

# 分子動力学計算を用いた DNA 分解酵素の失活メカニズムの解明

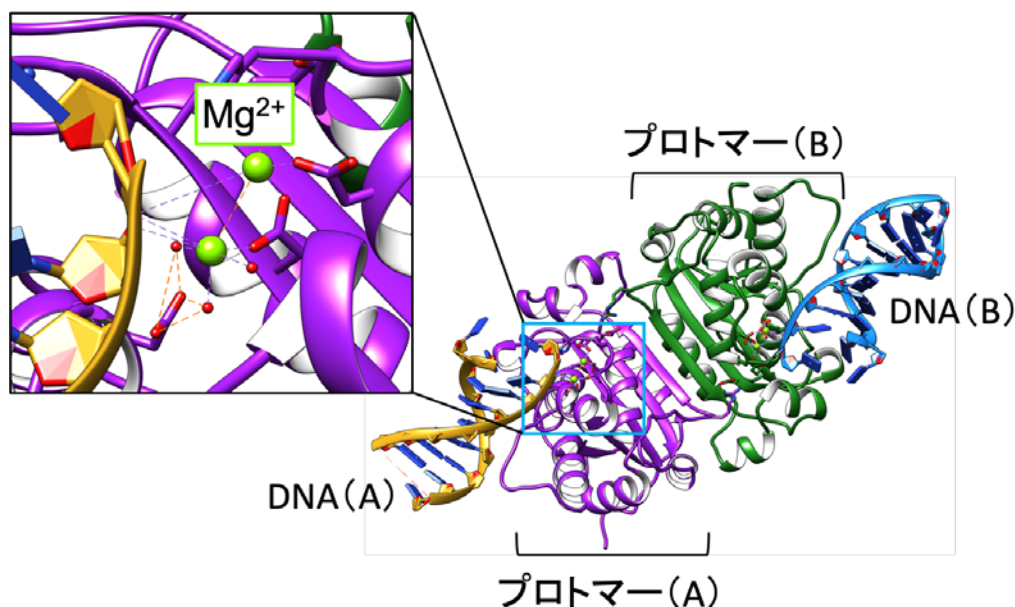
大滝大樹

長崎大学 生命医科学域 (医学系) 分子標的医学研究センター

## 1. はじめに

免疫は、細菌やウイルスなどの異物が体内に侵入するのを防いだり侵入した異物を認識して体外に排除する役割を持つ。その一方で、免疫の異常により臓器などに炎症や障害を生ずる疾患(免疫系疾患)が多数報告されている。人間の体に本来備わっている免疫(自然免疫)の異常による疾患は自己炎症性疾患と呼ばれ、例として家族性地中海熱、エカルディ・グティエール症候群(Aicardi-Goutières Syndrome: AGS)が挙げられる。一方、後天的に獲得する免疫(獲得免疫)に由来する疾患は自己免疫疾患と呼ばれ、例として全身性エリテマトーデス(Systemic Lupus Erythematosus: SLE)が挙げられる。原因・機序などにおいて不明な点も多く、厚生労働省の指定難病として挙げられているものも多く存在する。病態の解明および治療法の開発が喫緊の課題である。

大規模ゲノム解析などにより遺伝子変異と疾患の関係が明らかになってきており、免疫系疾患においても関連遺伝子が次々と同定されている。しかしながら、遺伝子がコードするタンパク質に着目すると、遺伝子変異がタンパク質の機能に及ぼす影響およびそのメカニズムについては不明な点が多い。例えば、免疫系疾患は上記のように区別されるが、自己炎症性疾患に分類される

