



コンピューターシミュレーションによるポリグルタミンペプチドの特性解析

中野, 美紀

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2010-09-25

(Date of Publication)

2010-09-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5095

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005095>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

コンピューターシミュレーションによる
ポリグルタミンペプチドの特性解析

平成22年6月

神戸大学大学院人間発達環境学研究科

中野 美紀

目次	
略語表	3
I 序論	4
1. 新しい遺伝子病　ートリプレットリピート病ー	4
2. 新しい病原体　ータンパク質フォールディング病ー	6
3. 新しい研究手法　ー生体分子のコンピューターシミュレーションー	6
4. 本研究の目的と概要	7
II ポリグルタミン病	9
1. タンパク質フォールディングとアミロイド線維	9
2. ポリグルタミンペプチドの構造	11
3. β ヘリックスモデルの解析	15
4. ポリグルタミン病の発症機構と治療戦略	19
III コンピューターシミュレーションによる生体分子の解析	21
1. 分子動力学 (Molecular dynamics simulation; MD) 法	21
(1) 分子動力学法	21
(2) 熱浴の制御	22
(3) 統計平均と時間平均	24
2. レプリカ交換分子動力学 (Replica exchange molecular dynamics simulation; REMD) 法	26
3. シミュレーション結果の解析	30
(1) Automated histogram filtering (AHF) 法	30
(2) Potential of mean force (PMF) 法	32
(3) MM-GB/SA 法	33
IV レプリカ交換法による単量体ポリグルタミンペプチドの特性解析	36
1. 対象と方法	36
(1) 対象とするペプチド一覧	36
(2) 計算手順とパラメータの設定	38
(i) レプリカ交換分子動力学法	38
(ii) 多重分子動力学 (Multiple molecular dynamics; MMD) 法	39
2. 結果と解析	40
(1) レプリカ交換分子動力学計算	40

(i) PDB 構造の再現.....	40
(ii) 二次構造によるスナップショットの分類.....	41
(iii) 水素結合数の集計.....	42
(iv) MM-GB/SA 解析.....	43
(v) AHF 解析.....	45
(vi) 自由エネルギー地形.....	47
(2) 多重分子動力学計算.....	50
(i) Q ₁₅ 単量体.....	50
(ii) 1E0Q 単量体.....	51
(iii) Q ₁₅ β ターン構造の単量体と多量体.....	52
3. 考察.....	54
V 議論.....	57
1. ポリグルタミンペプチドの特異性.....	57
(1) ポリグルタミンペプチドにおける水素結合の役割.....	57
(2) ポリグルタミンペプチドの疎水性.....	58
(3) ポリグルタミンペプチドと天然変性タンパク質.....	58
2. 長いペプチドのフォールディングシミュレーション.....	60
3. 種々のホモポリアミノ酸 (Homopolymeric amino acid; HPAA) と Q ₁₅ の比較.....	61
4. ポリグルタミンペプチドの進化的意味.....	65
(1) ゲノム中における種々の HPAA の発現頻度.....	65
(2) 脳の進化とポリグルタミンペプチド.....	66
VI 結論.....	68
謝辞.....	70
付録.....	71
1. エネルギー最小化.....	71
2. SHAKE 法.....	72
参考文献.....	73

略語表

略語	完全形
ACE	Acetyl group
AHF	Automated histogram filtering
AR	Androgen receptor
BSE	Bovine spongiform encephalopathy
CD	Circular dichroism
DSSP	The dictionary of protein secondary structure program
GB	Generalized Born
GST	Glutathione S-transferase
HD	Huntington's disease
HPAA	Homopolymeric amino acid
Htt	Huntingtin
IDP	Intrinsic disordered protein
MD	Molecular dynamics simulation
MM	Molecular mechanical energy
MMD	Multiple molecular dynamics simulation
NME	N-methyl group
NMR	Nuclear magnetic resonance
PCA	Principal component analysis
PDB	Protein data bank
PG	Proline-Glycine
PMF	Potential of mean force
polyQ	Polyglutamine
QBP1	Polyglutamine binding peptide 1
REMD	Replica exchange molecular dynamics simulation
RMSD	Root mean square deviation
TBP	TATA box-binding protein

I 序論

1. 新しい遺伝子病 ―トリプレットリピート病―

20 世紀半ば、ワトソンとクリックによる DNA 分子構造の発見を機に花開いた分子生物学の発展は、病気の発症や進行に関わる遺伝子の特定を可能にした。それまでに知られていた先天性異常病の多くが、特定の塩基の欠損、挿入、置換などによるものや、染色体異常によって引き起こされることが明らかになった。長い間、原因不明の奇病として扱われていたハンチントン病 (Huntington disease; HD) の原因もまた、特定の遺伝子の異常にあることが解明されたが、その結論は、それまでに知られていた遺伝子病の機構とは全く異なるものであった。HD の原因遺伝子 (Huntingtin; Htt) では、グルタミン (Q) をコードしている CAG リピート領域が異常に伸長していたのである (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993)。DNA 上で特定のアミノ酸をコードする塩基のトリプレットだけが異常伸長することによって引き起こされるこの新しい病気は、トリプレットリピート病と名付けられた。

遺伝子中に含まれる CAG リピート領域は mRNA、tRNA によって転写・翻訳され、ポリグルタミン (polyglutamine; polyQ) ペプチド領域を合成する(図 1-1)。

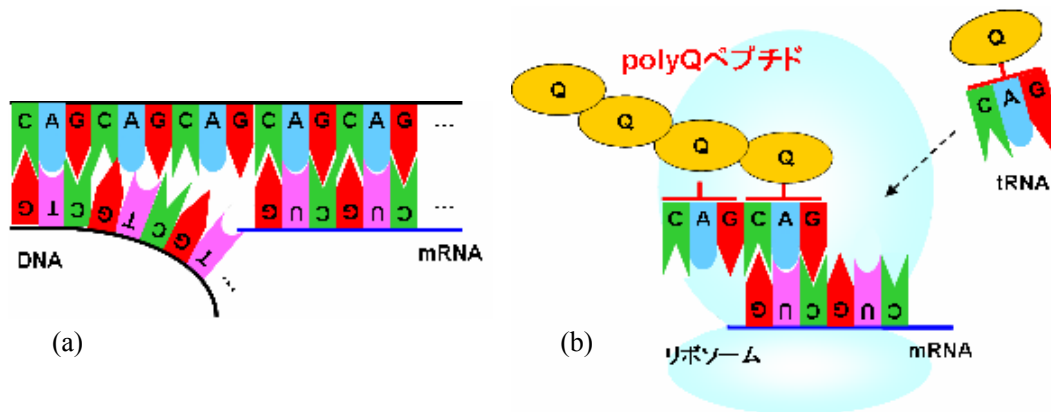


図 1-1. CAG リピート領域から polyQ ペプチドへの合成過程

(a) DNA 中の CAG リピート領域は mRNA によって転写され、

(b) リボソーム内で tRNA によってグルタミンに翻訳され、polyQ ペプチドを合成する。

CAG の伸長を原因とする一連の病気をポリグルタミン病 (polyQ 病) と言う。現在までに HD を含む 9 種類の polyQ 病が特定されている(表 1-1)。病気の発症は Q の伸長数によってのみ決定され、HD での閾値は 37 である (Rubinstein et al., 1996)。Q の伸長数が多いほど、症状は重篤で発症

年齢が早い (Chen et al., 2002a)。多くは遅発性で、病気の進行も遅いが、いずれも神経細胞が侵される難病である。残念なことに、現在までに有効な治療法は確立されていない。

表 1-1. polyQ 病とその原因タンパク質

病名 (原因タンパク質)	原因タンパク質の 正常な機能*	原因タンパク質内の Q 伸長領域の相対位置**
		Q 伸長数 (健常人; 患者) ***
ハンチントン病 (Htt)	転写関与、輸送とエンドサイトーシス、信号伝達、代謝、脳由来神経組織栄養因子由来の制御	
		(6-34; 36-121)
脊髄小脳性運動失調症 1 型 (Ataxin1)	遺伝子発現制御	
		(6-44; 39-82)
脊髄小脳性運動失調症 2 型 (Ataxin2)	RNA プロセッシングの可能性	
		(15-24; 32-200)
脊髄小脳性運動失調症 3 型 (Ataxin3)	脱ユビキチン化関与	
		(13-36; 61-84)
脊髄小脳性運動失調症 6 型 (Ataxin6)	神経伝達物質放出とカルシウムホメオスタシスに関与したカルシウムチャンネル	
		(4-19; 10-33)
脊髄小脳性運動失調症 7 型 (Ataxin7)	レチナール遺伝子発現の補助因子	
		(4-35; 37-306)
脊髄小脳性運動失調症 17 型 (TBP)	転写促進	
		(24-42; 47-63)
球脊髄性筋萎縮症 (AR)	核ステロイド甲状腺ホルモン受容体	
		(9-36; 38-62)
歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (Atrophin-1)	核受容体抑制因子	
		(7-34; 49-88)

