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　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

アルツハイマー病・パーキンソン病（PD）・プリオン病など，神経変性疾患の患者の神経細胞にはアミロイドの異常蓄積が見られる。アミロイドがβシート構造を多く有することは知られているが，その構造不均一性などから通常のタンパク質に用いられる構造決定手法の多くが適用できず，詳細な立体構造の決定は極めて難しい。そのため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不明な点が多い。

このような中，近年の実験技術の進歩によりアミロイドの三次構造が報告されるようになった。最近ではPDと関わりがあるとされるα-シヌクレイン（αSyn）のアミロイドの構造が次々に報告されている。αSynはパーキンソン病，レビー小体型認知症，多系統萎縮症の特徴となるレビー小体の主要な構成タンパク質である。αSynは正常型では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[1]。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[2]。一方，レビー小体中に異常蓄積しているαSyn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。プリオン病の原因となるプリオンタンパク質の構造についてはクライオ電子顕微鏡で2021年に初めてアミロイドの構造が報告された[3]ものの，未だに分かっていない部分が多い[1]。

アミロイドは一般的に疎水性相互作用を豊富に持つことが知られている。そこで本研究ではアミロイドの疎水性領域に着目し，①固体NMRにより提案されたαSynアミロイド構造を用いた分子動力学（MD）シミュレーションを行い，②これまでの研究および①で得られた知見に基づきプリオンタンパク質の部分アミロイドのモデルを作成しMDシミュレーションを行った。疎水性残基への変異を導入した変異型についても計算を行い，疎水性相互作用がアミロイドの構造安定性に及ぼす影響を調べた。

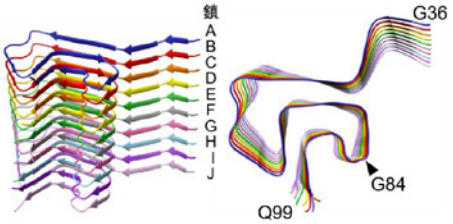

図 1：α-Synアミロイド

PDB：2N0Aの第36-99残基部分の構造。A-Jの10本の鎖が積層している。

２．計算方法

２．１．αSynのMDシミュレーション

αSynアミロイドの計算の初期構造には固体NMRにより得られた構造（PDB: 2N0A）[4]を用いた。構造が不安定な1-35，100-140残基を取り除

[1] 本研究を開始したのはクライオ電子顕微鏡による構造が報告されるより前である。報告された構造と本研究で作成したモデルアミロイドの間には細かい部分で違いは見られるが，モデル作成時に仮定したparallel-in-register βシート構造が実験でも観測されるなど，共通点も見られる。

き，N 末端と C 末端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。図 1 に計算に用いたαSyn アミロイドの構造を示す。

変異型のモデルは SCWRL4[5]により作成した。周囲に水分子，Na イオン，Cl イオンを配置し，150 mM の NaCl 水溶液を模した系を作成した。

MD 計算は GROMACS[6]を用いて Reedbush-U/H 上で行った。力場は，タンパク質には AMBER ff99SB-ILDN[7]，水分子には TIP3P[8]を用いた。温度は Velocity-rescaling 法[9]により 310 K に制御し，圧力は Berendsen 法[10]により 1 bar に制御した。MD 計算の時間刻みは 2 fs とした。最小化計算および平衡化計算ののち，400 ns のプロダクション計算を行った。各変異型について独立した MD シミュレーションを 3 回（野生型は 5 回）ずつ行った。

２．２．プリオンのモデルアミロイドの MD シミュレーション

プリオンのアミノ酸配列から疎水性残基が豊富な部分配列（第 107-143 残基）を取り出し，疎水性相互作用を豊富に持つ（疎水性コア）モデルアミロイドを作成した。まず，αSyn の結果から得られた知見などに基づき Swiss PDB Viewer[11]を用いて一層分のコンフォメーションを作成した。これを UCSF Chimera[12]を用いて 10 層分積層した後，Modeller[13]を用いてアミロイド構造の refinement を行った。変異型モデルは SCWRL4[5]により作成した。得られたモデルアミロイドのタンパク質の N 末端と C 末端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，最小化計算および平衡化計算の後 50 ns のプロダクション計算を行った。各変異型について独立した MD シミュレーションを 10 回ずつ行った。その他の条件はαSyn と同様である。

