

レプリカ交換分子動力学法の生体分子への 応用

宮下尚之[†] 杉田有治^{††}

我々は方法論やプログラムを開発しながら、疾患や生体機構に関連する生体分子の機能解明の為の研究を中規模—大規模並列型計算機を用いて行っている。現在、アルツハイマー病の機構解明に関する研究を行っており、アミロイドβペプチドの生成機構を関連蛋白質の構造予測から解明しようとしている。具体的にはレプリカ交換分子動力学法

(REMD) という効率の良いサンプリング手法を使い、生体膜中のアミロイド前駆体蛋白質 (APP) の構造予測を行っている。この計算により、アルツハイマー病の初期過程がわかってきたので報告する。

Structure prediction of APP fragments using Replica-exchange molecular dynamics simulation

Naoyuki Miyashita[†] and Yuji Sugita^{††}

Aggregation/oligomerization of Amyloidβ (Aβ) peptide is an essential event of the pathogenesis of Alzheimer Disease (AD). The Aβ peptide is a product of cleavage of Amyloid precursor protein (APP) by β- and γ- secretases. We have studied the mechanisms of Aβ peptide production by tertiary structure prediction of APP fragments in the membrane using Replica-exchange molecular dynamics simulations.

1. Introduction

アルツハイマー病は神経変性疾患の一つで、大脳や海馬等の神経細胞が死滅して脳が萎縮し、判断能力の低下や記憶障害等を引き起こす疾患である[1]。我が国では認知症の原因の60%を占め100万人ほどの患者がいると言われているが、世界的に見ても非常に患者の多い疾患である。この疾患には若年で発症する家族性と老年期に発症する老年性がある。家族性は遺伝的な変異が原因となっているが、基本的な疾患の進行過程は老年性とほぼ同じであろうと言われている。

アルツハイマー病の原因は不明であるが、現在のところアミロイド・カスケード仮説と呼ばれる説が有力である[2]。この仮説はアミロイドβ (Aβ) ペプチドの凝集化がアルツハイマー病進行の鍵となっていると考える説である。この説による疾患進行過程はAβペプチドの生成、Aβペプチドの凝集化、そして細胞死の3つの過程に分ける事ができる(図1)。Aβペプチドの生成過程では、神経細胞(ニューロン)表面に存在する膜蛋白質のアミロイド前駆体蛋白質(APP)がβ切断酵素によってβ部位を切断されて膜蛋白質APP-C99が生成される。それが更にγ切断酵素によってε, ζ, γ部位の順に切断され、Aβペプチドが生成される[3]。Aβペプチドになる部分はAPPの生体膜付近の領域にあたる(図2の残基番号1-42付近)。次に、Aβペプチドの凝集化過程では生成されたAβペプチドが凝集し、アミロイド繊維を形成する。更にそれらが集まって老人斑を形成する。最後に細胞死の過程では神経細胞中の微小管を形成するτ蛋白質が、リン酸化することで微小管から解離し、その結果ニューロンは神経原繊維変化(細胞死)をおこす。Aβペプチドの凝集化過程はアミロイド仮説の基本原理である事から注目され、既に関験やシミュレーション等で様々な研究がなされている[4]。

最近の研究で、γ切断部位の位置の違いで長さの異なるAβペプチドが幾種類か生成されるが、通常生成される40残基のアミノ酸でできたAβ₁₋₄₀より、まれに生成される42残基のアミノ酸でできたAβ₁₋₄₂の方が凝集化しやすい事がわかってきた。実際、Aβ₁₋₄₂は老人斑の主成分となっている[5]。また、家族性アルツハイマー病ではγ切断酵素の特定部位に遺伝的な変異がありAβ₁₋₄₂が生成されやすくなっている場合が多い。従って、確かにAβペプチドの凝集化過程も重要であるが、疾患を理解する為にはAβペプチドの生成過程の研究が必要であろう。ここ数年で生成過程の研究は増えてきたが、APPやγ切断酵素の膜領域近傍の揺らぎが大きく、関連膜蛋白質間の離合がおき易い事から、現在のところ実験的手法によってこれらの蛋白質の立体構造