*Scholefield and Wood, 2010; **Saunders and Bottomley, 2009; ***Hands et al., 2008

2. 新しい病原体 ―タンパク質フォールディング病―

牛海綿状脳症 (Bovine spongiform encephalopathy; BSE) は、牛の脳の中に空洞ができ海綿状になる病気で、1980年代半ば、イギリスで初の症例が報告された。その後、BSEが種を超えて感染し、さらに BSE を発症した牛肉を食することによって人へも感染する可能性が示されたことから、世界中で大きな社会問題を引き起こした。

同様の症状を示すヤギや羊のスクレイピーの病原体を追及していたアメリカの Prusiner は、この感染症の原因が、ウィルスでも細菌でもなく、特定のタンパク質の異常にあることをつきとめた (Prusiner, 1989)。Prusiner が“プリオン”と名付けたこの異常タンパク質は、アミノ酸の一次配列は正常なタンパク質と同一であるが、その立体構造が異なっていた。正常なプリオンの立体構造は α ヘリックス主体であるのに対し、異常なプリオンは β シート主体で水に溶けにくく、凝集体を形成しやすい (Pan et al., 1993)。Prusiner は、BSE の感染は異常プリオンが核となって正常プリオンを変形させることによって起きると提案した (Prusiner, 1991)。プリオン仮説は、病原体が DNA も RNA も持たずタンパク質だけで自己増殖するという提案に加え、タンパク質はその一次配列が決まれば立体構造が定まり、正しい機能を発現すると考えられていたそれまでの常識を覆すもので、大きな論争を巻き起こした。その後の研究により、プリオン病と同様、HD、アルツハイマー病など神経変性を引き起こす遅発性の多くの疾患で、細胞内外にアミロイドと呼ばれるミスフォールドしたタンパク質の凝集体が含まれることが判明し、これらの病気はタンパク質フォールディング病(アミロイド病)と呼ばれるようになった (Kelly 1996)。

一般のアミロイド形成タンパク質は、正常タンパク質と異常タンパク質でその一次配列が同じであるのに対し、polyQ 病は原因遺伝子内での Q の伸長数が異なるという点で特殊である。しかしながら、単純な配列の繰り返しを持ち、疎水基が少なく、複数の構造をとることが可能という polyQ ペプチドの特徴は、多くのアミロイド形成タンパク質と共通している。他のアミロイド病と同様、polyQ 病も異常タンパク質の発現から病気の発症までの分子レベルでのプロセスは不明なことが多い。

3. 新しい研究手法 ―生体分子のコンピューターシミュレーション―

近年、コンピューターの性能の目覚ましい進歩により、コンピューターシミュレーションにより生体分子の機能や相互作用の研究を行うことが可能になった。これまで多くの研究者によって、さま

ざまな計算手法が開発されてきた。

分子動力学 (Molecular dynamics; MD) 法は、分子を構成する原子が感じるポテンシャルからニュートン方程式を解いて、原子・分子の動的な振る舞いをコンピューターシミュレーションにより逐次計算する手法である。MD 計算によって、タンパク質や核酸の構造変化、安定性、水素結合の組み換え、分子内・分子間の相互作用など、実験では観察することが困難な微視的な観察が可能になる。

初期の MD 計算では主にコンピューターの性能による制限により、真空中に浮かぶ小分子の局所的な振る舞いしか解析することができなかった。しかし、近年のコンピューターの性能とアルゴリズムの目覚ましい進歩に伴い、現在では ns (10^{-9} 秒) 程度の短い時間なら水中での巨大タンパク質の計算が可能になり、粗視化などの手法を使えば μ s (10^{-6} 秒) 程度の長時間の運動も解析できるようになった。

しかし複雑なエネルギー地形を持つタンパク質の MD 計算では、しばしば系は局所的なエネルギー極小に留まり、よほど長時間のシミュレーションを行わない限り、自由エネルギー最少の折りたたみ構造の予測を行うことが難しいことが知られている。このような計算機シミュレーションの困難を克服するため、本研究で用いたレプリカ交換分子動力学 (Replica exchange molecular dynamics simulation; REMD) 法を含め、いくつかの拡張アンサンブル法が提案されている (Okamoto, 2004)。

4. 本研究の目的と概要

polyQ 病の発症には生体内の様々なメカニズムが関与しているが、病気の最初のステップは異常伸長した polyQ ペプチドを含むタンパク質のミスフォールドにある。同時に、この最初のステップは、他の多くのアミロイド病に共通する現象である。polyQ ペプチドの構造およびフォールディングの過程を知ることは、polyQ 病の治療のために有効な情報を提供するだけでなく、他のアミロイド病の発症機構にも光を当てることができる。これまで多くの研究者が polyQ ペプチドの構造解明に取り組んできたが、polyQ ペプチドの難溶性かつ非結晶性に起因する実験的困難より、X 線結晶解析や溶液 NMR (Nuclear magnetic resonance) などの手法を用いた原子レベルでの構造解析は困難を極めてきた。一方、コンピューターシミュレーションでよく用いられる手法の一つである分子動力学 (Molecular dynamics; MD) 法では Protein data bank (PDB) に登録されている結晶

構造を初期構造に設定することが多い。しかし polyQ ペプチドは上述のように原子レベルでの詳細な構造が得られていないため、シミュレーションを用いての研究も足踏みを続けてきた。

我々は当初、polyQ ペプチドの構造をその有力候補の一つである β ヘリックスモデルと仮定して、計算機により構造を作成し、MD 計算による解析をおこなった (Ogawa et al., 2008; Nakano et al., 2009)。しかし、前節で述べたように、タンパク質の自由エネルギー地形は複雑で、短い MD 計算では初期構造近傍のエネルギー状態の解析しか為し得ないという欠点があった。

この困難を克服するために、我々は広いエネルギー空間を効率よく探索できる方法として開発されたレプリカ交換分子動力学 (Replica exchange molecular dynamics; REMD) 法を用い、単量体の polyQ ペプチドの、水中での構造アンサンブルと自由エネルギー地形の探索を試みた (Nakano et al., 2010)。さらに我々は単量体 polyQ ペプチドのダイナミクスと、多量体 polyQ ペプチドの安定性を調べるために、同じ初期構造から初速度を変えて複数の MD 計算を行う多重分子動力学 (Multiple molecular dynamics simulation; MMD) 計算を行った。本研究の目的は、コンピュータシミュレーションを用いて polyQ ペプチドの物理化学的な性質と特異性を明らかにすることである。特に polyQ ペプチドの構造およびフォールディングの過程について、他のペプチドとの分子レベルでの比較による解析を行ったので、その結果について詳しく報告する。

本論文の構成は以下のとおりである。polyQ 病では異常伸長した polyQ ペプチドを含むタンパク質がミスフォールドを起こし、凝集してアミロイド線維を形成する。そこで次章では、タンパク質フォールディングプロセスとアミロイド線維についての概説、さらに、polyQ ペプチドの構造・発症機構を中心とした先行研究の整理を行う。第 III 章では、本研究に用いたコンピュータシミュレーションの手法、特に REMD 法について詳しい解説を行う。第 IV 章では、短い単量体 polyQ ペプチドについて行った REMD の計算内容と結果を示す。我々は polyQ ペプチドの特異性を明らかにするために、PDB に登録された、類似の残基数のペプチドについて同様の計算を行ったので、この章で、その結果の比較・検討結果を報告する。第 V 章では、第 IV 章での計算結果を元に、polyQ ペプチドの物理化学的な性質を中心に議論を行う。さらに長いペプチドのフォールディングシミュレーションの試行状況と、polyQ ペプチドの進化的意味について考察を加える。最後に第 VI 章で結論をまとめ、今後の展望を述べる。

II ポリグルタミン病

1. タンパク質フォールディングとアミロイド線維

Prusiner が提唱したプリオン仮説 (Prusiner, 1991) の検証により、タンパク質がその機能を発現するためには、正しい一次配列を持つだけでは不十分で、正しい立体構造に折れたたまることが重要であることが次第に明らかになってきた。

