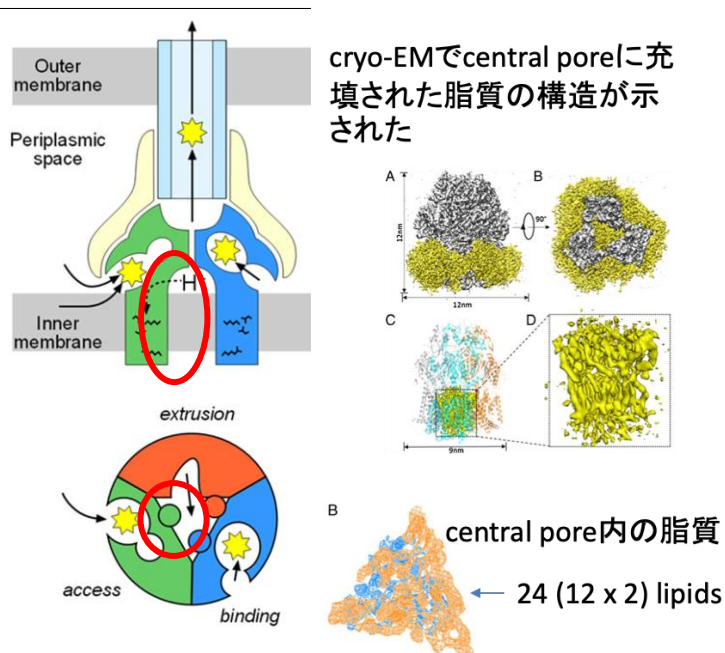


図 3-5-2: AcrB 三量体の中央部分 (左:Yamaguchi et al., *Front. Microbiol.*(2015)より引用) と cryo-EM で観測された脂質(右: Qiu et al., *PNAS*(2018)より引用)。三量体中央部 (赤で囲った箇所) に脂質が充填されている。

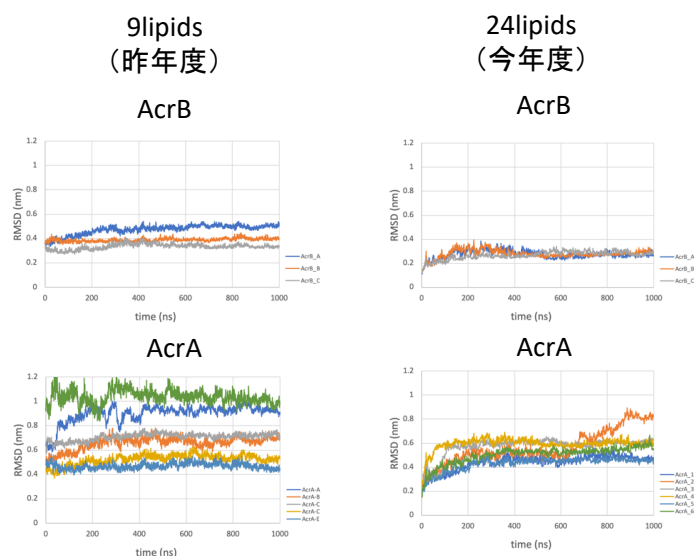


図 3-5-3: カルジオリピンを含まない LM301 株モデル膜に埋め込んだ AcrB 複合体の中の AcrB と AcrA の RMSD。AcrB は 3 つのモノマー、AcrA は 6 つのモノマーそれぞれの値に対して表示している。

三量体中央領域の結晶構造における脂質は部分構造であるため、一つ一つマニュアルで大腸菌の主要な脂質である PMPE にモデリングした。過去に取得したデータと比較するため、生体膜のモデルとしてよく用いられる POPE バージョンも構築を試みたがうまくモデリング出来ず、エネルギー最小化の段階で計算が破綻した。PMPE と比べて POPE はアシル鎖が長いことや結晶構造は大腸菌膜で取得されたものであるため構造が POPE とはかなり異なっていたためと考えられる。モデリングした 24 本の PMPE の構造を AcrB 複合体にはめ込んで、カルジオリピンを含まない LM301 株モデル膜及び昨年度構築したカルジオリピンを含む大腸菌 W3110S 株モデル膜に埋め込んだ系 (24-lipids 系と呼ぶことにする) を構築し、それぞれ独立の 2 本の MD シミュレーションを実施し、1 μ s のトラジェクトリを取得した。(以前の系については 9-lipids 系と呼ぶことにする。) まず中央部分の脂質の AcrABZ-ToC 複合体のダイナミクスへの影響を調べるために AcrB と AcrA の Root Mean Square Deviation(RMSD)を計算した (図 3-5-3)。AcrA は AcrB とは直接相互作用しているが AcrB 三量体中央領域の脂質とはかなり離れており相互作用はしない。しかし RMSD を見ると、AcrA は AcrB 三量体中央領域の脂質とは相互作用していないにもかかわらず、明らかに 24-lipids 系の方が安定していることがわかる。つまり AcrB 三量体中央領域の脂質と AcrB との相互作用が、AcrA のダイナミクスに影響を与え、揺らぎを抑えていることがわかった。

その他の複合体の各コンポーネントの RMSD と更にその中の基質排出のポンプの役割を持つ重要な AcrB のサブドメインの RMSD を大腸菌 LM301 株膜 (9-lipids 系と 24-lipids 系)、大腸菌 W3110S 株膜 (24-lipids 系) の系を用いて計算した結果を図 3-5-4 に示す。三量体中央部の脂質との相互作用が AcrB の揺らぎを介して、中央部の脂質と相互作用していない AcrA や AcrZ のダイナミクスに影響を与えていることが分かる。カルジオリピンを含む W3110S 膜系では LM301 株膜系と比べると揺らぎがさらに収まっていることも見て取れる。AcrB のサブドメインでは、基質結合サイトが含まれるポータードメインと呼ばれるドメインの中の PC1 サブドメインの RMSD において特に差が大きいことがわかった。