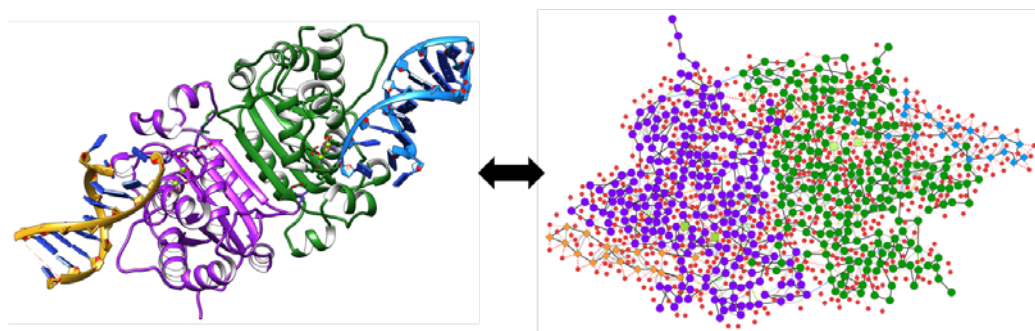


第1図：TREX1-DNA 複合体の構造 (PDB: 5YWS)。

2つのTREX1タンパク質(プロトマー)が二量体を形成し、それぞれがDNAを分解する。活性中心(拡大図)には2つのマグネシウムイオンが存在する。

AGS と自己免疫疾患に分類される SLE は、どちらも関連遺伝子として *TREX1* が同定されており、臨床的特徴も類似している。*TREX1* 遺伝子がコードする TREX1 タンパク質は、3' →5' DNA 分解酵素（エキソヌクレアーゼ）であり、不要な二本鎖（あるいは一本鎖）DNA フラグメントを分解する（第1図）。AGS, SLEに加え、家族性凍瘡状狼瘡（Familial Chilblain Lupus: FCL）、大脳白質脳症を伴う網膜血管障害（Retinal Vasculopathy with Cerebral Leukoencephalopathy: RVCL）などの免疫系疾患患者にも *TREX1* 遺伝子の変異が報告されている[1]。変異型の種類は多岐にわたり、一部の変異型 TREX1 では DNA 分解反応が阻害され、異常な免疫反応が引き起こされることが分かっている。しかしながら、(1) 変異により DNA 分解機能が損なわれる分子メカニズム、(2) 変異がどこに・どのように影響し、なぜ機能に異常を及ぼすのか、(3) TREX1 という一つのタンパク質の変異が複数の疾患・多様な症状と関係するのはなぜか、という問題については不明な点が多い。

我々は、遺伝子変異が TREX1 タンパク質の構造に及ぼす影響と、その結果としての機能への影響を調べることを目的として、分子動力学（Molecular Dynamics: MD）シミュレーションなどの計算化学的手法を用いた解析を行ってきた。MD シミュレーションのトラジェクトリから解析した相互作用を相互作用グラフで可視化する方法を考案し（第2図）、SLE 患者から見出された D130N 変異型に本手法を適用した。その結果、活性中心におけるマグネシウムイオンの相対位置が変化し、DNA との相互作用が必要以上に強くなることにより DNA 分解機能が失われる可能性を示した[2]。本研究では、これまでに報告されているその他の変異について MD シミュレーションを行い、相互作用グラフを用いた解析を行った。