[†] 理化学研究所 次世代計算科学研究開発プロジェクト
RIKEN Computational Science Research Program

^{††} 理化学研究所 基幹研究所
RIKEN Advanced Science Institute

はまだ決定されていない。

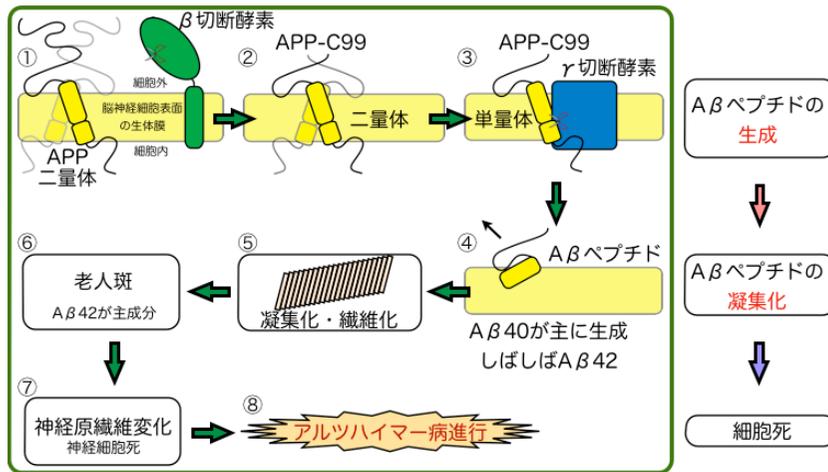


図 1: アミロイド仮説

一方で、近年の計算科学、計算機科学の技術的な進歩により、ある程度の規模の分子や膜蛋白質であれば、分子動力学法 (MD) や拡張アンサンブル法等のサンプリングを加速させるシミュレーションを用いて、その蛋白質の運動や構造の予測ができる様になってきた。我々は Aβ ペプチドの生成過程における APP の構造に注目し、拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換分子動力学法 (REMD) [6] を用いて生体膜中にある APP-C99 の膜貫通部位フラグメントの野生型および変異型の複合体、単量体、Aβ ペプチドの生成直後の構造を予測し、Aβ ペプチド生成過程について考察した[7]。

我々は以下の 4 つの計算を行った。

1. **野生型および変異型 APP の膜貫通部位フラグメントの二量体構造:** 野生型 APP の生体膜近傍領域には Gly-xxx-Gly モチーフというアミノ酸残基の並び (x は何でもよい) が 3 つ連続して並んでいる領域がある (図 2 の残基番号 25-38 の領域)。実験によると、APP が二量体を形成する際にこの領域を介して二量化している事がわかっている。しかし、2 番目の Gly₂₉-xxx-Gly₃₃ が二量化に寄与しているという報告 [8] と、3 番目の Gly₃₃-xxx-Gly₃₇ が二量化に寄与しているという報告 [9] がある。そこで我々は野生型 APP (Aβ₂₃₋₅₅) の膜貫通部位フラグメントの二量化構造予測を行い、どちらで二量化しているのかを調べた。また、Gly₂₉-xxx-Gly₃₃ モチーフの

Gly (グリシン) を Leu (ロイシン) に置き換えて Gly-xxx-Gly モチーフをなくした変異型 APP も二量化している事がわかっている。しかし γ 切断酵素による ε 部位での切断はおきるが Aβ ペプチドの生成はおきかない事がわかっている。野生型 APP と同様に変異型 APP (Aβ₂₃₋₅₅) の膜貫通部位フラグメントの二量化構造予測を行い、野生型と構造の比較を行った。

2. **生成直前と直後の Aβ ペプチドの構造:** 実験では APP-C99 のおおまかな二次構造 [10] はわかっているが、立体構造はわかっていない。APP-C99 は γ 切断酵素と結合する際に単量体になるが、この立体構造を予測する為に Aβ ペプチドの領域を含む Aβ₁₋₅₅ の構造予測を行った。膜に似せた環境 (ミセル中や低誘電率環境) での Aβ ペプチドの立体構造は NMR によって解かれている [11] が、生体膜中での立体構造はわかっていない。Aβ ペプチド (Aβ₁₋₄₀) の生成直後の構造予測を行い、切断前後の構造変化過程を考察した。

