

拡張アンサンブル法を用いたタンパク質の構造変化と変異が及ぼす影響の解析

大滝 大樹

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

1. はじめに

タンパク質が誤って折り畳まれることで形成される凝集体はアミロイドと呼ばれ、繊維状の構造をなす。これが身体の器官に異常蓄積すると、アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病など、神経変性疾患を主とする様々な病を引き起こす。これまでの研究により、種々の疾患とアミロイドの関係が明らかになったものの、その凝集様態（構造、プロセスなど）については未だに分かっていない部分が多い。

本研究ではプリオンタンパクを取り上げる。プリオンでは、アミノ酸配列に変異を導入した場合に凝集様態が異なることが実験研究により示されている。我々はこれまでプリオンの分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) シミュレーションを行い、変異がプリオンタンパクの構造を大きく揺らがせるという知見を得た。しかし、通常の MD 計算は局所安定構造周りを探索するのみで、タンパク質の複雑な自由エネルギー面の大域的な情報を得ることはできない。そこで本研究では、拡張アンサンブル法の 1 つであるレプリカ交換分子動力学 (Replica Exchange Molecular Dynamics: REMD) 法[1]を用いた分子シミュレーションを行い、プリオンタンパクが取り得る構造を幅広く探索する。野生型に加え、実験で凝集様態の変化が示唆されている代表的な変異体についても計算を行う。自由エネルギー面の差異やプリオンタンパクが取り得る構造について詳細に調べ、実験で見られる凝集様態の差異と関連付けて議論することを目的とする。

本研究は、『平成 29 年度 (前期) 東京大学情報基盤センター「若手・女性利用者推薦」』および『学際大規模共同利用・共同研究拠点 (JHPCN) 萌芽型共同研究課題』における採択課題「拡張アンサンブル法を用いたタンパク質の構造変化と変異が及ぼす影響の解析」(拠点課題 ID: EX17302) によって行われ、現在も研究を続けている。本稿では野生型の計算結果について述べる。

2. プリオン

プリオンはタンパク質性の感染性因子である。異常型プリオンが正常型プリオンの形状を変化させることで感染・増殖していく。図 1 に正常プリオンタンパクの主要部 (残基番号 119-231) の構造を示す。正常プリオンタンパクの主要部は 3 つの α -helix (H1: 143-151, H2: 171-184, H3: 199-221) と 2 つの β -strand を持ち、H2 と H3 の間にはジスルフィド結合が存在する。異常型プリオンは β シート構造を多く持ち、これらが凝集してアミロイド繊維が形成されることが分かっているが、その正確な 3 次元構造は明らかになっていない。

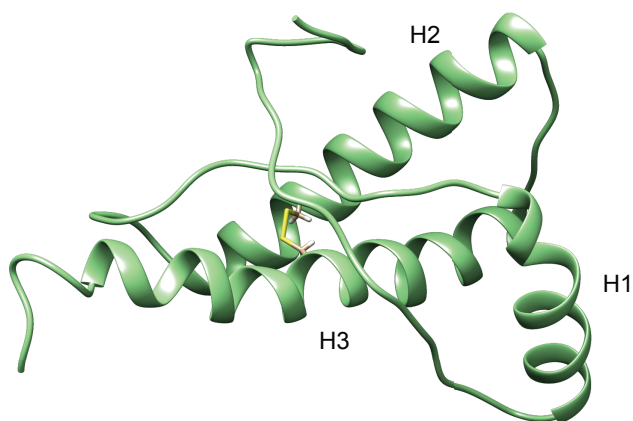


図 1: 正常プリオンタンパク主要部の構造

Protein Data Bank (PDB) ID: 2LSB の 119-231 残基を表示。H2 と H3 の間にはジスルフィド結合 (黄色) が存在する。UCSF Chimera[2]を用いて作成。

