

短いテトラペプチドの全原子シミュレーションによるアミノ酸の アモルファスな凝集性の洞察

佐藤雄士^{†1} 末永敦^{†2} 泰地真弘人^{†3} 黒田裕^{†1}

タンパク質の溶解性に対するアミノ酸の寄与を調べるために、分子動力学シミュレーションを用いた。18種類のアミノ酸を用いて、同一のアミノ酸4残基で構成されるペプチドのモデルを作成し、1辺約104 Åの立方体の系に27ペプチド配置した。これを初期構造とし100nsのシミュレーションを行った。計算は、MD-GRAPE3コンピュータ上で、AMBER8を用い、標準的な力場で行った。I、V、L、M、N、Q、F、W、Y、及びHからなるテトラペプチドが大きいアモルファスな凝集体を形成し、A、P、S、およびTを含むものは、小さいものを形成した。D、E、K、およびRは全く凝集が起らなかった。これらの観察結果は、BPTIタンパク質のC末端に付加された5残基のペプチドを使用した我々の以前の実験的な溶解度測定への傾向に全体的に沿ったものであった。さらに、マルコフ状態モデルを用いた統計解析では、二量体より大きな凝集体への核となるオリゴマーであることを提案する。全体として、このマルチペプチド系の全原子分子動力学シミュレーションは、本質的に実験的観察と一致しており、ペプチドの溶解性の基本的な特性を再現していた。

1. はじめに

タンパク質の凝集性及び溶解性は、酵素の産業的な応用や、生化学研究およびバイオ医薬品産業などのいくつかの分野において重要視されている[1]。そのため、*in vivo*あるいは*in vitro*での凝集メカニズムの解明が急がれている。これまでにタンパク質の凝集性、または溶解性に関する研究は数多く行われ、従来からその疎水性、親水性、総電荷や分子表面の電荷分布などによって決まると考えられており、これらは全てアミノ酸の種類による性質である。また、これらの因子とタンパク質の凝集性、溶解性の定量的な関係は、まだ解明されていない。本研究で用いた分子動力学シミュレーションは一般的に分子凝集体の熱力学量や時間依存性に関する様々な物理量を分子レベルで計算でき、メカニズムを裏付ける役割で用いられることが多い。しかし、現在、凝集のシミュレーションはアミロイド形成の解析が中心で、アモルファスな凝集の解析に焦点を絞ったシミュレーションは極めて少ない。そこで本研究では分子動力学シミュレーションを用いてアミノ酸の種類による性質の違いが凝集に及ぼす影響を分子レベルで解析することを目的とした。

2. 手法

2.1 MDシミュレーション

グリシンとシステインを除いた18種類のアミノ酸を用いて、同一のアミノ酸4残基で構成されるペプチドのモデルを作成した。側鎖の違いによる結果を詳細に解析するため、全てのモデルペプチドにおいて、C末端をN-メチル化、N末端をアセチル化し、主鎖電荷の影響をなくした。

各モデルペプチドにおけるシミュレーションの初期構造は、系の大きさが1辺約104 Åの立方体の内に、同一のモデルペプチドを27分子配置した。そして、約30,000個の水分子で系を満たし、濃度を約40 mMとした。初期構造の作成や実際のシミュレーションは分子動力学シミュレーションソフトウェアパッケージAmber 8.0を用い、理化学研究所のMD-GRAPE3を使用することにより高速化が可能となった。気圧1 atom、温度300 Kの条件を設定し、全モデルで100ナノ秒行った。0.01ナノ秒ごとに出力される座標データやエネルギーデータから解析を行った。1つのモデルを100ナノ秒終えるのに、8 core使用し、6ヶ月の計算量を必要とした。

2.2 クラスタ定義

全てのペプチド間における全原子間の距離を計算し、2本のペプチド間のいずれかの原子間距離が、それらの原子のファンデルワールス半径の円内に収まっている場合に、ペプチド同士が凝集を形成していると思われた。今回の研究では半径の円内に1つでも原子同士の距離が納まっている場合にペプチド同士が結びついていると仮定し、複数のペプチドが結びついた状態の集合体をクラスタと呼ぶことにした。また、その時に含まれているペプチドの数をクラスタサイズと定義した。

3. 結果、考察

3.1 クラスタ解析

各時間においてクラスタサイズの平均 (Mean Cluster Size) をグラフ化したところ、I, V, L, N, Q, F, M, H, W, Yは、23~27の大きなクラスタを形成していた。一方、E, D, R,

^{†1} 東京農工大学・工・生命工
Department of Biotechnology and Life Sciences/Graduate School of
Engineering

^{†2} 産業技術総合研究所、創薬分子プロファイリング研究センター
Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, AIST

^{†3} 理研、生命システム研究センター
Quantitative Biology Center, RIKEN

Kにおいてはほとんどのペプチドがクラスターを形成していなかった。また、T, A, P, S においては一部大きなクラスターを形成していた。これらのことから電荷の有無や親水性、疎水性といった性質がクラスター形成に影響を及ぼしていることが示唆された。(図1)

