

アルツハイマー病特異的タウ線維のマウスにおける 再構成モデルの確立

鹿野 真吏亜

東京大学大学院薬学系研究科 機能病態学教室

1. はじめに

高齢化の進行に伴いアルツハイマー病(AD)の患者数は劇的に増加しているが、根本的治療法は存在しない。その要因の1つとして、AD研究のモデルマウスの妥当性の低さが挙げられる。AD病理として脳全体でのタウの凝集・蓄積とそれによる神経細胞死や脳委縮による認知障害が挙げられる(図1)。凝集したタウは遊離タウを巻き込んで、さらに凝集を誘導し、神経細胞間を伝播する。このタウ蓄積の拡大は認知機能低下とも相関することから(Yanamandra et al., Neuron, 2013)、AD病理の本丸であると考えられる。

凝集タウは神経細胞内で paired helical filament (PHF) という疾患特異的な線維構造とすることが知られていたが、詳細な構造は不明であった。近年クライオ電顕により、PHFの断面構造が原子レベルで解明され、AD core と呼称される微小管結合領域を核としてもつことが判明した(図1,2)。また、PHFは他のタウ蓄積関連疾患(タウオパチー)の凝集タウとは線維の構造が異なり、この構造特異性が病理や伝播の疾患特異性を司るとされている。しかし既存のモデルマウスでPHF形成を再現できた例は存在しない。これはヒトより短命なマウスで、長期的なタイムスパンのヒトAD病理を再現するのが困難であるためだと考えられる。すなわち、次世代ADモデルマウスを作出するには、マウス脳でPHFの蓄積を安定的に加速させるアプローチが必要である。

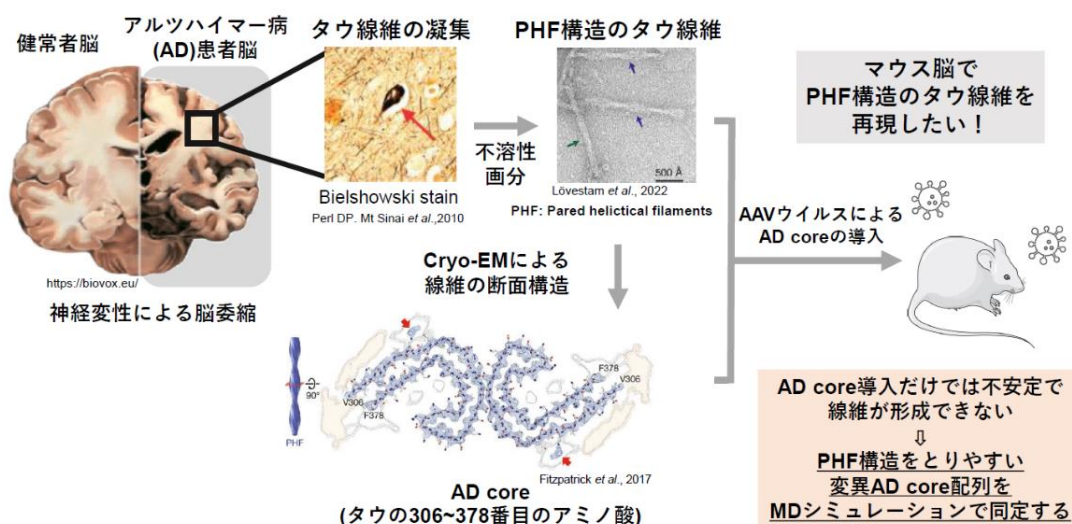


図1. 本研究の目的とアルツハイマー病(AD)のタウ病理

マウス脳で PHF の蓄積を再現するために、PHF を安定的かつ迅速に形成するタウの導入を検討し、AD core 領域のタウ断片を候補とした。申請者は AD core をマウスに導入することを想定し、マウスに AAV ウイルスを用いて AD core コンストラクトの発現を行った。しかし現段階で PHF の再構成はできていない。これは遊離 AD core が線維を迅速に形成できず不安定化するためであると考えた。よって、導入した AD core を迅速かつ安定的に PHF にするために、線維構造を安定化させる配列条件や条件を同定することが必要であると考えた。そこで、本研究では次項に示す通り、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いてアミノ酸配列条件の同定を行った。

2. 本課題の特色

前項の通り、AAV ウイルスによって変異 AD core を導入することで、PHF 線維をマウス脳で再現し、さらなるタウの病理解析や薬理試験を行っていききたい。そこで、マウス脳の脳で寿命以内の短い時間で PHF 構造を形成する変異を特定することを目的とした。

