

Appendix. A Tom20-シグナル配列複合体 のその他の結果

A.1 アンブレラサンプリング MD 計算

A.1.1 アンブレラサンプリング MD 計算の詳細

バイアスポテンシャルは 2 つの疎水性相互作用距離に掛けた, 1 つ目はシグナル配列 Leu15' の重心と Tom20 疎水性結合部位¹ の重心, 2 つ目はシグナル配列 Leu19' の重心と Tom20 疎水性結合部¹ の重心とした. それぞれの重心の計算には水素原子を含まない. この 2 つの距離で張られる 2 次元面をシグナル配列の結合様式を記述する反応座標とし

た. アンブレラサンプリング MD 計算の実行には, 2 種類の方法を試した. 1 つは各ウィンドウの MD 計算の初期構造として, 結晶構造を用いる方法 (離散的サンプリング)² であり, 他方は反応座標上で隣り合ったウィンドウの MD 計算の最終構造を用いる方法 (連続的サンプリング) である. 本論文では, 連続的サンプリングのみ記述する. 表 S-A-1-1 に系の詳細をまとめ, 表 S-A-1-2 にアンブレラサンプリング MD 計算の詳細を示した.

表 S-A-1-1 アンブレラサンプリング MD 計算の系の詳細

結合様式	全原子数	タンパク質原子数	水分子数	イオン数	water box [\AA^3]
A-pose	32,747	1,271	10,472	Na ⁺ 32 Cl ⁻ 28	68.5×68.5×68.5
Y-pose	32,747	1,271	10,472	Na ⁺ 32 Cl ⁻ 28	68.6×68.6×68.6

表 S-A-1-2 アンブレラサンプリング MD 計算の詳細

初期構造	バイアス ポテンシャル	ばね定数 [kcal/molÅ ²]	ウィンドウ数	温度[K]	計算時間[ns]
A-pose	Leu15'の重心と Tom20 結合部位の 重心間距離 Leu19'の重心と Tom20 結合部位の 重心間距離	6.0	64	300	2.5 (2.0)
Y-pose	Leu15'の重心と Tom20 結合部位の 重心間距離 Leu19'の重心と Tom20 結合部位の 重心間距離	6.0	64	300	2.5 (2.0)

括弧内の 2.0 ns は全計算時間 2.5 ns のうち解析に用いた時間を表す。最初の 0.5 ns は系の平衡化に要する時間とした。

A.1.2 アンブレラサンプリング MD 計算の解析結果

先に行った離散的サンプリングでは、すべてのウィンドウの初期構造を A-pose または Y-pose としていた。ウィンドウが結晶構造の位置から遠ければ遠いほどバイアスポテンシャルによる急激な力が掛かり、平衡状態への緩和が遅くなる問題がある。

そこで本論文で記述する連続的サンプリングでは、各ウィンドウの初期構造をそれぞれ反応座標上で隣り合ったウィンドウの MD 計算の最終構造とした。この方法ではバイアスポテンシャルが急激に掛かる悪影響を低減でき、系が平衡状態へ緩和しやすくなる。自由エネルギー地形を図 S-A-1-1 に示す。

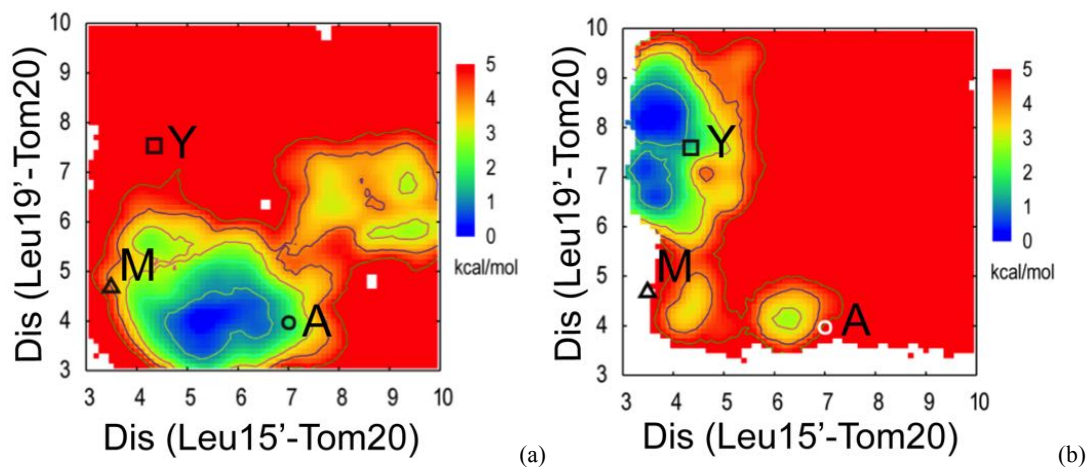


図 S-A-1-1 Tom20-シグナル配列複合体の疎水性相互作用距離の自由エネルギー地形

(a) 初期構造 A-pose, (b) 初期構造 Y-pose. 丸, 三角, 四角の印はそれぞれ結晶構造の A-pose (6.99, 3.90), M-pose (3.50, 4.74), Y-pose (4.31, 7.55) の位置を示す。等高線の間隔は 1 kcal/mol。ばね定数の単位は kcal/molÅ²。

A-pose から出発した場合、A-pose と M-pose の間の領域に自由エネルギーが小さい安定な領域が見られた。一方、Y-pose から出発した場合は、Y-pose に安定な領域が見られ、加えて M-pose と A-pose 周辺にも僅かではあるが、安定な領域が見られた。

しかし、これらの結果は初期構造が A-pose のときと Y-pose のときで自由エネルギー地形が異なっている。原因を調べるため、両者の計算結果の詳細な解析を行った。図 S-A-1-2 (A-pose), 図 S-A-1-3 (Y-pose) に示す。

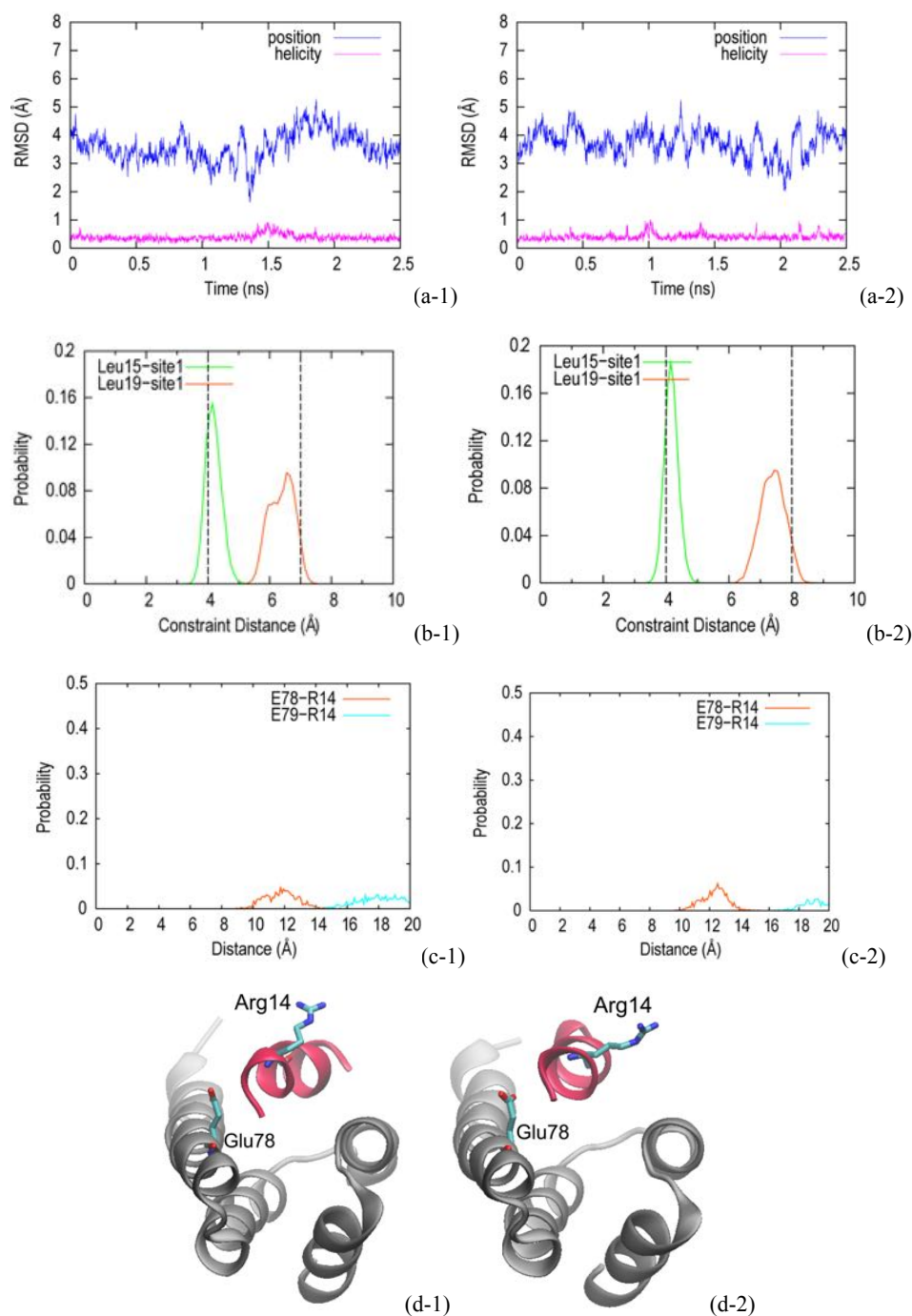


図 S-A-1-2 初期構造が A-pose のときの各ウィンドウの構造解析 (A-pose から Y-pose への遷移の場合)