第2図：TREX1 二量体の分子構造（左）と相互作用グラフ（右）。

相互作用グラフでは、各点（ノード）がアミノ酸や核酸の残基、水分子、イオンなどに対応し、相互作用が存在するノードの間を線（エッジ）で繋ぐ。

## 2. 計算方法

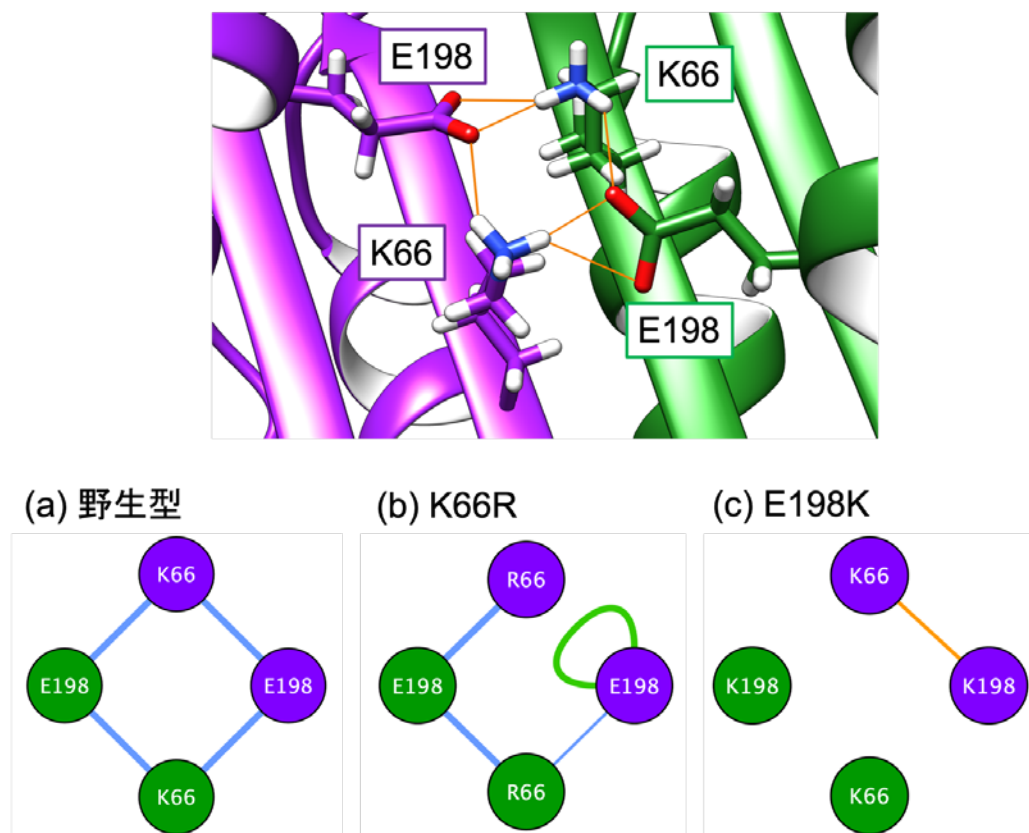
はじめに、Protein Data Bank (PDB)<sup>1</sup>からマウスの野生型 TREX1 と DNA の複合体 (PDB ID: 5YWS) [3]を取得し、SCWRL4[4]を用いて TREX1 の変異型モデルを作成した。タンパク質の末端は、N 末端側、C 末端側をそれぞれアセチル化、N-メチルアミド化することでキャップした。作成したモデルの周囲に水、ナトリウムイオン、塩化物イオンを配置し、MD シミュレーションを行う系を作成した。

<sup>1</sup> <https://www.rcsb.org/>

MD シミュレーションには Gromacs [5] を使用した。各モデルについて最小化計算，平衡化計算を行った後， $1\mu s$  のプロダクション計算を行った。時間刻みは 2 fs とした。力場は，タンパク質に AMBER ff14SB [6]，DNA に OL15 [7]，水分子には TIP3P [8] を用いた。TREX1 の活性中心にあるマグネシウムイオンには Allnér らのパラメータ [9] を用いた。系の温度は Velocity-rescaling 法 [10] により 310.15 K (37 °C) に制御し，圧力は Berendsen 法 [11] を用いて 1 atm に制御した。van der Waals 相互作用のカットオフは 1.2 Å とし，クーロン力による静電相互作用の計算には Particle Mesh Ewald 法 [12] を用いた。MD シミュレーション中は 20 ps 毎にスナップショットを取得し，解析は 200-1000 ns のトラジェクトリを用いて行った。水素結合解析は AmberTools17 [13] を用いて行った。本稿における分子の図は UCSF Chimera [14] を用いて作成した。

### 3. 結果

本稿では第 66 残基と第 198 残基の間の相互作用を取り上げる。野生型では第 66 残基はリシン (K)，第 198 残基はグルタミン酸 (E) であり，これらはプロトマー内およびプロトマー間で Salt Bridge を形成している (第 3 図上および下(a))。AGS の患者から K66R 変異および E198K 変異が



第 3 図：第 66 残基と第 198 残基の相互作用。

(上) 野生型では K66 と E198 はプロトマー内/間で Salt Bridge (オレンジ) を形成している。(下) 第 66 残基と第 198 残基部分の相互作用グラフ。青のエッジは側鎖-側鎖の相互作用，緑およびオレンジのエッジは主鎖-側鎖の相互作用を表す。エッジの太さは相互作用の強さに比例する。

見つかっていることから[15, 16], これらの変異型のモデルを作成し, MD シミュレーションを行った。第 3 図下 (b) (c) に, K66R 変異型と E198K 変異型のシミュレーションで得られた相互作用グラフを示す。K66R 変異型では, 野生型と比べて Salt Bridge が弱くなったり部分的に壊れたりしているのが分かる。また, E198K 変異では, 変異により Salt Bridge を作る事ができず, 第 66 残基と第 198 残基の間の相互作用がほぼ完全に失われている。Salt Bridge は強い静電相互作用で形成されるため, 変異によりこの部分の相互作用が弱くなる (あるいは失われる) と TREX1 二量体の構造, ひいては機能に影響が及ぶ可能性が考えられる。この局所的な相互作用が系全体の構造や機能に及ぼす影響については, 現在解析を進めている段階である。