リボソームの中で合成された新しいタンパク質が、折りたたまれて機能的な立体構造(天然構造)を形成する反応をフォールディング反応とよぶ。Anfinsen (1973) は、リボヌクレアーゼ A を用いて、タンパク質の天然構造が熱力学的に最も安定な状態で、その構造はタンパク質の一次配列によって決定されることを示した。しかし、その後の研究で、タンパク質のフォールディング過程はそれほど単純なものではないことがわかってきた。タンパク質が正しくフォールドするためには分子シャペロンや触媒などの助けを必要とする。また通常は、正しくフォールドされなかった(ミスフォールドした)変性タンパク質は細胞内の品質管理システムによりユビキチン化され、タンパク質分解酵素により分解される。しかし、一部の変性タンパク質は大変不安定で凝集体を作りやすく、いったん形成されたこれらの凝集体は非常に安定で分解されにくい。このように細胞内のタンパク質品質管理システムがうまく働かない場合、変性タンパク質が細胞内外に蓄積することになる (Dobson, 2003; Kaufman et al., 2002)。この、細胞内外に蓄積した線維状の異常タンパク質をアミロイド線維と呼ぶ。また、不安定な変性タンパク質を作る原因として、遺伝子異常やストレス、老化などの要因が挙げられる。

病理学分野でのアミロイド線維の定義は厳密であり、(1) コンゴーレッド色素で染色され、偏光顕微鏡下で緑色偏光を呈すること、(2) 電子顕微鏡観察で、幅 10 nm 程度で枝分かれのない線維構造が見られること、(3) X 線回折や円二色性測定によって β 構造であること、などが満たされることが条件となっている。医学用語としては、「繊維」ではなく、「線維」と表記される(後藤, 2009)。

アミロイド線維の X 線回折には共通して、線維軸上の β シートの主鎖間の反復距離に相当する 4.7–4.8 Å のピークと、線維と垂直方向の主鎖間の反復距離に相当する 8–10 Å の強いピークが存在する (Sunde et al., 1997)。Nelson ら (2005) はアミロイド微結晶の X 線解析により、アミロイド線維は 2 つのペプチド鎖の側鎖同士が互いに組み合う立体ジッパー (Steric zipper) と呼ばれる単位で構成され、線維軸に垂直に β シートが重なりあって伸長するクロス β 構造であることを示した(図 2-1)。

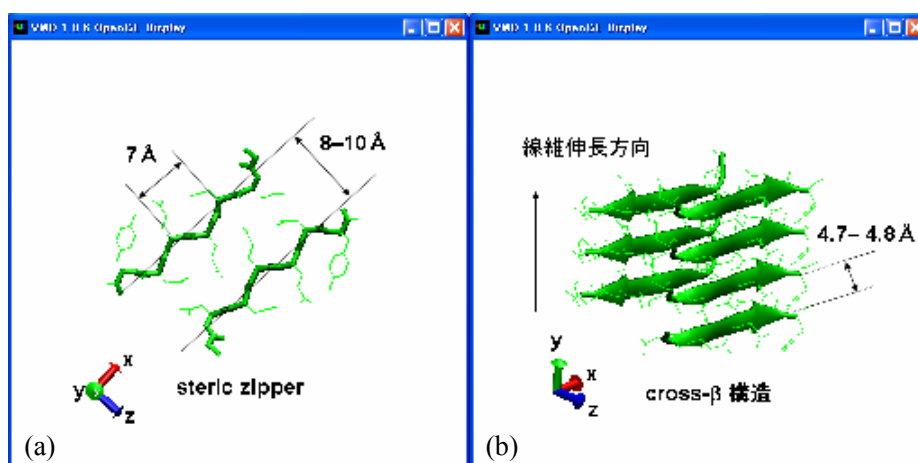


図 2-1. アミロイド形成タンパク質 (PDB ID: 1YJP) の微結晶 X 線解析構造

(a) アミロイド線維の単位構造を構成する立体ジッパー (Steric zipper)。主鎖をスティック表示、側鎖をライン表示で表す。向かい合った一対の β シートの側鎖が互いに組み合い、立体ジッパーを構成している。主鎖間の距離は 8-10 Å、主鎖に対して同じ方向を向く側鎖間の距離は約 7 Å。(b) 立体ジッパー構造が積み重なって形成されたアミロイドクロス β 構造。主鎖は β シートを表す矢印表示、側鎖はライン表示で表す。 β シートの伸長方向と垂直に線維が伸長する。線維伸長方向の主鎖間の距離は 4.7-4.8 Å。分子構造の描画は VMD (Humphrey et al, 1996) を用いた。

アミロイド線維の形成は物質の結晶形成に類似した反応であり、アミロイド核形成と伸長反応の二段階からなる。 β シートや α ヘリックスといった基本二次構造がさまざまに組み合わさることによって形成される天然構造の自発的な分子内構造形成とは全く異なり、アミロイド線維は分子間相互作用によって強固に安定化されており、より安定な立体構造である可能性が高い。「タンパク質の天然構造が進化の過程で形成された構造であるのに対して、アミロイド線維はポリペプチド鎖が高分子鎖としてとる基本的な構造ではないか」と提案されている (Fändrich and Dobson, 2002; Dobson, 2003; Li et al., 2007)。また最近では、多くのアミロイド病で見られる封入体は細胞内のミスフォールドしたタンパク質を無毒化するために、細胞が能動的防御反応として形成すると考えられるようになった (Ross and Poirier, 2005)。さらに、不溶性の成熟したアミロイド線維よりも多量体、線維前駆体などと呼ばれる可溶性の微細な中間体のほうが強い毒性を持つことが示されている (Ferreira et al., 2007)。

2. ポリグルタミンペプチドの構造

他のタンパク質フォールディング病と同様に、polyQ 病も、異常伸長した polyQ ペプチド領域を含むタンパク質のミスフォールドから始まる。ミスフォールドしたタンパク質は多量体形成を経て細胞外に凝集体として蓄積し、不溶性のアミロイド線維を形成して神経細胞死を引き起こすと考えられている。一般のアミロイド形成タンパク質は、正常タンパク質と異常タンパク質でその一次配列が同じであるのに対し、polyQ 病は原因遺伝子内での Q の伸長数が異なるという点で特殊である。今日まで多くの努力がなされてきたにも関わらず、polyQ ペプチドの詳しい構造やそのフォールディングプロセスは不明なことが多い。

多くの実験事実から、病的に伸長した polyQ ペプチド領域を含むタンパク質だけが不溶性の凝集を作ることが確認されている。Scherzinger ら (1997) は、37 残基以下の Q 伸長数を持つタンパク質が、電気泳動ゲル上で溶解、動きやすい一方、37 以上の Q 伸長数を持つタンパク質は、電気泳動ゲルを進むことができない不溶性の凝集体を形成することを示した。Cooper ら (1998) は伸長した CAG を含み、かつ、N 端を切断された Htt は、細胞質・核に凝集を作ることが示した。Hollenbach ら (1999) は電気泳動を用いて、20、30 残基の polyQ ペプチドを含む Htt は凝集しないのに対し、Q 伸長数が 51 残基かそれ以上の時に、Htt が線維状の構造に凝集することを示した。Cristofaro ら (1999) は、17 残基の Q 伸長数を持つタンパク質は細胞内で凝集しないのに対し、36、43 残基の Q 伸長数を持つ同じタンパク質が細胞内で凝集することを示した。Nagai ら (2007) は、試験管内の実験結果から、一つのミスフォールドした単量体が、アミロイド状線維を形成する核になると提唱している。

polyQ ペプチド領域を含む凝集したタンパク質は、円偏光二色性 (Circular dichroism; CD) スペクトル、電子顕微鏡、そして X 線回折を含むさまざまな実験結果によって、 β シートを多く含むことが明らかにされている。Perutz ら (1994) は 15 残基という短い合成 polyQ ペプチドの CD スペクトルのパターンからこのペプチドが β 構造をとることを発見した。また、このペプチドは水中でアミロイド様の線維を形成することを電子顕微鏡による観察により確認した。さらに、X 線回折構造では経線方向に 8.4 Å、4.8 Å、4.2 Å、赤道方向 3.6 Å と 3.2 Å に強いピークを示した。赤道方向 3.2 Å のピークは β シートの軸方向の残基間の距離、経線方向に現れた 4.8 Å の強いピークはやはり β シートの主鎖間の距離に相当する。これらの知見から Perutz らは、polyQ ペプチドは主鎖間、側鎖間で水素結合を持ち、反平行 β シートで構成されるとする、“polar zipper”モデルを提唱した。このモデルはその後の polyQ ペプチド凝集の研究に大きな影響を与えた。Scherzinger ら (1997)