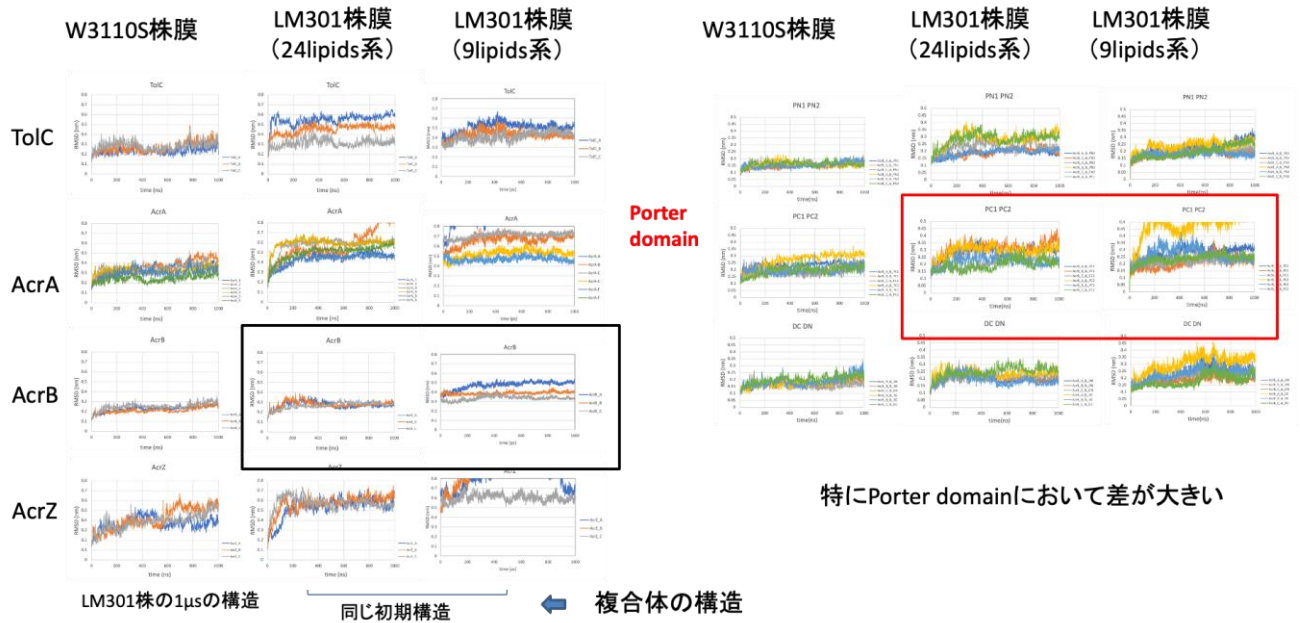


図 3-5-4: 複合体の各コンポーネントの RMSD(a)と AcrB のサブドメインの RMSD(b)。それぞれのコンポーネントは各モノマーについて表示している。AcrB の中では、porter ドメイン (赤で囲った部分) の PC1 サブドメイン (山吹色) の RMSD において三量体中央部の脂質による影響が特に大きい。

次に LM301 株膜モデル系において AcrB のモノマー間の相互作用を計算した。ホモ三量体である AcrB は非対称構造の時、各モノマーがそれぞれ薬剤の「アクセス」、「結合」、「排出」型のコンフォメーションをとることが知られているが、24-lipids 系では 9-lipids 系と比べて、排出型モノマーとアクセス型モノマーとの相互作用 (24-lipids 系では-1350 kJ/mol に対して 9-lipids 系では-1610 kJ/mol) 及び、排出型モノマーと結合型モノマーとの相互作用 (24-lipids 系では-1180 kJ/mol に対して 9-lipids 系では-1500 kJ/mol) が弱くなっていることがわかった (図 3-5-5 左)。9-lipids 系では 1μ 秒後においては 11~12 脂質分子が central pore に位置しており、シミュレーションが進行するにつれて、三量体中央領域に脂質が自発的に入り込むことがわかった。また、24-lipids 系と 9-lipids 系で、モノマー同士の相対位置を比べると明らかに異なっており (図 3-5-5 右)、AcrB 三量体中央領域の脂質が AcrB モノマーの四次構造に関わることが示唆された。

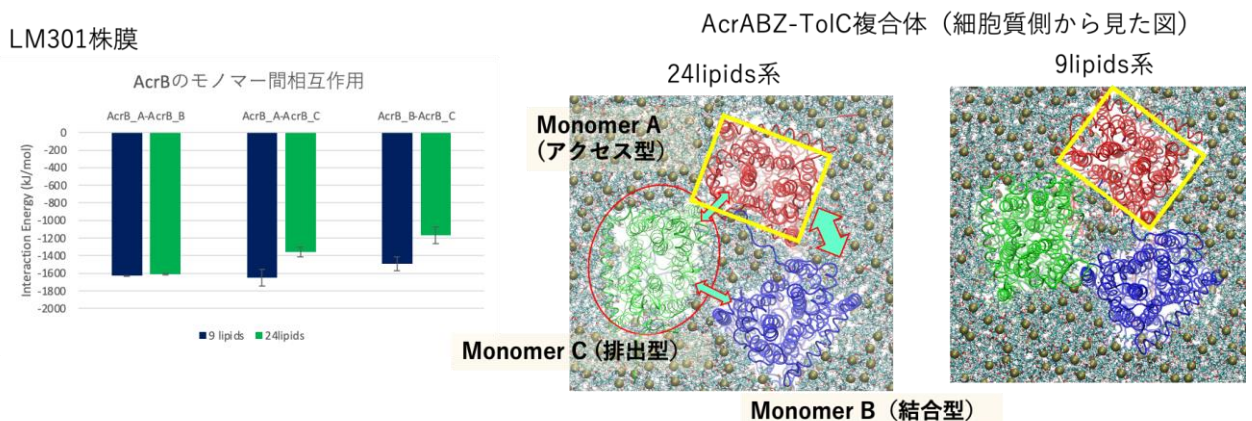


図 3-5-5: AcrB のモノマー間の相互作用(左)と AcrB の膜貫通領域を細胞質側から見た様子 (右)。3つのモノマーは色を変えて表示している。9-lipids 系では中央部分領域の面積が 24-lipids 系と比べて小さくモノマーがよりコンパクトに三量体を形成している。