(a-1) A-pose をターゲットとしたウィンドウ. MD 計算中の構造とターゲットとした A-pose 結晶構造との RMSD. (a-2) Y-pose をターゲットとしたウィンドウ. MD 計算中の構造とターゲットとした Y-pose 結晶構造との RMSD. 青はシグナル配列の Tom20 に対する結合様式の RMSD の時間変化, 紫はシグナル配列自体の helicity の RMSD の時間変化.
 (b-1) A-pose をターゲットとしたウィンドウ. バイアスポテンシャルを掛けて拘束を課した距離の分布. (b-2) Y-pose をターゲットとしたウィンドウ. バイアスポテンシャルを掛けた距離の分布. 緑は Leu15' と Tom20 結合部位との距離, オレンジは Leu19' と Tom20 結合部位との距離. 点線が指定した拘束距離を示す.
 (c-1) A-pose をターゲットとしたウィンドウ. (c-2) Y-pose をターゲットとしたウィンドウ. オレンジは Arg14' と Tom20 Glu78 との静電相互作用距離, シアンはシグナル配列 Arg14' と Tom20 Glu79 との静電相互作用距離.
 (d-1) A-pose をターゲットとしたウィンドウ. (d-2) Y-pose をターゲットとしたウィンドウ. ウィンドウの最終構造のスナップショット.

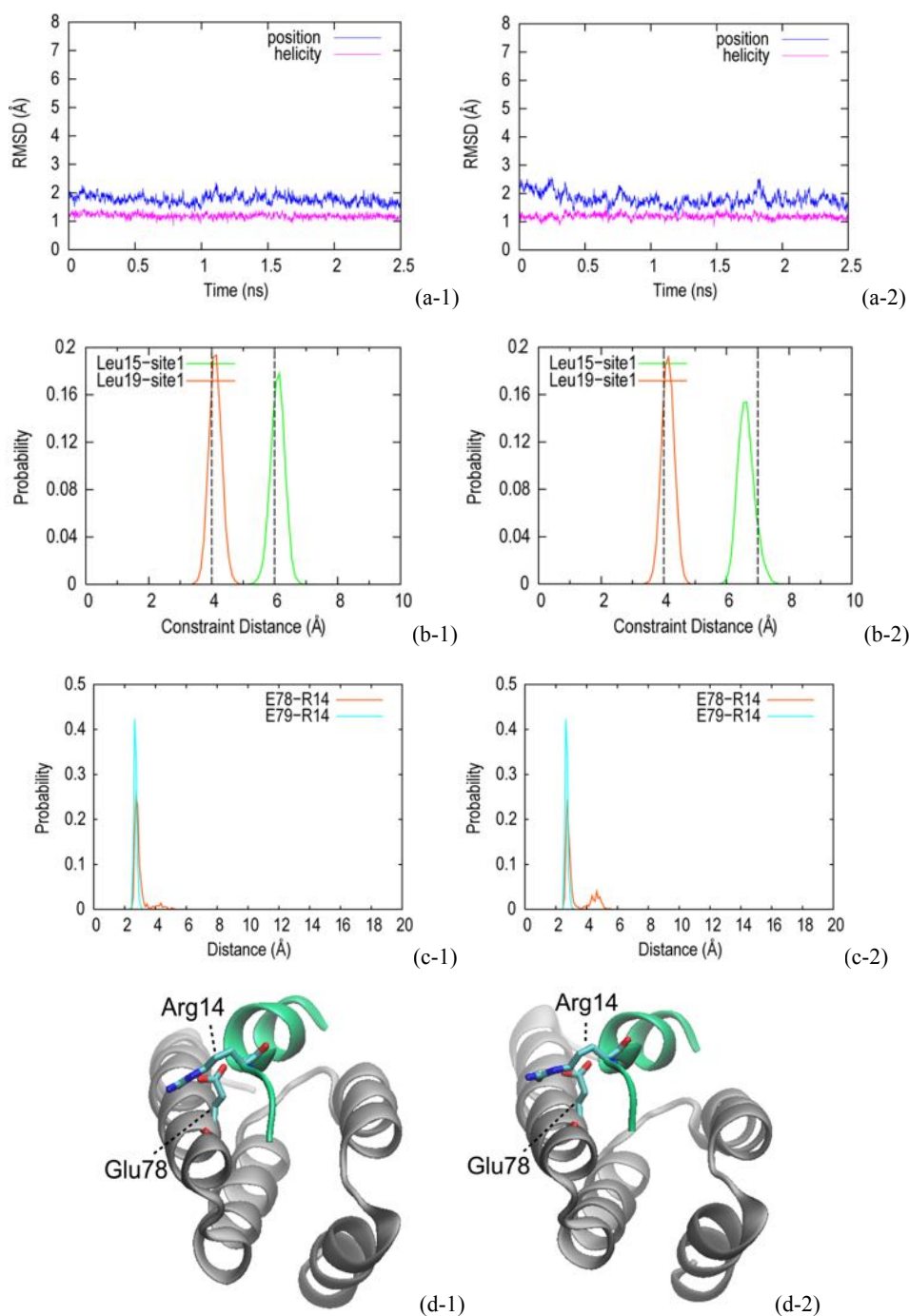


図 S-A-1-3 初期構造が Y-pose のときの各ウィンドウの構造解析 (Y-pose から A-pose への遷移の場合)

(a-1) A-pose をターゲットとしたウィンドウ. MD 計算中の構造とターゲットとした A-pose 結晶構造との RMSD. (a-2) Y-pose をターゲットとしたウィンドウ. MD 計算中の構造とターゲットとした Y-pose 結晶構造との RMSD. 青はシグナル配列の Tom20 に対する結合様式の RMSD の時間変化, 紫はシグナル配列自体の helicity の RMSD の時間変化.
 (b-1) A-pose をターゲットとしたウィンドウ. バイアスポテンシャルを掛けて拘束を課した距離の分布. (b-2) Y-pose をターゲットとしたウィンドウ. バイアスポテンシャルを掛けた距離の分布. 緑は Leu15' と Tom20 結合部位との距離, オレンジは Leu19' と Tom20 結合部位との距離. 点線が指定した拘束距離を示す.
 (c-1) A-pose をターゲットとしたウィンドウ. (c-2) Y-pose をターゲットとしたウィンドウ. オレンジは Arg14' と Tom20 Glu78 との静電相互作用距離, シアンはシグナル配列 Arg14' と Tom20 Glu79 との静電相互作用距離.
 (d-1) A-pose をターゲットとしたウィンドウ. (d-2) Y-pose をターゲットとしたウィンドウ. ウィンドウの最終構造のスナップショット.

