

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「計測技術と高度情報処理の融合による
インテリジェント計測・解析手法の開発と応用」
研究課題「高速原子間力顕微鏡 1 分子計測の
データ同化による生体分子 4 次元構造解析法の
開発」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2024年03月

研究代表者：高田 彰二
(京都大学 大学院理学研究科 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) は、わが国で開発され、単一のタンパク質や DNA 分子の 3 次元構造の経時変化 (4 次元構造) を観察できる唯一の計測技術である。中程度の分解能をもつ高速 AFM 計測から高精度情報を得るために情報科学との融合研究が必要である。本研究は、データ同化と分子シミュレーション法によって高速 AFM 計測からの生体分子の高精度 4 次元構造解析法を開発し、同時に高速 AFM 計測装置のさらなる高速化・高機能化を実現し、それらを適用して創薬開発に貢献することを目指した。

具体的に、3 つの情報科学的項目 1~3、計測技術開発の項目 4、および 2 つの細胞生物学課題への適用の項目 5,6 の合計 6 研究項目について、互いに連携させながら研究を実施した。

- 1) 高速 AFM で得られた静止像に対して、適合する 3 次元分子構造モデルを求める方法をベイズ統計の枠組みによって構築し、実データに適用した。既存のタンパク質データベースからの構造情報及び高精度モデルによる分子動力学シミュレーションから質の高い事前確率を得ることで、AFM 画像による分子表面情報のみを尤度として利用することで、高精度な事後確率・AFM 画像に適合する 3 次元分子構造モデルを推定することが可能であることを示した (高田)。また同手法を項目 5, 6 のコンデンシン、MyD88、FlhA 等に適用した (高田、古寺、朽尾)。
- 2) 走査型顕微鏡である高速 AFM 動画に含まれる非斉時性 (時差) に着目し、データ同化・カルマン平滑化を適用して非斉時性を解消する方法論を開発し、実データに適用しその有効性を示した (高田、古寺)。また、機械学習で開発されたツールを利用して高速 AFM 画像のみから任意の探針形状を推定できるエンドツーエンド微分可能な探針形状再現法を開発し、実データに適用した。この方法により AFM 画像から分子表面情報を従来よりも高精度に得ることができることを示した (松永、高田)。
- 3) データ同化・粒子フィルタ法および隠れマルコフ法それぞれによって、高速 AFM 動画と分子シミュレーションのデータ同化を行う方法論を開発し、双子実験によって時空間高分解能構造情報が得られることを確認し、さらに隠れマルコフ法をモーター蛋白質・ミオシン V の歩行運動の実 AFM 動画に適用し高精度 4 次元構造を推定することに成功した。また、AFM 動画から分子運動の未知パラメータの推定が (少数であれば) 可能であることを示した (高田、松永)。
- 4) 高速 AFM の時間分解能の向上のために、超高速 Z スキャナー (Z-SB と呼ぶ) の開発 (特許出願)、振幅計測器 (DB-A² と呼ぶ) の開発 (特許出願)、超小型カンチレバーの開発、Z スキャナーの共振周波数制御回路 (Reso-con) の開発 (特許出願)、高速 AFM 実機への導入を実施し、AFM 計測全体として従来型 (約 70kHz) の 7~8 倍の時間分解能向上 (約 520 kHz) を達成した (古寺)。
- 5) 高速 AFM の細胞生物学的課題への応用を進めた。主な成果として、クロマチン動態に関して、染色体構造形成で中心的役割を持つ SMC タンパク質 (コンデンシンおよびコヒーシン) の構造・動態計測とデータ同化による構造モデル構築に成功した (朽尾、古寺、高田)。また自然免疫系のシグナル伝達の足場タンパク質 MyD88 の動態計測と分子シミュレーションによる解析を実施した (朽尾、古寺、高田)。さらに細菌鞭毛の輸送装置 FlhA のリング構造等さまざまなタンパク質動態を観察することに成功した (古寺)。
- 6) クロマチン動態に関して、SMC タンパク質・コンデンシンの運動の 1 分子蛍光イメージングに成功し、DNA 張力依存的な運動様式変化を発見した。コンデンシンは DNA 上を、高張力では低速モード、低張力では高速と低速の 2 つのモードで進むことを見出した。また高速モードのときのみ DNA 上の障害物 (ヌクレオソーム) を乗り越えた。これらは DNA ループ捕捉モデルを強く支持するものである (朽尾)。また、5 で得られた高速 AFM データをもとに、細菌 SMC タンパク質について分子シミュレーションを行い、DNA ループ捕捉モデルを示