3. **Aβ₁₋₄₀ と Aβ₁₋₄₂ の生成直後の相違:** 実験的に Aβ₁₋₄₂ の凝集化速度が Aβ₁₋₄₀ より速い事がわかっている。生成過程でも差が存在するのか確認する為に、膜中の Aβ₁₋₄₂ の立体構造予測を行った。

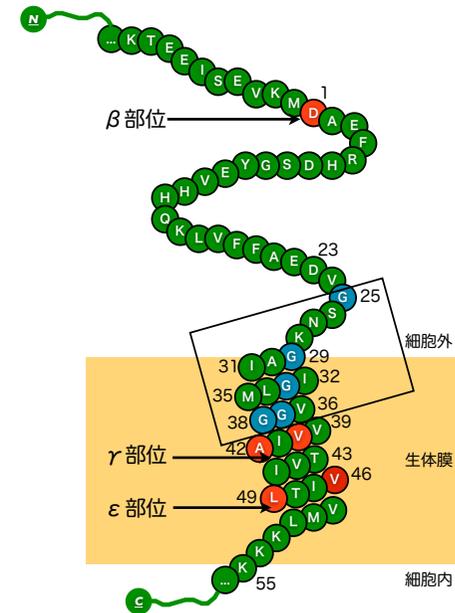


図 2: APP の配列

2. Material and Methods

我々は野生型と変異型の APP の膜貫通部位フラグメント $A\beta_{23-55}$ の二量体, APP の膜貫通付近フラグメント $A\beta_{1-55}$ の単量体, そして $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ の構造予測をレプリカ交換分子動力学法 (REMD) を用いて行った.

(1) 初期構造

$A\beta_{1-40}$ の初期構造は Protein Data Bank (PDB) ID: 1BA4 を用いた. $A\beta_{1-42}$ はイソロイシン (ILE) とアラニン (ALA) を $A\beta_{1-40}$ に足したものをを用いた. $A\beta_{1-55}$ には $A\beta_{1-40}$ に 15 残基 (IATVI VITLV MLKKK) を足したものをを用いた. 野生型 $A\beta_{23-55}$ の二量体構造予測には, $A\beta_{1-55}$ の安定構造から $A\beta$ の 1-22 残基を削除したものを 2 つ用いた. 変異型 $A\beta_{23-55}$ は野生型同様の構造に 2 つの Gly を Leu に置換したものをを用いた.

(2) Implicit solvent/membrane model

Implicit solvent model は計算時間を減らす時にしばしば使用する方法で, 水と生体膜の影響を誘電率や表面積, 排除体積効果等で近似する方法である. 本研究では単量体の計算は Generalized Born with a simple switching function 法 (GB/SW) [12] を用い, 二量体の計算は Implicit membrane model 1 法 (IMM1) [13] を用いた. これらの近似法を用いた MD や REMD シミュレーションは, 実験で得られた蛋白質の運動や立体構造を良く再現するので, 近年よく使われている. しかし, 分子間の 1-2 個の水や 1 個の脂質分子等の記述は原理的にできないのでその様な状況が重要な場合には使用を控えた方がよい. 本研究では GB/SW の力場に CHARMM parm22 CMAP を用い, IMM1 の力場に CHARMM19 EEF1.1 を用いた. 膜の厚さはいずれも 30Å とし, 脂質の Head group の存在する領域を膜の表面から上下 2.5Å とした.

(3) レプリカ交換分子動力学法 (REMD)

大規模系で通常のカノニカルアンサンブルの MD シミュレーションを行うと, 有限時間のシミュレーションでは, 通常 trajectory はポテンシャル障壁をのり越える事ができず, local minimum に捕われてしまう. 従って, 正しいアンサンブルを得る事ができない場合が多い. REMD ではパラメータの違う複数のレプリカを用意し, 同時に MD 計算を行い, ある MD のステップ毎に隣り合うパラメータをもつレプリカ間でそのパラメータ交換をメトロポリス・クライテリアに従って行う (図 3). これを繰り返す事により, trajectory のパラメータ空間上でのランダムウォークがおき, 構造空間上のランダムウォークが実現される. すると trajectory は local minimum から抜け出す事が可能となり, サンプリング効率は上がる. この方法はレプリカ間の通信がパラメータ交換の評価の際だけなので, 原理的に並列化効率の高い方法である.

