

分子動力学計算による UCH-L1 変異体の構造変化予測

小関 祐司^{†1} 金城 知広^{†1} 黒木 理人^{†1} 青木 俊介^{†1,2}

概要: UCH-L1 は神経特異的な脱ユビキチン化酵素で、S18Y, I93M 変異はパーキンソン病発病リスクに関連している。未だ解明されていないアミノ酸変異によるタンパク質変性メカニズムを予測するために、分子動力学計算を行った。その結果、それらの変性構造を予測することに成功し、さらに、I93M 変異型は野生型と比較して不安定な分子運動を示すことを明らかにした。

キーワード: 分子動力学計算, パーキンソン病, UCH-L1

Aberrant structures of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 variants predicted by molecular dynamics simulations

Yuji Koseki^{†1} Tomohiro Kinjo^{†1} Masato Kuroki^{†1} Shunsuke Aoki^{†1,2}

Abstract: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) is a neuron-specific deubiquitinating enzyme. Single amino acid changes (S18Y and I93M) within UCH-L1 are associated with risk of Parkinson's disease. In this study, we attempted to predict these protein denaturation mechanism based on molecular dynamics (MD) simulations. We succeeded in predicting the three-dimensional structures of the UCH-L1 variants in aqueous solution. Moreover, we revealed that I93M UCH-L1 exhibit disordered directional motion compared with WT UCH-L1.

Keywords: Molecular dynamics, Parkinson's disease, UCH-L1

1. はじめに

ユビキチンプロテアソーム系は誤った折り畳まれ方をしたことで真核細胞に対して毒性を帯びたタンパク質などを分解する重要な経路である。本研究における評価タンパク質であるユビキチン C 末端加水分解酵素 L1 型は神経特異的な脱ユビキチン化酵素であり、脳内における可溶性タンパク質の 1-5%を占める [1]。先行研究では、UCH-L1 における変異及び多型はパーキンソン病やアルツハイマー病に関連することが報告されている。S18Y 多型は突発性パーキンソン病の発症リスクを軽減するだけでなく、孤発性アルツハイマー病に対する防御に関連している。反対に、UCH-L1 の活性中心近傍の I93M 変異は常染色体優性遺伝のパーキンソン病に関わる [2]。さらに、I93M 変異型は酵素活性が野生型と比較して約 50%低下すると共に、水溶液下における円偏光二色性分析では、 α -ヘリックス構造の有意な減少が認められた。対照的に、S18Y 多型は二次構造変性を伴わずに約 10%酵素活性の増加を示した [3]。

分子動力学計算は有用な計算手法の一つで、タンパク質の変性やタンパク質内の相互作用変化についての予測を可能としている。これまでに、UCH-L1 の変異体の三次元立体構造が X 線結晶構造解析により解かれている。しかしながら、円偏光二色性分析による水溶液下での UCH-L1 変異体の立体構造と異なり、結晶構造下では I93M 変異は有意な変性を導かないことが報告された [4]。そのため、

UCH-L1 が関連するパーキンソン病の病理学的メカニズムは未だに解明されていない。本研究では、野生型、S18Y 多型、I93M 変異型の結晶構造を初期構造情報として分子動力学計算を行った [5]。計算の結果、S18Y 多型と I93M 変異型 UCH-L1 は野生型と比較して不安定であることを明らかにした。さらに、経時的な構造変化をアミノ酸間相互作用に注目した所、I93M 変異型では局所的な相互作用変化と α -ヘリックス構造の変性を捉えた。また、主成分分析により I93M 変異に伴う第 7, 8 α -ヘリックスの不規則な分子運動を明らかにした。本研究の結果は UCH-L1 が関連する神経変性疾患における病理メカニズムの理解に有益な知見を与えるものと考えられる。

2. 方法

2.1 分子動力学計算 (MD)