A-pose を出発構造とした場合、ターゲットとした Y-pose との RMSD (青) から、図 S-A-1-2(a-1), (a-2) とともに Y-pose へ収束せず、ずれが大きかった。シグナル配列の helicity の RMSD (紫) を見ると、ともに非常に近い構造であった。バイアスポテンシャルを掛けた距離の分布は、図 S-A-1-2(b-1), (b-2) とともに Leu19' と Tom20 結合部位との距離が拘束距離からずれた。静電相互作用距離の分布を見ると、図 S-A-1-2(c-1), (c-2) とともに形成されなかった。Y-pose を出発構造とした場合、ターゲットとした A-pose との RMSD (青) から、図 S-A-1-3(a-1), (a-2) とともに A-pose に収束しており、シグナル配列の

helicity の RMSD (紫) はともに非常に近い構造であった。バイアスポテンシャルを掛けた距離の分布では、図 S-A-1-3(b-1) は拘束距離と一致していたが、図 S-A-1-3(b-2) は Leu15' と Tom20 結合部位間の距離がずれていた。そして、静電相互作用距離の分布から、図 S-A-1-3(c-1), (c-2) とともに Tom20 の 2 つのグルタミン酸と塩橋が形成されていた。まとめると、出発構造が A-pose と Y-pose で異なるのは、ターゲットとの RMSD と、シグナル配列-Tom20 間の塩橋形成の有無である。そこで、すべてのウィンドウを含めて静電相互作用距離の分布を取った。これを図 S-A-1-4、表 S-A-1-3 に示す。

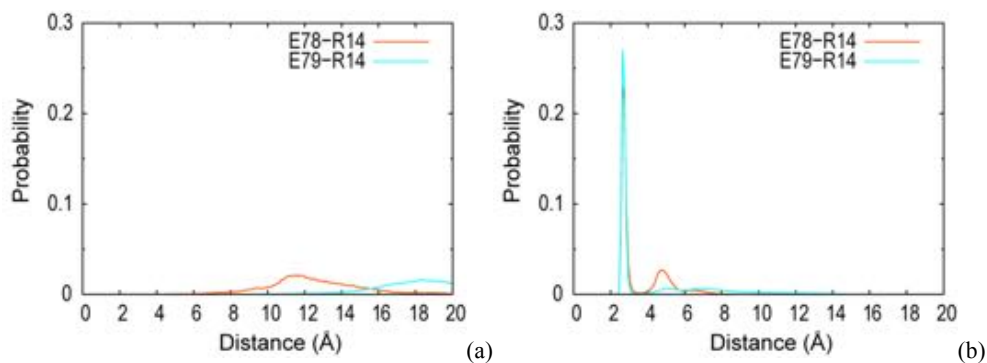


図 S-A-1-4 Tom20 とシグナル配列間の静電相互作用距離の全ウィンドウを含めた分布

(a) 初期構造 A-pose, (b) 初期構造 Y-pose. それぞれ全 64 ウィンドウを含む。オレンジはシグナル配列 Arg14' と Tom20 Glu78 との距離、シアンはシグナル配列 Arg14' と Tom20 Glu78 との距離。

表 S-A-1-3 Tom20 とシグナル配列間の静電相互作用距離の全ウィンドウを含めた分布のまとめ

初期構造	Glu78-Arg14' ($\leq 3.0 \text{ \AA}$)	Glu78 - Arg14' ($\leq 3.0 \text{ \AA}$)
A-pose	0 %	0 %
Y-pose	63.5 %	66.5 %

全ウィンドウでの分布であっても、A-pose が出発構造の場合、シグナル配列と Tom20 との間で塩橋の形成は見られなかった。一方、Y-pose の場合では Tom20 の Glu78, Glu79 との塩橋が形成された。自由エネルギー地形が両者で異なる原因はやはり、

塩橋の形成にあると考えられる。連続的サンプリングでは、初期構造とターゲットとした構造が反応座標上ですべて隣り合っている存在しているため、バイアスポテンシャルによる結合様式の変化は小さくなる。そのため、各ウィンドウでは、塩橋の

形成・不形成を含めて初期構造をそのまま引き継ぐ形となり，出発構造である A-pose, Y-pose に依存した結果になったと結論する。

A.1.3 アンブレラサンプリング MD 計算のまとめ

Tom20-プレ配列複合体に対し，アンブレラサンプリング MD 計算を実行した。各ウィンドウの初期構造を，それぞれ反応座標上で隣り合ったウィンドウの MD 計算の最終構造とする連続的サンプリングを行った。この方法であれば，塩橋形成が特定の初期構造に依らず任意に決まると思われたが，出発構造とした結晶構造によって塩橋の形成が起こり，結果として自由エネルギー地形が両者

で異なった。要因として塩橋の形成・不形成を含めて初期構造をそのまま引き継ぐ形となり，自由エネルギー地形が出発構造である結晶構造に依存した。第 III 部第 3 章の通常の MD 計算で示したように，この塩橋は 500 ns に渡って安定に形成され切断にはさらに長時間を要することが分かる。アンブレラサンプリング MD 計算では，バイアスポテンシャルによる構造変化を伴うが，本研究で行った各ウィンドウの計算時間は 2.5 ns であり，切断に要する時間として不十分である。すなわち，Tom20-シグナル配列複合体では，塩橋の形成・切断を含めた結合様式のサンプリングが必要であるため，アンブレラサンプリング MD 計算は不向きであることが分かった。

A.2 Targeted MD 計算

A.2.1 Targeted MD 計算の詳細

Targeted MD 計算は，初期構造からターゲット構造へ RMSD を反応座標として調和ポテンシャルによる遷移を実現する手法である。本研究で用いたバイスポテンシャルを式(A.2.1)に示す。系の詳細を表 S-A-2-1 に示し，Targeted MD 計算の詳細を表 S-A-2-2 に示す。

$$U = \frac{1}{2} \frac{k}{N} [RMSD(t) - RMSD^*(t)]^2 \quad (\text{A.2.1})$$

但し， k はばね定数， N は選択した原子数， $RMSD(t)$ は，現在の構造とターゲット構造との RMSD， $RMSD^*(t)$ は初期構造とターゲット構造を，指定した遷移時間で線形に結んだときの， t ステップ目に割り振った RMSD である。

表 S-A-2-1 Targeted MD 計算の系の詳細

結合様式	全原子数	タンパク質原子数	水分子数	イオン数	water box [\AA^3]
A-pose	20,292	1,271	6,327	Na ⁺ 22 Cl ⁻ 18	58.3×58.3×58.3
Y-pose	20,292	1,271	6,327	Na ⁺ 22 Cl ⁻ 18	58.3×58.3×58.3

表 S-A-2-2 Targeted MD 法の詳細

遷移方向	ばね定数 k [$\text{kcal/mol}\text{\AA}^2$]	選択原子数 N	選択原子	遷移時間[ns]
A-pose→Y-pose	200	55	Tom20 ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) プレ配列全残基	40
Y-pose→A-pose	200	55	Tom20 ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) プレ配列全残基	40