しかし、そもそも実験的に PHF 構造を再現することが困難なため、変異実験行って PHF 構造形成や安定化に寄与する変異を調べることができない。また構造が再現できたとしても網羅的に分子生物学的に変異実験を行うのはコストと時間がかかりすぎるため現実的ではない。そこで本研究では、実験の代わりに計算機の中で PHF 構造を仮想的に再現し、その仮想構造に対して変異による構造形成・安定性の変化を調べる計算を行った。具体的には、近年進展の著しい AI ベースと分子動力学シミュレーションのツールを組み合わせることで有望な変異を探索した。

3. 変異導入領域の検討

PHF 構造のコア部分は 73 アミノ酸残基から成っており(図 2)、これをそれぞれ別のアミノ酸 (19 種類)へ網羅的に点変異させるには、 $73^{19} \approx 10^{35}$ 通りもの場合の数があり現実的ではない。

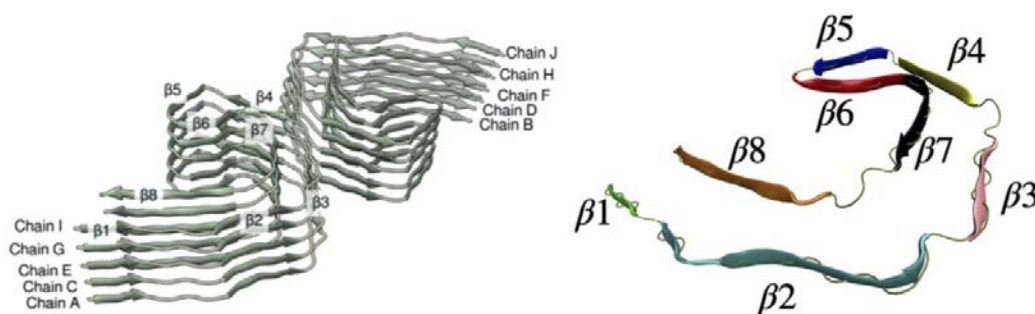


図 2. PHF の断面構造。(左) 複数の Chain が結合した繊維上の PHF 構造と
(右) ひとつの Chain を取り出した構造。Leonard et al., *Front. Mol. Biosci.* 2021 より引用。

そこでこれまでに、PHF 構造のシミュレーションを行い、変異が有効な部位を絞ってきた。具体的には、PHF 繊維からひとつの Chain を外力を加えて剥がすシミュレーションを複数回行った。Chain が剥がれる際にどの相互作用が最も力が必要だったかを調べることで、PHF 繊維形成に重要と思われる(遷移状態に関連していると予想される)相互作用を特定した。その結果、他の Chain と β シートを形成している $\beta 1 \sim \beta 8$ のうち、 $\beta 4$ と $\beta 7$ が特定された (図 3)。

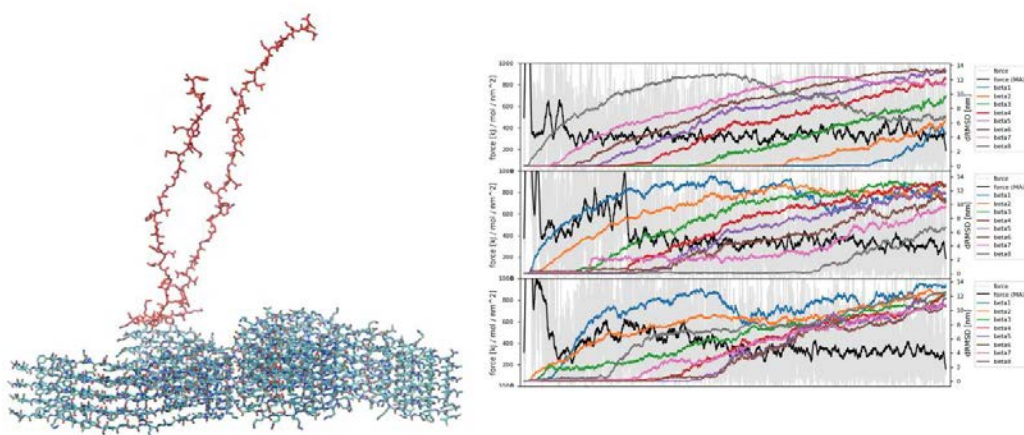


図 3. PHF 繊維のひとつの Chain に外力を加えて外すシミュレーションの結果。どの部位が外れる際に最も力が大きくなったかを調べることで、遷移状態における相互作用を調査した。

