

分子動力学計算によるアミロイド凝集様態の理論的解析

大滝大樹

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子標的医学研究センター

1. はじめに

タンパク質は生命の重要な構成単位の1つであり、その生化学的機能の発現には固有の立体構造の形成（フォールディング）が必須である。しかし、近年、多くのタンパク質が誤って折りたたまれ（ミスフォールディング）、 β シート構造が豊富な凝集体を形成することが明らかになってきた。この凝集体はアミロイドと呼ばれ、線維状の構造をなす。アミロイドが身体の器官に異常蓄積すると、神経変性疾患を主とする様々な病を引き起こす。例として、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病、パーキンソン病、2型糖尿病などが挙げられる。これまでの研究により疾患とアミロイドの関係が明らかになったものの、アミロイドの詳細な分子構造情報は少なく、変異により凝集性が大きく変化する原因など、アミロイドの分子構造と凝集性との関係は未だに分かっていない部分が多い。

本研究では、近年アミロイドの構造が報告された α -シヌクレイン（ α Syn）をもとに野生型および変異型の α Synアミロイドのモデルを作成し、分子動力学（Molecular Dynamics: MD）シミュレーションを行った。得られたトラジェクトリから水素結合・疎水性相互作用解析、構造ゆらぎの評価、二次構造解析による β シート化傾向の算出などを行い、野生型と変異型との比較を行った。

本研究は『平成30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」』、『平成30年度（後期）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「分子動力学計算によるアミロイド凝集様態の理論的解析」（拠点課題ID: EX18312）によって行われ、現在も研究を行っている[1-3]。本稿ではこれまでにやってきた研究と得られた結果について紹介する。

2. α -シヌクレイン

α -シヌクレイン（ α Syn）はパーキンソン病（PD）、レビー小体型認知症（DLB）、多系統萎縮症（MSA）のhallmarkとなるレビー小体の主要な構成タンパク質である。 α Synは140のアミノ酸で構成され、細胞質内において特定の構造を持たない状態と α ヘリックスが豊富な構造とで平衡状態で存在していると考えられている[4]。また、*in vitro*では α ヘリックス構造が豊富な四量体で存在するという報告もある[5]（図1(A)）。一方、レビー小体中に異常蓄積している α Synはアミロイド構造をとり、株多様性などプリオン様の性質を示すことが知られている。しかし、アミロイドの詳細な分子構造情報は少なく、変異により凝集性が大きく変化する原因など、アミロイドの分子構造と凝集性との関係は未だに分かっていない部分が多い。

このような中、近年、固体NMRやクライオ電子顕微鏡により、 α SynアミロイドがGreek-key型の平行 β シート構造を取ることが明らかになった[6]（図1(B)）。本研究では、決定された構造をもとに野生型および報告されている点変異型の α Synアミロイドのモデルを作成し、MDシミュレーションを行い、変異がアミロイドの構造に及ぼす影響を調べた。

