

分子動力学シミュレーションによる自己炎症性疾患に関わるタンパク質の研究

大滝大樹

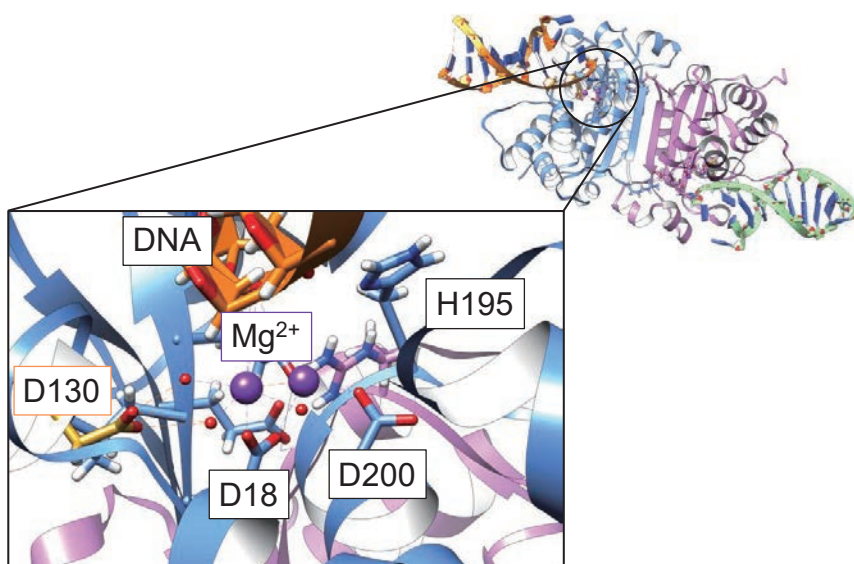
長崎大学 生命医科学域（医学系） 分子標的医学研究センター

1. はじめに

自己炎症性疾患は、もともと人間に備わっている自然免疫の異常によって炎症反応が起こり、臓器に障害を生ずる疾患の総称である。原因・機序などにおいて不明な点も多く、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、自己炎症性疾患疾患においても責任遺伝子が次々と同定されている。一方、遺伝子がコードするタンパク質を考えると、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。本研究では、遺伝子変異がタンパク質に及ぼす影響を調べることを目的として、自己炎症性疾患であるエカルディ・グティエール症候群 (Aicardi-Goutières Syndrome: AGS) に関わるタンパク質 TREX1 と、家族性地中海熱 (Familial Mediterranean Fever: FMF) に関わるタンパク質 Pyrin について変異型のモデルを作成し、分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) シミュレーションを行った。

2. TREX1 タンパク質の計算

TREX1 は、逆転写で生じた異常な DNA を分解する酵素である。酵素反応の活性中心には 2 個の



第 1 図: TREX1-DNA 複合体の構造 (PDB: 5YWS)。

2つのプロトマーが会合して二量体を形成し、各プロトマーがDNAと結合している。拡大部は反応の活性中心を表す。活性中心には2つのMg²⁺イオンが存在する。本稿における分子図はUCSF Chimera[1]を用いて作成した。

Mg²⁺イオンが存在し、反応に重要な役割を担っている（第1図）。AGS以外にも全身性エリテマトーデス（Systemic Lupus Erythematosus: SLE）、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）などの免疫系疾患の患者にも *TREX1* 遺伝子に変異が見られ、酵素作用が失活することが知られている[2]。最近、長崎大学病院の SLE 患者から *TREX1* における稀少変異 D130N（130番目のアミノ酸残基におけるアスパラギン酸（D）からアスパラギン（N）への変異）が見つかった。この変異が *TREX1* タンパクに与える影響を調べるために、変異型のモデリングおよび MD シミュレーションを行った。