我々は温度をパラメータとした REMD シミュレーションを行った. 二量体の計算には 300K から 500K までの温度を 32 個に分割し, 32 個のレプリカを用いた. 単量体の計算では 300K から 700K までの温度を 32 個に分割して 32 レプリカの温度 REMD 計算を行った. いずれも 2 ピコ秒(ps)毎に交換の評価を行い, 単量体は 1 レプリカ当たり 10 ナノ秒(ns) (total 320ns), 二量体は 1 レプリカ当たり 22ns (total 704 ns) の計算を行った. 計算には MMTSB_TOOLSET[14]及び CHARMM[15]を用いた.

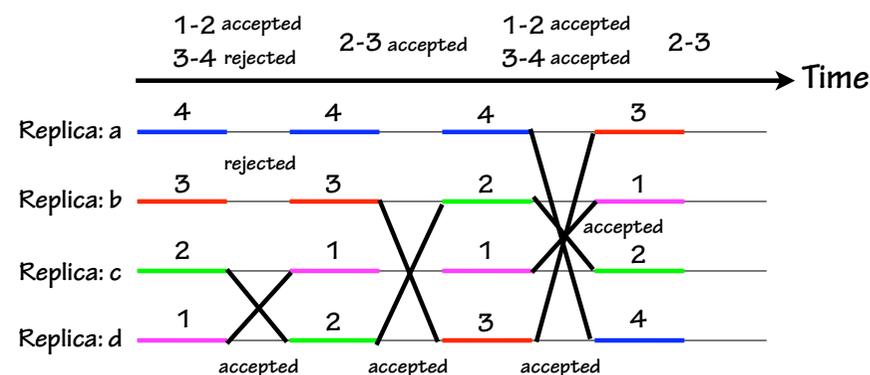


図 3: レプリカ交換法の trajectory (4 レプリカの場合)

(4) 解析

二量体では 10-20ns, 単量体では 4-10ns の trajectory を解析に用いた. 単量体の解析では Weighted histogram analysis method (WHAM) を用いた. 全て温度が 300K における結果を示す.

3. Results

3.1 野生型および変異型 APP の膜貫通部位フラグメントの二量体構造

野生型と変異型の APP 膜貫通部位フラグメント ($A\beta_{23-55}$) の二量体構造予測を行った (図 4). 野生型は Gly₃₃-xxx-Gly₃₇-Gly₃₈ による主鎖間の相互作用で二量化している. 一方, 変異型 APP は, 側鎖間の相互作用で二量化しており, 野生型と変異型では二量体化のメカニズムが異なる. 疎水性残基は疎水性環境 (膜内) を好むが, 変異型は全体的に疎水性残基の数が多く, 全て膜中に入ろうとして膜への挿入角が野生型より大きくなる. その影響で, 変異型の γ 部位の位置が野生型より細胞内側に下がる. 一方, ϵ 部位の膜に対する位置は変異型と野生型に違いは無い. 変異型は, γ 部位の