２．３．解析

それぞれの MD 計算で 10 ps ごとにスナップショットを取得し，αSyn は 100-400 ns，プリオンのモデルアミロイドは 40-50 ns のトラジェクトリを用いて解析を行った。二次構造解析には DSSP[14,15]を用いて，βシート化傾向を評価した。疎水性相互作用解析には PyInteraph[16]を用いた。疎水性アミノ酸残基の側鎖の重心間距離が 5 Å以内だった場合に疎水性相互作用をカウントし[17]，MD 計算のトラジェクトリ中に占める割合をスコアとして比較した。分子の図は UCSF

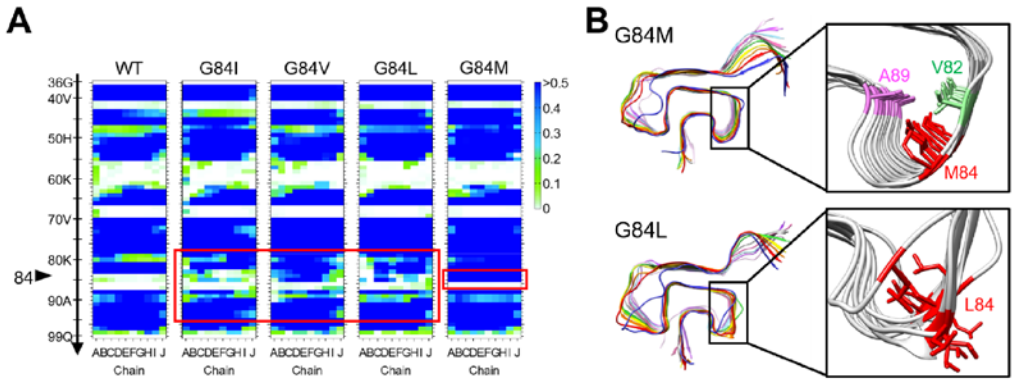

図 2：αSyn における MD 計算の結果

(A)βシート化傾向。(B)G84M および G84L 変異型の最後のスナップショットと第 84 残基近傍の U 字ループ構造における疎水性残基の側鎖の配向。

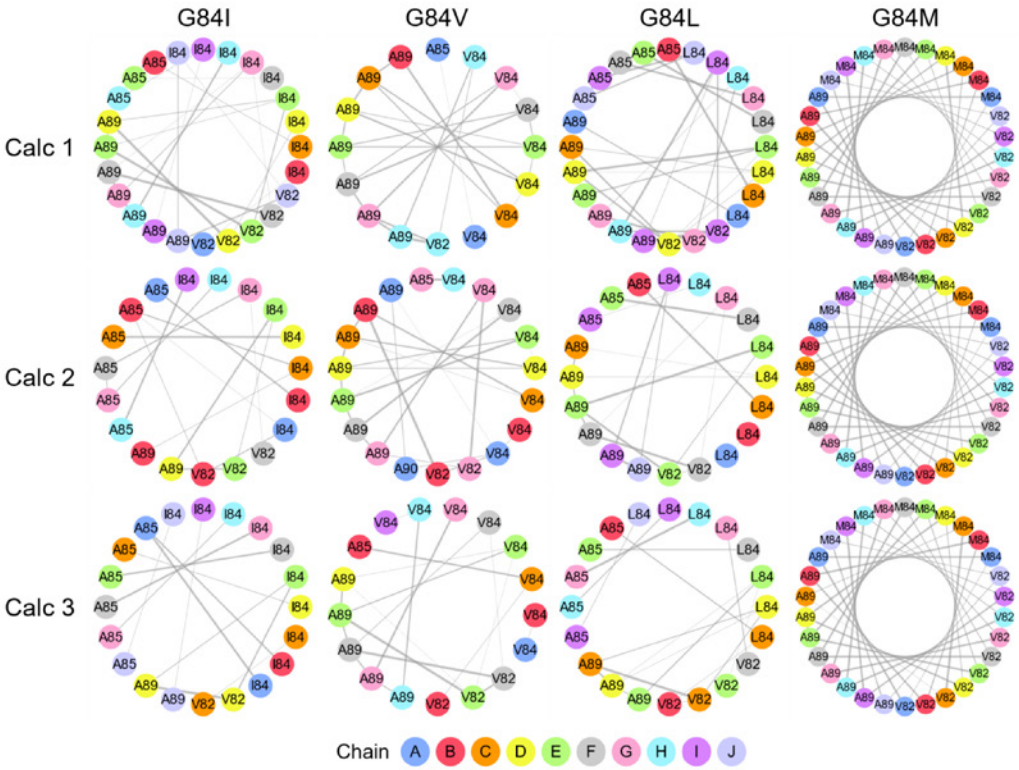

図 3：αSyn における疎水性相互作用

各点（ノード）がアミノ酸残基を表し，疎水性相互作用がある残基間を線で結んでいる。線が太いほど疎水性相互作用が強い。

Chimera[12]，疎水性相互作用のダイアグラムは Cytoscape[18]を用いて作成した。

３．結果

３．１．αSyn

本研究ではαSyn アミロイドの U 字ループ構造（第 84-87 残基）に注目した。このような U 字型の構造は αSyn 以外のアミロイドにも多く見られるため，本研究により得られた知見が他のアミロイドにも適用できる可能性がある。そこで，第 84 残基の Gly を疎水性残基（Ile，Met，Leu など）に変更したモデルを作成し MD 計算を行った。

図 2A に野生型（WT），G84I，G84V，G84L，G84M 変異型の計算から得られたβシート化傾向を示す。第 84 残基近辺を見ると G84M 変異体のβシート化傾向が特に大きく，構造が安定化していることが分かる。一方で G84I はβシート化傾向が小さく U 字ループ構造が不安定化していることが分かる。MD 計算終了時における G84M，G84L 変異型の U 字ループ部分のスナップショットを図 2B に示す。これを見ても，G84M では M84 が A89 や V82 と相互作用して U 字ループ構造が安定化していることが分かる。