ヒトの UCH-L1 変異体の立体構造情報は RCSB PDB から入手し [6]、結晶構造中の水分子及び擬似基質は取り除いた。分子動力学計算の実行は GROMACS 4.5.1 パッケージ [7] 分子力場として Amber ff99SB [8]を用いて行った。系のエネルギー極小化及び初期平衡化を行った後に、50 ns の production MD を NPT 条件下 (1 atm, 300 K)で行った。

2.2 データ解析及び化合物結合部位の推定

分子動力学計算の結果は GROMACS 付属の解析ツールを使用した。経時的な二次構造変化の抽出には DSSP プログラム [9]を用いた。分子構造の描画には UCSF Chimera を用いた [10]。化合物結合部位の予測には MOE 2010.10 [11] 及び UCSF DOCK 6.4 のツールである DMS 及び SPHERE_GENERATOR プログラム [12]を使用した。

^{†1} 九州工業大学大学院 情報工学府 情報科学専攻 生命情報分野
Department of Bioscience and Bioinformatics, Graduate School of Computer Science and System Engineering, Kyushu Institute of Technology
^{†2} 九州工業大学バイオメディカルインフォマティクス研究開発センター
Biomedical Informatics R&D Center, Kyushu Institute of Technology

3. 結果

3.1 DSSP による UCH-L1 変異体の経時的二次構造解析

50 ns の分子動力学計算により得られた野生型, S18Y 多型及び I93M 変異型の経時的な二次構造変化を DSSP により解析した. 野生型 UCH-L1 はその二次構造含有率を保持する傾向が見られた一方で, S18Y 多型及び I93M 変異型 UCH-L1 では二次構造変化を示した. そこで, 40-50 ns における代表的な二次構造 (α -helix, β -sheet, turn, others)の平均含有率を解析した (表 1). I93M 変異型 UCH-L1 は野生型と比較して α -helix 構造の含有率が 0.85 倍低下するとともに, β -sheet 構造の含有率が 1.03 倍増加することが示された. 対照的に, S18Y 多型 UCH-L1 は野生型と比較して有意な変化を示さなかった.

表 1

UCH-L1 変異体の平均二次構造含有率 (40-50 ns の平均)

Protein	Structural features (%) ¹			
	α -Helix	β -Sheet	Turn	Others ²
WT	36.5 $\pm$ 0.2	19.5 $\pm$ 0.1	13.2 $\pm$ 0.2	36.5 $\pm$ 0.1
I93M	30.9 $\pm$ 0.2	20.0 $\pm$ 0.1	16.0 $\pm$ 0.2	33.0 $\pm$ 0.2
S18Y	34.3 $\pm$ 0.1	19.8 $\pm$ 0.1	13.8 $\pm$ 0.2	32.1 $\pm$ 0.1

¹ Each value represents the mean $\pm$ SEM.

² Others: coil, β -bridge, bend, 3-helix and 5-helix.

3.2 野生型及び I93M 変異型 UCH-L1 の主成分分析

野生型及び I93M 変異型 UCH-L1 における分子の振動をより明確にするために主成分分析 (PCA) [13]を行った (図 1). 固有ベクトルとして上位 2 つの固有値を第一主成分及び第二主成分として解析を行った. 野生型 UCH-L1 では第 7 α -helix において規則正しい分子運動が捉えられた (図 1A). 一方で, I93M 変異型 UCH-L1 では二次構造の変性が見られた第 7, 8 α -helix において不規則な配向の分子運動が捉えられた (図 1B). 従って, I93M 変異によりタンパク質全体の主鎖の動きが不規則となることで, I93M 変異型 UCH-L1 における第 7, 8 α -helix の変性に影響を与えると考えられる.