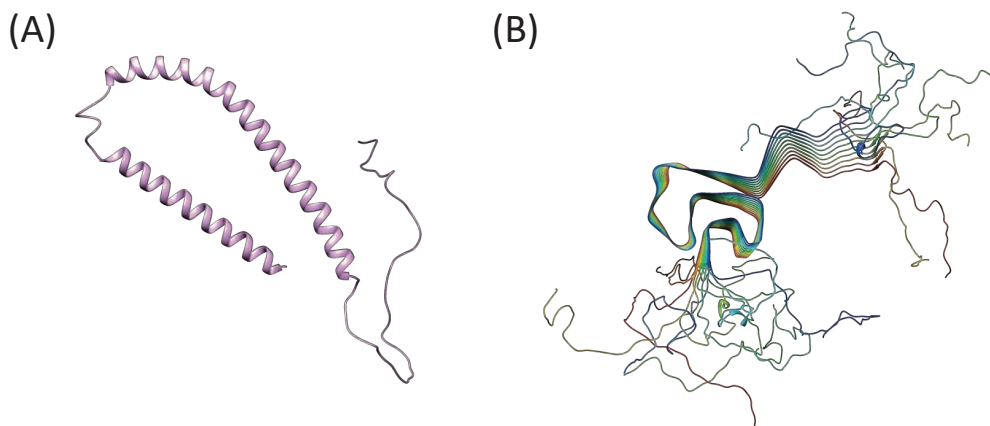


図 1: α -シヌクレインの構造

*in vitro*では α ヘリックス構造が豊富な構造を取るとされている (A) PDB:2KKW)。一方、アミロイドでは β シート構造を取って積層する (B) PDB:2N0A)。図はUCSF Chimera[7]を用いて作成した。

3. 計算手順

(全原子) MD 計算は、系を構成する原子のNewtonの運動方程式を数值的に解くことで系の時間発展を追跡する方法である。原子間にはたらく力は原子間距離、結合角、二面角、電荷などで表現された関数およびパラメータで近似されている。これは力場とよばれ、タンパク質の計算用に様々な力場が作られている。

最初に、計算のための系の構築を行った。 α Syn アミロイドの構造データをProtein Data Bank¹ (PDB) から入手し (PDB:2N0A)、 β シート構造を持つ部位 (第36-99残基) を取り出した (図2)。変異型はSCWRL4[8]を用いて該当するアミノ酸残基を置換して作製した。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

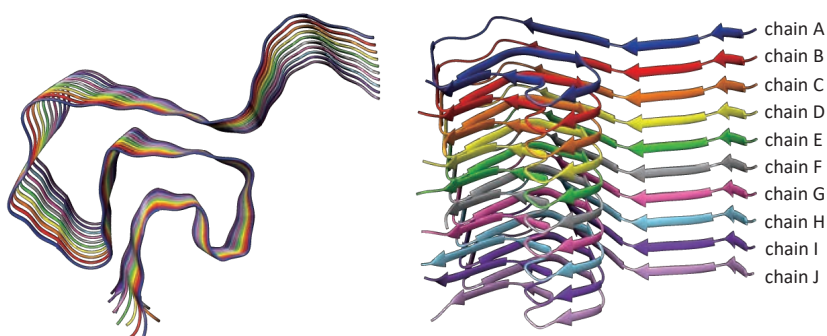


図 2: 計算に用いたアミロイドのモデル

PDBから取得した構造 (PDB ID: 2N0A, 図1 (B) 参照) から β シート構造を持つ第36-99残基を取り出した。10個の α Syn タンパク (A鎖-J鎖) が積層している。図はUCSF Chimera[7]を用いて作成した。

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

た。その後、 α Syn アミロイド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約 11 万であった。

MD 計算は Gromacs[9]を用いて行った。タンパク質の力場は AMBER の ff99SB-ILDN[10], 水分子には TIP3P[11]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 2 ns の平衡化計算を行った。その後, 400 ns の Production Run を各変異型につき 3 回行った (ただし, 野生型および A53T については 5 回)。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[12]により制御し, 圧力は Berendsen 法[13]により 1 atm に制御した。MD 計算の時間刻みは 2 fs とした。スナップショットは 10 ps 毎に取得し, 100-400 ns のトラジェクトリを用いて解析を行った。二次構造解析は DSSP[14, 15], 水素結合解析は VMD[16]を用いて行った。

4. 計算結果

本稿では野生型 (WT), A53T 変異型, H50Q 変異型, G51D 変異型の計算結果について述べる。図 3 に DSSP[14, 15]を用いて計算した, トラジェクトリ中における各アミノ酸残基の β シート化傾向, 図 4 に MD 計算終了時における α Syn アミロイドの構造, 図 5 には水素結合解析の結果から作成した水素結合ダイアグラムを示す。