図 3 には G84I，G84V，G84L，G84M 変異型の疎水性相互作用ダイアグラムを示す。どの変異型も第 84 残基と V82・A89 との疎水性相互作用が見られるが，G84M 変異型が一番強く，かつ再現性良く疎水性相互作用を形成していることが分かる。この理由は Met の側鎖が他の疎水性残基に比べて長く，周辺の疎水性残基と相互作用しやすいためと考えられる。僅かな長さの差が部分構造の安定性に大きく影響することが示唆される。

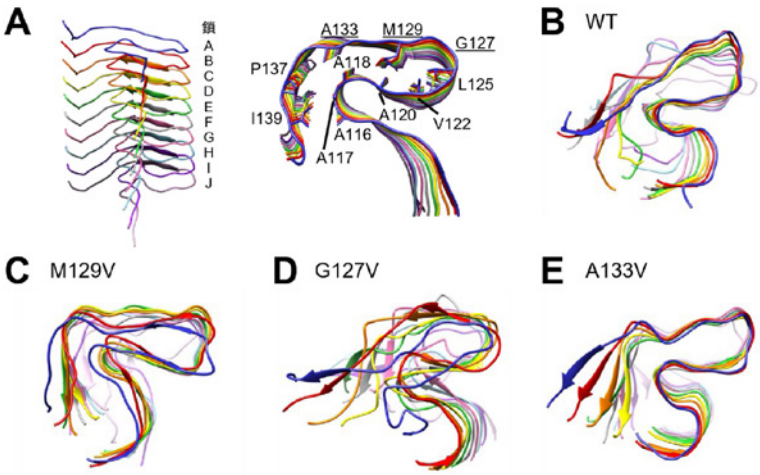

図 4：プリオンのモデルアミロイド

(A)作成したモデルアミロイドの構造。変異を導入したアミノ酸残基には下線を付している。(B)-(E)は MD シミュレーション終了時のスナップショット。(B)WT，(C)M129V，(D)G127V，(E)A133V。

３．２．プリオンのモデルアミロイド

本研究で作成したモデルアミロイドの構造を図 4A に示す。変異はこれまでの実験研究などの報告に基づき，G127V，M129V，I138M，A133V を考えた。

図 4B-E に 50 ns の MD 計算における最後のスナップショットを示す。野生型（WT）に比べて，M129V 変異型は全体的にアミロイド構造を保っているが（図 4C），G127V 変異型ではアミロイド構造が大きく崩れている（図 4D）。M129V 変異は疎水性コアを大きく安定化することが分かっているが，本モデルの計算結果でも安定化されており，実験事実と矛盾しない。また，ヒトのプリオンタンパクのアミロイドはクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）と関係しているが，G127V 変異は CJD に感染し難いことが分かっている。本計算結果より，G127V 変異型はアミロイドの構造の保持が難しく，蓄積が困難になることで CJD に感染し難くなる可能性が示唆される。

