

要旨

第一章 序論

多彩な生命現象は細胞内での精巧な機能性生体分子の動作に端を発しており、そのような生体分子の多くは機能の発揮に構造の変化を必要とする。生命現象を理解する上で、それらの分子が生理学的条件下でどのような構造を取り、また変化するかを知ることが避けて通ることが出来ない重要なプロセスであり、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡法などによる構造解析や、FRET や超解像顕微鏡などによる一分子スケールでの動態解析が近年活発に行われている。

高速 (HS-) 原子間力顕微鏡 (AFM) はナノメートルオーダーの高い空間解像度と、一画面あたり一秒以下という時間解像度を両立させつつ、生理学的条件に近い環境での生体分子の挙動を染色なしで計測することができる顕微鏡である。反面、観測手法の性質上得られるデータは生体分子の表面の高さに限られており、そこから詳細な三次元構造モデルを得ることは容易ではない。本研究では、HS-AFM による観測データから分子の三次元構造モデルを再構築するための汎用的な手法を開発することを目指し、複数の計算手法を用いた分子シミュレーション研究を行った。

これまでの研究においては、HS-AFM による観測データの解釈には分子モデルから疑似的な AFM 画像を生成し、観測によって得られた画像と比較する方法が用いられてきた。ここから、分子モデルを動かしつつ生成される疑似 AFM 画像を観測画像に近づけることによって、観測された生体分子の三次元構造モデルを復元する方法を考えた。まずは分子モデルに対して剛体並進と剛体回転を適用し、モデルから得られる疑似 AFM 画像を参照画像に一致させるような構造を探す手法を実装し、方向性の検証を行った。しかし、剛体運動では生体分子の構造変化を解析することはできない。そこで、疑似 AFM 画像を参照画像に近づけるような非物理的な力をかけるポテンシャルを設計、粗視化分子動力学に導入し、フィッティングのために構造変化を起こすことが可能なフレキシブルフィッティング手法の開発を行った。第一章ではこれらのフィッティング手法について述べ、その頑強性を評価し、実験データを交えつつ適用可能性を探る。

HS-AFM は観測に探針にかかる原子間力を用いるため、探針の形状が観測精度とデータ自体に大きな影響を与えることが知られている。しかしながら、極めて細く成形された探針先端の形状を事前に知ることは非常に難しい。そこで、観測画像から分子構造と同

時にその観測に用いられた探針の形状を予測する方法の開発を行った。第二章ではこの手法の精度を調べ、様々な画像の類似度を使用してその特性を比較し、また実験データを用いて適用可能性を確認する。

第二章 粗視化分子動力学シミュレーションによる高速原子間力顕微鏡像に対するフレキシブルフィッティング手法の開発

HS-AFM は探針が試料分子から受ける原子間力を計測することで分子表面の高さを計測する。そのため、探針の先端形状を半球を乗せた円錐としてモデル化し、生体分子モデルとの接触位置を計算することで HS-AFM の計測過程をシミュレーションし、疑似 AFM 画像を生成する手法が知られている。また、実験によって観測された構造に対してモデル構造から生成した疑似 AFM 画像との類似度を計算し、構造を推測するという方法が用いられてきた。

そこでこの手法を推し進め、剛体分子モデルの並進と回転を用いて、疑似 AFM 画像と参照 AFM 画像との類似度が高まる位置とオリエンテーションをマルコフ連鎖モンテカルロ法によって探索する方法を実装した。この手法を、予め用意した構造モデルから生成した疑似 AFM 画像を参照画像として適用し、疑似 AFM 画像の類似度を高めることによって元の構造モデルの位置とオリエンテーションを再現できることを確認した。また、誤差を加えた疑似 AFM 画像を用いて同様の数値実験を行い、観測誤差が構造予測に与える影響を調べ、HS-AFM に典型的な大きさのノイズが大きな問題にならないことを確認した。

続いて、剛体分子モデルでは達成できない、観測された分子が構造変化を起こしている場合にも適用可能な手法の開発を行った。そのために、クライオ電子顕微鏡によって得られる電子密度マップへのフレキシブルフィッティング法に倣い、微分可能な関数の組み合わせによって疑似 AFM 画像を生成する関数を設計し、従来の疑似 AFM 画像生成手法と類似した画像を生成できるパラメータの値を決定した。この微分可能な疑似 AFM 画像生成関数と画像のコサイン類似度を組み合わせることで、疑似 AFM 画像を参照画像に近づけるようなポテンシャル関数を設計し、粗視化分子動力学法に導入することで AFM 画像へのフレキシブルフィッティング法を開発した。ここでも、予め用意した構造モデルから生成した疑似 AFM 画像を参照画像としてシミュレーションを行い、この手法が構造変化を引き起こせること、高いコサイン類似度を持つ、言い換えればエネルギーの低い構造ほど正しい構造モデルに近づくことを確認し、さらにタンパク質の力場に比較して適

切なパラメータを探索し、決定した。加えて、実際の HS-AFM による FlhA_c タンパク質のモノマーを捉えた実験データに対してフレキシブルフィッティング法を適用し、結晶構造解析による構造モデルからの構造変化を誘導できること、より高いコサイン類似度を持つ画像を生成するような新規なコンフォメーションを予測できることを確認した。

第三章 剛体モデルによる画像スキャンを用いた対象タンパク質の位置・配向と探針先端形状の同時推定

HS-AFM による観測画像の精度には、観測時に用いられた探針先端の形状が大きく影響を及ぼすことが知られている。また、疑似 AFM 画像においても、探針先端の形状を表すパラメータの影響は大きい。よってフィッティングにおいても探針先端の形状は非常に重要であり、事前に推測しておくことが必要となる。しかし、HS-AFM の探針の先端形状の測定は極めて高コストであり、実験に際して毎回計測することは現実的ではない。よって、得られた観測画像から探針先端の形状を推測する方法が求められる。

そこで、剛体分子モデルの位置とオリエンテーションを網羅的に探索し最適構造を探す手法を開発し、複数の探針形状モデルに対して最適構造を探し、そのスコアを比較することで、探針の形状と分子の位置とオリエンテーションを同時に推測する方法を提案した。さらに、画像の類似度についてこれまでの研究で使用されてきたコサイン類似度だけでなく、各観測点ごとの平均二乗偏差、相関係数、過去の類似研究で用いられたペナルティ関数を用いて、その特性を比較した。複数の大きさのタンパク質や、タンパク質複合体であるアクチンフィラメントに対して双子実験を行い、それぞれの類似度指標が機能する条件を確かめた。また、実際の HS-AFM によるアクチンフィラメントと FlhA_c リングの観測データに対してもそれらの手法を適用し、探針の先端形状を推定した。

第四章 結論

第一章で、モデルから生成される疑似 AFM 画像を近づけることで分子の位置とオリエンテーションを予測できることを示した。さらに微分可能な関数の組み合わせによる疑似 AFM 画像生成手法を設計し、それと画像の類似度を組み合わせることで、AFM 画像を再現するような力を加えるポテンシャルを実現し、粗視化分子動力学に導入することで、構造変化を許容する AFM 画像へのフレキシブルフィッティング法を開発し、実際の HS-AFM による実験データに対しても適用できることを示した。第二章では、様々なオリエンテーションの構造モデルから生成された疑似 AFM 画像を用いて参照 AFM 画像中をス

キャンすることによって、構造モデルの位置とオリエンテーションを推定する方法を開発した。さらに、複数の探針形状について網羅的に探索を行うことによって、AFM 画像の解釈やフィッティングにおいて重要な問題となる探針先端形状の推定を行う手法を開発し、その精度と限界を明らかにした。