3. レプリカ交換分子動力学 (REMD) 法

図 2 に REMD 法の模式図を示す。REMD 法では、温度の異なる複数の系のコピー (レプリカ) の分子動力学計算を独立・並行的に実行し、隣り合うレプリカ間の温度を確率的に交換することで幅広い構造空間のサンプリングを可能とする。その一方、レプリカ交換を適切な確率 (20-30 % が良いとされている) で行うためには、系の大きさや計算条件に応じたレプリカ数を用意する必要があるため[3]、多くの計算資源が必要になる。本研究では正常型プリオンタンパクを初期構造として REMD シミュレーションを行う。

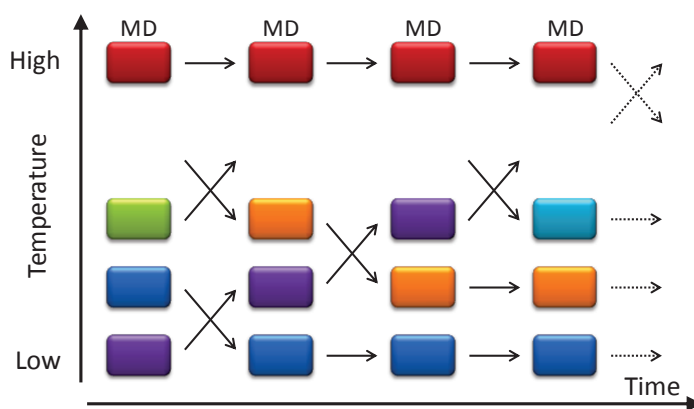


図 2: REMD 法の模式図

横軸は時間、縦軸は温度、四角は系のレプリカを表す。各レプリカでは温度の異なる独立した短い MD 計算が行われ、隣接した温度のレプリカペアについて温度交換の試行が行われる。試行が採択された場合のみ温度を交換する。

4. 計算条件

まず、計算のための系の構築を行った。正常プリオンタンパクの構造データを Protein Data Bank¹ (PDB) から入手し (PDB ID:2LSB), 主要部 (119-231) の構造を取り出した。次に、末端の影響を抑えるために 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。その後、プリオンタンパクの周囲に水分子を配置し、イオン濃度が 150 mM となるようにナトリウムイオンと塩化物イオンをランダムに配置した。最終的な系の原子数は 38,569 であった。

MD 計算は Gromacs[4]を用いて行った。タンパク質の力場は AMBER の ff99SB-ILDN[5], 水分子には TIP3P[6]を用いた。タンパク質の水素以外の原子に拘束をつけて最急降下 (steepest descent) 法で 5,000 ステップ, 共役勾配 (conjugate gradient) 法で 2,000 ステップの最小化を行った。次に、拘束をつけたまま系の温度を 310 K まで升温し, 1 ns かけて拘束を徐々に緩めた後, 圧力・温度一定の NPT アンサンブルで 500 ps の MD 計算を行った。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 法を用いた。系の温度は Velocity-rescaling 法[7]により制御し, 圧力は Berendsen 法[8]により 1 atm に制御した。MD 計算の時間刻みは 2 fs とした。以上により得られた構造を初期構造として, 300 K~450 K の間に 84 個のレプリカを用意し, 各温度においてレプリカの交換を伴わない NPT アンサンブルでの平衡化計算を 2 ns 行った。その後, レプリカ当たり 160 ns の Production Run を行った。したがって, 全体で 160 ns * 84 レプリカ = 13.44 μ s 分のサンプリングを行ったことに相当する。レプリカ交換の試行は 4 ps (2,000 ステップ) 毎に行い, その度にスナップショットを取得した。これにより各レプリカについて 40,000 点, 合計 3,360,000 点のスナップショットを得た。このスナップショットを用いて解析を行った。

5. 計算結果

本稿では野生型の計算結果について述べる。図 3 に REMD 計算におけるレプリカ間の交換確率, レプリカ空間の遷移, 温度空間における遷移を示す。交換確率はシミュレーションの温度領域に渡ってほぼ一定であり, 平均交換確率は 30 % であった (図 3(a))。図 3(b) は 300 K のレプリカ番号を時系列でプロットしている。シミュレーション中, あらゆる番号のレプリカが 300 K になっており, レプリカ空間のランダムウォークを確認できる。また, 各レプリカは時間経過と共に