は GST-HD 融合タンパク質 (Glutathione S-transferase-HD fusion protein) を用いて、臨界長を超える CAG リピートを含むこのタンパク質が不溶性の凝集体を形成することを確認した。電子顕微鏡による観察により、この凝集体はプリオンやアルツハイマー病の β アミロイドとよく似たリボン状の形態を示した。また、この凝集体は他のアミロイドと同様、コンゴレッドで染色されることを確認した。さらに彼らは細胞下分画技術や超微形態学技術を用いて、HD 遺伝子を導入したマウスの脳細胞内でも同様の構造が見られることを示した。Tanaka ら (2001) はミオグロビタンタンパク質中に異なる長さの polyQ ペプチド鎖を挿入して、CD スペクトル、赤外線分光、電子顕微鏡写真、NMR を測定し、伸長した polyQ ペプチド鎖が β シート構造をとり、アミロイド線維を形成することを確認した。Chen ら (2002b) は長さが異なる polyQ ペプチドの CD スペクトル、凝集、電子顕微鏡写真、コンゴレッド染色などを調べ、伸長した polyQ ペプチドが β シート構造をとり、アミロイド線維を形成することを確認した。

単量体の polyQ ペプチドが取りうる構造として、 β ヘリックスと、 β ターン構造の二つの有力な候補が提案された。Perutz ら (2002) は、彼らが合成した Q_{15} の X 線回折写真より、Q だけでできているタンパク質内では全ての Q は同等であるはずだという仮定のもとに、polyQ ペプチドの構造は β ヘリックス構造であると提案した。この構造は、二巻き以上のヘリックスを形成すると安定で、polyQ 病の Q 伸長発症閾値をうまく説明できる。一方、Sikorski と Atkins (2005) は Perutz らが撮影した X 線回折写真の再解釈により、polyQ ペプチドは β ターンによってつながれた β シートで構成されていると提案した。この構造は β ヘリックス構造に比べ主鎖間／側鎖間で形成される水素結合が多く、X 線回折パターンをさらに合理的に説明できる。

Stork ら (2005) は MD 計算により、一巻き 18 残基の β ヘリックス構造が 2-3 巻き以上で安定であることを示した。Khare ら (2005) は Q 伸長数が 37 残基以上の時、polyQ ペプチドは一巻き 18.5 残基の β ヘリックス構造をとることを MD 計算によって示した。Merlino ら (2006) は 40 残基以上の polyQ ペプチドでは、polyQ は楕円形のヘリックス構造をとりやすいことを MD 計算によって示した。Elliot ら (2006) は一巻き 20 残基の β ヘリックス構造が 2 巻き以上で安定であることを MD 計算により示した。

プロリンはアミノ酸の配列において β シートの伸長を止める働きを持つことが知られている。凝集した polyQ ペプチドの基本的な折りたたみの単位が反平行 β シートであるという仮説を確認するために、polyQ ペプチド配列に沿って異なる間隔でプロリン・グリシン (Proline-Glycine; PG) ペアを挿入した実験が *in vitro*、*in vivo*、および *in silico* により行われた。Thakur と Wetzel (2002) は合成した polyQ ペプチド鎖に異なる間隔で PG ペアを挿入し、polyQ ペプチドの凝集の性質を調

べた。彼らは polyQ ペプチドの凝集速度は、PG ペアの挿入位置によって大きく異なることを示した。彼らは野生型と置換型との凝集速度の比較から、polyQ ペプチドは 4 房以上の β シートが β ターンでつながれた反平行 β シート構造を単位としていると提案した。Poirier ら (2005) は PG ペアを挿入した polyQ ペプチドが哺乳類の細胞で毒性を持つ線維を作ることを実験的に示した。Van Schowen ら (2010) は Simulated annealing 法とフラグメント分子軌道法を用いて凝集抑制に対する PG ペアの挿入効果が局所的であることを示した。

しかしながら、最近の研究で単量体の polyQ ペプチドは水中で特定の構造をとらないことが分かってきた。Chen ら (2002b) は $K_2Q_{42}K_2$ の CD スペクトルを測定し、単量体の polyQ ペプチドはランダムコイル状態で、時間とともに凝集し β シート構造に変換することを示した。Masino ら (2002) は GST 融合タンパク質によって polyQ ペプチドの特性を調べ、polyQ ペプチドは水中でランダムな構造をとることを示した。Tanaka ら (2003) はミオグロビンに polyQ ペプチドを挿入し、準凝集状態の小角 X 線散乱スペクトルを測定した。彼らは準凝集状態の polyQ ペプチドは秩序がなく β シートが部分的に露出していることを示した。Crick ら (2006) は蛍光相関分光法を用い、水と polyQ ペプチドの相互作用を観察し、単量体の polyQ ペプチドは特定の構造をとらず、凝集プロセスは溶媒の状況に依存することを示した。Legleiter ら (2009) は原子間力顕微鏡を使って polyQ ペプチド抗体の凝集抑制効果を調査し、伸長した polyQ ペプチドは水中で様々な構造をとることを示した。Walters と Murphy (2009) は Q_8 から Q_{24} までの長さの polyQ ペプチドの CD スペクトルや蛍光共鳴エネルギー移動などを測定し、すべてのペプチドは二次構造を持たず、 Q 伸長数数の伸長に伴い polyQ ペプチドがよりつぶれた構造をとることを示した。Kim ら (2009) は Q_{17} を含む Htt の X 線結晶解析を行い、poly Q_{17} ペプチド領域は α ヘリックス、ランダムコイル、伸長したループ構造を含む様々な構造をとることを示した。

表 2-1 に polyQ ペプチドの構造に関する先行研究の一覧をまとめる。

表 2-1. polyQ ペプチドの構造に関する先行研究

著者（出版年）	Q 伸長数	方法	内容
Scherzinger et al. (1997)	20–122	in vitro & in vivo	伸長した polyQ ペプチド領域を含むタンパク質は不溶性の凝集を作る
Cooper et al. (1998)	18,23,82	in vitro	
Hollenbach et al. (1999)	20–83	in vitro	
Cristofaro et al. (1999)	17,36,43	in vitro & in vivo	
Nagai et al. (2007)	0–62	in vitro	
Perutz et al. (1994)	15	in vitro	polyQ ペプチド領域を含む凝集したタンパク質は β シートを形成する
Scherzinger et al. (1997)	20–122	in vitro & in vivo	
Tanaka et al. (2001)	12–50	in vitro	
Chen et al. (2002)	15–47	in vitro & in vivo	
Perutz et al. (2002)	15	in vitro	β ヘリックス構造の提案
Stork et al. (2005)	37–61	in silico	
Khare et al. (2005)	25,37,45	in silico	
Elliot et al. (2006)	20–40	in silico	
Merlino et al. (2006)	36–161	in silico	
Thakur & Wetzel (2002)	42	in vitro	β ターン構造の提案
Sikorski & Atkins (2005)	15	in vitro	
Poirier et al. (2005)	9,16,76	in vivo	
Van Schouwen et al. (2010)	42	in silico	polyQ ペプチドのエネルギー計算
Chen et al. (2002)	28–47	in vitro	単量体の polyQ ペプチドは定まった構造をもたない
Masino et al. (2002)	22,41	in vitro	
Tanaka et al. (2003)	35–50	in vitro	
Crick et al. (2006)	15–53	in vitro	
Leglelter et al. (2009)	53	in vitro	
Walters & Murphy (2009)	8–24	in vitro	
Kim et al. (2009)	17	in vitro	

3. β ヘリックスモデルの解析

我々は当初、polyQ ペプチドの構造が Perutz ら (2002) が提案する β ヘリックス構造であると仮定して分子動力学 (MD) 計算を行い、その安定性の解析を Root mean square deviation (RMSD) 値の比較により行った (Ogawa et al., 2008)。RMSD 値は MD 計算で得られたスナップショット (Snapshot) の原子座標と参考構造の原子座標のずれの合計を表し、次式で表される。

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{ref})^2}{N}} \quad (\text{式 2-1})$$

i は原子の識別番号、 $\mathbf{r}_i$ は原子 i の座標、 $\mathbf{r}_{ref}$ は参照原子の座標、 N は総原子数を表す。

我々は、Perutz らが提唱した一巻き 20 残基の β ヘリックス構造と、Khare が提唱した一巻き 18.5 残基の β ヘリックス構造を作成し、それぞれで、20、25、30、37、40 残基の単量体と、 β ヘリックス構造で構成される多量体凝集モデルを作成し 1 ns の MD 計算を行った。その結果、どちらのモデルも Q の伸長数の増加に伴い β ヘリックス構造が安定化することが確認した。