位置と二量体中の角度が γ 切断酵素の結合部位とマッチしていない為に、 $A\beta$ ペプチドが生成されないであろう。

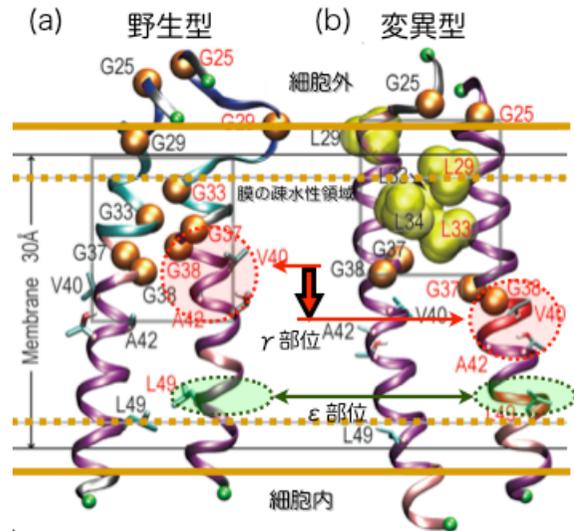


図 4: (a)野生型と(b)変異型の APP 膜近傍フラグメントの二量体構造

3.2 生成直前と直後の $A\beta$ ペプチドの構造

$A\beta$ ペプチド生成直前の構造に相当する $A\beta_{1-55}$ と、生成直後の $A\beta_{1-40}$ の膜中での構造予測を行った (図 5)。 $A\beta_{1-55}$ は図 5(a)の様な構造になっており、その二次構造は実験結果に非常に近い。また、3つの Gly-xxx-Gly モチーフの後に続く Gly₃₈ でヘリックスは少し折れ曲がっている。ここで膜の揺らぎを吸収して結合部位の位置を維持できる様になっていると考えられる。

生成直後の $A\beta_{1-40}$ は2つのヘリックスをもっており、その間が type I β -turn である事がわかった。これは膜に似せた環境下での実験結果と良く一致している。更に、 β -turn を中心にくの字状になって水中ではなく生体膜表面に好んで存在している事がわかった。

生成過程の構造変化を理解する為に $A\beta$ の残基番号 13-18 をドメイン A、残基番号 30-35 をドメイン B として、ドメインの間のなす角を θ 、ドメイン B の膜に対する挿入角を α として得た二次元自由エネルギー面を描いた (図 6 (a))。 $LA\beta_{1-40}$ は生成後、

APP-C99 $9 \rightarrow LM3 \rightarrow LM2 \rightarrow LM4 \rightarrow LM1$ の様に構造変化して膜表面に移動する事がわかる (図 6 (a) 中の点線)。