#### 4. まとめと今後の展望

本研究では, 免疫系疾患に関与する TREX1 タンパク質について, 変異がタンパク質に及ぼす影響を調べるため, 変異型のモデルタンパク質を作成し MD シミュレーションを行った。アミノ酸残基間の相互作用を相互作用グラフで可視化することにより, 野生型および変異型の相互作用の違いを顕在化することができた。野生型ではプロトマー内およびプロトマー間で形成されていた K66-E198 の Salt Bridge が, K66R 変異と E198K 変異では弱くなる (あるいは形成されない) ことが分かった。これが系全体にどのような影響を及ぼすかは現在解析中である。相互作用グラフは系全体の相互作用を俯瞰的に捉えられる点の特徴であるため, 局所的な相互作用の違いが系全体にどのように影響するかを調べるのに本手法が非常に有用であると期待される。本稿では割愛したが, 免疫系疾患患者から報告された他の変異型についても MD シミュレーションを実行済みである。複数の変異型の計算結果を統合的に解釈することにより, 変異と TREX1 二量体の機能との関係性を明らかにしたいと考えている。

#### 謝 辞

本研究は『2021 年度東京大学情報基盤センター「若手・女性利用課題」』および『2021 年度学際大規模情報基盤共同利用・共同研究拠点 (JHPCN) 萌芽型共同研究課題 (拠点課題 ID: EX21306)』の支援を受けて行われました。本研究における分子動力学シミュレーションは東京大学情報基盤センターの Oakbridge-CX で行われました。また, 本研究は科学研究費助成事業 (若手研究: 19K16058) の支援を受けています。この場を借りて感謝申し上げます。

#### 参 考 文 献

- [1] G. I. Rice, M. P. Rodero, Y. J. Crow, Human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, *J. Clin. Immunol.* 35 (2015) 235-243.
- [2] Y. Endo, T. Koga, **H. Otaki**, K. Furukawa, A. Kawakami, Systemic lupus erythematosus overlapping dermatomyositis owing to a heterozygous TREX1 Asp130Asn missense mutation, *Clin. Immunol.* 227 (2021) 108732.
- [3] K.-W. Huang, T.-C. Liu, R.-Y. Liang, L.-Y. Chu, H.-L. Cheng, J.-W. Chu, Y.-Y. Hsiao, Structural basis for overhang excision and terminal unwinding of DNA duplexes by TREX1, *PLoS Biol.* 16 (2018) e2005653.
- [4] G. G. Krivov, M. V. Shapovalov, R. L. Dunbrack, Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4, *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* 77

(2009) 778-795.

- [5] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX* 1-2 (2015) 19-25.
- [6] J.A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K.E. Hauser, C. Simmerling, ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.* 11 (2015) 3696-3713.
- [7] M. Zgarbová, J. Šponer, M. Otyepka, T.E. Cheatham, III, R. Galindo-Murillo, P. Jurečka, Refinement of the Sugar-Phosphate Backbone Torsion Beta for AMBER Force Fields Improves the Description of Z- and B-DNA, *J. Chem. Theory Comput.* 11 (2015) 5723-5736.
- [8] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926-935.
- [9] O. Allnér, L. Nilsson, A. Villa, Magnesium ion-water coordination and exchange in biomolecular simulations, *J. Chem. Theory Comput.* 8 (2012) 1493-1502.
- [10] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 014101.
- [11] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684-3690.
- [12] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 8577-8593.
- [13] D.A. Case, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, et al., *AmberTools17*, University of California, San Francisco, 2017.
- [14] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605-1612.
- [15] G.I. Rice, G.M.A. Forte, M. Szykiewicz, D.S. Chase, A. Aeby, et al., Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study, *The Lancet Neurology* 12 (2013) 1159-1169.
- [16] G. Ramantani, J. Kohlhase, C. Hertzberg, A.M. Innes, K. Engel, et al., Expanding the phenotypic spectrum of lupus erythematosus in Aicardi-Goutières syndrome, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 1469-1477.