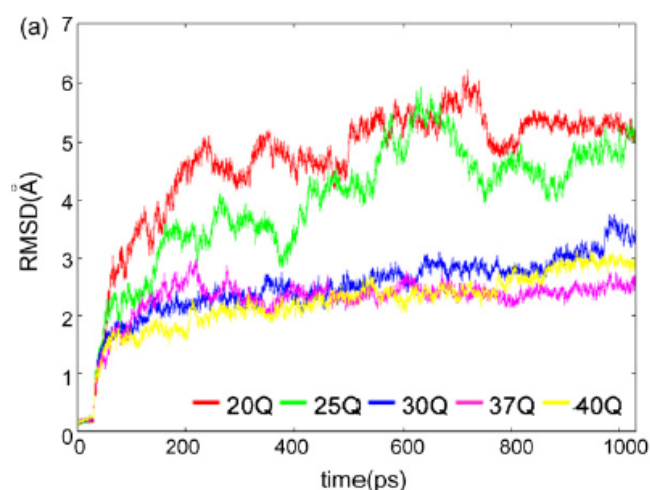


図2-2. 20 残基／巻の β ヘリックス構造単量体の MD 計算。20,25,30,37,40 残基の polyQ ペプチドにおける、初期構造に対する主鎖の RMSD 値の経時変化を表す。30 残基以上で RMSD 値は 3 Å 程度に収まっている。

また、初期構造で水素結合をしっかりとるように二面角を調整した結果、20 残基／巻のモデルでは、先行研究 (Elliot et al., 2006) よりも短い 30 残基で、より長い時間、 β ヘリックス構造が崩れないことを示した(図 2-2)。さらに、安定な単量体から構成される凝集体の構造はより安定であることを、多量体の MD 計算により示すことができた(図 2-3)。

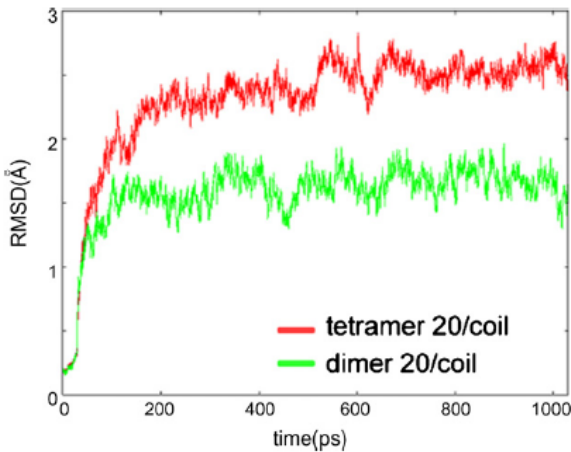


図 2-3. 20 残基／巻の β ヘリックス構造の polyQ ペプチド多量体に対する MD 計算。初期構造に対する主鎖の RMSD 値の経時変化を表す。赤:20 残基／分子の四量体。緑:40 残基／分子の二量体。全長はどちらも 80 残基だが、単量体で安定な 40 残基／分子の二量体がより安定であることを示している。

我々は次に、Thakur と Wetzel (2002) の凝集実験を MD 計算で再現することを目指し、20 残基／巻の β ヘリックス構造に一定の間隔でプロリン・グリシン (PG) ペアを挿入し、やはり MD 計算によりその安定性を調べた (Nakano et al., 2009)。こ我々の計算で扱ったペプチドの配列を図 2-4 に示す。

	1	2	3	4
	1234567890123456789012345678901234567890			
Q_{40}	Q	Q	Q	Q
$Q_{40}-Q_7$	Q	Q	Q	Q
$Q_{40}-Q_8$	Q	Q	Q	Q
$Q_{40}-Q_9$	Q	Q	Q	Q

図 2-4. プロリン・グリシン (PG) ペアを挿入した polyQ ペプチドの配列

10 ns の MD 計算の結果、 β ヘリックス構造の安定性は PG ペア挿入位置により大きく異なった。しかし Thakur らの実験では Q が 9 個続いた後 PG ペアを挿入した配列が、PG ペア挿入のない polyQ ペプチドと同じ凝集傾向を示したのに対し、我々の計算結果は Q が 8 個続いた後に PG ペアを挿入した $Q_{40_Q_8}$ が Q だけのモデル Q_{42} と同じ傾向を示した (図 2-5)。このことは初期構造に用いた β ヘリックス構造が polyQ ペプチドの構造モデルとして適当でない可能性を示唆している。

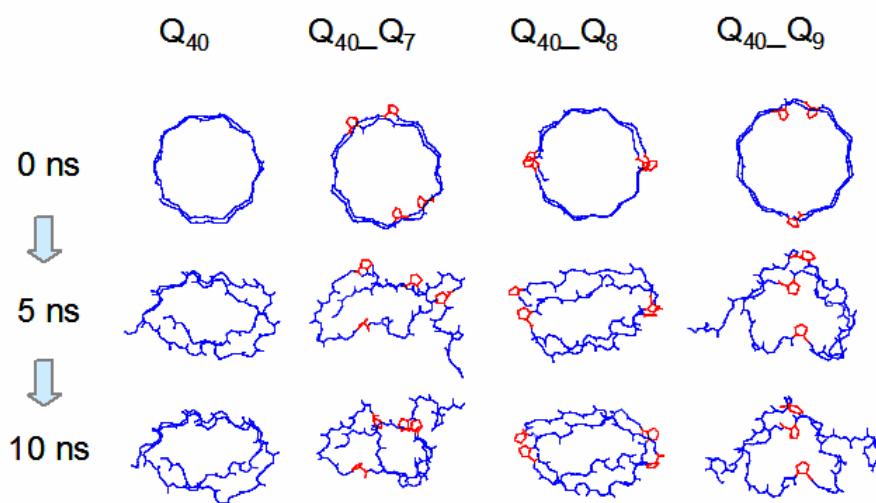


図 2-5. MD 計算で得られた、0、5、10 ns 後の PG ペア挿入 polyQ ペプチドの構造変化。
プロリンの位置を赤い五画形で示している。

さらに我々は PG ペア挿入モデルの多量体の安定性も MD 計算により調査した。単量体で安定な傾向を示した Q_{40} の三量体は 5 ns の MD 計算で構造が崩れなかったのに対し、単量体で不安定な $Q_{40_Q_7}$ の三量体は多量体を形成しても不安定であった。さらに Q_{40} の二量体に $Q_{40_Q_7}$ を重ねた三量体はやはり崩れやすい傾向を示した (図 2-6)。このことは PG ペアを挿入した polyQ ペプチドの導入が、polyQ ペプチドの凝集を防ぐ可能性があることを示している。

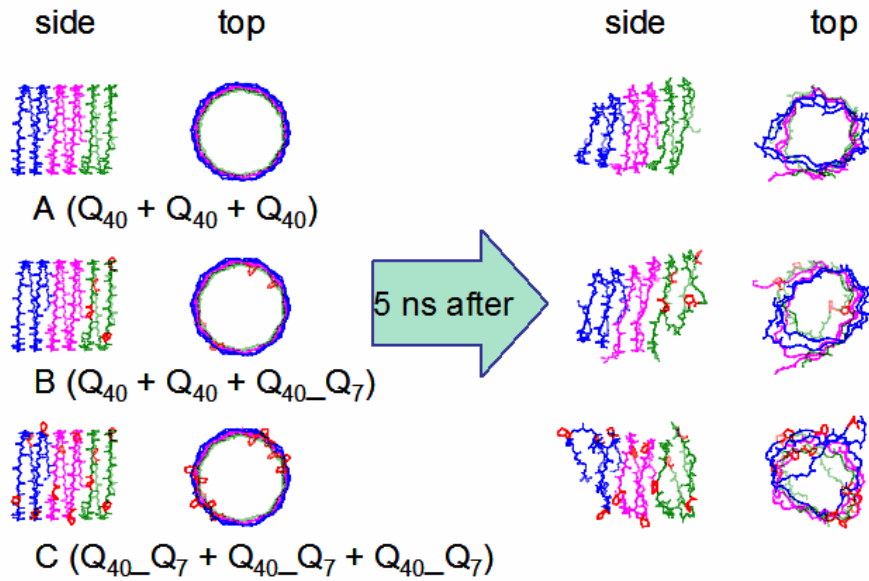


図 2-6. 凝集モデルに対する MD 計算結果。初期構造と 5 ns の MD 計算後の構造。
 A: Q_{40} の三量体。B: Q_{40} の二量体の C 端側に Q_{40_Q7} を重ねたもの。C: Q_{40_Q7} の三量体。プロリンの位置を赤の五角形で示している。