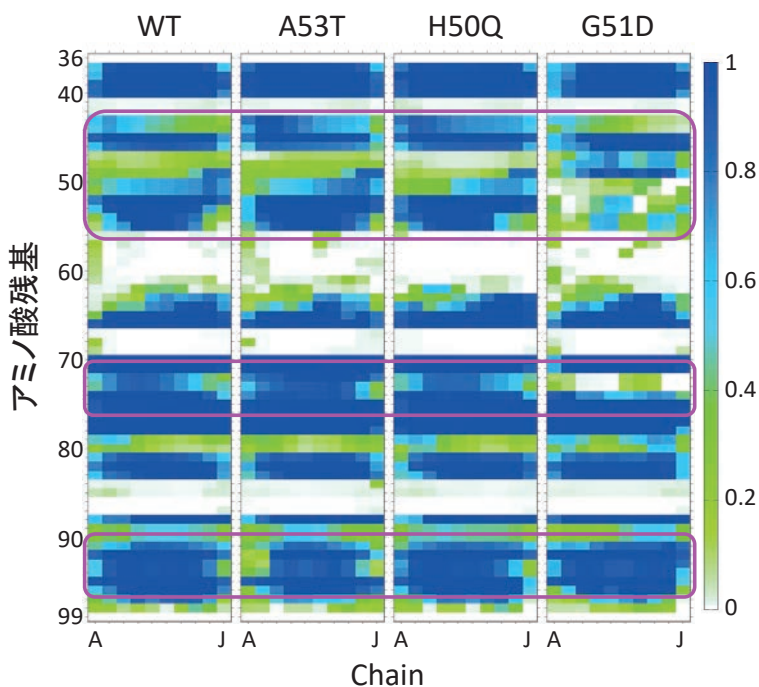


図 3: トラジェクトリ (100-400ns) 中における β シート化傾向
横軸は各アミロイドの鎖 (図 2 参照), 縦軸はアミノ酸残基の番号。値が大きいほど β シート化傾向が強い。

まず、全てに共通して端の鎖 (A 鎖または J 鎖) の β シート化傾向が中心部のものより低く、アミロイドの端が不安定であることが分かる。また G51D 変異型は第 50 残基周りの β シート化傾向が小さく、最も不安定であることが分かる。このことは、MD 計算の最後のスナップショット (図 4) から確認できる。

次に、野生型と A53T 変異型を比べると、A53T 変異型では第 53 残基の β シート化傾向が僅かに強くなるだけでなく、第 73 残基近傍の β シート化傾向が強くなり、第 93 残基近傍の β シート化傾向が弱くなっている。変異を導入した第 53 残基と水素結合するアミノ酸残基を調べると (図 5 (A) (B)), A53T 変異型ではあらたに T53-G73, T53-V74 の水素結合が

