

(続紙 1)

| | | | |
|---|---|----|------|
| 京都大学 | 博士 (理学) | 氏名 | 新稲 亮 |
| 論文題目 | 高速原子間力顕微鏡データから分子構造・探針先端形状を推定するシミュレーション技法の開発 | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>第1章は、高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) の現状をまとめ、博士論文の目的を書いている。数ある生体分子計測技術の中で、1個の生体分子の構造とその時間変化を、生理的溶液条件に近い環境下で観察できるのは、現在のところHS-AFMのみである。HS-AFMは、生体分子等が吸着した表面に垂直方向から探針を走査することによって、試料生体分子の1分子構造動態を観察する。しかし、実験の性質上、観測できるのは分子の高さ情報であり、また分解能も中程度である。そこで、HS-AFM計測データから、3次元的な分子構造情報を得るために、コンピュータシミュレーションによるモデリングが求められる。本博士論文は、HS-AFM 静止像に適合する分子構造および探針先端形状を推定する分子シミュレーション法を開発することを目的とする。そのために、2章と3章でそれぞれフレキシブルフィッティング法および剛体フィッティング法を開発し、その有効性を検討したのち、実データに適用した。</p> <p>第2章は、HS-AFM静止像データに適合する分子構造を得ることを目的に、既存の分子構造情報から出発し、分子シミュレーションによって構造を変形させながら画像に適合させる方法 (フレキシブルフィッティング法) を開発した。まず、分子の3次元構造から疑似AFM像を作成する手法を作成した (afmize法)。それをもとに、ある分子構造と所与の実験AFM像の適合度を定量化するスコアとして、分子構造からの疑似AFM像と実験AFM像のコサイン類似度を使用している。コサイン類似度に負の係数を乗じた項を、従来の分子シミュレーションに用いる物理化学的なエネルギー関数に加えた有効エネルギー関数を定義し、これを最小化するように分子動力学 (MD) シミュレーションを行う。有効エネルギーは、物理化学的エネルギーを安定化することと、実験AFM像との類似度を高めることを反映したものになる。ただし、ここで技術的課題として、3次元構造から疑似AFM像を作成する従来法においては、画像は原子座標の微分可能な関数にはなっていないため、そのままではMD計算に適用できないことに留意する。そこで、本論文では、原子座標に対して微分可能となる近似画像作成法を新たに提案し、パラメータを適切に選ぶことで精度よく画像を作成できることを示した。以上の準備の後、フレキシブルフィッティング法を、まず双子実験で検証した。双子実験では、まずある分子構造を仮定する (正解構造)。これから疑似的な”実験AFM像”を作成する。次に、正解構造とは異なる構造から出発し、疑似実験AFM像に適合するようにフレキシブルフィッティングシミュレーションを実施する。得られた構造ともとの正解構造を比較することで、構造推定の成否を検証する。小型タンパク質ZO-1を例とした双子実験で、開発したフレキシブルフィッティング法の有効性を確かめた。最後に、細菌べん毛を構成するタンパク質FlhAのCドメインFlhACのモノマーに対して、実際の実験AFM像をもとに、それに適合する構造を予測した。既存のX線結晶構造と比較的よく適合するAFM像については高信頼度で構造推定が可能あるのに対して、X線結晶構造から大きくずれたと考えられるAFM像では、構造推定の信頼度は低くなった。</p> | | | |