これらの計算は、それぞれ有益な知見を得ることができたものの、初期構造依存性が大きいことに問題があった。タンパク質の自由エネルギー地形は複雑で、数 ns の MD 計算では初期構造近傍のエネルギー状態の解析しか為し得ない。この困難を克服するために、我々は広いエネルギー空間を効率よく探索できる方法として開発されたレプリカ交換分子動力学 (Replica exchange molecular dynamics; REMD) 法を用い、単量体の polyQ ペプチドの水中での構造アンサンブルと自由エネルギー地形の探索を試みた (Nakano et al., 2010)。その詳細については IV 章で述べる。

4. ポリグルタミン病の発症機構と治療戦略

polyQ 病の原因は病因遺伝子における CAG リピートの異常伸長であるが、発病までの機構は多くの要因が絡み合い、単純ではない。polyQ 病の根本的な治療法は残念ながら現在までに確立されていない。しかし、分子レベルでの発症機構の研究はここ 10 年で急速に進んでおり、いくつかの有望な治療法も提案されてきている。正常な伸長数の polyQ ペプチドは α ヘリックスやランダムコイル構造をとり、細胞毒性を持たない一方、異常伸長した polyQ ペプチドは β シート構造を好み、凝集して細胞毒性を持つ。ミスフォールドしたタンパク質は通常、ユビキチン化されタンパク質分解酵素により分解されるが、この処理がうまく行われず生き残った変性タンパク質や反応性が高い β シート構造を持つ polyQ ペプチドは細胞内で異常な相互作用の原因となり、細胞死を引き起こす(図 2-7)。

polyQ 病の治療戦略は病気の発症機構に伴い、以下の 3 つに大別される。(1) 異常伸長 polyQ ペプチド含有タンパク質のミスフォールディング補正と凝集阻害、(2) 異常伸長 polyQ ペプチド含有タンパク質の分解促進、(3) 異常伸長 polyQ 含有タンパク質による異常な相互作用の改善(図 2-7 参照)。polyQ 病を含む多くのタンパク質フォールディング病では、原因タンパク質のミスフォールドと凝集体の蓄積が発症過程の上流にある。したがって、polyQ ペプチドの構造・フォールディングプロセスを知ることは、他のアミロイド病の治療にも光を当てることにつながる。

Poirier ら (2002) は polyQ ペプチドの線維形成過程の観察から、polyQ ペプチドの β シート変移が毒性の獲得に重要な役割を果たしていると提案した。Nagai と Popiel (2008) は polyQ 病における神経変性メカニズムとして、異常伸長した polyQ ペプチドの β シート変移による細胞毒性獲得と、アミロイド線維形成による分解抵抗性獲得の両者が重要な役割を果たすという、露出 β シート仮説を提唱した。また、Takahashi ら (2008) は分化した神経細胞に対しては、単量体や封入体よりも多量体の方が強い毒性を示すことを示した。これらの結果は、多量体の形成を促進する単量体の構造変化が polyQ 病発症の重要なプロセスであることを示唆しており、多量体の形成や毒性を持つ β シートへの変換を防ぐことが有効な治療戦略であると考えられる。Nagai ら (2003) は単量体の polyQ ペプチドと直接相互作用し β シート構造への変換を防ぐ Polyglutamine binding protein-1 (QBP1) が封入体の形成を抑制し、さらに神経変性ショウジョウバエの生存率を改善することを示した。Tanaka ら (2005) はトレハロースが polyQ ペプチドの凝集を防ぐことを *in vitro* で示し、さらに HD マウスモデルの生存率を改善することを示した。

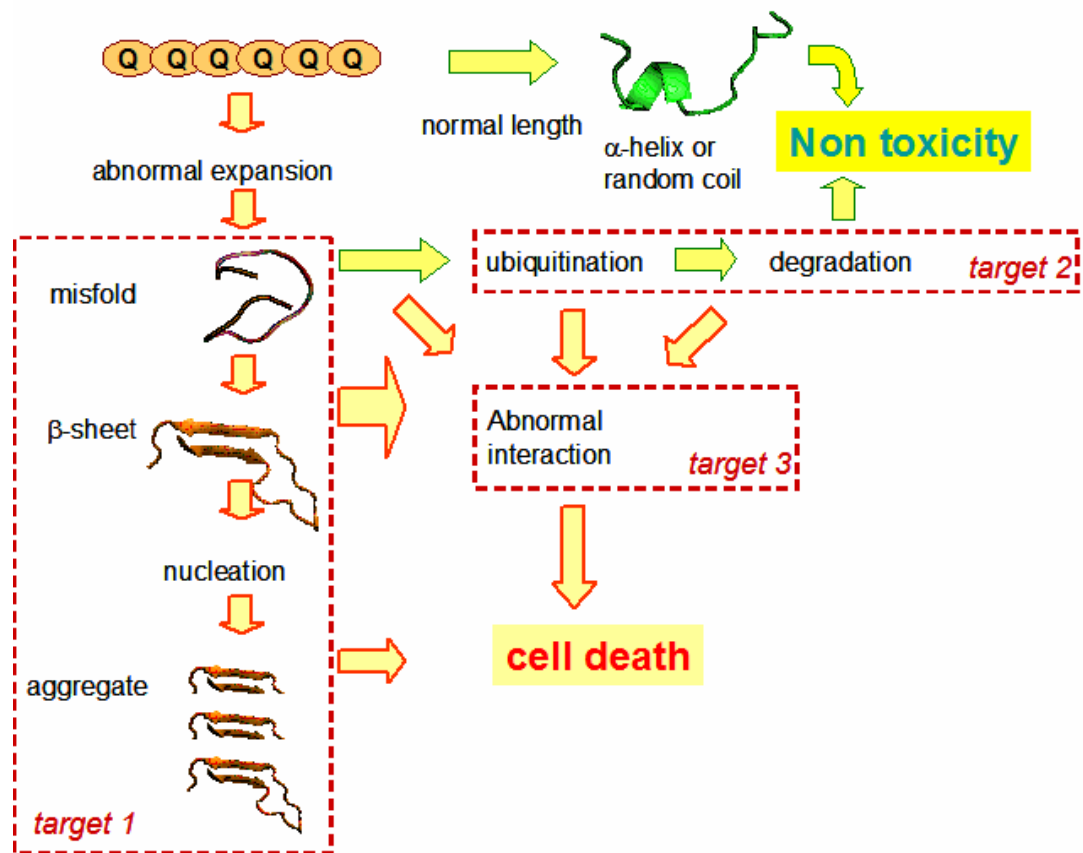


図 2-7. polyQ 病発症メカニズムと治療戦略

polyQ 病の治療戦略は病気発症メカニズムに伴い、*target 1*: 異常伸長 polyQ ペプチド含有タンパク質のミスフォールディング補正と凝集阻害、*target 2*: 異常伸長 polyQ ペプチド含有タンパク質の分解促進、*target 3*: 異常伸長 polyQ 含有タンパク質による異常な相互作用の改善に大別される。

本研究では、コンピューターシミュレーションを用いて polyQ ペプチドの構造およびフォールディングの過程について微視的な観察を行うことにより、polyQ ペプチドの物理化学的な性質と特異性を明らかにすることを試みた。コンピューターシミュレーションは廃液の処理や実験動物も必要とせず、薬剤候補物質のスクリーニングのコストと手間を大幅に削減することが可能である。さらに実験では難しい、分子レベル・原子レベルで分子内・分子間の相互作用を直接解析することができる。以下の章で本研究で用いた手法と内容・結果について詳しく報告する。

III コンピューターシミュレーションによる生体分子の解析

1. 分子動力学 (Molecular dynamics simulation; MD) 法

(1) 分子動力学法

分子動力学 (Molecular dynamics; MD) 法は、Alder と Wainwright (1957) により剛体球の相転移の研究に適用が試され、McCammon ら (1977) によって生体高分子への適用が試された。MD 計算によって、タンパク質や核酸の構造変化、安定性、水素結合の組み換え、分子内・分子間の相互作用など、実験では観察することが困難な微視的な観察が可能になる。

タンパク質や DNA など、生体高分子の MD 計算では、「分子を、電荷を持った粒子(原子)がバネでつながったもの」とみなし、熱浴中の n 体多体系の状態の時間発展を、古典力学の運動方程式(式 3-1)の数値積分によって求める。