2. 1. 計算方法

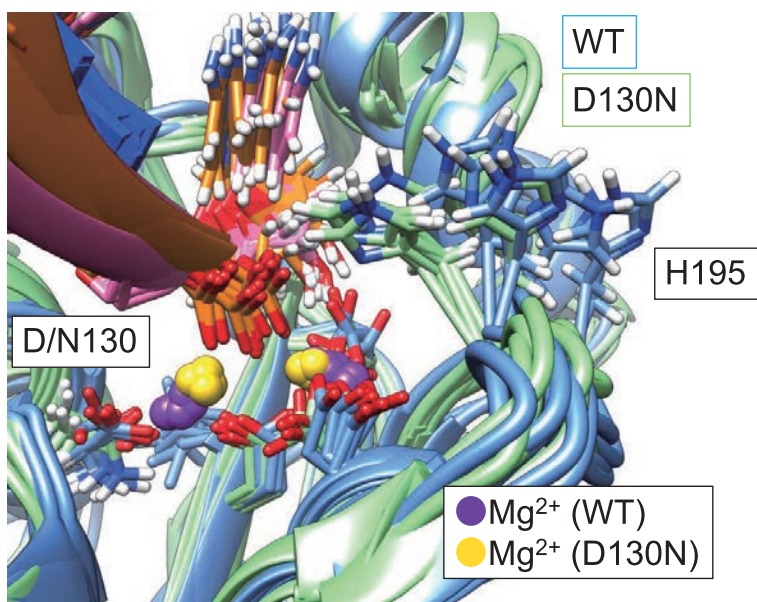
変異型のモデリングは野生型 *TREX1* と DNA の複合体 (PDB: 5YWS) [3] を出発点とし、SCWRL4[4] を用いて D130N 変異体を作成した。タンパク質の末端は、N 末端側、C 末端側をそれぞれアセチル化、*N*-メチルアミド化することでキャップした。

MD 計算は GROMACS[5] を用いて Reedbush-H 上で行った。力場は、タンパク質に AMBER ff99SB*-ILDN[6, 7]、DNA に ParmBSC0[8, 9]、水分子には TIP3P[10] を用いた。*TREX1* の活性中心にある Mg²⁺ には Allnér らのパラメータ[11]を用いた。野生型と D130N 変異型のそれぞれについて、独立した 150 ns の MD シミュレーションを 3 回ずつ行った。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[12]を用いた。系の温度は Velocity-rescaling 法[13]により 300 K に制御し、圧力は Berendsen 法[14]により 1 bar 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、50-150 ns のトラジェクトリを用いて解析を行った。水素結合解析は AmberTools17[15]を用いて行った。

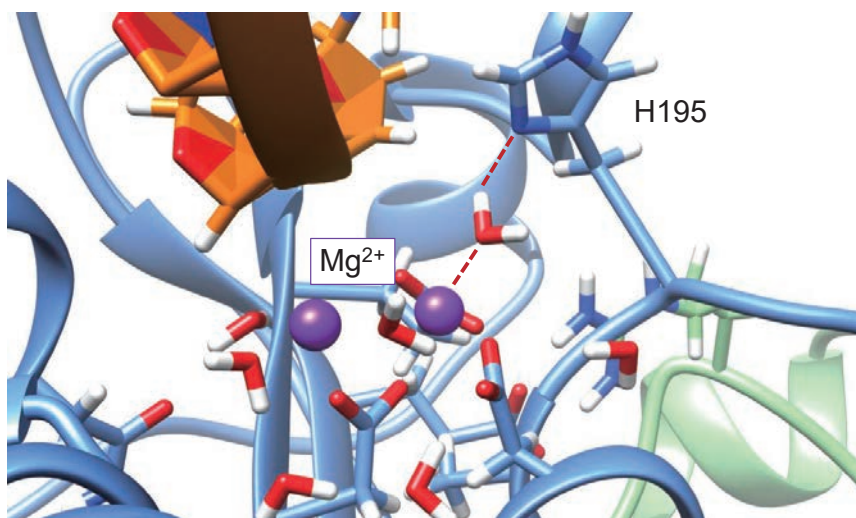
2. 2. 結果

第2図に MD 計算終了時（150 ns）の活性中心周りのスナップショットを重ねたものを示す。まず、Mg²⁺イオンの位置に着目すると、野生型 (Wild Type: WT) と比べて、D130N 変異型では変異が起きた N130 側の Mg²⁺イオンの位置が大きく変化し、2つの Mg²⁺イオン間の距離が短くなっている。これは側鎖が生体環境下で負電荷を持つアスパラギン酸（D）から電気的に中性であるアスパラギン（N）へ変異したことにより、N130 が Mg²⁺イオンを引き寄せられなくなったためと考えられる。Mg²⁺イオン間の距離は酵素反応の効率を大きく左右する[16]。この結果は、D130N 変異型では酵素反応の効率が大きく低下する可能性を示唆している。