第3章は、HS-AFM静止像データに適合する分子構造の推定と同時に、AFM探針先端形状のパラメータを推定することを目的として、網羅的探索による剛体フィッティング法を開発したものである。第2章の研究等において一つの課題は、AFM計測に利用する探針先端の形状が予め分からないことにある。AFM像は、分子構造とともに探針先端形状に強く依存する。しかし現状、探針は一つ一つ異なる形状をもち、予めそれを知ることができない。本論文3章では、生体分子を剛体と近似し、その並進及び回転の自由度と探針先端形状パラメータを同時に推定する方法を開発し、双子実験を用いて検証し、最後に実際の実験AFMデータに適用したものである。探針先端形状は半球と円錐を合わせたもので表現し、半球の半径と円錐の頂角を推定パラメータとした。まず、探索法としては、並進および回転の自由度（合わせて配置とよぶ）および探針半径と頂角（探針形状とよぶ）を離散的グリッドで表現し、また離散化された配置のあらゆる可能性を試す網羅的探索を行う。類似度のスコアとして、2章で用いたコサイン類似度のほかに、相関係数、ピクセルRMSD、表面ペナルティ関数を導入し、合計4つの類似度スコア関数の有効性を比較している。まず、モータータンパク質ダイニン、ミオシン、アクチン単量体、アクチンフィラメントの4つの系それぞれで、2つの異なる解像度の疑似実験データを用いた双子実験を行い、4つのスコア関数の比較を行った。総じて、コサイン類似度は高いパフォーマンスを示した。またピクセルRMSDは配置探索にとくに強みを示した。残り2つのスコアは明確に劣っていた。また、標的タンパク質の大きさと異方性が強いほど、配置探索および探針形状の推定が正しく行える確率が高くなった。最後に、この剛体フィッティング法を、アクチンフィラメントおよび細菌べん毛を構成するFliAのCドメインのオリゴマー構造に適用し、配置と探針形状の推定を行った。どちらの場合も、探針形状の推定値は、半径2-3nmの間であった。これは、実験的に言われていたことと整合的である。

第4章は、短いまとめと今後の課題を記している。実際のAFM探針先端形状は必ずしも単純な半球と円錐の組合せとは限らないため、より複雑な探針先端形状を推定できるのかどうか、今後の課題となる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

新稲亮氏の博士論文は、高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)で計測される静止像データにタンパク質等の分子構造を適合させる計算法、およびそれと同時にAFM探針先端形状のパラメータを推定する方法を開発・検証し、実際のAFM像に適用したものである。

前半では、HS-AFM像で計測される時々刻々の分子構造が既知構造とずれる場合を想定し、既知構造から出発して構造を変形させながらHS-AFM像に適合させていく、いわゆるフレキシブルフィッティング法を開発した。AFM像に対してフレキシブルフィッティングを行うことは前例がなく、本研究が世界で最初のものとなった。分子構造とAFM像の類似度をコサイン類似度で定量化し、その類似度を原子座標に関して微分可能なもので近似したことが鍵となっている。また、双子実験による有効性の検証では、物理化学的な相互作用エネルギーと、AFM像との類似度スコアのバランスをとることが重要であることを示している。この新規方法の実効性と限界について注意深く考察しており、今後の応用研究に有益なものと考えられる。

後半では、AFM計測に用いる探針の先端形状を、分子構造と同時に推定する方法を提案し、その有効性を検証している。実験で得られるAFM像は、探針先端形状に強く依存しているが、先端形状はサンプル毎に異なっており、また予め形状を知ることが難しい。本研究では、対象分子を剛体モデルで近似し、剛体の並進・回転と、探針先端形状(半球の半径と円錐部分の頂角)を同時に推定する。推定パラメータの値を離散化し、あらゆる組合せを網羅的に探索することによって推定を可能にしている。分子配置と先端形状パラメータに依存して得られる像と、実験AFM像との類似度を4つのスコア関数で表現し、その有効性を比較検討している。その結果、前半でも用いられたコサイン類似度がもっとも適していると結論している。この研究は、AFM像からの分子構造推定においてネックとなっている探針形状を、分子配置と同時に推定する方法を、初めて提案したものである。また、方法は簡便で普遍性があり、今後、さまざまな研究において利用可能なツールとなっている。

以上のように本論文は、ほとんど前例のなかった、高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)で計測される静止像データにタンパク質等の分子構造を適合させる一般的計算法、およびAFM探針先端形状を推定する方法を開発・検証したものであり、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年1月13日に、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 学位授与日から即時