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = -\nabla_i U(\mathbf{r}_1 \cdots \mathbf{r}_n) \quad (\text{式 3-1})$$

m_i 、 $\mathbf{r}_i$ は粒子 i の質量と座標、 $U(\mathbf{r}_1 \cdots \mathbf{r}_n)$ は系全体のポテンシャルエネルギーを表す。タンパク質の MD 計算では一つのアミノ酸残基を一つの粒子と粗視化して扱う手法と、原子一つを一つの粒子として扱う、全原子モデルがある。本研究で用いた分子動力学計算プログラムパッケージ Amber10 (Case et al., 2005) では、全原子モデルを採用している。

力の計算に必要なポテンシャルは、一般的には力場と呼ばれる経験的なポテンシャルパラメータによって与えられる。Amber10 では bond、angle、torsion、van der Waals、electrostatic potential を含むパラメーターセット(力場)が用意されており(図 3-1)、式 3-2 の関数形を持つ。

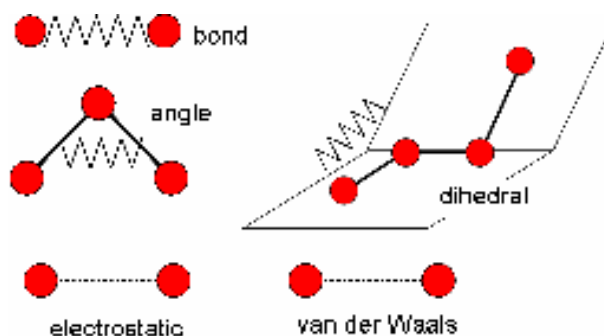


図 3-1. MD 計算に必要なポテンシャルの種類

$$\begin{aligned}
U = & \sum_{\text{bonds}} K_{ij}^R (R_{ij} - R_{ij}^{eq})^2 + \sum_{\text{angles}} K_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^{eq})^2 \\
& + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_{ijkl}^n}{2} [1 + \cos(n\phi_{ijkl} - r_{ijkl})] \\
& + \sum_{j=1}^N \sum_{i>j}^N \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] + \sum_{j=1}^N \sum_{i>j}^N \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}}
\end{aligned} \tag{式 3-2}$$

ここで、 R_{ij} は原子 i と原子 j の間の原子間距離、 K_{ij}^R は伸縮運動のバネ定数、 R_{ij}^{eq} は平衡距離、 θ_{ijk} は 2 つの化学結合でつながった 3 つの原子 ijk の間の角度、 K_{ijk}^θ は変角振動のバネ定数、 θ_{ijk}^{eq} は平衡結合角を表す。また、 ϕ_{ijkl} は 4 つの原子 $ijkl$ が結合しているときに、3 原子 ijk が作る面と、別の 3 原子 jkl が作る面がなす二面角、 V_{ijkl}^n は n 次の二面角振動のバネ定数、 r_{ijkl} は平衡二面角を表す。 A_{ij} と B_{ij} はファンデルワールス相互作用を表すパラメータ、 q_i 、 q_j は原子 i 、 j の有効点電荷、 ϵ は比誘電率、 N は総原子数を表す。バネの強さや平衡距離、平衡角度、ファンデルワールス相互作用の強さや各原子に割り当てられる電荷は、量子力学計算や PDB 登録構造との比較により経験的に決定され、これらのパラメータのセットがいわゆる力場セットになる。

(2) 熱浴の制御

式 3-1 の運動方程式を解くと対象系のエネルギーは保存するが、温度は一定にならない。ほとんどの実験は温度一定の条件のもとで行われるため、MD 計算で温度一定を実現するためにはなんらかの工夫を必要とする。

本研究での温度制御は、系と熱浴との間に仮想的な摩擦力を与え、速度に比例する抵抗力にランダム力を加えた Langevin 方程式により行った。Langevin 方程式の MD への応用は Schneider と Stoll (1978) により提案され、Pastor ら (1988) によって、正しい速度分布が得られることが保証されている。Langevin 方程式による温度制御方法では、対象系と温度 T_0 の熱浴との結合を想定し、系を構成する原子が熱浴とランダムに衝突を繰り返すことで、温度一定の系を実現している(式 3-3)。

$$m_i \frac{d\mathbf{v}_i}{dt} = \mathbf{F}_i - m_i \gamma \mathbf{v}_i + \mathbf{R}_i(t) \quad (\text{式 3-3a})$$

$$\langle \mathbf{R}_i(t) \rangle = 0 \quad (\text{式 3-3b})$$

$$\langle \mathbf{R}_i(t) \mathbf{R}_j(t + \tau) \rangle = 2m_i \gamma k_B T_0 \delta(\tau) \delta_{ij} \quad (\text{式 3-3c})$$

式 3-3a で $\mathbf{v}_i$ は原子 i の速度、 $\mathbf{F}_i$ はポテンシャルから計算される原子 i が受ける力、 γ は熱浴と原子 i の衝突頻度を表す。式 3-3a の右辺の第 2 項、 $m_i \gamma \mathbf{v}_i$ は摩擦力に相当し、第 3 項、 $\mathbf{R}_i(t)$ はランダム力を表す。式 3-3b、3-3c はそれぞれランダム力が平均すると等方的に働き、各原子に対して時間的に独立であることを示している。

一般に、温度一定 ($=T$) のカノニカルアンサンブルでは、ポテンシャルエネルギー E の分布 P_B は状態密度 $n(E)$ とボルツマン因子 $\exp(-\beta E)$ との積で表される(式 3-4)。

$$P_B(E; T) \propto n(E) \exp(-\beta E) \quad (\text{式 3-4})$$

β はボルツマン定数 k_B と絶対温度 T の積の逆数である ($\beta = 1/k_B T$)。状態密度はエネルギーとともに急速に増加する関数であり、ボルツマン因子はエネルギーとともに指数関数的に減少するので、カノニカル分布は一般にベル型をしている。この分布の範囲内で、タンパク質は様々な構造をとることが可能である(図 3-2)。

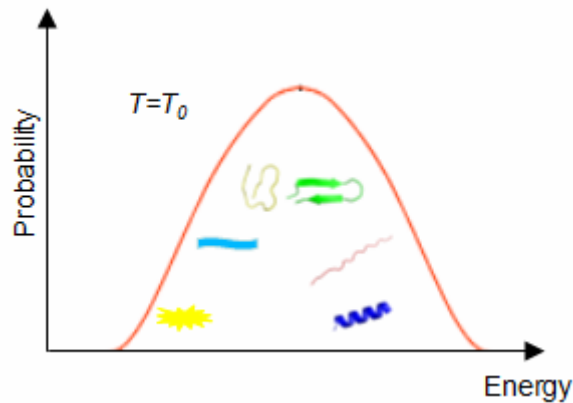


図 3-2. カノニカルアンサンブルのポテンシャルエネルギー分布関数

k_B はボルツマン定数、 T_0 は平均温度を表す。グラフ中の図形は、タンパク質がカノニカル分布の範囲内で様々な構造をとることができることを示している。

タンパク質は一般に、その一次配列によって定まる、自由エネルギー最小の折りたたみ構造をとる (Anfinsen, 1973)。しかし数百個・数千個の原子から構成され、分子内・分子間で複雑な相互作用を及ぼしあうタンパク質は非常に複雑なエネルギー地形を持ち、局所的な準安定構造を数多く持つ(図 3-3)。

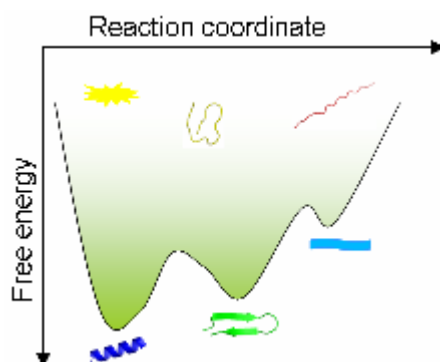


図 3-3. タンパク質の自由エネルギー地形。局所的な準安定構造を数多く持つ。

(3) 統計平均と時間平均

MD 計算による物理量の解析は通常、十分(と思われる)な時間の MD 計算実施後、その軌跡を解析することによって行われる。実験で得られる物理量 A は、とてつもなく多数の原子や分子の分布から得られる統計平均 $\langle A \rangle_{\text{ensemble}}$ であるが、MD 計算によって得られる平均は多くの場合、一分子の時間平均 $\langle A \rangle_{\text{time}}$ である。統計平均と時間平均が等しい(エルゴード仮定が成り立つ)場合にのみ、MD 計算の結果は実験値と正しく比較することができる。この基本的な考えは、もし、無限時間のシミュレーションが可能なら、システムは全ての可能な状態を取り得るだろうという仮定にある。しかし、実際にはコンピューターを使って限られた時間しか計算できず、タンパク質の大きなダイナミクスを観察するには相当する長時間の MD 計算が必要になる(図 3-4)。