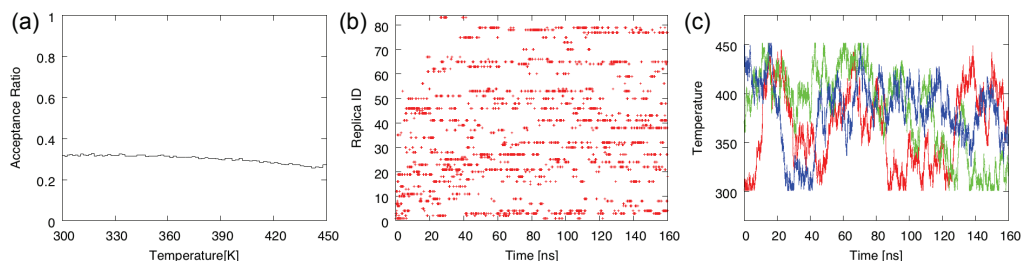


図 3: REMD 計算におけるレプリカ交換の様子

(a) Production Run におけるレプリカの交換確率。(b) 300 K におけるレプリカ番号の時間変化。(c) 代表的な 3 つのレプリカにおける温度変化 (赤: レプリカ 1, 緑: レプリカ 43, 青: レプリカ 83)。

¹ <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

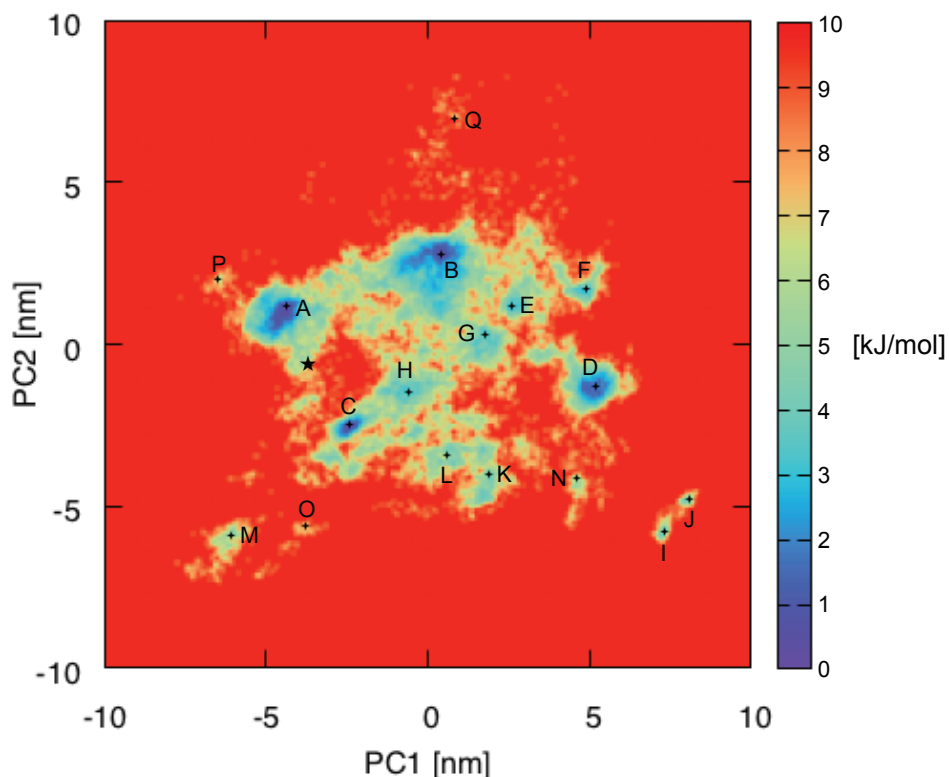


図 4: 300 K における自由エネルギー面

横軸は第一主成分 (PC1), 縦軸は第二主成分 (PC2)。★印は主成分空間におけるオリジナルの PDB 構造の位置, A-Q は代表的な極小点を示す。

最低温度から最高温度を経巡っており (図 3(c)), 温度空間のランダムウォークが実現されていることが分かる。これらにより, REMD 計算が適切に行われていることが確認できる。