図 5 はアミノ酸残基間の疎水性相互作用のスコアを比較したものである。WT と M129V 変異型で U 字ループ部分（第 120-130 残基，図 4A 参照）の相互作用を比較すると，WT では V122-M129 のスコアが A120-M129 や V122-L125 に比べて大きいのに対し，M129V 変異型では 3 つのスコアが同等（～400）になっており，変異により相互作用のバランスが変化していることが分かる。さらに，M129V 変異型では変異箇所のスタック方向の相互作用（図 5，M/V129-M/V129）のスコアが高くなっていることからアミロイドが安定化されたことが見て取れる。また，A115-V121 および A118-P137 では M129V 変異によりスコアが減少しているのに対し，A113-V121，A117-A133，A117-I139，I139-I139 では（有意性はないが）スコアが増加している。このように，変異の影響は変異箇所近辺だけでなく，より広範な領域に影響を与えながら疎水性相互作用のバランスを変化させていることが分かる。また，G127V 変異における構造の不安定性は V122-V122，V122-M129，L125-L125，L130-L130 のスコアの大幅な減少からも確認できる。

A133V 変異型の MD 計算における最後のスナップショット（図 4E）は WT に比べて構造が安定化しているように見える。これは Ala から Val へ変わったことにより A118-V133 の疎水性相互作用が大きくなり U 字ループの「閉じ口」の部分（図 5 右下図を参照）が安定化したこと，また，