さらに、複合体のコンポーネント間の相互作用を調べた結果、24-lipids 系と 9-lipids 系で AcrA-AcrB 間の相互作用は差が見られなかったが、AcrA-TolC 間の相互作用に有意な差が見られ、24-lipids 系では -1430 kJ/mol なのに対し 9-lipids 系では -1630 kJ/mol であることがわかった(図 3-5-6 左)。

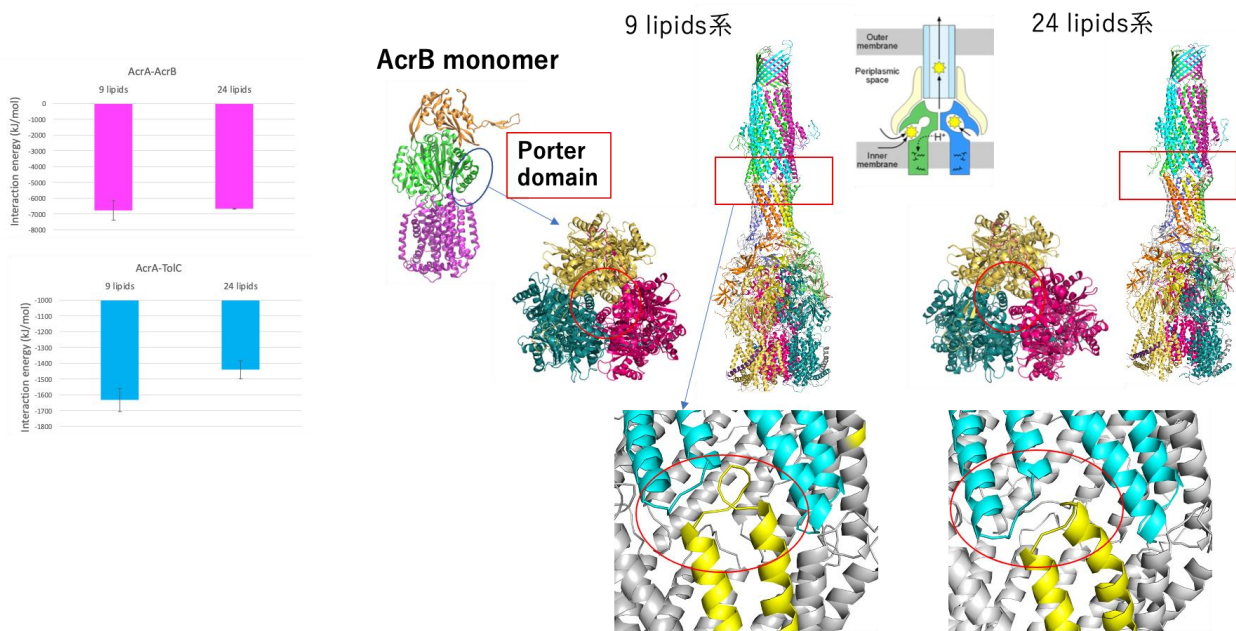


図 3-5-6: AcrA と隣り合うコンポーネント間の相互作用 (左) と AcrA-TolC の結合領域(右)。AcrA-AcrB 間相互作用はマゼンダ、AcrA-TolC 間相互作用はシアンの棒グラフで示す。AcrA-TolC の結合領域では、赤丸で示した部分の AcrA のモノマー (黄色) のループが、9-lipids 系では立ち上がった形状をしており、TolC のモノマーのヘリックス (シアン) の間に入り込んでいる。

AcrA と TolC の結合領域では AcrA のループのコンフォメーションが異なっており、24-lipids 系では AcrA のループは TolC のループと比較的離れるように傾いていたが、9-lipids 系では AcrA のループは立ち上がった形状で TolC のヘリックス間に入り込むようになっており(図 3-5-6 右)、そこに位置する Tyr137 が TolC の Asp378 や Arg389 と相互作用していた。このような相互作用の差は、AcrB 三量体中央領域内の脂質が遠く離れた AcrA と TolC の相互作用に影響を与えていることを示しているだけでなく、AcrB のダイナミクスが、相互作用していない TolC へ影響を与えることをも示している。さらに、AcrB 三量体中央領域内の脂質を調整することにより AcrB 以外のコンポーネントのダイナミクスや相互作用を変えることができることを示唆している。