次に H195 に注目すると、WT の 6 枚のスナップショットでは MD シミュレーション終了時において側鎖の位置が散らばっているのに対し、D130N 変異型では 1 つを除いてほぼ同じ位置にあり、活性中心側を向いていることが分かる。50-150 ns のトラジェクトリに対し H195 の側鎖のゆらぎの大きさ[17]を計算すると、WT の平均値は 0.23、D130N の平均値は 0.09 であり、トラジェクトリを通して D130N の方が側鎖のゆらぎが小さいことが分かった。トラジェクトリを解析した結果、D130N では H195 と Mg²⁺が水分子を介して相互作用しており、これにより H195 の側鎖が内側に閉じた状態で固定されることが分かった（第3図）。H195 は *TREX1* の酵素分解反応で重要な役割を果たす。反応サイクルにおいて、分解反応中は活性中心側に閉じている H195 が外側に開くことで、分解後の DNA 末端がリリースされる[16]。今回のシミュレーション結果は、DNA 分解反



第2図: MDシミュレーションの最後 (150 ns) のスナップショット。
WT, D130N それぞれについて, 3回のシミュレーション結果 (計6個) を重ね合わせている。



第3図: D130N変異型のスナップショット。

Mg^{2+} イオンが水の酸素原子と静電相互作用し, 水の水素原子が H195 の側鎖の窒素原子と水素結合している (赤点線)。

応が起きたとしても, 反応後に生成物をリリースできない可能性を示している。

次に, DNA の C3' 末端周りの相互作用をグラフで表示したものを第4図に示す。野生型では Mg^{2+} の片方が水分子を介して DNA の C3' 末端と相互作用しているのに対し, D130N では 2 つの Mg^{2+} が直接 C3' 末端と相互作用している。これにより, D130N 変異型では C3' 末端と Mg^{2+} の静電相互作用が必要以上に強くなり, 分解後の C3' 末端が活性中心から適切にリリースされず, TREX1 の機能が失われる可能性がある。これも, 変異により Mg^{2+} の位置が大きく変化して DNA 末端のリ

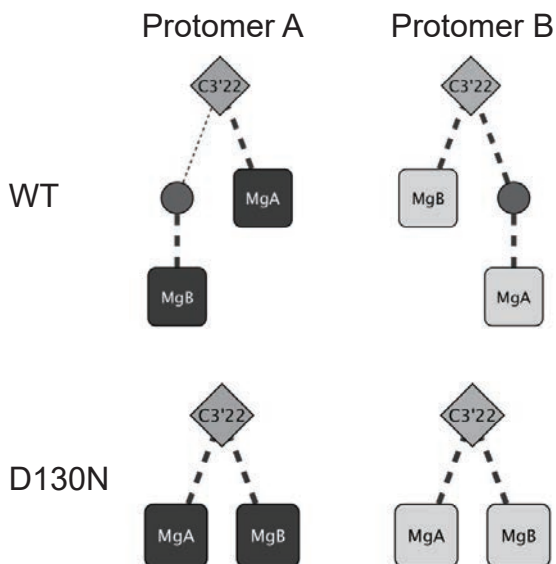
ン酸側に移動したことが理由の一つと考えられる。

このように、TREX1 の D130N 変異型では Mg²⁺ の位置が変化し、その影響から活性中心周りの相互作用が大きく変化することが分かった。これにより、DNA 分解反応の効率が低下すること、また、生成物が適切にリリースされなくなることが、TREX1 が機能を失う原因であることを示すことができた[18]。

3. Pyrin タンパク質の計算

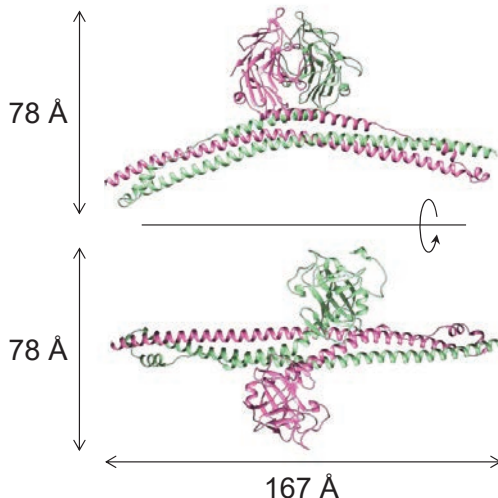
FMF は遺伝性の自己炎症性疾患の 1 つであり、周期的な発熱、関節炎、漿膜炎などを伴う。全世界で 10 万人以上の患者がいると推定されている。「家族性地中海熱」という病名の通り地中海沿岸地方の民族に多く見られる疾患であるが、日本国内でも 500-1000 人程度の患者がいると推定されている。