次に 300 K のトラジェクトリのスナップショットを用いて主成分解析を行った。図 4 に第一主成分と第二主成分を軸にして得られた自由エネルギー面を示す。PDB の構造 (★印) 以外にも複数のエネルギー極小点を確認できる。これらの極小点に対応する構造をスナップショットから抽出し, DSSP[9, 10]による二次構造解析を行った結果が図 5 である。H2 (171-184) と H3 (199-221) は両者の間に形成されているジスルフィド結合 (図 1) により比較的 helix 構造を保持しているが, 構造 E, G, I, J, M, O では H1 (143-151) の helix 構造を保てていないことが分かる。これらの構造を図 6 に示した。PDB の構造と比較すると明らかに H1 の部分が大きく崩れていることが分かる。構造 I, J では H2 や H3 も大きく変形している。このように, REMD 法を用いることで通常の MD 計算よりも幅広い構造空間のサンプリングに成功した。

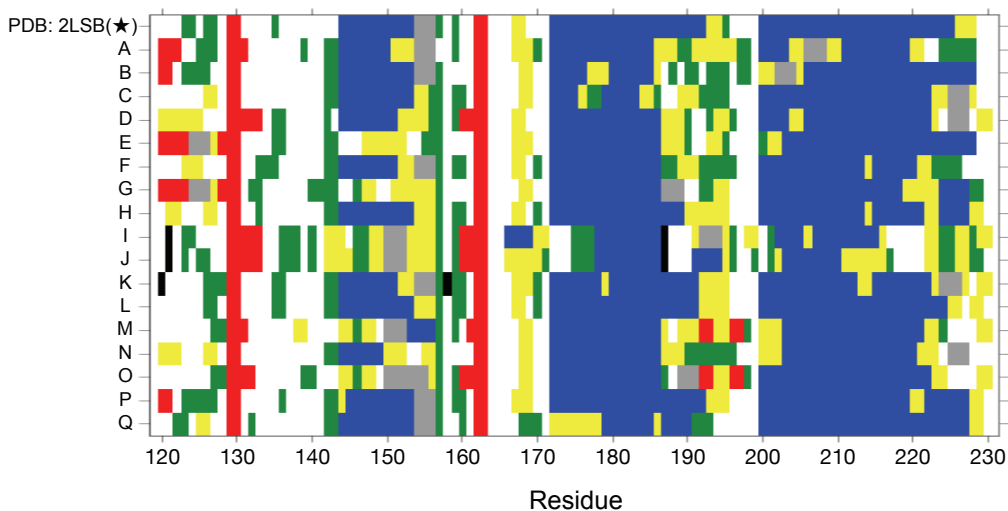


図 5: 各エネルギー極小点におけるプリオンタンパクの二次構造

赤: β -sheet, 黒: β -bridge, 緑: Bend, 黄: Turn, 青: α -helix, グレー: 3_{10} -helix, 白: Coil。横軸は残基番号, 縦軸は構造の ID を表す (★およびA-Qは図4を参照)。二次構造はDSSPを用いて解析を行った。