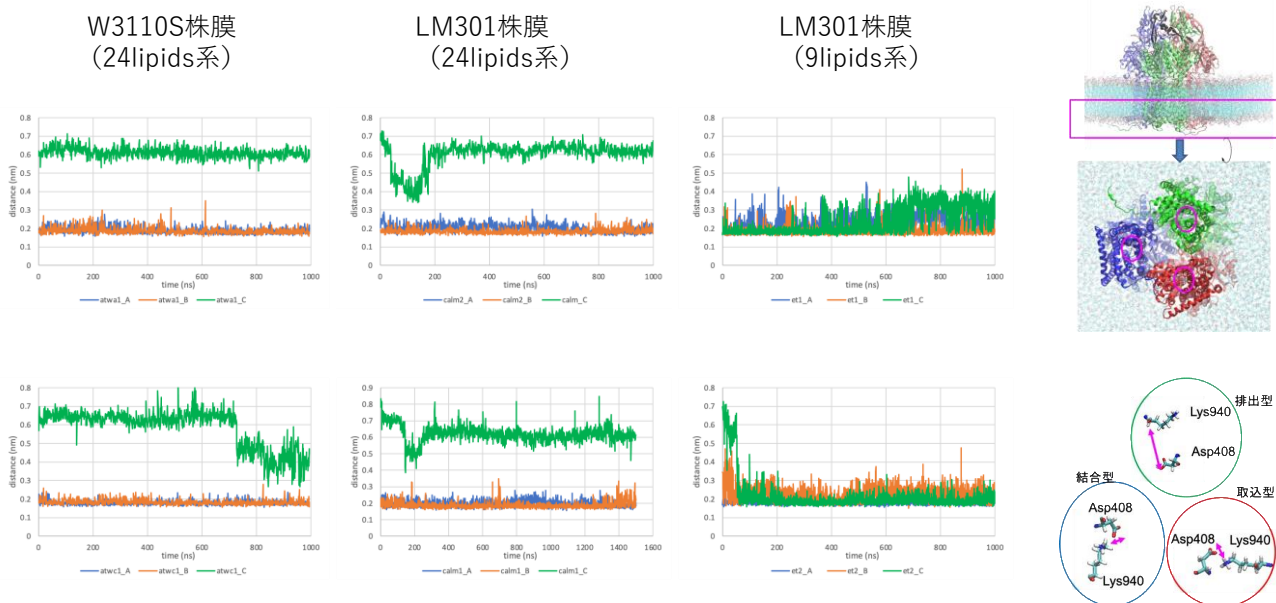


図 3-5-7: Asp408-Lys940 間最小距離の時間変化。各膜モデル系においてアクセス型 (赤) 結合同型 (青) 排出型 (緑) のモノマーの結果を表示している。それぞれの系で、初期運動量を変えて行った独立の 2 つの 1 μ s シミュレーションの結果を示している。

貫通ドメインの中央に位置する Asp407、Asp408、Lys940 の残基は AcrB の機能発現に必須であることが実験的に分かっているが、Asp408 のプロトン化・脱プロトン化によるその周りの残基との相互作用の変化が、基質排出機能の駆動力の一つとなっていると考えられている。非対称状態の結晶構造では、これら残基の相対的な配置が 3 つのモノマーで異なり、アクセス型及び結合同型モノマーでは Lys940 は Asp407 と Asp408 の間に位置しているのに対し、排出型モノマーでは Asp408 と Thr978 間に位置している。そのため排出型のモノマーは他の 2 つのモノマーと比べて Asp408-Lys940 間の距離が長くなっている。また非対称状態の AcrB では排出型モノマーの Asp408 はプロトン化され、それ以外のモノマーは脱プロトン化されていると考えられているが、我々のシミュレーションでは Asp408 や Asp407 は脱プロトン化状態に設定したため、シミュレーションが進めば進むほど排出型モノマーはアクセス型に変化し、Asp408-Lys940 間が短くなることが予想される。そこで、このコンフォメーション変化の 1 ステップが AcrB 三量体中央部の脂質によって影響を受けるのかを調べるために、各モノマーの Asp408-Lys940 間の最小距離の時間変化をモニターした。図 3-5-7 を見ると LM301 株膜モデルの 9-lipids 系では、排出型モノマーの値が急激に変化し、2 つのシミュレーションとも数 ns~数十 ns の間に Asp408-Lys940 間最小距離は 0.7 nm 付近から 0.2 nm 付近まで減少している。しかし、そのうちの 1 つのシミュレーションでは、減少した後およそ 0.2 nm から 0.4 nm の間を頻りに揺らいている様子も観測され、このシミュレーションでは AcrB の構造全体が完全には緩和されていないことが示唆された。一方、24-lipids 系では、W3110S 株膜モデル系では 2 つのうち 1 つのシミュレーションでアクセス型に近づいたが、1 μ s の間では 2 種類の膜のどちらの系もアクセス型の値にはならなかった。

W3110S 株膜でアクセス型の値に近づいたトラジェクトリではどんなことが起こったのかを見るために、Asp408-Lys940 間最小距離が変化した時間付近のトラジェクトリを調べた。その結果カルジオリピンが

TM1/TM2 界面に存在する hydrophobic な残基と相互作用することによって、隣接する TM4 に位置する Asp408 のコンフォメーションを変化させていることがわかった(図 3-5-8)。この TM1/TM2 界面は、AcrB 三量体中央部の一部を含む基質排出経路とは異なる経路上の binding site へ向かう入り口である。カルジオリピンは 2 価の負電荷と 4 つのアシル基を持つ大きい脂質で、他の脂質分子と比べて膜貫通領域のアミノ酸との相互作用も大きいと、さらに長時間のシミュレーションを実施すれば Asp408-Lys940 間最小距離はいずれアクセス型の値へ収束するだろうと考えられる。