A.2.2 Targeted MD 計算の解析結果

Targeted MD 計算が正確に実行されているか確認するため、RMSD の時間変化と確率分布図を図

S-A-2-1 に示し、MD 計算の最終構造とターゲットとした構造の重ね合わせを図 S-A-2-2 に示す。

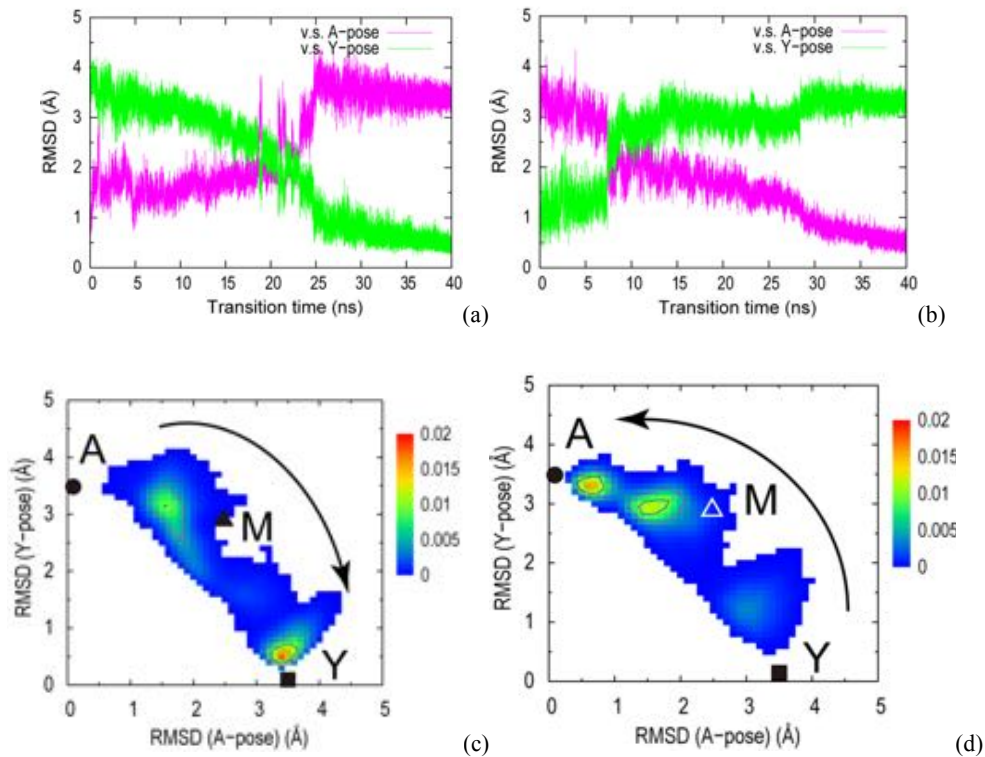


図 S-A-2-1 Targeted MD 計算におけるシグナル配列の RMSD の時間変化と確率分布

(a) シグナル配列の結合様式の RMSD 時間変化 (A-pose→Y-pose), (b) シグナル配列の結合様式の RMSD 時間変化 (Y-pose→A-pose). 横軸は遷移時間, RMSD は結晶構造の A-pose (紫) と, Y-pose (緑) に対して計算した. (c) シグナル配列の結合様式の RMSD 確率分布 (A-pose→Y-pose), (d) シグナル配列の結合様式の RMSD 確率分布 (Y-pose→A-pose). 横, 縦軸はそれぞれ A-pose, Y-pose との RMSD. 丸, 三角, 四角の印はそれぞれ結晶構造の A-pose (0, 3.45), M-pose (2.50, 2.95), Y-pose (3.45, 0) の位置を示す. 等高線の間隔は 0.005.

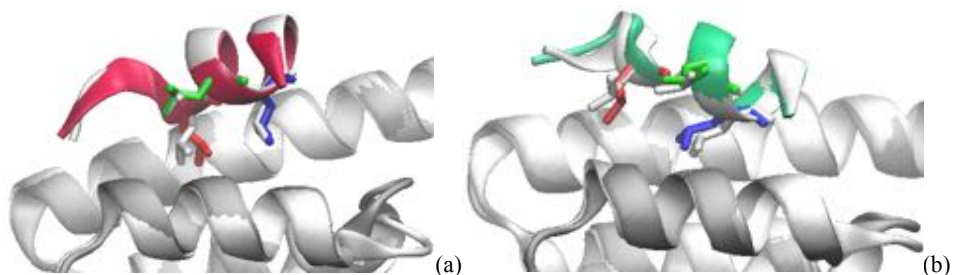


図 S-A-2-2 Targeted MD 計算の最終構造とターゲットとした構造との重ね合わせ

(a) 初期構造 A-pose とし, ターゲットを Y-pose とした Targeted MD 計算の最終構造のスナップショット. シグナル配列は最終構造を赤で表示し, ターゲット構造を白で表示した. (b) 初期構造を Y-pose とし, ターゲットを A-pose とした Targeted MD 計算の最終構造のスナップショット. シグナル配列は最終構造を緑で表示し, ターゲット構造を白で表示した. (a), (b) で両者の最終構造はターゲット構造と十分重なっていることから, シグナル配列の結合様式の遷移が実現している.

図 S-A-2-1a, b の時間変化では紫と緑の線が交差し、図 S-A-2-1c, d の確率分布でもターゲットの結晶構造へ十分接近していたことから、両方向へのシグナル配列の結合様式の遷移は十分実現されている。今回の Targeted MD 計算では、A-pose と Y-pose を線形に繋ぐバイアスポテンシャルのみ課しており、

M-pose を経由するような仮定はしていないが、確率分布の M-pose 周辺にも一定の分布が出来ていた (図 S-A-2-1d)。

次に、疎水性相互作用距離の確率分布を図 S-A-2-3 に示す。

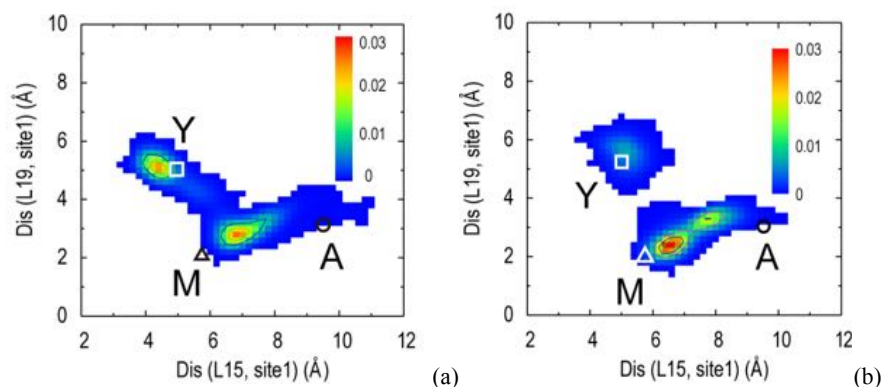


図 S-A-2-3 Tom20 とシグナル配列の疎水性相互作用距離の確率分布

(a) 確率分布 (A-pose→Y-pose), (b) 確率分布 (Y-pose→A-pose). 横, 縦軸はそれぞれシグナル配列 Leu15' と Tom20 hydrophobic site1 との距離, シグナル配列 Leu19' と Tom20 hydrophobic site1 との距離. 丸, 三角, 四角の印はそれぞれ結晶構造の A-pose (9.65, 3.11), M-pose (5.84, 2.14), Y-pose (5.06, 4.73)の位置を示す. 等高線の間隔は 0.01.

Tom20 とシグナル配列の疎水性相互作用距離の分布においても A-pose, M-pose, Y-pose を繋ぐような遷移経路が観測されており、両方向への遷移が確認できた。遷移経路上に M-pose を示す分布が見られた。遷移時間を変えた場合 (1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45 ns) でも同様の結果が得られた (data not shown)。この結果は、シグナル配列の結合様式が

A-pose と Y-pose の間で遷移する際に M-pose を経由することを示唆している。アンブレラサンプリング MD 計算と比較すると、Targeted MD 計算では初期の結合様式 (A-pose または Y-pose) に依らず、同様な遷移経路と確率分布が得られた。

最後に、シグナル配列と Tom20 の静電相互作用距離を図 S-A-2-4 に示す。

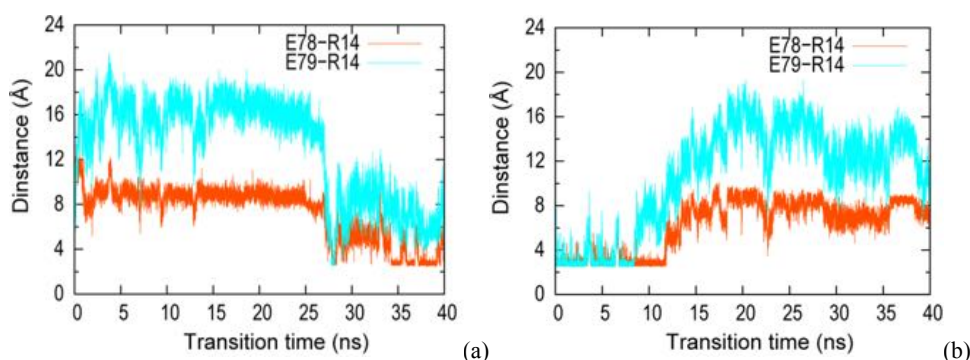


図 S-A-2-4 Tom20 とシグナル配列間の静電相互作用距離の時間変化

(a) A-pose から Y-pose へ遷移させたときの Tom20 とシグナル配列間の静電相互作用距離の時間変化. (b) A-pose から Y-pose へ遷移させたときの Tom20 とシグナル配列間の静電相互作用距離の時間変化. オレンジは Arg14' と Tom20 Glu78 との距離を示し、シアンは Arg14' と Tom20 Glu79 との距離を示す.

A-pose から Y-pose への遷移では、30 ns 付近から Arg14' と Tom20 Glu78 で塩橋が形成された. 一方、Y-pose から A-pose への遷移では、はじめ Arg14' と Tom20 の2つのグルタミン酸 (Glu78, Glu79) が塩橋を形成していたが、10 ns 付近から切断された. すなわち、両方向への遷移においてシグナル配列と Tom20 の塩橋の形成と切断の両方のサンプリングが実現していた.