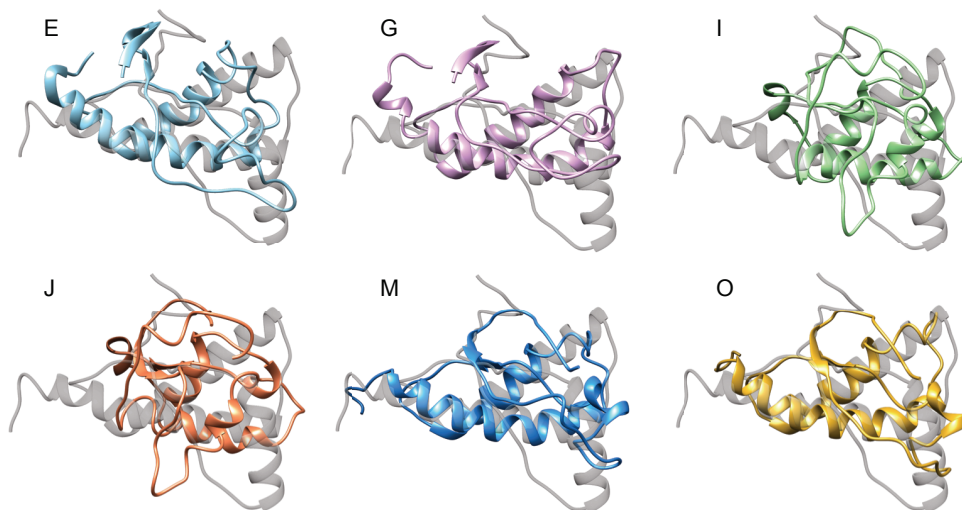


図 6: エネルギー極小点 (E, G, I, J, M, O) におけるプリオンタンパクの構造

PDBの構造 (灰色) と重ねて比較している。UCSF Chimera[2]を用いて作成。

6. まとめと今後の課題

本研究ではプリオンタンパクの構造探索を目的として, REMD法を用いた分子シミュレーションを行った。シミュレーションにより得られたスナップショットについて主成分解析を行い, 主成分軸を用いて描いた自由エネルギー面を参照することで複数の局所安定構造を得た。自由エネ

ルギー面およびDSSPによる二次構造解析の結果が示すように、幾つかの構造はオリジナルのPDB構造から大きく異なるものであり、特にH1の構造変化が最も顕著であった。

本稿では野生型のREMDシミュレーションの計算結果について述べた。変異体の計算は現状サンプリング時間が不十分であるため今後は追加計算を予定している。野生型と変異体の結果を比較することで、変異の導入によりどのような構造変化がもたらされるか、構造変化が顕著な変異は何かを調べる予定である。プリオンタンパクの凝集様態については多くの実験報告があり、幾つかの変異体について凝集様態が大きく変化することが分かっている。変異体についての計算データを蓄積し、計算と実験との比較検証を目指す。

謝 辞

本研究は『平成29年度(前期)東京大学情報基盤センター「若手・女性利用者推薦」』および『学際大規模共同利用・共同研究拠点(JHPCN)萌芽型共同研究課題』における採択課題「拡張アンサンブル法を用いたタンパク質の構造変化と変異が及ぼす影響の解析」(拠点課題ID:EX17302)によって行われた。本研究における数値計算は東京大学情報基盤センターのReedbush-U上で行われた。また、田口謙助教(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)にはプリオンの実験研究者の立場から多くの有益な助言を頂いた。

参 考 文 献

- [1] Y. Sugita, Y. Okamoto, “Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding”, *Chem. Phys. Lett.* 314, 141-151 (1999)
- [2] 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, 1605-1612 (2004)
- [3] A. Patriksson, D. van der Spoel, “A temperature predictor for parallel tempering simulations”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10, 2073-2077 (2008)
- [4] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, “GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit”, *Bioinformatics* 29, 845-854 (2013)
- [5] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J. L. Klepeis, R. O. Dorr, D. E. Shaw, “Improved side-chain torsion potentials for the AMBER ff99SB protein force field”, *PROTEINS: Struct. Funct. Gen.* 78, 1950-1958 (2010)
- [6] 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, 926-935 (1983)
- [7] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, “Canonical sampling through velocity rescaling”, *J. Chem. Phys.* 126, 014101 (2007)
- [8] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, A. DiNola, J. R. Haak, “Molecular dynamics with coupling to an external bath”, *J. Chem. Phys.* 81, 3684-3690 (1984)
- [9] W. Kabsch, C. Sander, “Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition

of hydrogen-bonded and geometrical features” , *Biopolymers* 22, 2577-2637 (1983)

[10] W. G. Touw, C. Baakman, J. Black, T. A. H. te Beek, E. Krieger, R. P. Joosten, G. Vriend, “A series of PDB related databases for everyday needs” , *Nucleic Acids Research* 43, D364-D368 (2015)