唆する運動を見出した(高田)。

- 7) 本研究課題 1~3 で開発した様々な高速 AFM データ情報計測法を多くの AFM 実験研究者に利用可能とするための統合解析プラットフォームを構築することを目標として、1 年間研究期間を延長し、プラットフォームを構築した。統合解析プラットフォームは、AFM 像から分子表面への変換、分子表面から AFM 像への変換、エンドツーエンド微分可能な探針形状再構成法、パラシューディング自動検出、ステージ表面検出、断面表示、タンパク質構造モデルの AFM 像への適合、等の機能を有する。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要: モータータンパク質ミオシン V が、ATP 加水分解と共役してアクチン線維上を歩行する運動について、分子シミュレーションデータを用いてマルコフモデルを構築したうえで、高速 AFM 動画データによるデータ同化(隠れマルコフモデル)を行い、高精度 4 次元構造を推定することに成功した。また、最尤推定により、化学反応パラメータを推定できることを示した。これにより分子動力学シミュレーションを高速 AFM データに同化させて、高精度な分子動態情報を得る一般的な方法論を確立した。

2.

概要: コンデンシンやコヒーシン等の SMC タンパク質は、ATP 加水分解エネルギーを利用して染色体高次構造形成を誘導するタンパク質である。本研究では、高速 AFM により、コンデンシンが ATP 依存的に構造変化する様子を直接観察することに成功した。これをもとに分子動力学(MD)シミュレーションを行い、細菌 SMC タンパク質が DNA 取り込みを起こす様子を計算機上で実現した。これは、現在活発に議論されている SMC タンパク質の DNA ループ押出しの分子機構を明らかにするものである。

3.

概要: 自然免疫や炎症などの生体防御応答に必要な不可欠なアダプタータンパク質 MyD88 のシグナル伝達様式は、既知の様式とは大きく異なることが知られていたが、その分子的詳細は未解明であった。高速 AFM とクライオ EM を用いて受容体による MyD88 の多量化制御機構の解明に取組み、高速 AFM による多量化過程の追跡、受容体との相互作用の可視化に成功し、決定した立体構造情報と合わせ、MyD88 を中心として形成されるシグナル複合体の全容を明らかにした。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要: 高速 AFM の時空間分解能の向上のために、超高速 Z スキャナー(Z-SB と呼ぶ)の開発(特願 2020-149584)、振幅計測器(DB-A² と呼ぶ)の開発、超小型カンチレバーの開発、Z スキャナーの共振周波数制御回路(Reso-con)の開発(特願 2022-141581)、高速 AFM 実機への導入を実施し、AFM 計測全体として従来型(約 70kHz)の 7~8 倍の時間分解能向上(約 520 kHz)を実現した(古寺)。

2.

概要: 標的タンパク質の標準状態における 3 次元構造が既知である場合について、高速 AFM で得られた静止画像に適合する 3 次元分子構造モデルを求める方法として、分子動力学(MD)シミュレーションによる AFM 像へのフレキシブルフィッティング法を開発した。実際的高速 AFM 像への適用に基づきパラメータチューニングを行った。さらに、既知構造の並進回転自由度のみを網羅探索する剛体フィッティング法も開発した。

3.

概要：高速 AFM 画像情報のみから、その計測に用いられた任意の探針形状を推定できるエンドツーエンド微分可能な探針形状再現法を、機械学習で開発されたツールを利用して開発し、実装した。従来法が AFM 画像のノイズに弱いのに比して、新規開発法は高いノイズ頑健性をもち実用性が高い。加えて、高速 AFM データを情報解析するための、基礎的なツール群を開発した。

<代表的な論文>

1. S. Fuchigami, T. Niina, S. Takada, *Particle Filter Method to Integrate High-Speed Atomic Force Microscopy Measurements with Biomolecular Simulations*. Journal of chemical theory and computation, **10**, 6609, 2020.

概要：高速 AFM 動画データと分子シミュレーションを、データ同化の粒子フィルタ法によって融合する新たな方法を提案し、ヌクレオソーム動態を例にとり、その方法を検証した。高速 AFM1 フレーム計測時間とシミュレーション1ステップ時間に 100 万倍の開きがある場合でも、高速 AFM 動画と整合する分子構造の時空間構造を構築できることを示した。粒子数が多いほど精度は向上した。また、イオン濃度等の物理パラメータを推定することが可能であった。

2. N. Terahara, Y. Inoue, N. Kodera, Y.V. Morimoto, T. Uchihashi, K. Imada, T. Ando, K. Namba, T. Minamino, *Insight into structural remodeling of the FlhA ring responsible for bacterial flagellar type III protein export*, Science Advances, **4**, eaao7054, 2018