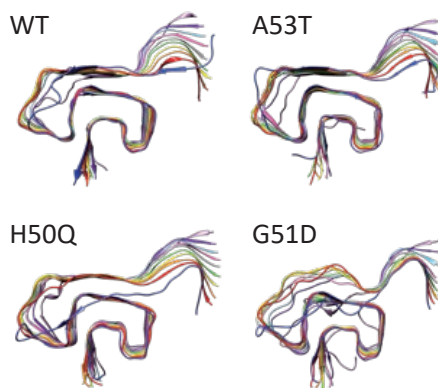


図 4 : MD 計算終了時 (400 ns 後) における α Syn アミロイドの構造

アミロイドの端の鎖が不安定になっている。また、変異によって構造の崩れ方が異なる。

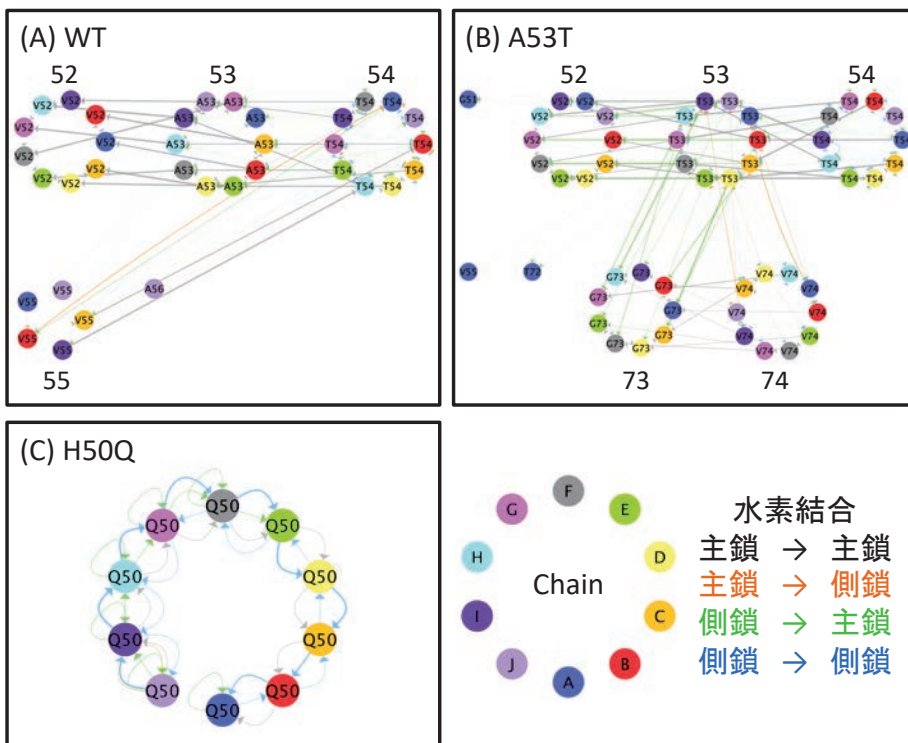


図 5 : 水素結合ネットワーク

(A) 野生型の第 53 残基周りの水素結合。(B) A53T 変異型の第 53 残基周りの水素結合。(C) H50Q 変異型の第 50 残基の鎖間の水素結合 (Glutamine ladder)。●はアミノ酸残基(鎖は色で区別)、矢印は水素結合(ドナー→アクセプター)を示す。水素結合をしているアミノ酸残基の部位(主鎖/側鎖)は矢印の色、水素結合の頻度は矢印の太さで表現している。ダイアグラムは Cytoscape[17] を用いて作成。

生じていることが分かる。同様の傾向は G51D 変異型にも見られる。G51D 変異型では変異を導入した第 51 残基近傍の β シート化傾向が小さくなるだけでなく、第 73 残基近傍の β シート化傾向も小さくなっており、構造が不安定になっていることが分かる。

図 6 には α Syn アミロイドにおけるアミノ酸残基の位置関係を示した。詳細は述べないが、水素結合および疎水性相互作用の解析結果から、 α Syn アミロイドの β シート間には多数の水素結合および疎水性相互作用が存在し、構造の安定化に寄与していることが分かった。これらの結果から、 α Syn アミロイドは β シート間の相互作用を介して構造のバランスを保っており、変異を導入したことによりそのバランスが崩れるため、変異箇所だけでなく全体の構造安定性に変化が生じると考えられる。

H50Q 変異型については、野生型と比較して β シート化傾向に大きな差は見られなかったが、水素結合解析では変異した Q50 が鎖間で水素結合をする“Glutamine ladder”が見られた(図 5 (C))。Glutamine ladder のような水素結合鎖は β シートを安定化させ、アミロイドの積層のためのエネルギー障壁を下げることも示唆されており[18]、 α Syn アミロイドの凝集にも寄与している可能性がある。

5. まとめと今後の課題

本研究では α Syn アミロイドの変異に伴う構造安定性の変化を調べるために、変異型のモデルアミロイドを作成して MD シミュレーションを行った。得られたトラジェクトリから二次構造解析や相互作用解析を行った。その結果、変異型によってアミロイド末端の分子構造の安定性が大きく異なること、 α Syn アミロイドが β シート間の相互作用を介して構造のバランスを保っていること、変異によりそのバランスが崩れ、影響が変異箇所近辺だけでなく離れたところにも及んでいることを明らかにした。