A.2.3 Targeted MD 計算のまとめ

Targeted MD 計算を用いて、シグナル配列の結合様式を A-pose から Y-pose と、その反対の Y-pose から A-pose へ遷移させることができた. また複数の遷移時間の場合でも、Targeted MD 計算で事前に仮定していない M-pose 付近に一定の分布が見られたことから、両方向への遷移には、M-pose を経由することが示唆された. 遷移過程では、Tom20 と

シグナル配列の間の塩橋の形成と切断の両方がサンプリングできていたことから、両方向で同様な遷移経路と確率分布が得られたと考えられる (図 S-A-2-3). アンブレラサンプリング MD 計算と比較すると精度よく結合様式の遷移を実現できた. しかし本手法では、RMSD の反応座標上で A-pose と Y-pose を線形に繋ぐバイアスポテンシャルを課しているため、限られた構造空間でのサンプリングとなっている可能性が大きい. また、Targeted MD 計算のトラジェクトリから A-pose と Y-pose 間の自由エネルギー差の見積もりは、第 II 部第 2 章第 2.4 節で述べたように多数の MD 計算を必要とし、計算コストが非常に大きい. そのため本研究において重要な結合様式間の自由エネルギー計算には不向きであり、REMD 計算による構造サンプリングへと移行した.

A.3 Tom20 の構造揺らぎ

これまでの解析ではシグナル配列に焦点を当ててきたが、ここでは Tom20 の構造揺らぎを解析する. REMD 計算のトラジェクトリから Tom20 自身

の主成分分析を行い第 1, 第 2, 第 3 主成分軸での自由エネルギー地形と各主成分方向を図 S-A-3-1 に示す.

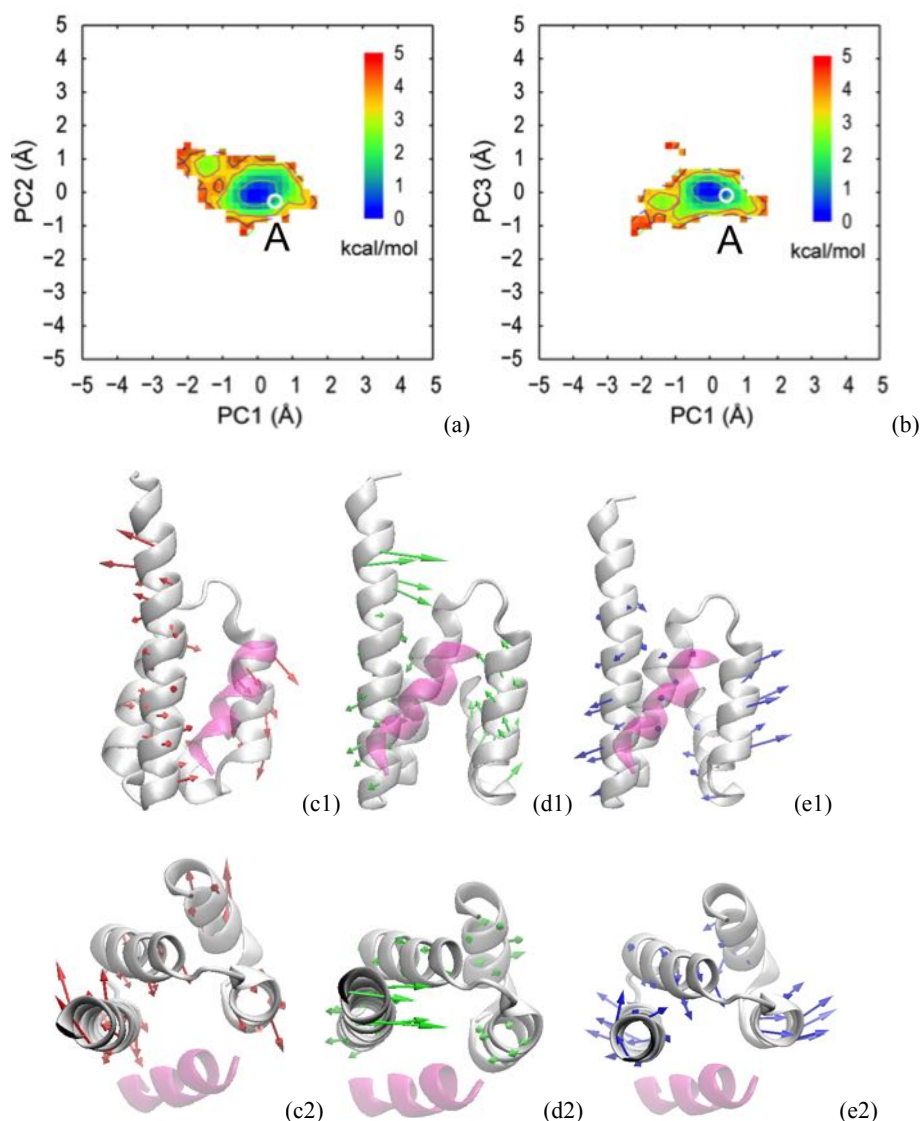


図 S-A-3-1 REMD 計算における Tom20 の主成分空間での自由エネルギー地形と主成分方向

(a) 第 1, 第 2 主成分での Tom20 の構造揺らぎの自由エネルギー地形, (b) 第 1, 第 3 主成分での Tom20 の構造揺らぎの自由エネルギー地形. 第 1, 第 2, 第 3 主成分の寄与率はそれぞれ, 30.0 %, 13.5 %, 8.55 %. 丸の印は結晶構造 (A-pose) (0.68, -0.13) の位置を示す. 等高線の間隔は 1 kcal/mol. (c), (d), (e) はそれぞれ第 1, 第 2, 第 3 主成分方向を示すベクトル. ベクトルを比較しやすいよう構造を見る方向を複数変えて示した (数字の 1, 2 で区別した). 白が Tom20, 紫がシグナル配列を表す.

自由エネルギー地形を見ると, 結晶構造 A-pose から大きな構造の変化はなく, ほぼ A-pose 近傍で揺らいでいた. また, 第 1, 第 2, 第 3 主成分の寄与率はそれぞれ, 30.0 %, 13.5 %, 8.55 % となっており, 合計しても 50 % 程度であることから Tom20 の揺らぎの異方性は小さいことが分かる. 次に

Tom20 にシグナル配列が結合した複合体と, Tom20 単体との揺らぎの差を比較するため, 結晶構造の A-pose からシグナル配列を取り除き, Tom20 単体での 500 ns の通常の MD 計算を実行した. 初期構造と 500 ns 後の最終構造を図 S-A-3-2 に示す.

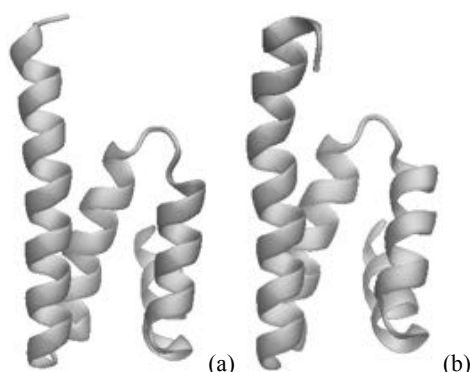


図 S-A-3-2 Tom20 単体で行った通常の MD 計算の初期構造と最終構造

(a) Tom20 単体で行った通常の MD 計算初期構造. (b) Tom20 単体で行った通常の MD 計算 500 ns 後の最終構造.

2つの構造には大きな変化は見られない. 次に得られたトラジェクトリを図 S-A-3-1 の主成分軸に射影し, 揺らぎの大きさを比較した (図 S-A-3-3). 図 S-A-3-1a, b と比較すると, 第 1, 第 2, 第 3 主成

分方向の大きさはほぼ同様であり, 揺らぎの大きさには差がない. 従って Tom20 の構造揺らぎの大きさと方向は, シグナル配列との複合体中と単体で変わらないことが分かった.

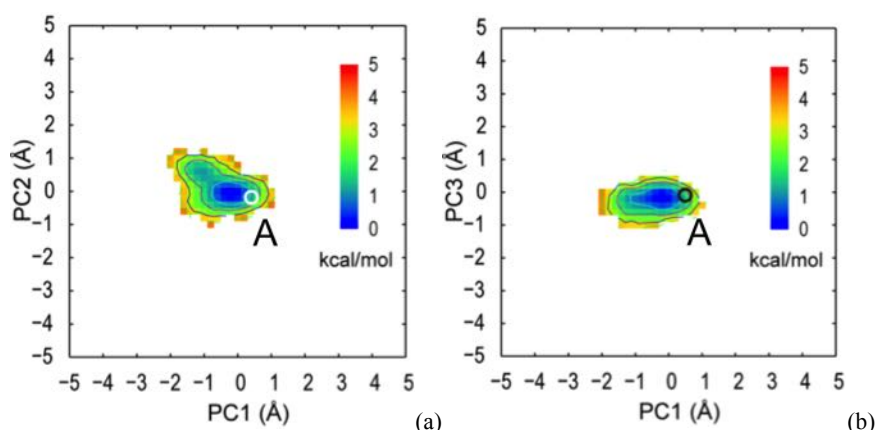


図 S-A-3-3 REMD 計算で得られた Tom20 の主成分空間に射影した Tom20 単体の通常の MD 計算 500ns の PMF 地形

(a) Tom20 単体の通常の MD 計算 500 ns の第 1, 第 2 主成分の PMF 地形. (b) Tom20 単体の通常の MD 計算 500 ns の第 1, 第 3 主成分の PMF 地形. 丸の印は結晶構造 (A-pose) (0.68, -0.13) の位置を示す. 等高線の間隔は 1 kcal/mol.