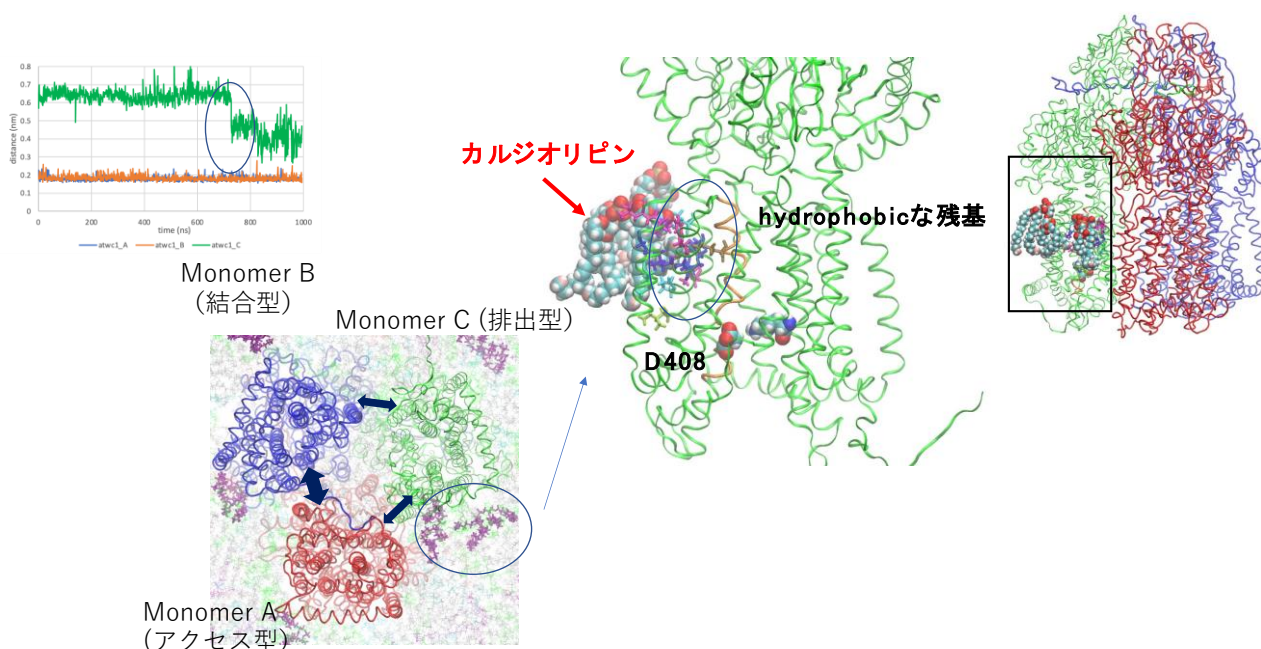


図 3-5-8: カルジオリピンと AcrB の膜貫通領域との相互作用。カルジオリピンによって AcrB 排出型モノマーのコンフォメーション変化が促進されると予測される。

今年度の MD シミュレーションにより、蛋白質間相互作用におけるこれまで知られていなかった膜脂質の関与が見出された。AcrB 三量体中央部の脂質によって異なる複合体コンポーネント間の相互作用は、見方を変えると AcrB のダイナミクスが直接は相互作用しない TolC まで影響を及ぼすことを示しており、これまで分かっている、「AcrB のコンフォメーション変化がどのように他の複合体コンポーネントへ伝わり、基質排出へと繋がるのか」に対して一つの道筋を与えるものになった。また、詳細な解析はこれからだが、トラジェクトリを可視化することにより AcrB の動きを観察すると AcrB のモノマーの動きが 9-lipids 系と 24-lipids 系とは異なっており 24-lipids 系の方が三量体として調和の取れた動きのような印象をもった。PCA 解析などで運動モードの解析を行えばよりダイナミクスの違いがはっきり捉えられると考えられる。これは今後の課題である。

(4) プロジェクトの総合推進

令和 2~3 年度のプロジェクトの活動により、「富岳」を用いたプロダクションランを行う準備等が十分にできており、早期の論文発表を目指して各チームで活動した。プロジェクトの総合推進に必要な議論は主に Slack と Box を用いてオンラインで行った。「富岳」の利用状況については毎月、理研で計算時

間を調査し、プロジェクトメンバーで共有することによって効率的に「富岳」のリソースを活用することができた。令和 5 年 3 月にプロジェクトの最終ミーティングを、Zoom を用いて行い最終的な成果について議論した。

2-3. 活動（研究会の活動等）

令和 4 年度にはオンサイトでの学会活動が可能となったため、日本生物物理学会でシンポジウムを開催した。

- ・第 60 回日本生物物理学会年会シンポジウム（令和 4 年 9 月 29 日（火）13:50-16:20）

「富岳を用いた高性能計算による生物物理」

オーガナイザー：松永康佑（埼玉大学）・信夫愛（理研）

招待講演者：北尾彰朗（東工大）

篠田恵子（東京大学）

浦野諒（岡山大学）

信夫愛（理研）

入浴本亨（横浜市大）

Sriram Srinivasa Raghavan（理研）

徳久淳師（理研）

また、「富岳」に最適化された新しいバージョンの GENESIS(Version 2.0.0)を 2022 年 7 月 29 日に公開した。GENESIS のアウトリーチ活動として、国内の大学院生や若手研究員をターゲットに夏の学校を開催した。

- ・GENESIS Summer School (Online)（令和 4 年 8 月 1 日（月）～ 2 日（火））

<https://tms.riken.jp/misc/genesis-summer-school2022/>

オーガナイザー：杉田有治、八木清、Weitong Ren、Hisham Dokainish、新津藍（理研）

講義 1 MD の基本と GENESIS の使い方（小林千草（理研））

講義 2 gREST 法の紹介（新津藍（理研））

講義 3 Applications of gREST (Hisham M Dokainish（北海道大学））

講義 4 GENESIS/QSimulate による QM/MM 計算（八木清（理研））

講義 5 MD 計算に基づくクライオ電顕フレキシブル・フィッティング（森貴治（理研））

この他、4 つの Hands-on tutorial を行った。参加者は「富岳」上での GENESIS を用いた計算を体験することができた。

ベーシックコース

アドバンスコース 1 拡張アンサンブル法

アドバンスコース 2 QM/MM 計算

アドバンスコース 3 Cryo-EM フィッティング

非常に多くの大学院生等が夏の学校に参加したことから、本研究プロジェクトで開発したソフトウェア GENESIS を広くアカデミアに普及できたことを実感した。

2-4. 実施体制

実施項目	実施場所	担当責任者
(1) 全原子・粗視化分子動力学の最適化と並列化	〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3 国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター	杉田有治
	〒700-8530 岡山県山市北区津島中 1-1-1 国立大学法人岡山大学	篠田渉
(2) データ科学的手法による粗視化モデルパラメーターの最適化	〒606-8501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学	高田彰二
	〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 国立大学法人埼玉大学	松永康佑
(3) 生体分子系のモデリングと「富岳」を用いたシミュレーション	〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3 国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター	杉田有治
	〒606-8501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学	高田彰二
	〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構	河野秀俊
	〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中1-1-1 国立大学法人岡山大学	篠田渉
	〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1 国立大学法人 東京大学	篠田恵子
(4) プロジェクトの総合推進	〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3 国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター	杉田有治

別添 1 学会等発表実績

別紙の通り

学会発表実績

1. 学会等における口頭・ポスター発表(国際会議)