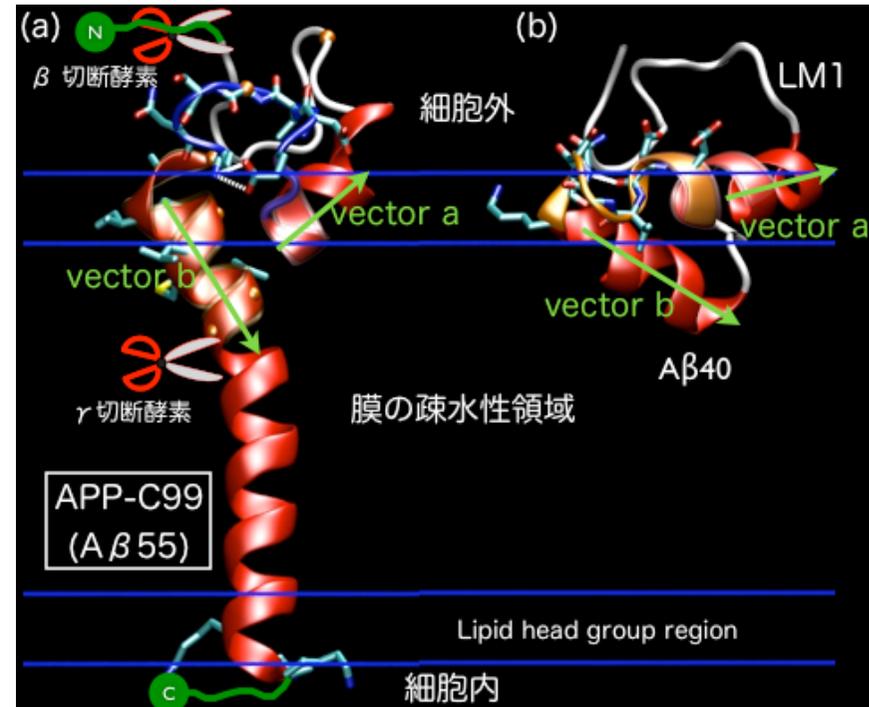


図 5: (a) APP 膜近傍フラグメントの単量体. (b)生成直後の $A\beta_{1-40}$

3.3 $A\beta_{1-40}$ と $A\beta_{1-42}$ の生成直後の相違

生成直後の $A\beta_{1-40}$ と $A\beta_{1-42}$ の相違を調べる為に、 $A\beta_{1-42}$ の構造予測も行った。その結果、最安定構造は $A\beta_{1-40}$ とほぼ同じ構造をしており、同じく生体膜表面を好む事がわかった (図 6 (b) LM1)。この二次構造も膜に似せた環境下での実験結果と一致している。しかし、二次元自由エネルギー面には相違があった。 $A\beta_{1-40}$ では APP-C99 と LM1 の間のバリアが低く、いくつかの LM 構造を経て LM1 へ構造変化し易い。しかし、 $A\beta_{1-42}$ では APP-C99 と LM1 の間のバリアが高いため、 APP-C99 の構造に近い LM2 の構造へ変化した後、時間をかけて LM1 へと構造変化するであろう (図 6)。実験的に $A\beta_{1-40}$ と $A\beta_{1-42}$ では凝集速度が違う事がわかっているが、それは主に $A\beta_{1-42}$ の疎水性残基 2 残基が水中での凝集を加速させているからだと言

われている。しかし、本研究では2残基の差による生成過程の違いも、疾患進行に影響する可能性がある事を示唆できた。

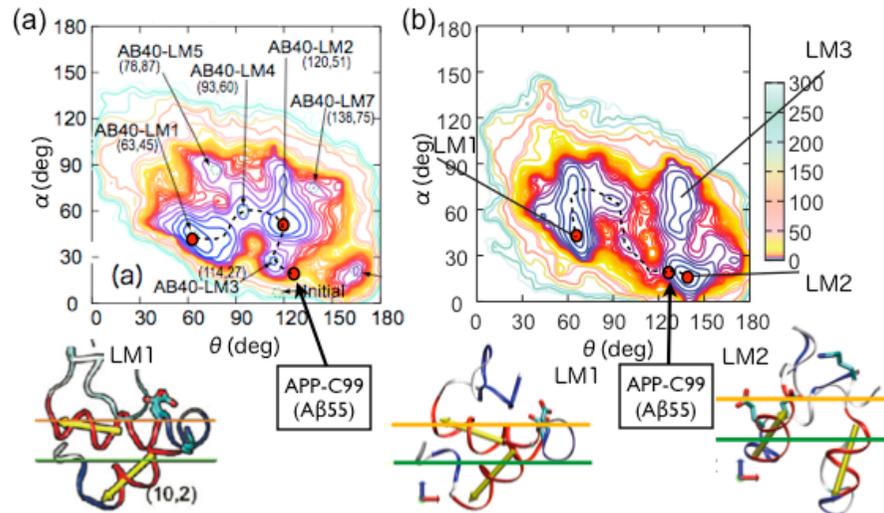


図 6 : (a) $A\beta_{1-40}$, (b) $A\beta_{1-42}$ の二次元自由エネルギー面. LM は local minimum basin を表していて, LM1 は global minimum basin に対応する.

4. Discussion

我々は、 $A\beta$ ペプチドの生成過程を知る為に、野生型と変異型の APP の膜貫通部位フラグメント $A\beta_{23-55}$ の二量体、 $A\beta$ ペプチド部分を全て含む APP の膜貫通部位付近フラグメント $A\beta_{1-55}$ の単量体、そして $A\beta_{1-40}$ と $A\beta_{1-42}$ の立体構造予測を行った。まず、APP、APP-C99 は膜貫通部位付近の Gly-xxx-Gly モチーフによる主鎖を介した二量体形成をしている事がわかった (図 7 (a))。変異型の $A\beta_{23-55}$ の二量体構造は、たった 2 残基しか変わらない野生型と結合様式が大きく異なる事がわかった。その変異体の二量体構造と実験事実から判断すると、 γ 切断酵素との結合の際には、膜に対する挿入角や γ 部位の膜に対する位置が γ 切断酵素の結合部位と match する必要があると考えられる。

γ 切断酵素と APP-C99 の結合機構は未だ不明であるが、結合している時には APP は単量体であろうと言われており、その単量体構造は図 7 (b) の様になっている。こ

の構造には長い膜貫通ヘリックスがあるが、Gly₃₇-Gly₃₈ の部分がゆるいヒンジになっており、生体膜の揺らぎの反応部位への影響をここで緩和しているのではないかと我々は考えている。