A.4 各手法と REMD 計算の結果の比較

はじめに

本研究では, さまざまな MD 計算手法を Tom20-シグナル配列複合体に適用した. 最終的に, REMD 計算が Tom20 に結合したシグナル配列の構造変化を最も広い構造空間から探索した. 本章では, REMD 計算と他の手法の結果の比較を行い, 特に

自由エネルギー地形においてどのような違いがあったのか調べた.

A.4.1 通常の MD 計算と REMD 計算の比較

REMD 計算で得られたシグナル配列の構造揺らぎの主成分軸に, 通常の MD 計算 500 ns によって

得られたトラジェクトリを射影し PMF を求めた

(図 S-A-4-1).

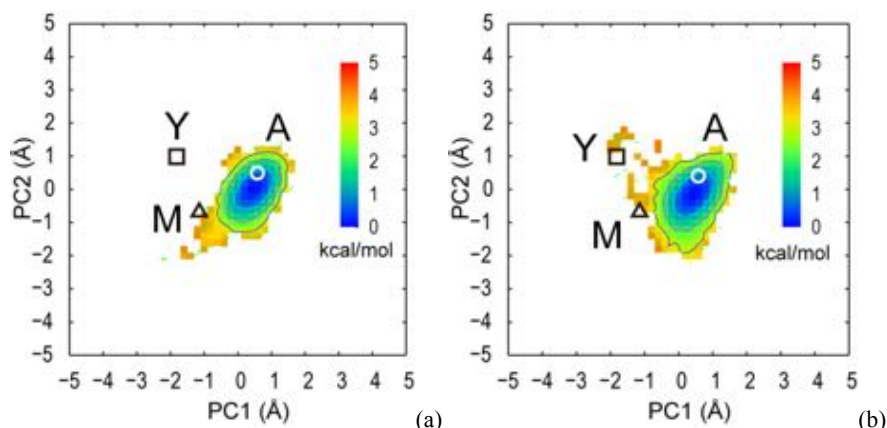


図 S-A-4-1 REMD 計算で得られたシグナル配列の主成分空間に射影した通常の MD 計算 500ns の PMF 地形

(a) MD_A のトラジェクトリを射影したシグナル配列の主成分空間の PMF, (b) MD_Y のトラジェクトリを射影したシグナル配列の主成分空間の PMF. 横軸が第 1 主成分, 縦軸が第 2 主成分. 丸, 三角, 四角の印はそれぞれ結晶構造の A-pose (0.63, 0.49), M-pose (-1.13, -0.72), Y-pose (-1.94, 1.02) の位置を示す. 等高線の間隔は 1 kcal/mol.

REMD 計算によって得られた自由エネルギー地形

(図 3-3-5-5a) と比較すると, 明らかにシグナル配列の構造揺らぎが小さく, 限られたコンフォメーションしか探索できていないことが分かる. 特に Y-pose 周辺は, 通常の MD 計算では全くサンプリングが出来ていない. これは A-pose と Y-pose の間には 3-4 kcal/mol 程度の自由エネルギー障壁が存在しており, 通常の MD 計算における 300 K のボルツマン因子に従う熱揺らぎでは, この障壁を越えられないことを示している.

A.4.2 Targeted MD 計算と REMD 計算の比較

REMD 計算で得られたシグナル配列の構造揺らぎの主成分軸に, Targeted MD 計算によって得られたトラジェクトリを射影しシグナル配列主成分の分布を求めた (図 S-A-4-2).

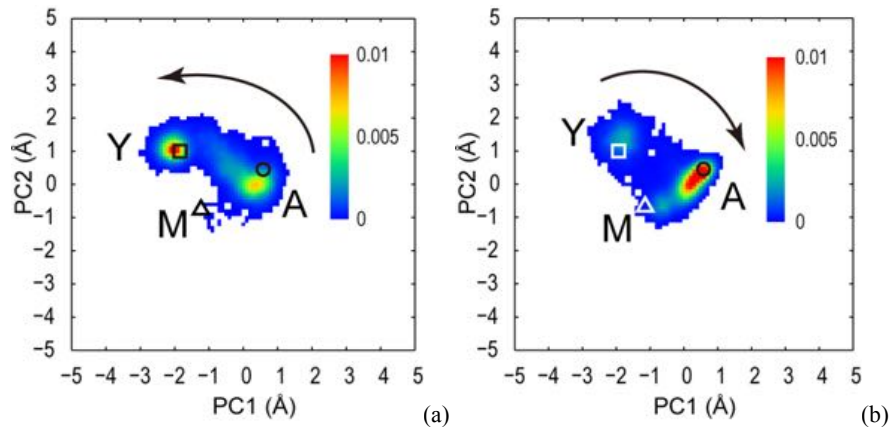


図 S-A-4-2 REMD 計算で得られたシグナル配列の主成分空間に射影した Targeted MD 計算の分布

(a) A-pose から Y-pose へ遷移させたトラジェクトリを射影したシグナル配列の主成分空間の分布. (b) A-pose から Y-pose へ遷移させたトラジェクトリを射影したシグナル配列の主成分空間の分布. 丸, 三角, 四角の印はそれぞれ結晶構造の A-pose (0.63, 0.49), M-pose (-1.13, -0.72), Y-pose (-1.94, 1.02) の位置を示す.

2つの確率分布(図 S-A-4-2a, b)を見比べると, 遷移方向によって遷移経路が異なっている. REMD 計算から, A-pose から Y-pose への遷移には, M-pose 周辺を経由する結果が得られている. 図 S-A-4-2b では M-pose 周辺に分布があるので, 経由して結合様式が遷移していたが, 図 S-A-4-2a では M-pose 周辺でのサンプリングが取れていなかった. このように Targeted MD によるサンプリングでは, 遷移方向を変更すると, 遷移経路が変わってくる. そのため, 得られた結果から対象とした系の正確な遷移経路を得るのは難しいことが分かる. ただし, 始点と終点の自由エネルギー差のみを得るのであれば, 多数の試行回数による MD 計算を必須要件として, 有用な手段となりうる場合もある³⁻⁴.

得られたトラジェクトリを射影し, PMF や分布を求めた. その結果いずれの手法も REMD 計算と比べて得られた分布が小さく, シグナル配列の構造探索が不十分であった. 従って, 溶液中において Tom20 とシグナル配列の相互作用を解析するには, REMD 計算が最も適していることが分かった.

A.4.3 各 MD 計算手法と REMD 計算の比較のまとめ

REMD 計算と種々の MD 計算手法の比較のため, REMD 計算で得られたシグナル配列の主成分空間に, 通常の MD 計算や Targeted MD 計算によって

Appendix. B 筋小胞体カルシウムポンプの その他の結果

B.1 改良した多リン酸分子力場に配位する金属イオンの影響の検証

タンパク質と Mg^{2+} のような金属イオンとの相互作用は生体反応において重要である。古典力学に基づく MD 計算においても精度の高い金属イオンの記述を目的とし、これまで多くのモデルの改良が行われてきた⁵⁻¹⁵。本研究では、MD(sim2)の結果が金属イオンの力場の影響をどの程度受けるのか検証した。MD(sim2)の系のうち Mg^{2+} と Ca^{2+} の力場のみを最新のパラメタ¹⁴に変更し、mod-C27(ATP)を用いて 20 ns の MD 計算を実行した。ヌクレオチド結合部位の構造特性の時間変化を図 S-B-1-1 に示し、20 ns 後のスナップショットを図 S-B-1-2 に示した。