No.	発表題目	発表者氏名	発表した場所(学会名等)	発表した時期	国内外の別
1	Conformational Dynamics and Functions of Proteins in Crowded Cellular Environments	Yuji Sugita	Hamburg, Germany (BPS Thematic Meeting Hamburg)	2022年5月	国際
2	Conformational Change and Dissociation/Association of Biological Macromolecules Investigated by Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics and Markov State Model	Akio Kitao	Tainan, Taiwan (ABA, APPA&TBS Joint Congress 2022)	2022年6月	国際
3	Free-energy calculations of protein-ligand binding in solution and crowded environments	Yuji Sugita	Taipei, Taiwan (WCB2022)	2022年7月	国際
4	Coarse-grained molecular dynamics of lipid self-assembly	Wataru Shinoda	Rome, Italy (CECAM workshop. Ions, membrane and channels: Multiscale simulations from quantum to coarse-grain. A symposium in honor of Mike Klein.)	2022年10月	国際
5	Integrative Modeling of Protein Dynamics from High-Speed Atomic Force Microscopy and Molecular Dynamics Simulations	Yasuhiro Matsunaga	Osaka, Japan (Frontier of Dynamic Structural Biology)	2022年10月	国際
6	Integrative modeling of biomolecular dynamics from simulations and experiments	Yasuhiro Matsunaga	Saitama, Japan (The joint symposium of Kanto spin chemistry meeting 2022 and startup symposium "Strategic research center incubation research group of	2023年1月	国際
7	Acceleration of residue-level coarse-grained molecular dynamics by efficient parallelization	Jaewoon Jung, Cheng Tan, Chigusa Kobayashi, Diego Ugarte, Yuji Sugita	San Diego, USA (67th Biophysical Society Annual Meeting)	2023年2月	国際
8	Acceleration of residue-level coarse-grained molecular dynamics on Fugaku by efficient parallelization with improved load balancing	Jaewoon Jung, Cheng Tan, Chigusa Kobayashi, Diego Ugarte, Yuji Sugita	Kobe, Japan (The 5th R-CCS International Symposium)	2023年2月	国際
9	Analysis of structural changes of multi-chain/multi-domain proteins.	Chigusa Kobayashi, Hisham M. Dokainish, Suyong Re, Takaharu Mori, Jaewoon Jung, Yuji Sugita	Kobe, Japan (The 5th R-CCS International Symposium)	2023年2月	国際
10	Exploring the Mechanism of Endosomal Escape of Lipid Nanoparticles: A Coarse-Grained Molecular Dynamics Study	Wataru Shinoda	Quy Nhon, Vietnam (Asia Pacific Conference of Theoretical and Computational Chemistry, APATCC-10)	2023年2月	国際
11	Integrative Modeling of Protein Dynamics from High-speed Atomic Force Microscopy and Molecular Dynamics Simulations	Yasuhiro Matsunaga	San Diego, USA (67th Biophysical Society Annual Meeting)	2023年2月	国際
12	Integrative modeling of biomolecular dynamics from simulations and experiments	Yasuhiro Matsunaga	Kobe, Japan (The 5th R-CCS international symposium)	2023年2月	国際
13	Repulsive interaction and secondary structure of highly charged proteins in regulating biomolecular condensation.	Cheng Tan, Ai Niitsu, Yuji Sugita	San Diego, USA (The 67th Biophysical Society Annual Meeting)	2023年2月	国際
14	Binding free energy landscape of c-Src kinase to its inhibitors sampled by molecular dynamics simulations: effect of ligand size and flexibility	Ai shinobu, Suyong Re, Yuji Sugita	San Diego (2023 Annual Biophysical Society Meeting)	2023年2月	国際

学会等における口頭・ポスター発表(国内学会)

No.	発表題目	発表者氏名	発表した場所(学会名等)	発表した時期	国内外の別
1	実験とシミュレーションを統合した生体分子構造ダイナミクスのモデリング	松永康佑	オンライン開催(第40回関東CAE懇話会)	2022年4月	国内
2	静電相互作用計算を高速化した自由エネルギー摂動法の開発	尾嶋拓, 杉田有治	つくば(第22回日本蛋白質科学会年会)	2022年6月	国内
3	細胞内環境における蛋白質の構造・ダイナミクス・機能	杉田有治	つくば(第22回日本蛋白質科学会年会)	2022年6月	国内
4	計算科学で挑む細胞内環境の生物学	杉田有治	鳥取(第48回生体分子科学討論会)	2022年6月	国内
5	実験とシミュレーションを統合したタンパク質ダイナミクスのモデリング	松永康佑	つくば(第22回日本蛋白質科学会年会・ワークショップ「富岳」時代の計算蛋白質科学)	2022年6月	国内
6	How EGCG perturbs the interaction between MDM2 and N-terminal domain of p53	Duy Phuoc Tran, Akio Kitao	Tsukuba(第22回日本蛋白質科学会年会)	2022年6月	国内
7	PaCS-MD/MSM法を用いたキナーゼ複合体の結合速度論解析	竹村和浩, 北尾彰朗	つくば(第22回日本蛋白質科学会年会)	2022年6月	国内
8	Substrate Unbinding Mechanism of Candida rugosa Lipase Explored by Parallel Cascade Selections Molecular Dynamics and Markov State Model	Darin Flamandita, Akio Kitao	Tsukuba(第22回日本蛋白質科学会年会)	2022年6月	国内
9	分子シミュレーションを利用した膜蛋白質デザイン	川崎寿, 篠田恵子, 濱本晋	バイオインダストリー協会「発酵と代謝研究会」講演会	2022年7月	国内
10	A method for analyzing structural changes of protein with multi-chains/multi-domains	Chigusa Kobayashi, Hisham M Dokainish, Suyong Re, Takaharu Mori, Jaewoon Jung, Yuji Sugita	Hakodate(第60回日本生物物理学会年会)	2022年9月	国内
11	Acceleration of residue-level coarse-grained molecular dynamics by new development of parallelization	Jaewoon Jung, Cheng Tan, Chigusa Kobayashi, Ugarte Diego, Yuji Sugita	Hakodate(The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan)	2022年9月	国内
12	Development of the free-energy perturbation method toward drug discovery on supercomputer Fugaku	Hiraku Oshima, Yuji Sugita	Hakodate(第60回日本生物物理学会年会)	2022年9月	国内

