

# 生体分子ダイナミクスの高解像度解析を実現する「4次元イメージング法」の確立

所属：東北大学 大学院工学研究科 応用物理学専攻

助成対象者：吉留 崇

共同研究者：

## 概要

タンパク質の低温電子顕微鏡実験データ（タンパク質の2次元投影像）を用いて、タンパク質の3次元構造変化をイメージングする「4次元イメージング法」を確立することを目的として研究を行った。アデニル酸キナーゼの低温電子顕微鏡実験を想定したシミュレーションを通して、以下の手順で4次元イメージングを構築できることを提案した：(1) マニフォールド学習を用いてアデニル酸キナーゼの2次元投影像を構造変化に応じて並べ替える、(2) アデニル酸キナーゼの分子動力学シミュレーションで得られた構造アンサンブルを用いて、各2次元投影像に対応する立体構造を推定する、(3) (2)で得られた立体構造と(1)で得られた2次元投影像の並べ替え結果を用いて、3次元構造変化を得る。

## abstract

We proposed a method for reconstructing a protein conformational change from cryo-electron microscopy experimental data, referred to as the “four-dimensional imaging technique”. It was found through a simulation for a cryo-electron microscopy experiment of adenylate kinase that its conformational change can be reconstructed through the following procedure: (1) cryo-electron microscopy experimental data (two-dimensional electron density

maps) were arranged in accordance with the conformational change using the manifold learning; (2) using molecular dynamics simulation data of adenylate kinase, the conformation corresponding to a two-dimensional electron density map was obtained; and (3) using the obtained conformations and the result of the manifold learning, the protein conformational change was reconstructed.

## 研究内容

近年の低温電子顕微鏡実験の技術発展により、4次元イメージング（3次元構造の変化をイメージングする事）の可能性が指摘されている[1]。この実験では、多数の粒子を用意し、それぞれに電子線を照射して、2次元投影像（実験投影像）を得る。粒子ごとに電子線に対する配向と粒子の構造が異なるので、原理的には低温電子顕微鏡実験データを用いて4次元イメージングが可能である。4次元イメージングが可能になれば、粒子の構造変化を原子レベルで可視化する斬新な視点から、生物物理学や細胞生物学における難問が解明できると期待される。

本研究では、4次元イメージング法を確立することを目的として研究を行った。その結果、タンパク質の低温電子顕微鏡実験、分子動力学（MD）シミュレーション、マニフォールド学習を組み合わせた4次元イメージング法を提案した[2]。提案した方法は、

- (1) マニフォールド学習を用いて実験投影像を構造変化に応じて並べ替える、
  - (2) MDシミュレーションを行い、サンプリングした構造を用いて2次元投影像（「計算投影像」と呼ぶ）を作成、
  - (3) 実験投影像と相関最大となる計算投影像を選ぶ、
  - (4) 対応する立体構造（フィット構造）を実験投影像の順番に並べる、
- である。

本研究では、低温電子顕微鏡実験を想定したシミュレーションを行い、提案した4次元イメージング法の妥当性を議論した。タンパク質としてオープン状態とクローズド状態の2状態を有するアデニル酸キナーゼを用いた。シミュレーションでは、まず計算機上でオープン状態からクローズド状態に強制的に構造変化させ、オープン状態、クローズド状態、構造変化途中の状態（In-between、IB状態）の実験投影像を作成した。その際、簡単なた

めに投影方向は1つに固定した。また、実験投影像には水に起因するノイズを加え、実験データに近い投影像を作成した。その後、提案した4次元イメージング法を適用してアデニル酸キナーゼの構造変化を再構成した。その際、マニフォールド学習の手法として、Isomap法[3]を用いた。

アデニル酸キナーゼの構造変化を再構成した結果を図1に示す。図の横軸は、4次元イメージング法の手順(1)をIsomap法で行って得られた座標軸である。各点は実験投影像に対応しており、点の色の違いは状態の違いを表す。点がクローズド状態(赤点)、IB状態(緑点)、オープン状態(青点)の順番に並んでいることから、Isomap法を用いて実験投影像を構造変化の違いに応じて並べ替えることができた。また、図1には、実験投影像の作成に用いた「正解構造」もいくつか示している。正解構造には、4次元イメージング法の手順(3)で得られたフィット構造を重ね合わせている。図から、フィット構造は正解構造に近いことが分かる。さらに図1に、フィット構造と正解構造の間の平均自乗偏差(RMSD)をタンパク質のC $\alpha$ 原子に対して計算し、それをIsomap法で得られた座標軸に対してプロットした。ほとんどのフィット構造のRMSDは3Å未満であり、この結果は4次元イメージング法の手順(3)で3次元立体構造を正しく推定できていることを意味する。最後に、オープン状態からクローズド状態への構造転移が起こっているかどうかを明らかにするために、クローズド状態の立体構造からのRMSDとオープン状態の立体構造からの