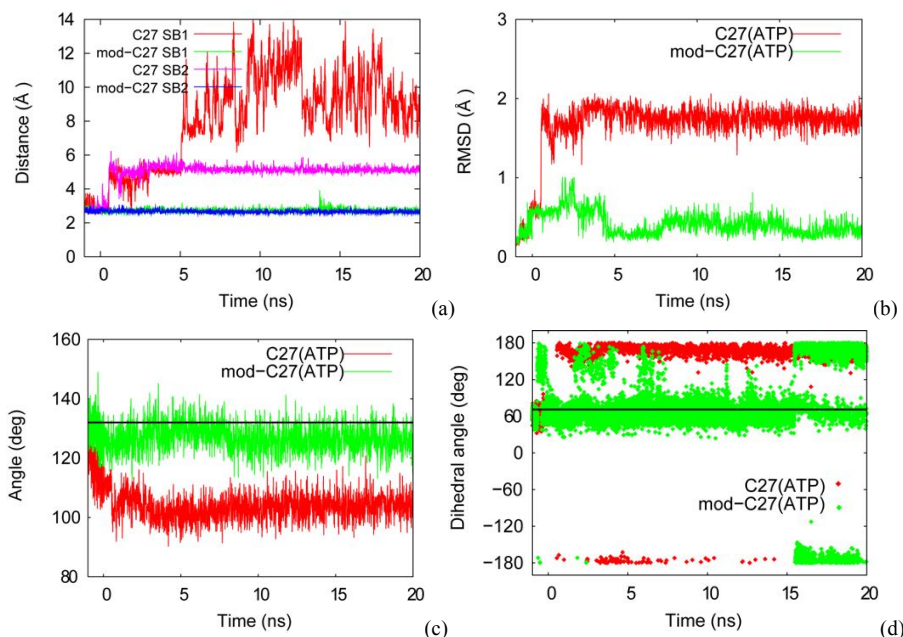


図 4-3-6-4 MD(sim2)のうち Mg^{2+} と Ca^{2+} を最新の力場¹⁴ に変えた MD 計算のヌクレオチド結合部位の構造特性の時間変化

(a) 2つの塩橋を SB1 と SB2 とした結合長の時間変化. SB1=ATP α リン酸基-Arg489 (赤: C27(ATP), 緑: mod-C27(ATP)), SB2= ATP β リン酸基-Arg560 (ピンク: C27(ATP), 青: mod-C27(ATP)). (b) トリリン酸部分の RMSD の時間変化, トリリン酸中の PA, PB, PG の 3 原子でフィッティングを行った. (c) Bond angle PA-O3A-PB の角度の時間変化. (d) Dihedral angle O5'-PA-O3A-PB の角度の時間変化. (b)-(d)では, 赤: C27(ATP), 緑: mod-C27(ATP). (c), (d)では黒の実線が X 線結晶構造の値を示す.

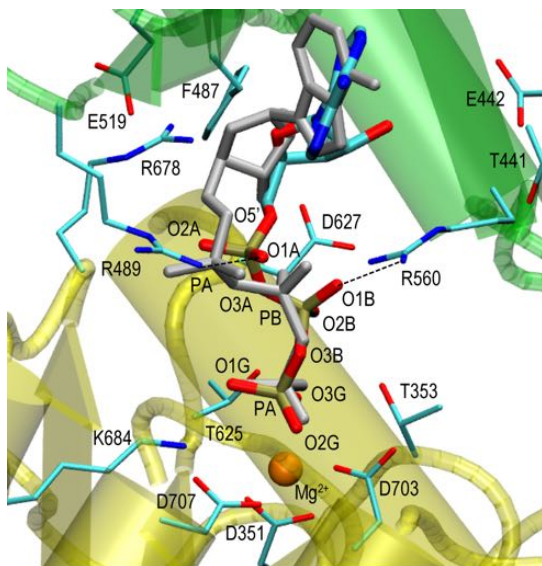


図 4-3-6-5 MD(sim2)のうち Mg^{2+} と Ca^{2+} を最新の力場¹⁴ に変えた MD 計算のヌクレオチド結合部位のスナップショット

比較のため X 線結晶構造の ATP (グレー) を示した. N ドメイン (緑) と P ドメイン (黄色) を表示した. P ドメインでフィッティングを行ってから結晶構造と重ね合わせた. 図をわかりやすくするため溶媒の水分子は除いて表示した.

MD(sim2)のうち, Mg^{2+} と Ca^{2+} に最新の力場パラメタ¹⁴ を用いた MD 計算では, ATP はアデニン環とリボースが若干回転したものの, ほぼ X 線結晶構造と同じコンフォメーションが観測された. MD 計算中の構造の時間変化も, Mg^{2+} と Ca^{2+} に従来^{5, 13} の力場パラメタを用いていた場合 (図 4-3-6-2) と同じ傾向を示していた. 従って, mod-C27(ATP)は金属イオン (Mg^{2+} , Ca^{2+}) の力場に依存せず, カルシウムポンプと ATP の相互作用を十分精度よくモデリングできていることが示された.

B.2 カルシウムポンプの結晶化条件の塩濃度

ATP 結合状態と ADP 結合状態のカルシウムポンプについて、結晶化条件における塩濃度を表 S-B-2-1a-e に示す。

表 S-B-2-1 カルシウムポンプの結晶化条件における塩濃度

(a) E1.ATP 状態の結晶化条件下の塩濃度		
塩	E1.AMPPCP ¹⁶ (mM)	E1.AMPPCP ¹⁷ (mM)
AMPPCP	0.5	1.0
CaCl ₂	10	10
MgCl ₂	5.0	3.0
NaN ₃	2.5	-
KCl	-	80

(b) E1P.ADP 状態の結晶化条件下の塩濃度		
塩	E1.AIF ₄ ⁻ .ADP ¹⁸ (mM)	E1.AIF ₄ ⁻ .ADP ¹⁷ (mM)
ADP	0.3	1.0
CaCl ₂	3.0	10
MgCl ₂	1.0	3.0
NaN ₃	2.5	-
KCl	-	80
NaF	6.0	5.0
AlCl ₃	2.0	0.33

(c) E2.ATP 阻害状態の結晶化条件下の塩濃度	
塩	E2.ATP(TG inhibition) ¹⁹ (mM)
ATP	10
Ca ²⁺	1.0
TG	30 μM
Mg ²⁺	11
NaN ₃	2.5

TG=thapsigargin

(c) E2.AMPPCP 阻害状態の結晶化条件下の塩濃度	
塩	E2.AMPPCP(TG inhibition) ²⁰ (mM)
AMPPCP	1.0
ATP	10
MgCl ₂	3.0
TG	125 μM
KCl	80

TG=thapsigargin

(d) E2.TNP-ATP 阻害状態の結晶化条件下の塩濃度	
塩	E2.TNP-ATP(TG inhibition) ¹⁹ (mM)
TNP-ATP	10
Ca ²⁺	1.0
TG	30 μM
Mg ²⁺	11
NaN ₃	2.5

TG=thapsigargin, TNP= trinitrophenyl

(e) E2.TNP-AMP 阻害状態の結晶化条件下の塩濃度	
塩	E2.TNP-AMP(TG inhibition) ¹⁹ (mM)
TNP-AMP	2.5
Ca ²⁺	1.0
TG	30 μM
Mg ²⁺	3.5
NaN ₃	2.5