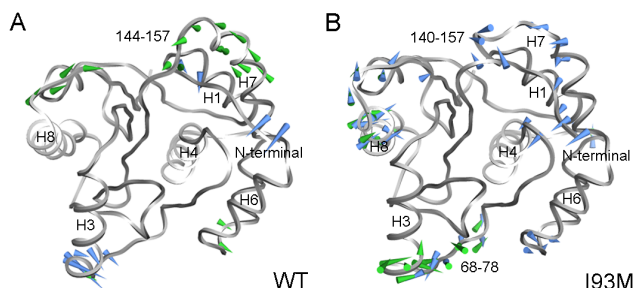


図 1. UCH-L1 変異体における分子運動の可視化: (A) 野生型 UCH-L1, (B) I93M 変異型 UCH-L1.

3.3 UCH-L1 変異体の変性構造予測

分子動力学計算により得られた水溶液下での野生型 UCH-L1 の構造は結晶構造と比較して同様な二次構造含有

率を示した (図 2A). 一方, I93M 変異型 UCH-L1 は第 7 α -helix (136-149 残基)が turn 及び coil 構造に変性するとともに, 第 8 α -helix の (193-197, 202-205 残基)が turn 及び 3-helix 構造に変性することが予測された (図 2B). また, *in silico* 手法による UCH-L1 の活性化剤及び変性領域の変性を制御する化合物の結合部位を予測した所, I93M 変異型 UCH-L1 における部分変性領域近傍に“pocket”構造が特定された (図 2B 中における青丸で囲まれた領域). 従って, パーキンソン病を治療するための新規薬剤の同定が *in silico* 手法により可能であることが示唆された.

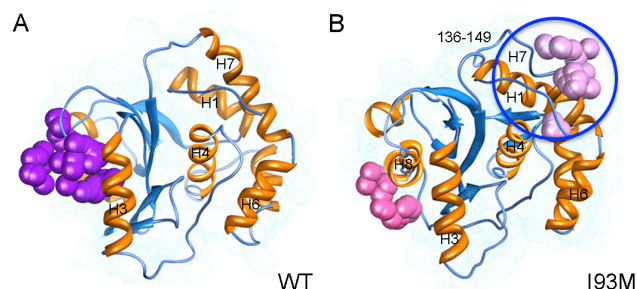


図 2. 分子動力学計算により予測された変性構造: (A) 野生型, (B) I93M 変異型. 予測された化合物結合部位は仮想原子球で示している.

4. おわりに

分子動力学計算を用いたアプローチでパーキンソン病に関連する UCH-L1 変異体の水溶液下における構造の予測に成功した. I93M 変異型 UCH-L1 は結晶構造とは異なり部分的な変性を示すことが示唆された [5]. 本研究結果は, NMR 解析及び円偏光二色性分析による UCH-L1 変異体の構造解析 [3, 4]と矛盾しない結果であった. 本研究で予測された UCH-L1 変異体の変性構造は神経変性疾患に対して有益な知見を与えることが期待される.

謝辞

研究にあたり藤井 聡博士と鶴田 康一郎君の技術的なサポート及び各種アドバイスに感謝申し上げます.

参考文献

- 1) K.D. Wilkinson et al., J. Nutr. 129 (1999).
- 2) E. Leroy et al., Nature 395 (1998).
- 3) K. Nishikawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 304 (2003).
- 4) D. A. Boudreaux et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 107 (2010).
- 5) Y. Koseki et al., Chem. Phys. Lett. 535 (2012).
- 6) RCSB Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- 7) B. Hess et al., J. Chem. Theory. Comput. 4 (2008).
- 8) V. Hornak et al., Proteins. Struct. Funct. Bioinform. 65 (2006).
- 9) W. Kabsch et al., Biopolymers 22 (1983).
- 10) E. F. Pettersen et al., J. Comput. Chem. 25 (2004).
- 11) MOE 2010.10 <http://www.chemcomp.com>
- 12) UCSF DOCK <http://dock.compbio.ucsf.edu>
- 13) A. Amadei et al., Proteins Struct. Funct. Genet. 17 (1993).