学会発表実績

13	Improved diffusive and thermodynamic properties of proteins with modified interactions between water and protein in CHARMM c36m	Daiki Matsubara, Kento Kasahara, Hisham M. Dokainish, Hiraku Oshima, Yuji Sugita	Hakodate (第60回日本生物物理学会年会)	2022年9月	国内
14	Molecular dynamics study of phase behaviors of heat-resistant obscure proteins and their anti-aggregation functions	Cheng Tan, Ai Niitsu, Yuji Sugita	Hakodate (The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan)	2022年9月	国内
15	ウイルス粒子の粗視化分子動力学シミュレーション: B型肝炎ウイルス粒子構造	浦野 諒, 篠田 渉	横浜 (第16回分子科学討論会)	2022年9月	国内
16	エンベロープ型ウイルス粒子の粗視化シミュレーション: B型肝炎ウイルス	浦野 諒, 篠田 渉	北海道 (第60回生物物理学会年会)	2022年9月	国内
17	分子動力学シミュレーションによるエンドソーム脱出分子機構の解明	柴田果奈, Akhil Pratap Singh, 篠田 渉	北海道 (第60回生物物理学会年会)	2022年9月	国内
18	分子動力学シミュレーションを用いた脂質膜におけるメリチンの抗菌作用の研究	宮崎 裕介, 篠田 渉	北海道 (第60回生物物理学会年会)	2022年9月	国内
19	分子動力学法を用いた脂質ナノ粒子のエンドソーム脱出機構の解明	柴田 果奈, Pratap Singh Akhil, 宮崎 裕介, 篠田 渉	広島 (第 73 回コロナIDおよび界面化学討論会)	2022年9月	国内
20	抗菌ペプチドによる膜細孔形成の分子シミュレーション研究	川端一正, 宮崎裕介, 篠田 渉	北海道 (第60回生物物理学会年会)	2022年9月	国内
21	環境依存の構造変化を取り入れた粗視化タンパク質モデルの開発	山田 哲平, 篠田 渉	横浜 (第16回分子科学討論会)	2022年9月	国内
22	環境変化によるタンパク質の構造変化を取り込んだ粗視化タンパク質モデル	山田 哲平, 篠田 渉	北海道 (第60回生物物理学会年会)	2022年9月	国内
23	粗視化分子力場SPICAのタンパク質系への拡張と応用	宮崎 裕介, 篠田 渉	横浜 (第16回分子科学討論会)	2022年9月	国内
24	Protein conformational change, association and dissociation observed using Fugaku and massively parallel molecular dynamics simulations	Akio Kitao	Hakodate (第60回日本生物物理学会年会)	2022年9月	国内
25	The relative motion of MotA around MotB in bacterial flagellar stator	Duy Phuoc Tran, Akio Kitao	Hakodate (第60回日本生物物理学会年会)	2022年9月	国内
26	Analysis of High Speed Atomic Force Microscopy Image of FliAc	Riku Osawa, Akio Kitao	Hakodate (第60回日本生物物理学会年会)	2022年9月	国内
27	並列カスケード選択分子動力学法を用いた生体分子の解離課程解析	中矢光, チャンフズイ, 北尾彰朗	横浜市 (第16回分子科学討論会)	2022年9月	国内
28	分子動力学計算におけるタンパク質の二面角遷移の解析	吉岡美月, 北尾彰朗	横浜市 (第16回分子科学討論会)	2022年9月	国内
29	Binding free energy landscapes of Src Kinase to its inhibitors sampled by two-dimensional replica exchange molecular dynamics simulations	Ai Shinobu, Suyong Re, Yuji Sugita	Hakodate (The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan)	2022年9月	国内
30	Molecular dynamics study of multidrug efflux transporter complex embedded in lipid bilayer: Role of membrane lipids in the transporter	Keiko Shinoda	Hakodate (The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan)	2022年9月	国内
31	Free Energy Perturbation Method in GENESIS	Hiraku Oshima, Yuji Sugita	東京 (CBI学会2022年大会)	2022年10月	国内
32	分子動力学計算による抗菌ペプチドの膜選択性解析	川端一正, 宮崎裕介, 篠田 渉	鹿児島 (第44回溶液化学シンポジウム)	2022年10月	国内
33	脂質ナノ粒子を用いた核酸エンドソーム脱出の分子動力学	柴田果奈, Akhil Pratap Singh, 宮崎裕介, 篠田 渉	鹿児島 (第44回溶液化学シンポジウム)	2022年10月	国内
34	Acceleration of gREST simulations of large biological systems on massively parallel computers	Jaewoon Jung, Chigusa Kobayashi, Yuji Sugita	Tokyo (第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
35	静電相互作用の計算コストを抑えた自由エネルギー摂動法の開発	尾嶋拓, 杉田有治	東京 (第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
36	Implementation of residue level coarse-grained models in GENESIS for large-scale molecular dynamics simulations	Cheng Tan, Jaewoon Jung, Chigusa Kobayashi, Diego Ugarte La Torre, Shoji Takada, Yuji Sugita	Tokyo (第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
37	エンベロープ型ウイルス粒子の粗視化シミュレーション: B型肝炎ウイルスのポリオン構造とエンベロープ膜	浦野 諒, 篠田 渉	東京 (第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
38	分子動力学計算による脂質ナノ粒子を用いた核酸エンドソーム脱出機構の解明	柴田果奈, Akhil Pratap Singh, 宮崎裕介, 篠田 渉	東京 (第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
39	微分可能なアプローチによる高速原子間力顕微鏡データの解析	松永康佑	オンライン (情報計測オンラインセミナー)	2022年12月	国内
40	抗菌ペプチドがもつ膜選択性の分子論的研究	川端一正, 宮崎裕介, 山田哲平, 篠田 渉	東京 (第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
41	環境依存の構造変化を取り込んだ粗視化タンパク質モデルの開発と脂質膜吸着現象への応用	山田 哲平, 篠田 渉	東京 (第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内