APP-C99 は γ 切断酵素によって γ 部位切断されて $A\beta$ ペプチドを排出するが、膜から出てゆく前に膜表面で 2 つのヘリックス間に type I β -turn をもつ立体構造を形成する。ただし、自由エネルギー面から考察すると、 $A\beta_{1-40}$ の場合には大きな揺らぎとともにその安定構造へ変化するが、 $A\beta_{1-42}$ の場合は暫く $A\beta_{1-55}$ と似た構造を保つであろう。凝集過程の詳細は未だわかっていないが、この違いは $A\beta$ ペプチドの膜外への出方や、凝集過程にも影響する可能性がある。

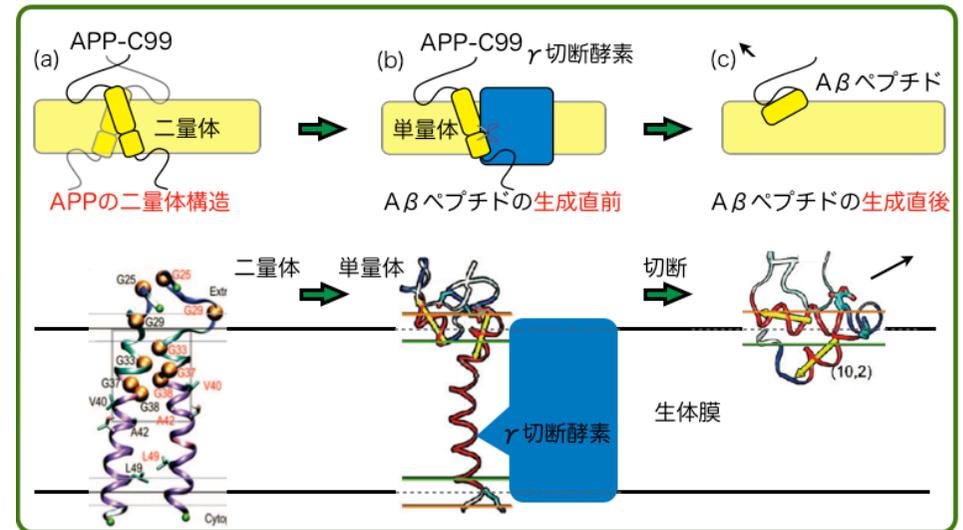


図 7 : $A\beta$ ペプチドの生成過程

以上、APP の膜近傍フラグメント及び $A\beta$ ペプチドの構造予測から、 $A\beta$ ペプチドの生成機構を明らかにした。今後はこれらの計算精度をあげる為に多次元レプリカ交換分子動力学法を用いた全原子での構造予測を行い、 $A\beta$ ペプチド生成過程だけでなく凝集化過程の研究も行う予定である。

謝辞 ボストン大学 John E. Straub 教授, メリーランド大学 D. Thirumalai 教授に感謝致します。本計算は, Boston University's Center for Computational Science の計算機及び, RIKEN Integrated Cluster of Clusters (RICC) を用いて実行された。

参考文献

- 1) <http://www2f.biglobe.ne.jp/~boke/newsadi.htm>
- 2) See for instance: C. Haas, and D. Selkoe, *J. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007,130,153-173
- 3) P. S. George-Hyslop, and G. Schmitt-Ulms, *Nature*, 2010, 467, 36-37
- 4) See for instance: (a) A. T. Petkova, et al., *Biochem.* 2006, 45, 498-512, (b) R. Nelson, and D. Eisenberg, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006, 16, 260-265
- 5) C. Masters et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985, 82, 4245-4249
- 6) Y. Sugita and Y. Okamoto, *Chem. Phys. Lett.* 1999, 314, 141-151
- 7) (a) N. Miyashita et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 17843-17852, (b) N. Miyashita, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131,3438-3439
- 8) M. Lisa-Marie et al., *EMBO J.* 2007, 26, 1702-1712
- 9) P. Kienlen-Campard et al., *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 7733-7744
- 10) A. J. Beel et al., *Biochem.* 2008, 47, 9428-46
- 11) See for instance: S. Tomaselli et al., *Chembiochem*, 2006, 7, 257-267
- 12) W. Im et al, *J. Comput. Chem.* 2003, 24, 1691-1702
- 13) T. Lazalidis, *Proteins*, 2003, 52, 176-92
- 14) M. Feig et al., *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, 2004, 22, 377-395
- 15) A. D. Mackerell et al., *J. Phys. Chem. B*, 1998, 102, 3586-3616