4. 変異配列の検討

以上のように変異導入領域を絞り込んだ上で、当初は、解明されている PHF 構造に対して ProteinMPNN (Duparas, et al., *Science* 2022) というグラフニューラルネットベースのアミノ酸配列設計(主鎖構造を入力としてそれを安定化すると予想される配列を提案する AI 手法)を適用し、PHF 構造を安定化させるアミノ酸配列を提案させ、少数の有望な変異箇所を特定した後に、それらに自由エネルギー摂動法(Free Energy Perturbation) (Mey et al., *LiveCoMS* 2020)を適用することで変異させた際の PHF 構造の自由エネルギー変化 $\Delta\Delta G$ を求めることを計画していた。しかし、ProteinMPNN の結果を細かく精査したところ、提案配列と天然配列との配列一致度(sequence identity)が 2 割程度と予想以上に低く、少数の変異候補を絞ることが難しいとともに、提案配列が本当に安定な PHF 構造を生成するのか、その提案の信頼性を評価する必要が生じた。そこで提案配列の構造と安定性を調査するために、ProteinMPNN 提案の信頼性を評価するために、ProteinMPNN スコアの良い配列から順におよそ 1000 配列について、AlphaFold (Jumper et al., *Nature* 2021)による構造予測と pLDDT (安定性と相関があると言われている)を計算した。

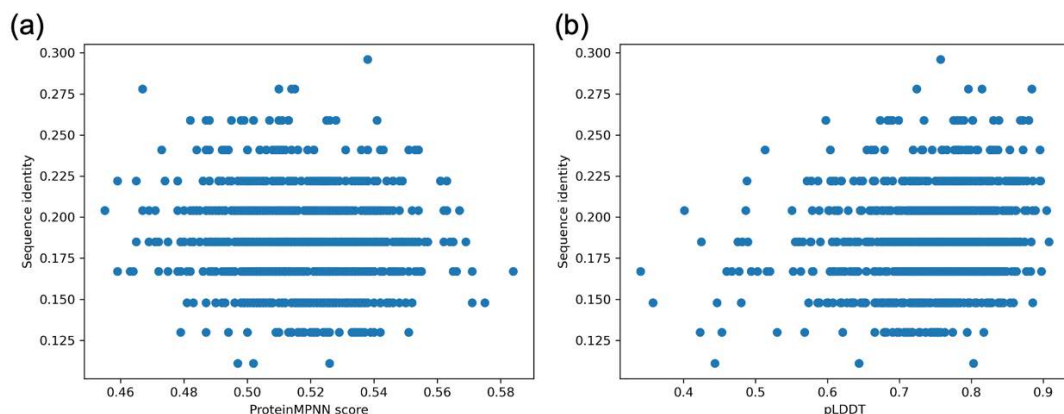


図 4. 提案配列の天然配列への一致度(sequence identity)と各種スコア。(a) ProteinMPNN スコアとの散布図。(b) AlphaFold の pLDDT との散布図。

その結果現状の PHF 構造では ProteinMPNN スコアと提案配列の天然配列との一致度には相関がないことがわかった(図 4)。天然配列がとる PHF 構造は形成には時間がかかるが一度形成されたら非常に安定なので、この結果は ProteinMPNN における PHF がとる beta-helix 様構造への適用限界を示唆している。

一方で、上記の計算によって、AlphaFold 計算により得られた pLDDT と天然配列一致度にはよい相関が見られることが判明した(図 4)。そこで、ProteinMPNN の代わりに AlphaFold を用いて変異候補を提案させる計画へと切り替えた。具体的には、Ovchinnikov らによって提案された、予測構造と入力構造のずれを配列空間まで誤差逆伝播させることで配列を最適化する ColabDesign フレームワーク(<https://github.com/sokrypton/ColabDesign>)を用いて、PHF 構造を入力とした配列最適化計算を行った。ColabDesign では自由な箇所天然配列を保存させる拘束を与えることができるが、最初は拘束を与えずに配列初期条件(乱数シード等)を替えて長時間計算を実行したところ、PHF 構造を再現しかつ pLDDT が高い配列を探索することに成功した(図 5)。更にその後、 $\beta 4$ 部位(図 1, 2 を参照のこと)、 $\beta 7$ 部位、PGGG motifs の配列を保存させる等の拘束を与えて、配列最適化計算を行った。条件を厳しくすると pLDDT が悪化したが、ある程度の拘束条件では高い pLDDT を得ることができた。