学会発表実績

42	FliHAcの高速原子間力顕微鏡画像の解析	大沢陸輝、寺原直矢、古寺哲幸、今田勝巳、南野徹、北尾彰朗	オンライン発表(第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
43	How different glycopeptide affects the binding of glycoprotein B to paired immunoglobulin-like type 2 receptor	Ting-Yi Chu, Duy Tran, Akio Kitao	Online presentation(第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
44	Molecular Dynamics investigation of binding affinities between amino acid and taste receptor	Hao Nguyen, Duy Tran, Akio Kitao	Online presentation(第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
45	The Effect of Tricaprylin-Water Interface on the Conformational Dynamics of Candida antarctica Lipase B	Tegar Wijaya, Akio Kitao	Online presentation(第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
46	線形応答理論を応用した効率的な分子動力学シミュレーションに基づく自由エネルギー解析	生澤真司、北尾彰朗	オンライン発表(第36回分子シミュレーション討論会)	2022年12月	国内
47	Implementation of residue level coarse-grained models in GENESIS for large-scale molecular dynamics simulations	Cheng Tan, Jaewoon Jung, Chigusa Kobayashi, Diego Ugarte La Torre, Shoji Takada, Yuji Sugita	Kobe(The 5th RCCS Symposium)	2023年2月	国内
48	生体分子構造ダイナミクスの統合モデリング	松永康祐	オンライン(第2回「富岳」成果創出加速プログラム研究交流会)	2023年3月	国内
49	Corynebacterium stationisの変異型MFSトランスポーターによるIMPの分泌型発酵生産	黄瀬啓太、小西智之、篠田恵子、川崎寿	(オンライン開催)日本農芸化学会2023年度大会	2023年3月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

No.	掲載論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所(学会誌・雑誌名等)	発表した時期	国際共著(○を記入)
1	SPICA Force Field for Proteins and Peptides	Shuhei Kawamoto, Huihui Liu, Yusuke Miyazaki, Sangjae Seo, Mavank Dixit, Russell DeVane, Yuichi Umegawa, Tomoya Yamamoto, Mayank Dixi, Kosuke Funahashi, Sangjae Seo, Yasuo Nakagawa Taiga Suzuki, Shigeru Matsuoka, Hiroshi Tsuchikawa, Shinva Hanashima, Tohru	J. Chem. Theory Comput, 18, 3204-3217 (2022)	2022年4月	○
2	Amphotericin B assembles into seven-molecule ion channels: An NMR and molecular dynamics study	Yuichi Umegawa, Tomoya Yamamoto, Mayank Dixi, Kosuke Funahashi, Sangjae Seo, Yasuo Nakagawa Taiga Suzuki, Shigeru Matsuoka, Hiroshi Tsuchikawa, Shinva Hanashima, Tohru	SCIENCE ADVANCES, Vol.8, eabo2658 (2022)	2022年6月	
3	Principal Component Analysis and Related Methods for Investigating the Dynamics of Biological Macromolecules	Akio Kitao	J, Vol.5, pp.298-317 (2022)	2022年6月	
4	Conserved GYXLI Motif of FliH Is Involved in Dynamic Domain Motions of FliA Required for Flagellar Protein Export	Tohru Minamino, Miki Kinoshita, Yumi Inoue, Akio Kitao, Keiichi Namba	Microbiology Spectrum, Vol.10, 01110-22 (2022)	2022年8月	
5	Free Energy Landscape of H2A-H2B Displacement From Nucleosome	Hisashi Ishida, Hidetoshi Kono	Journal of Molecular Biology, Vol.434, 167707 (2022)	2022年8月	
6	Modified Protein-Water Interactions in CHARMM36m for Thermodynamics and Kinetics of Proteins in Dilute and Crowded Solutions	Daiki Matsubara, Kento Kasahara, Hisham M. Dokainish, Hiraku Oshima, Yuji Sugita	Molecules, Vol.27, 5726 (2022)	2022年9月	
7	Cooperative antimicrobial action of melittin on lipid membranes: A coarse-grained molecular dynamics study	Yusuke Miyazaki, Wataru Shinoda	Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes, Vol.1864, 183955 (2022)	2022年9月	
8	Structure of MotA, a flagellar stator protein, from hyperthermophile	Tatsuro Nishikino, Norihiro Takekawa, Duy Phuoc Tran, Jun-ichi Kishikawa, Mika Hirose, Sakura Onoe, Seiji Kojima, Michio Homma, Akio Kitao, Takavuki Kato, Katsumi Imada	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.631, pp.78-85 (2022)	2022年11月	
9	Development of hidden Markov modeling method for molecular orientations and structure estimation from high-speed atomic force microscopy time-series images	Tomonori Ogane, Daisuke Noshiro, Toshio Ando, Atsuko Yamashita, Yuji Sugita, Yasuhiro Matsunaga	PLOS Computational Biology, Vol. 18, e1010384 (2022)	2022年12月	
10	Use of multistate Bennett acceptance ratio method for free-energy calculations from enhanced sampling and free-energy perturbation	Yasuhiro Matsunaga, Motoshi Kamiya, Hiraku Oshima, Jaewoon Jung, Shingo Ito, Yuji Sugita	Biophysical Reviews, Vol. 14, 1503-1512 (2022)	2022年12月	
11	Highly Charged Proteins and Their Repulsive Interactions Antagonize Biomolecular Condensation	Cheng Tan, Ai Niitsu, Yuji Sugita	JACS Au Vol. 3, 834-848 (2023)	2023年2月	
12	Self-Assembly of Glycerol-Amphiphilic Janus Dendrimers Amplifies and Indicates Principles for the Selection of Stereochemistry by Biological Membranes	Dapeng Zhang, Qi Xiao, Mehrnosh Rahimzadeh, Matthew Liu, Cesar Rodriguez-Emmenegger, Yusuke Miyazaki, Wataru Shinoda, Virgil Percec	Journal of American Chemical Society, Vol.145, 4311-4323 (2023)	2023年2月	○