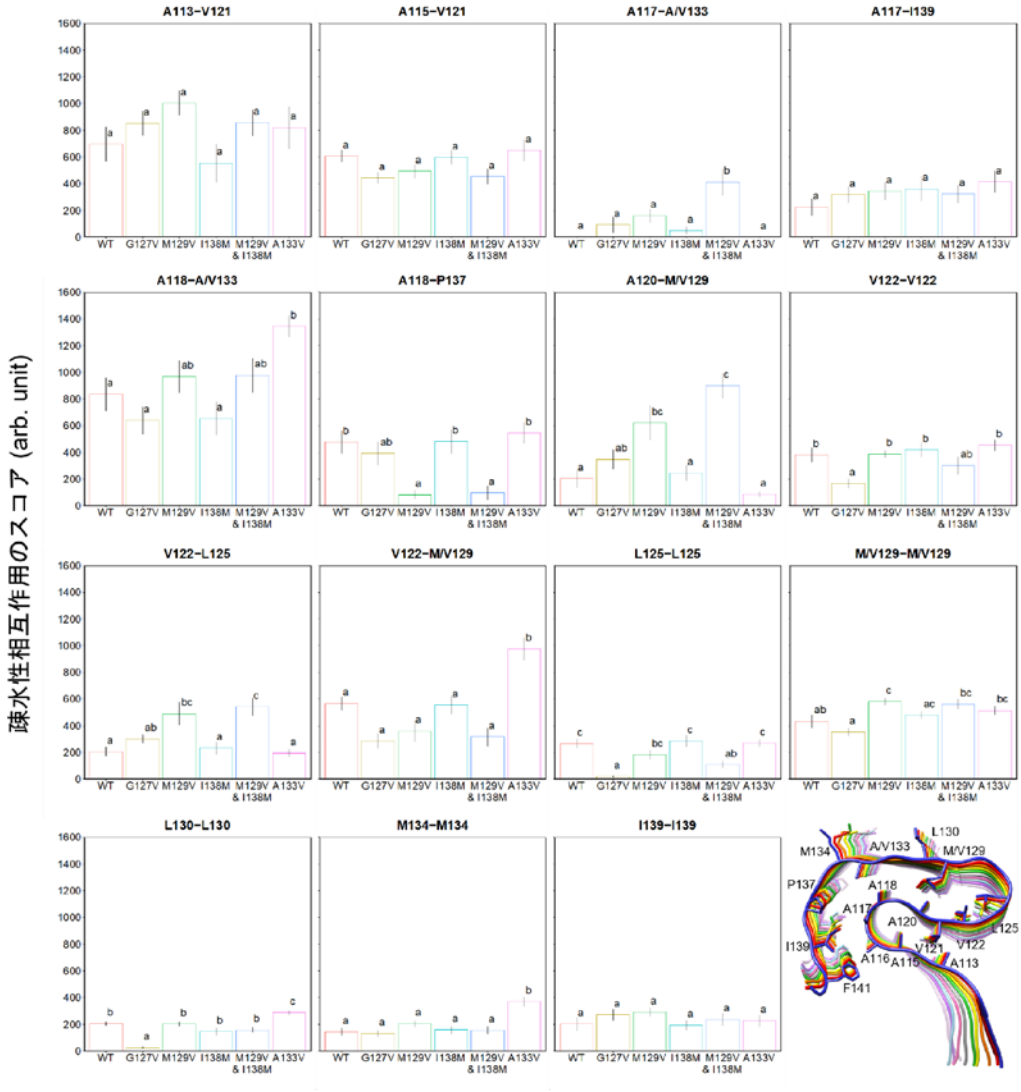

図 5：疎水性相互作用のスコア

エラーバーは標準誤差を示す。変異型間のスコアの差の有意性については Tukey 法（$\alpha = 0.05$）で比較した。同じアルファベットが付記されている棒グラフ間には有意差がない。

それに伴い M134-M134，L130-L130 のスタック方向の相互作用や V122-M129 の相互作用が増加したことが原因と考えられる（図 5）。図 6 にシミュレーション中における A118-A/V133 の α 炭素（C_α）間の距離の変化を示す。これを見ても，A133V 変異型では距離が 7 Å 程度に保たれており，WT に比べ安定化していることが分かる。

I138M 変異型および M129V&I138M 変異型についても，疎水性相互作用の変化やそれに伴う構造変化について知見を得ることができた。特徴的なのは，A120-M/V129 や A117-A133 の疎水性相互作用に見られるように，M129V 変異により強くなった相互作用が I138M 変異を導入することでさらに強くなる点である（図 5）。これは第 128-133 残基の β シートがシフト（図 4A では左方向）することで U 字ループ部分の相互作用が入れ替わることに起因しており，M129V と I138M が相性の良い変異であることを示唆している。詳細な議論は文献[19]を参照されたい。

4．まとめと今後の展望

本研究では α Syn アミロイドに変異を導入したモデルを幾つか作成し，MD 計算を行った。U 字型のループ構造に着目し，疎水性コアの疎水性相互作用が α Syn アミロイドの構造安定性に大きく影響することを示した。また，これらの知見に基づき，プリオンタンパク質の一部の配列を用いたモデルアミロイドを作成して MD 計算を行った。実験などで報告されている特徴的な変異型についても計算を行い，我々のモデルが実験で得られた結果と大きく矛盾しないことを確認した。さらに，疎水性相互作用に注目し，疎水性残基の変化が疎水性コア（ひいてはアミロイドの構造）の安定性に大きく影響することが分かった。今後は，近年，数多く報告されているアミロイドの構造（プリオンのアミロイドを含む）などと比較することで，疎水性相互作用とアミロイドの構造安定性について議論を深めていきたいと考えている。

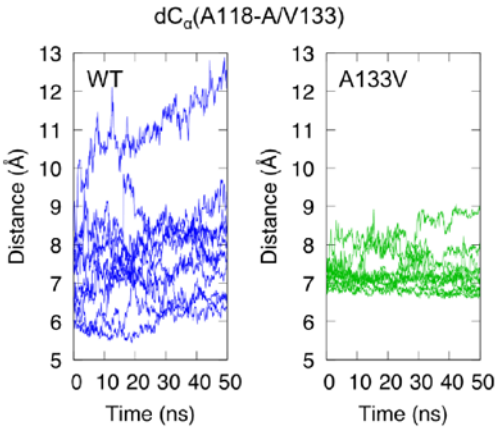

図 6：A118-A/V133 の C_α 間の距離

謝　辞

本研究は『2019 年度（前期・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：EX19301）によって行われました。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/H 上で行われました。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] A. Pineda, J. Burré, “Modulating membrane binding of α-synuclein as a therapeutic strategy” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114, 1223-1225 (2017)

[2] 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)

[3] A. Kraus, F. Hoyt, C. L. Schwartz, B. Hansen, E. Artikis, A. G. Hughson, G. J. Raymond, B. Race, G. S. Baron, B. Caughey, “High-resolution structure and strain comparison of infectious mammalian prions” Mol. Cell 81, 1-12 (2021).

[4] 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)

[5] G. G. Krivov, M. V. Shapovalov, R. L. Dunbrack, “Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4” Proteins: Structure, Function, and