FMF の責任遺伝子として *MEFV* 遺伝子が特定されている。*MEFV* 遺伝子は 10 個のエクソン領域 (exon 1-10) から構成されており、FMF 患者には exon 10 に変異が多く見られることが分かっている。代表的な例として M694V, M680L, M694I などが挙げられる。最近、長崎大学のグループは、exon 10 領域の変異 I729M を発見した[19]。しかし、既存の変異も含め、変異と疾患に伴う炎症の機序との関係は明らかになっていない。



第 4 図: WT と D130N 変異型における相互作用グラフ。

C3' 末端 (C3' 22) と Mg²⁺イオン (MgA, MgB) の間で相互作用があるところを点線でつないでいる。線が太いものほど相互作用が強い。丸は水分子を表す。



第 5 図: Pyrin タンパク質二量体の分子モデル。

長いヘリックス領域 (Coiled Coil と呼ばれる) とコンパクトに丸まっている B30.2 領域から構成される。

TRIM20 タンパク (PDB: 4CG4) から作成。

本研究では、*MEFV* 遺伝子がコードする Pysin タンパク質に注目した。MD シミュレーションを行い、構造変化および相互作用の違いから変異が Pysin タンパク質に与える影響を調べることを目的とした。

3. 1. 計算方法

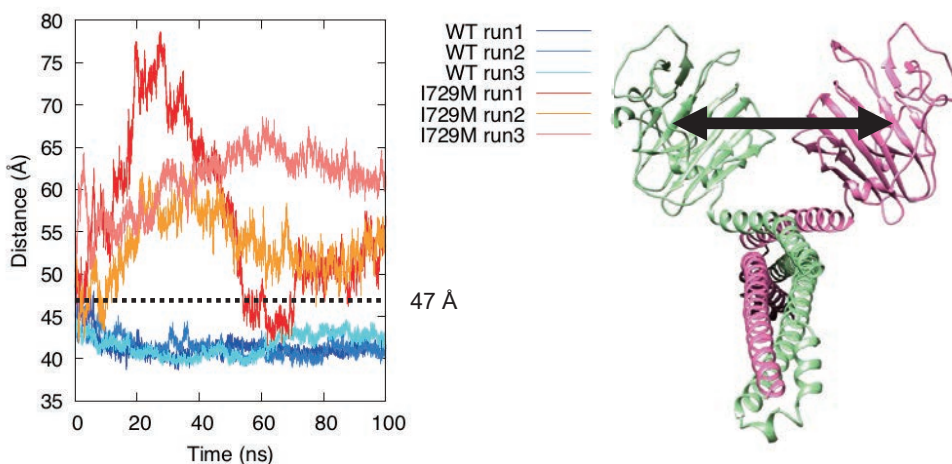
Pysin タンパク質二量体 (PDB : 4CG4, 第 5 図) [20] を用い、exon 10 領域を含む部分の野生型および変異型のモデルを作成した。第 5 図に示すように Pysin タンパク質は異方性が大きく、一方向に非常に長い構造を持つ。周囲に十分量の水分子を配置したシミュレーション系の総原子数は約 60 万個であった。このモデルを用い、各モデルにつき 100 ns の独立した MD シミュレーションを 3 回ずつ行った。力場は AMBER ff99SB-ILDN を用いた [6]。その他の計算条件は TREX1 と同様である (2. 1 節を参照)。

3. 2. 結果

第 6 図に、Production Run (0-100 ns) における WT, I729M における B30.2 領域の重心間距離の時間変化を示す。結晶構造では約 47 Å と報告されており [20]、野生型においては run 1-3 のいずれも短い距離 (40-42 Å) を保っている。一方、I729M では重心間距離が結晶構造のものよりも長くなり、計算中に大きく変動していることが分かる。他の変異型では、野生型と同程度の距離になるものも見られたが、計算により振る舞いは異なっており、3 回の計算全てにおいて安定して 40-42 Å の距離を保っていたのは野生型のみであった。また、トラジェクトリを観察していると、Coiled Coil 領域もシミュレーション中に大きくたわみ、全体的に柔らかい構造をしていることが明らかになった。詳細な解析のためには、計算時間を延長する必要があると考えられる。