今後は他の変異体についても計算を行いデータを蓄積するとともに、アミロイドの鎖内・鎖間の相互作用についてより詳細な解析を行う予定である。実験データと対応付けながら、アミロイドの構造安定性や凝集性に関わる特徴的な相互作用を明らかにする。

謝 辞

本研究は『平成 30 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」』、『平成 30 年度（後期）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「分子動力学計算によるアミロイド凝集様態の理論的解析」（拠点課題 ID：EX18312）によって行われ、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、本研究は科学研究費助成事業（若手研究：19K16058）の支援を受けた。この場を借りて感謝申し上げます。

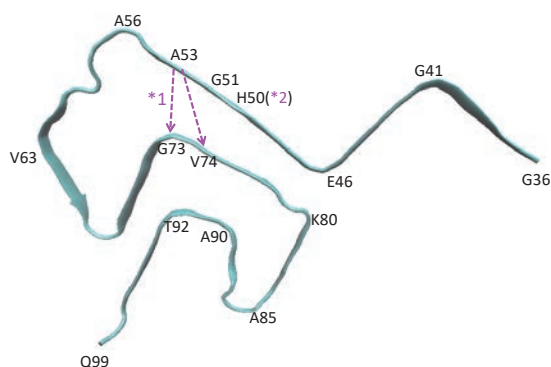


図 6： α Syn のアミノ酸残基の位置関係

*1: A53T 変異で水素結合が生じる。

*2: H50Q 変異で Glutamine ladder が見られる。

参考文献

- [1] H. Otaki, Y. Taguchi, N. Nishida, “Molecular dynamics simulation reveals that switchable combinations of β -sheets underlie the prion-like properties of α -synuclein amyloids” bioRxiv: 10.1101/326462
- [2] Y. Taguchi, H. Otaki, N. Nishida, “Mechanisms of strain diversity of disease-associated in-register parallel β -sheet amyloids and implications about prion strains” *Viruses* 11, 110 (2019)
- [3] H. Otaki, Y. Taguchi, N. Nishida, “In silico evidence of unique behaviors of methionine in an in-register parallel beta-sheet amyloid, suggestive of possible contribution to strain diversity of amyloids” bioRxiv: 10.1101/596742
- [4] A. Pineda, J. Burré, “Modulating membrane binding of α -synuclein as a therapeutic strategy” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 1223-1225 (2017)
- [5] T. Bartels, J. G. Choi, D. J. Selkoe, “ α -synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation” *Nature* 477, 107-110 (2011)
- [6] M. D. Tuttle, G. Comellas, A. J. Nieuwkoop, D. J. Covell, D. A. Berthold, K. D. Kloepper, J. M. Courtney, J. K. Kim, A. M. Barclay, A. Kendall, W. Wan, G. Stubbs, C. D. Schwieters, V. M. Y. Lee, J. M. George, C. M. Rienstra, “Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein” *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 409-415 (2016)
- [7] 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)
- [8] G. G. Krivov, M. V. Shapovalov, R. L. Dunbrack, “Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 77, 778-795 (2009)
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] 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)
- [12] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, “Canonical sampling through velocity rescaling” *J. Chem. Phys.* 126, 014101 (2007)
- [13] 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)
- [14] W. Kabsch, C. Sander, “Dictionary of protein secondary structure: pattern

- recognition of hydrogen-bonded and geometrical features” *Biopolymers* 22, 2577-2637 (1983)
- [15] 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)
- [16] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, “VMD: Visual molecular dynamics” *J. Mol. Graphics* 14, 33-38, (1996)
- [17] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, “Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks” *Genome Research* 13, 2498-2504 (2003)
- [18] T. D. Kurt, P. Aguilar-Calvo, L. Jiang, J. A. Rodriguez, N. Alderson, D. S. Eisenberg, C. J. Sigurdson, “Asparagine and glutamine ladders promote cross-species prion conversion” *J. Biol. Chem.* 292, 19076-19086 (2017)