TG=thapsigargin, TNP= trinitrophenyl

Appendix. A, B の引用文献

1. Saitoh, T.; Igura, M.; Obita, T.; Ose, T.; Kojima, R.; Maenaka, K.; Endo, T.; Kohda, D., Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* **2007**, *26*, 4777-4787.
2. 小室靖明, 分子動力学によるミトコンドリア外膜受容体 Tom20 のプレ配列認識機構の解析. 中央大学修士論文 **2011 年度**, 1-140.
3. Liphardt, J.; Dumont, S.; Smith, S. B.; Tinoco, I.; Bustamante, C., Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of Jarzynski's equality. *Science (New York, N.Y.)* **2002**, *296*, 1832-1835.
4. Collin, D.; Ritort, F.; Jarzynski, C.; Smith, S. B.; Tinoco, I.; Bustamante, C., Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies. *Nature* **2005**, *437*, 231-234.
5. Åqvist, J., Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8021-8024.
6. Beglov, D.; Roux, B., Finite representation of an infinite bulk system: solvent boundary potential for computer simulations. *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 9050-9063.
7. Babu, C. S.; Lim, C., Theory of ionic hydration: insights from molecular dynamics simulations and experiment. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 7958-7968.
8. Sakharov, D. V.; Lim, C., Zn protein simulations including charge transfer and local polarization effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4921-4929.
9. Babu, C. S.; Lim, C., Empirical force fields for biologically active divalent metal cations in water. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 691-699.
10. Jiao, D.; King, C.; Grossfield, A.; Darden, T. A.; Ren, P., Simulation of Ca^{2+} and Mg^{2+} solvation using polarizable atomic multipole potential. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 18553-18559.
11. Oelschlaeger, P.; Klahn, M.; Beard, W. A.; Wilson, S. H.; Warshel, A., Magnesium-cationic dummy atom molecules enhance representation of DNA polymerase β in molecular dynamics simulations: Improved accuracy in studies of structural features and mutational effects. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 687-701.
12. Neves, R. P. P.; Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J., Parameters for molecular dynamics simulations of manganese-containing metalloproteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 2718-2732.
13. Allnér, O.; Nilsson, L.; Villa, A., Magnesium Ion-Water Coordination and Exchange in Biomolecular Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 1493-1502.
14. Li, P.; Roberts, B. P.; Chakravorty, D. K.; Merz, K. M., Jr., Rational Design of Particle Mesh Ewald Compatible Lennard-Jones Parameters for +2 Metal Cations in Explicit Solvent. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 2733-2748.
15. Li, P.; Merz, K. M., Jr., Taking into Account the Ion-induced Dipole Interaction in the Nonbonded Model of Ions. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 289-297.
16. Toyoshima, C.; Mizutani, T., Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **2004**, *430*, 529-535.
17. Sørensen, T. L.-M.; Møller, J. V.; Nissen, P., Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* **2004**, *304*, 1672-1675.
18. Toyoshima, C.; Nomura, H.; Tsuda, T., Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* **2004**, *432*, 361-368.
19. Toyoshima, C.; Yonekura, S.; Tsueda, J.; Iwasawa, S., Trinitrophenyl derivatives bind differently from parent adenine nucleotides to Ca^{2+} -ATPase in the absence of Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2011**, *108*, 1833-1838.
20. Jensen, A.-M. L.; Sørensen, T. L.-M.; Olesen, C.; Møller, J. V.; Nissen, P., Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. *EMBO J.* **2006**, *25*, 2305-2314.

Appendix. C 記号・略号一覧

C.1 アミノ酸の略号

略号	英語表記	日本語表記
A, Ala	alanine	アラニン
C, Cys	cysteine	システイン
D, Asp	aspartic acid	アスパラギン酸
E, Glu	glutamic acid	グルタミン酸
F, Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
G, Gly	glycine	グリシン
H, His	histidine	ヒスチジン
I, Ile	isoleucine	イソロイシン
K, Lys	lysine	リジン
L, Leu	leucine	ロイシン
M, Met	methionine	メチオニン
A, Asn	asparagine	アスパラギン
P, Pro	proline	プロリン
Q, Gln	glutamine	グルタミン
R, Arg	arginine	アルギニン
S, Ser	serine	セリン
T, Thr	threonine	スレオニン
V, Val	valine	バリン
W, Trp	tryptophan	トリプトファン
Y, Tyr	tyrosine	タイロシン

C.2 その他の略号

略号	英語表記	日本語表記
ATP	adenosine 5'-triphosphate	アデノシン 5'-三リン酸
ADP	adenosine 5'-diphosphate	アデノシン 5'-二リン酸
AMPPCP	adenylyl 5'-(beta,gamma-methylene)diphosphonate	-
MD	molecular dynamics	分子動力学
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴
RMSD	root-mean-square deviation	-
PMF	potential of mean force	平均力ポテンシャル
PCA	principal component analysis	主成分分析
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase	筋小胞体カルシウムポンプ
Tom20	translocase of the outer mitochondrial membrane, 20kDa	ミトコンドリア外膜透過装置, 20 kDa

Appendix. D 研究業績

D.1 査読論文

1. Yasuaki Komuro, Naoyuki Miyashita, Takaharu Mori, Eiro Muneyuki, Takashi Saitoh, Daisuke Kohda, and Yuji Sugita, "Energetics of the Presequence-Binding Poses in Mitochondrial Protein Import Through Tom20.", *J. Phys. Chem. B* (2013) **117**:2864–2871.
2. Yasuaki Komuro, Suyong Re, Chigusa Kobayashi, Eiro Muneyuki, and Yuji Sugita, "CHARMM Force-Fields with Modified Polyphosphate Parameters Allow Stable Simulation of the ATP-Bound Structure of Ca²⁺-ATPase.", *J. Chem. Theory Comput.* (2014) **10**:4133–4142.

D.2 研究歴

1. 2009 年 5 月–2011 年 3 月 理化学研究所 基幹研究所 杉田理論生物化学研究室 研修生
2. 2011 年 4 月–2012 年 3 月 理化学研究所 基幹研究所 杉田理論生物化学研究室 研究補助パートタイマー
3. 2012 年 3 月–2014 年 3 月 理化学研究所 杉田理論分子科学研究室 大学院生リサーチ・アソシエイト (JRA)
4. 2014 年 4 月–2015 年 3 月 日本学術振興会 特別研究員 (DC2)

D.3 受賞

1. 3rd International Conference on Molecular Simulation 学生優秀発表賞 (2013 年 11 月)
2. 理化学研究所 野依理事長感謝状 (2014 年 1 月)
3. 第 14 回日本蛋白質科学会年会 ポスター賞 (2014 年 6 月)
4. 理化学研究所 野依理事長感謝状 (2015 年 1 月)

謝辞

宗行英朗教授には、研究を行う上で細部にとらわれない本質を見抜く力を教えていただきました。研究発表に限らず、ものごとを相手にわかりやすく伝えるとはどういうことかを指導していただきました。学外との交流が盛んな宗行研に入ったことで、多くの研究者を知り、幅広い研究を学ぶ機会を得ました。そして何よりも、どんと背中を押されるような元気の出る言葉をこれまで数多く掛けていただきました。学部4年次から博士課程まで指導をしていただいたことに深く感謝いたします。

理化学研究所の杉田有治主任には、学部4年次から快く研究室に受け入れてくださり、これ以上ない恵まれた環境を提供していただきました。学術研究をするとはどういうことか、論文にまとめるとはどういうことかを、多忙な日々の合間を縫って指導をしていただきました。研究の方針について夜遅くまで議論をしていただき、また私の進路についても親身になって考えてくださいました。学部4年次から博士課程まで素晴らしい研究環境をいただき、一貫して熱心な指導と温かい励ましを常にいただいたことに深く感謝の気持ちを申し上げます。誠にありがとうございました。

理研の李秀栄博士には、これまで数えきれない多くの議論や相談をしていただき、議論のたびに研究へ向かう熱意が湧いてきました。いつも気に掛けてくださり、温かく話を聞いてくださったことに心から感謝いたします。八木清博士には、学振の書類を何度も添削していただき、どのような研究に意義があり、それをどのように論理的な文章で表現するのかについて多くの時間を使って指導をしていただきました。ご指導をいただいたことに深く感謝いたします。小林千草博士にはカルシウムポンプのMD計算のセットアップや解析方法、また GENESIS のプログラムや計算機の使い方について多くのことを指導していただきました。森貴治博士には Tom20 の MD 計算のセットアップや GENESIS の構成について多くのことを指導していただきました。宮下尚之博士には Tom20 の REMD 計算結果について多くの議論をしていただきました。今井隆志博士には液体論について議論していただきました。松永康佑博士にはストリング法について多くの時間を割いて共同作業と議論をしていただきました。プログラムの実装を行えたことは、研究における大きな自信となりました。水上渉博士には QM/MM 法についてご指導と議論をしていただきました。これらのことに深く感謝いたします。優乙石博士、二島渉博士、大滝大樹博士、Jaewoon Jung 博士、安藤格士博士、柏原裕美博士、原田隆平博士、小串典子博士には、これまでの各人のキャリアの中で行われた研究成果を教えていただきました。知見が広まると同時に、ものごとを理解する視座の多様さを学ぶ機会となりました。ご指導と議論をいただき誠にありがとうございました。

九州大学・生体防御医学研究所の神田大輔教授と齊藤貴士博士には、Tom20 研究について班会議から論文執筆まで多くの議論をしていただきました。私のような一学生に大切な時間を割いていただき丁寧に実験内容等の議論を重ねることができたことは大変に貴重な勉強となりました。誠に感謝申し上げます。

中央大学の上野博史博士には、タンパク質の考察とはどういうものかを議論する中でご指導いただきました。特に計算の結果をどのように検証できるのかを、実験技術を例に取って教えていただきました。鳥

谷部祥一博士には、問題の捉え方から手法開発まで研究に向かう姿勢を学ばせていただき、その背中に大きく影響を受けました。これらのことに深く感謝いたします。

最後にこれまでの長きに渡る学生生活を支援して下さった両親に心から感謝の気持ちを申し上げます。

2015 年 3 月

小室靖明