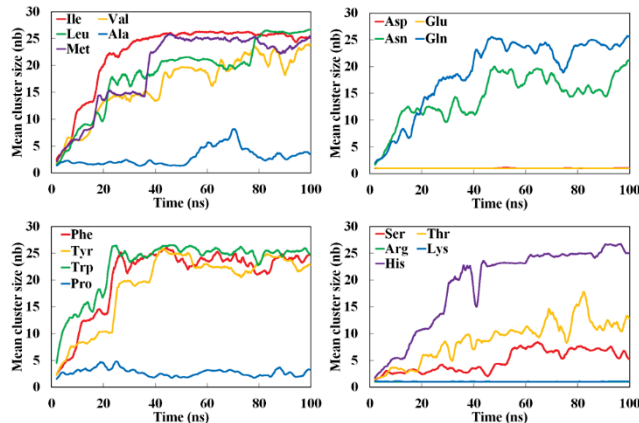


図1 各アミノ酸モデルにおける平均クラスターサイズ

3.2 マルコフ状態モデルによる解析

凝集のメカニズムの初期段階を調べるために、クラスター形成が確認できたアミノ酸についてマルコフ状態モデルを用いて解析を行った。0~20nsのデータを使用し状態遷移確率を計算し、単量体が100%の初期分布でステップ毎に多量体の割合を計算した。

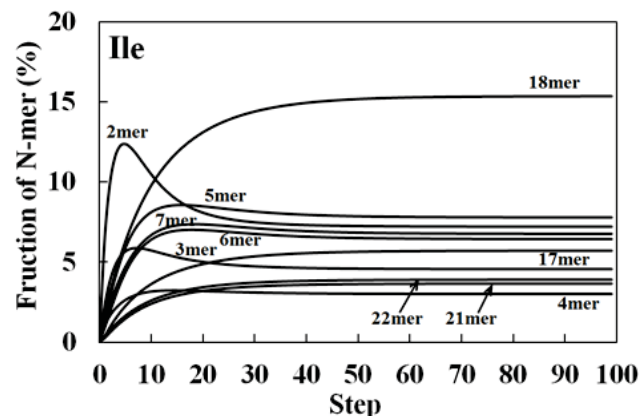


図2 状態遷移確率によって計算された多量体の割合

結果より、2merのような小さなクラスターが蓄積され、それがより大きなクラスターを形成していくことが観察された。この結果は、我々のシミュレーションシステム下における初期段階において重要な役割を果たしていると考えられる。

3.3 実験的な溶解性の値との比較

個々のアミノ酸の特徴とポリペプチドの溶解性の間の関係を調べるために、いくつかのアミノ酸の実験的な値と今

回の計算の値との比較を行った。平均クラスターサイズのデータから、80~100nsの間で平均を取ったものを計算の値とした。

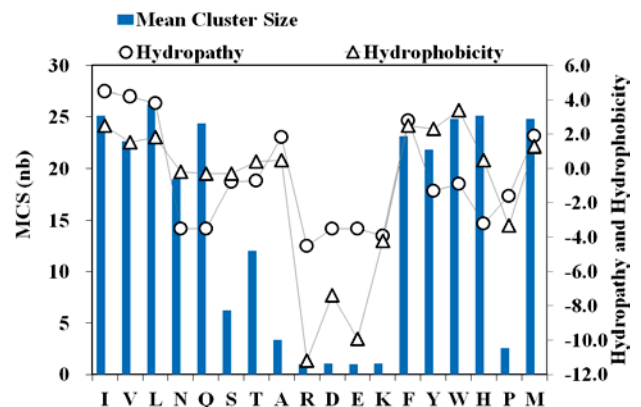


図3 実験的な溶解性の値との比較

上記の Hydropathy と Hydrophobicity において特に高い相関が見られた。その他の実験的な値に対しても、疎水性アミノ酸や親水性アミノ酸など、部分的に相関が見られた。この結果は、単に本計算の指摘を裏付けることに加え、アミノ酸の溶解性が標準的なMDシミュレーションを用いて再現されたことは興味深いことである。

4. おわりに

シミュレーションを用いて親水性や疎水性、電荷、側鎖の大きさといったアミノ酸の特徴によるペプチドの凝集性の違いを、クラスターの形成という分子レベルの解析で確認できた。また、マルコフモデルを用いた解析により2~4の小さなクラスターが初期の段階で蓄積され、その後より大きなクラスターへ遷移していくことが示唆された。実験的な溶解性の値の比較からも、いくつかのパラメーターとは高い相関が見られたため、シミュレーションによるメカニズム説明がアミノ酸の違いによる凝集性の解析というテーマに対しても有効であることが示された。

謝辞

本研究の計算結果は、RIKEN Integrated Cluster of Clusters (RICC) システムを利用して得られた。

参考文献

- 1) Fowler, S.B., et al., *Rational design of aggregation resistant bioactive peptides: reengineering human calcitonin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(29): p. 10105-10.