概要：バクテリアべん毛を作るときに分泌装置として働く FlhA というタンパク質の C 末端側 (FlhA_C) の形状を高速 AFM で観察することに成功した(大阪大学の南野・難波研究室との共同研究)。FlhA_C は 9 量体のリング構造を持っていること、FlhA_C がリング構造を形成するため、及び、FlhA が分泌するタンパク質を正しく切り替えを行えるためには、FlhA_C のフレキシブルリンカーが必要であることを明らかにした

3. H. Koide, N. Kodera, S. Bisht, S. Takada, T. Terakawa, *Modeling of DNA binding to the condensin hinge domain using molecular dynamics simulations guided by atomic force microscopy*, PLoS Computational Biology, 10.1371/journal.pcbi.1009265, 2021.

概要：細胞分裂期の染色体高次構造形成の主要タンパク質であるコンデンシンについて、高速 AFM により構造動態を観察し、そのヒンジ領域が開閉を繰り返していることを見出した。AFM 像をもとにフレキシブルフィッティング分子シミュレーションによりヒンジ構造をモデル化することに成功した。ヒンジが閉じた状態ではその内部に DNA を結合できないが、開いた状態では結合できることを、分子シミュレーションにより示した。

4. Y. Matsunaga, S. Fuchigami, T. Ogane, and S. Takada *End-to-End Differentiable Blind Tip Reconstruction for Noisy Atomic Force Microscopy Images*, Scientific Reports **13**, 129, 2023.

概要：AFM で計測される形状情報はその原理から、サンプル表面形状だけでなく探針の形状によって歪む。AFM 画像のみを解析することで探針形状を推定し、より詳細なサンプル表面形状を得るために、これまで blind tip reconstruction (Villarrubia 1997)という手法が提案されていたが、ノイズに弱いという問題があった。本論文では、現代的な正則化とそれを最適化するための微分可能プログラミングのアプローチを適用することでノイズに対してより頑健な探針形状推定法を提案し、テストデータと実データで実証した。※1年追加支援時の成果

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

※1 年追加支援時の体制

①「高田」グループ

研究代表者: 高田 彰二 (国立大学法人京都大学理学研究科 教授)

研究項目

- ・高速 AFM 静止イメージからの 3 次元構造解析
- ・高速 AFM 計測からの直接データ同化・画像処理
- ・高速 AFM 計測からの分子シミュレーションと共役したデータ同化(4 次元構造解析)
- ・高速 AFM 計測とデータ同化法の融合による細胞生物学的課題への応用
- ・1分子蛍光イメージングからの細胞内分子動態のベイズ統計モデリング

②「古寺」グループ

主たる共同研究者: 古寺 哲幸 (国立大学法人金沢大学ナノ生命科学研究所 教授)

研究項目

- ・高速 AFM 計測からの直接データ同化・画像処理
- ・高速 AFM 計測からの分子シミュレーションと共役したデータ同化(4 次元構造解析)
- ・高速 AFM 装置の高度化
- ・高速 AFM 計測とデータ同化法の融合による細胞生物学的課題への応用

③「枳尾」グループ

主たる共同研究者: 枳尾 豪人 (国立大学法人京都大学理学研究科 教授)

研究項目

- ・高速 AFM 計測とデータ同化法の融合による細胞生物学的課題への応用
- ・1分子蛍光イメージングからの細胞内分子動態のベイズ統計モデリング

④「松永」グループ

主たる共同研究者: 松永 康佑 (国立大学法人埼玉大学情報メディア基盤センター 准教授)

研究項目

- ・高速原子間力顕微鏡1分子計測のマルコフ状態モデル解析

⑤「湊上」グループ

主たる共同研究者: 湊上 壮太郎 (静岡県公立大学法人静岡県立大学 薬学部 助教)

研究項目

- ・高速原子間力顕微鏡1分子計測のデータ同化法開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

2020 年度から、スーパーコンピュータ「富岳」成果創出加速プログラム・領域①「全原子・粗視化分子動力学による細胞内分子動態の解明」(代表: 杉田有治)に、高田、松永が参画し、富岳のパフォーマンスを活用した超大規模系のシミュレーション、実験計測データとの機械学習による融合について研究開発を展開してきた。

古寺は、2017 年度から、世界トップレベル研究拠点プログラム「金沢大学 ナノ生命科学研究所」に参画し、高速 AFM バイオ計測の世界のハブとして、国内外の数多くの研究者と共同研究のネットワークを形成してきた。