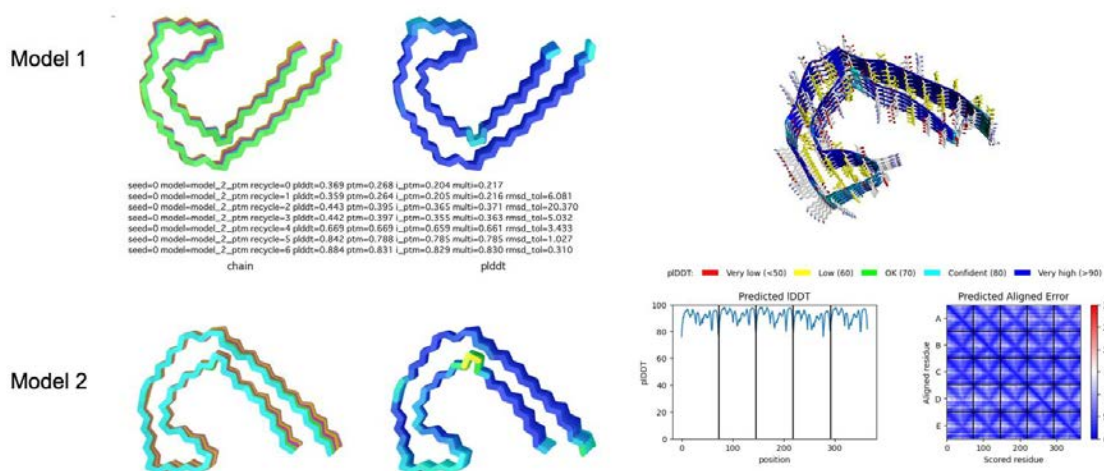


図 5. ColabDesign で探索した人工配列を AlphaFold に再予測させた構造と pLDDT (配列に拘束をかけていない場合)。

その後、ColabDesign によって得られた構造が本当に安定かどうか調べるために、分子動力学シミュレーションを行い検証した。天然配列の PHF 構造と、複数の ColabDesign 配列の構造を含め、それぞれ分子動力学シミュレーションソフトウェア OpenMM を用いておよそ 500 ns のシミュレーションを行った。リアルな条件とは異なり、5 量体のみからなる beta-helix でシミュレーションであるため、天然配列においても表面のモノマーが一部剥がれるものが観測されたが全体としては構造は安定であった。ColabDesign 配列でも配列探索時に拘束が少なかった pLDDT の高い配列は天然と同様の安定性が確認できた。しかし、拘束条件が多かった配列はシミュレーション初期(< 100 ns)の段階で一部構造の崩壊が見られた。

課題の後半では、以上のように PHF 構造をターゲットとして AI 手法で”redesign”した配列(ColabDesign で得られた配列だけでなく、ProteinMPNN の提案配列も含めて)を実験で検証した。

具体的には、大調印から精製した提案配列の AD core コンストラクトを試験管内で高塩濃度条件下で振盪し、電子顕微鏡で形成された線維を観察した。そのうち、ColabDesign で得られた候補配列は患者線維様の PHF の特徴であるねじれた構造を示した (図 6)。今後クライオ電子顕微鏡で詳細な断面構造を観察する予定である。

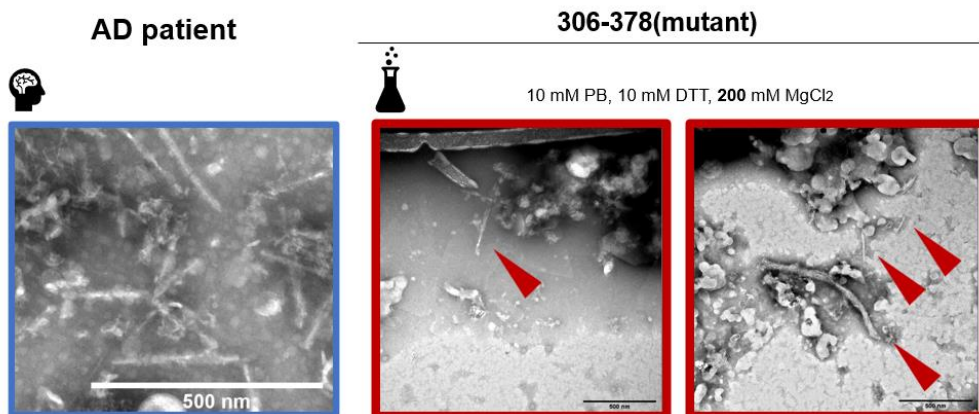


図 6. 変異候補は PHF 様線維を形成した

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始多大なご指導を賜った埼玉大学大学院理工学研究科 松永 康佑准教授に深謝致します。また、今回 Wisteria/BDEC-01 スーパーコンピュータシステムの仕様の機会を与えてくださった東京大学情報基盤センターの皆様に深く御礼申し上げます。