4. まとめと今後の展望

本研究では自己炎症性疾患に関わるタンパク質 TREX1 および Pysin を対象に、遺伝子変異がタンパク質の構造および機能に及ぼす影響を調べることを目的として、MD シミュレーションを行った。



第 6 図: 野生型 (WT), I729M における B30.2 領域の重心間距離。

各モデルにつき run 1-3 の MD シミュレーションの結果を表示。結晶構造では重心間距離は約 47 Å である (文献 [19])。

TREX1 のシミュレーションでは D130N 変異により Mg^{2+} イオンの位置が変化し、それに伴い活性中心の相互作用が変化することが分かった。これにより、DNA 分解反応の効率が低下する可能性や、反応が進んだとしても生成物を適切にリリースできなくなる可能性が示唆された。これらの理由により、D130N 変異型では TREX1 の DNA 分解酵素としての機能が失われていると考えられる [18]。今後は患者から報告されている他の変異型に対しても計算を行い、変異の影響を調べていく予定である。

Pyrin のシミュレーションでは、変異型では B30.2 領域が大きく動き、重心間距離が大きく変動する様子が見られた。また、全体的に柔らかい構造をしていることが分かり、シミュレーション時間を延長する必要があると判断した。引き続き計算を行い、詳細な解析を行っていく。

謝 辞

本研究は『2020 年度 東京大学情報基盤センター「若手・女性利用者推薦」』の支援を受けて行われたものです。数値計算は東京大学情報基盤センターの Reedbush-H を用いて行われました。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。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] G.I. Rice, M.P. Rodero, Y.J. Crow, Human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, *J. Clin. Immunol.* 35 (2015) 235-243.
- [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] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D.E. Shaw, Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field, *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* 78 (2010) 1950-1958.
- [7] R.B. Best, G. Hummer, Optimized molecular dynamics force fields applied to the helix-coil transition of polypeptides, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 9004-9015.
- [8] A. Pérez, I. Marchán, D. Svozil, J. Sponer, T.E. Cheatham, C.A. Laughton, M. Orozco, Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: Improving the description of α/γ conformers, *Biophys. J.* 92 (2007) 3817-3829.
- [9] A.T. Guy, T.J. Piggot, S. Khalid, Single-stranded DNA within nanopores: conformational dynamics and implications for sequencing; a molecular dynamics

- simulation study, *Biophys. J.* 103 (2012) 1028-1036.
- [10] 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.
- [11] O. Allnér, L. Nilsson, A. Villa, Magnesium ion-water coordination and exchange in biomolecular simulations, *J. Chem. Theory Comput.* 8 (2012) 1493-1502.
- [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] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 014101.
- [14] 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.
- [15] D.A. Case, D.S. Cerutti, I. T.E. Cheatham, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, W.M. Botello-Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D.M. York, P.A. Kollman, AmberTools17, University of California, San Francisco, 2017.
- [16] S.L. Bailey, S. Harvey, F.W. Perrino, T. Hollis, Defects in DNA degradation revealed in crystal structures of TREX1 exonuclease mutations linked to autoimmune disease, *DNA Repair* 11 (2012) 65-73.
- [17] J.E. Fuchs, B.J. Waldner, R.G. Huber, S. von Grafenstein, C. Kramer, K.R. Liedl, Independent metrics for protein backbone and side-chain flexibility: Time scales and effects of ligand binding, *J. Chem. Theory Comput.* 11 (2015) 851-860.
- [18] 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.
- [19] Y. Endo, T. Koga, H. Otaki, D. Sasaki, R. Sumiyoshi, K. Furukawa, Y. Tanaka, Y. Katsunori, A. Kawakami, Idiopathic multicentric Castleman disease with novel heterozygous Ile729Met mutation in exon 10 of familial Mediterranean fever gene, *Rheumatology* 60 (2021) 445-450.
- [20] C. Weinert, D. Morger, A. Djekic, M.G. Grutter, P.R. Mittl, Crystal structure of TRIM20 C-terminal coiled-coil/B30.2 fragment: Implications for the recognition of higher order oligomers, *Sci. Rep.* 5 (2015) 10819.