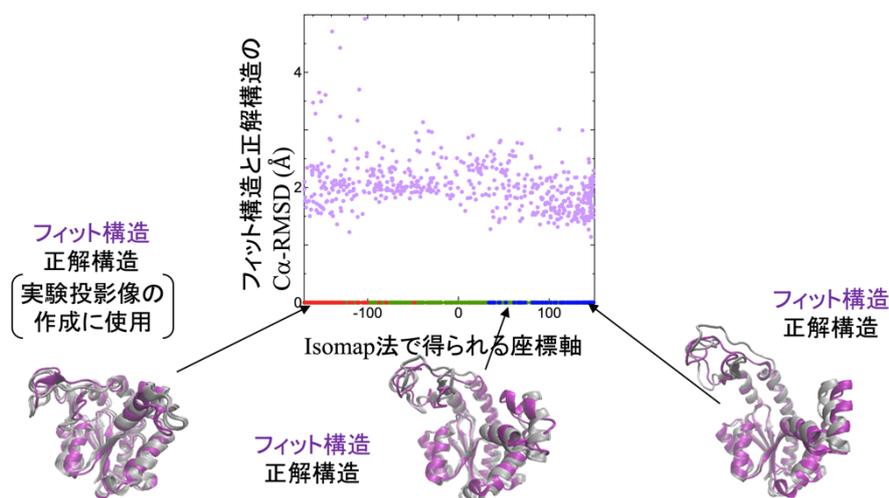


図1 アデニル酸キナーゼの4次元イメージングの結果。横軸はIsomap法で得られる座標軸、縦軸はフィット構造(4次元イメージング法の(3)で得られた構造)と正解構造(実験投影像作成に用いた構造)との間の平均自乗偏差(RMSD)。図には、フィット構造と正解構造を重ね合わせたものも示している。

RMSD を Isomap 法で得られた座標軸に対してプロットした (図 2)。Isomap 法で得られた座標軸における値が増大するにつれて、クローズド状態の立体構造からの RMSD が増大し、一方でオープン状態の立体構造からの RMSD が減少していることが分かる。この結果はオープン状態からクローズド状態 (またはその逆) への構造変化が起こっていることを意味しており、アデニル酸キナーゼの構造変化を再現することに成功した。以上より、提案した方法を用いて 4 次元イメージングを行うことに成功した。

今後は、複数の投影方向から得られた実験投影像を用いた 4 次元イメージング法を確立し、実際の低温電子顕微鏡実験データへ応用する。

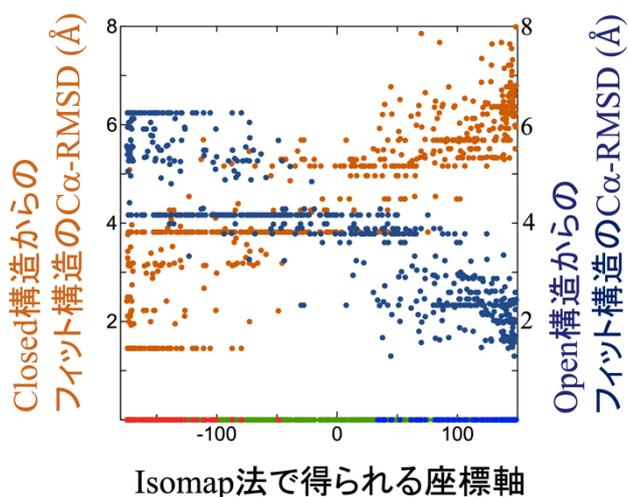


図 2 Isomap 法で得られる座標軸に対して、クローズド状態の立体構造からの RMSD と、オープン状態の立体構造からの RMSD をプロットしたものの。

#### 引用文献

- [1] J. Frank and A. Ourmarzd, *Methods* **100**, 61 (2016).
- [2] T. Yoshidome, *J. Comput. Chem.*, **45**, 738 (2024).
- [3] J. B. Tenenbaum, V. de Silva, and J. C. Langford, *Science*, **290**, 2319 (2000).

#### 本助成に関わる成果物

##### [論文発表]

- Takashi Yoshidome, “Four-Dimensional Imaging for Cryo-Electron Microscopy Experiments Using Molecular Simulations and Manifold Learning”, *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 45, pp. 738-751 (2024).

##### [口頭発表]

- 吉留 崇、“分子シミュレーションと低温電子顕微鏡実験を用いた 4 次元イメージング法の構築”、第 37 回分子シミュレーション討論会、福井県県民ホール、2023 年 12 月 5 日
- 吉留 崇、“低温電子顕微鏡 4 次元イメージング法の提案”、日本物理学会第 78 回年次大会、東北大学、2023 年 9 月 16 日
- Takashi Yoshidome, “A Four-Dimensional Imaging Technique for Cryo-Electron Microscopy Experiment”, 34th IUPAP Conference on Computational Physics, Kobe, Japan, 2023/8/7.

[ポスター発表]

- Takashi Yoshidome, “Four-Dimensional Imaging Technique to Reconstruct Protein Conformational Change Using Cryo-Electron Microscopy Experiment”, The 68th Biophysical Society Annual Meeting, Pennsylvania, USA, 2024/2/13.

[その他]