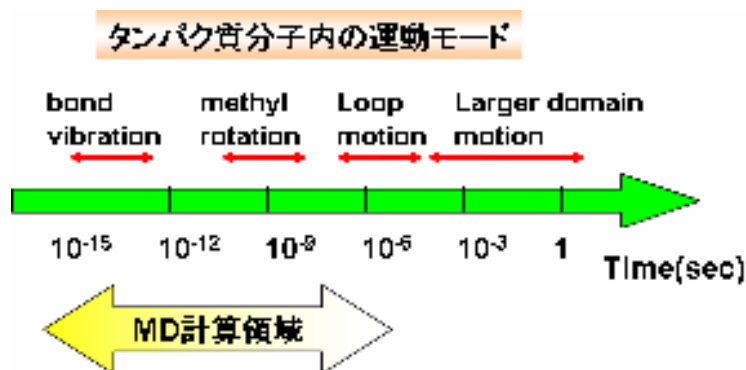


図 3-4. タンパク質分子内の運動の時間スケールと MD 計算の適用範囲

局所的な小さな運動の時間スケールは短い、タンパク質フォールディングに関わるような大規模な運動は長時間かかる。MD 法で計算ができる時間スケールは 10^{-15} 秒から 10^{-6} 秒。

MD 計算による解析は先に述べたエルゴード仮定が成り立つ場合にその信頼性が保証される。しかし複雑なエネルギー地形を持つタンパク質の MD 計算では、しばしば系は局所的なエネルギー極小に留まり、よほど長時間のシミュレーションを行わない限り、自由エネルギー最少の折りたたみ構造の予測を行うことが難しいことが知られている。このような計算機シミュレーションの困難を克服する有効な方法の一つとして、本研究で用いたレプリカ交換分子動力学 (Replica exchange molecular dynamics simulation; REMD) 法がある。この手法は、非ボルツマン因子による人工の統計集団に基づいた拡張アンサンブル法の一つであり、Sugita と Okamoto (1999) によって提案された。REMD 法では、互いに相互作用しない温度の異なるレプリカを用意し、それぞれのレプリカで独立に分子動力学計算を行い、一定の時間間隔で隣接した温度を持つレプリカ対を以下の遷移確率に従い交換する。以下、REMD 法の理論について詳しく述べる。

2. レプリカ交換分子動力学 (Replica exchange molecular dynamics simulation; REMD) 法

レプリカ交換法における系は、互いに相互作用しない M 個の独立なコピー (レプリカ) からなる。温度 T_m にあるレプリカ m の状態は $x_{T_m}^m \equiv (q^m, p^m)_{T_m}$ で表される。 T_m は対応する温度のラベル、 m はレプリカのラベル、 q^m, p^m はレプリカ m の位置座標と運動量を表す。各レプリカはそれぞれ異なる温度を持ち、温度の個数とレプリカの個数は一致する。系全体の状態は $X = \{x_{T_1}^1, \dots, x_{T_m}^m, x_{T_n}^n, \dots, x_{T_M}^M\}$ で表される。また、レプリカ同士は相互作用しないので、状態 X の重み因子はボルツマン因子の積で次のように与えられる。

$$\begin{aligned} W_{REM}(X) &= \exp \left[- \sum_{m=1}^M \beta_m H(q^m, p^m) \right] \\ &= \exp \left[- \sum_{m=1}^M \beta_m \{E(q^m) + K(p^m)\} \right] \end{aligned} \quad (\text{式 3-5})$$

ここで β_m はボルツマン定数 k_B と温度 T_m の積の逆数、 $H(q^m, p^m)$ は状態 $x_{T_m}^m$ のハミルトニアン、 $E(q^m)$ 、 $K(p^m)$ はポテンシャルエネルギーと運動エネルギーを表す。

今、二つのレプリカ m と n の間で、それぞれの座標を保持したまま、温度 T_m と T_n を交換することを考える。

$$X = \{x_{T_1}^1, \dots, x_{T_m}^m, x_{T_n}^n, \dots, x_{T_M}^M\} \rightarrow X' = \{x_{T_1}^1, \dots, x_{T_n}^m, x_{T_m}^n, \dots, x_{T_M}^M\} \quad (\text{式 3-6})$$

この際、運動量は交換後の温度でカノニカル分布を満たすよう、各原子の速度を修正する必要がある。温度 T_m のカノニカル分布における平均運動エネルギーは、

$$\langle K(p^m) \rangle_{T_m} = \left\langle \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} \right\rangle = \frac{3}{2} N k_B T_m \quad (\text{式 3-7})$$

(m_i は原子 i の質量、 p_i は原子 i の運動量、 N は総原子数) で与えられるので、交換後の速度は、各原子の交換前の速度に温度の比の平方根をかけて補正すればよい。

$$\begin{cases} p'^m \equiv \sqrt{\frac{T_n}{T_m}} p^m \\ p'^n \equiv \sqrt{\frac{T_m}{T_n}} p^n \end{cases} \quad (\text{式 3-8})$$

このレプリカ交換は次のようにも表現できる。

$$\begin{cases} x_{T_m}^m \equiv (q^m, p^m)_{T_m} \\ x_{T_n}^n \equiv (q^n, p^n)_{T_n} \end{cases} \rightarrow \begin{cases} x_{T_n}^m \equiv (q^m, p'^m)_{T_n} \\ x_{T_m}^n \equiv (q^n, p'^n)_{T_m} \end{cases} \quad (\text{式 3-9})$$

系全体が平衡状態にあるとき、状態 $X \rightarrow X'$ への遷移が起こる頻度は、その逆過程である状態 $X' \rightarrow X$ への遷移が起こる頻度と等しい(詳細釣り合いの原理)。したがって、状態 $X \rightarrow X'$ 、 $X' \rightarrow X$ への遷移確率 $w(X \rightarrow X')$ 、 $w(X' \rightarrow X)$ には次の詳細釣り合いが要求される。

$$W_{REM}(X)w(X \rightarrow X') = W_{REM}(X')w(X' \rightarrow X) \quad (\text{式 3-10})$$

$$\begin{aligned} \frac{w(X \rightarrow X')}{w(X' \rightarrow X)} &= \frac{W_{REM}(X')}{W_{REM}(X)} \\ &= \frac{\exp\{\cdots - \beta_n H(q^m, p'^m) - \beta_m H(q^n, p'^n) \cdots\}}{\exp\{\cdots - \beta_m H(q^m, p^m) - \beta_n H(q^n, p^n) \cdots\}} \\ &= \exp[-\beta_n \{E(q^m) + K(p'^m)\} - \beta_m \{E(q^n) + K(p'^n)\} \\ &\quad + \beta_m \{E(q^m) + K(p^m)\} + \beta_n \{E(q^n) + K(p^n)\}] \\ &= \exp[-\beta_m \{E(q^n) - E(q^m)\} - \beta_n \{E(q^m) - E(q^n)\} \\ &\quad - \beta_n K(p'^m) - \beta_m K(p'^n) + \beta_m K(p^m) + \beta_n K(p^n)] \\ &= \exp[-\beta_m \{E(q^n) - E(q^m)\} + \beta_n \{E(q^n) - E(q^m)\} \\ &\quad - \frac{1}{k_B T_n} \frac{T_n}{T_m} K(p^m) - \frac{1}{k_B T_m} \frac{T_m}{T_n} K(p^n) + \beta_m K(p^m) + \beta_n K(p^n)] \\ &= \exp[-(\beta_m - \beta_n) \{E(q^n) - E(q^m)\}] = \exp(-\Delta) \end{aligned} \quad (\text{式 3-11a})$$

$$\Delta = (\beta_m - \beta_n) \{E(q^n) - E(q^m)\} \quad (\text{式 3-11b})$$

状態 $X \rightarrow X'$ へのレプリカ対交換の判定は、以下の手続きで行われるメトロポリス判定に従う。
 $W_{REM}(X') / W_{REM}(X) > 1$ の場合は、現在の状態 X よりも次の状態 X' が実現される確率が高くなるので、無条件にレプリカの交換を実施する。 $W_{REM}(X') / W_{REM}(X) < 1$ の場合は、 $[0,1]$ の間の一様乱数 λ を発生させ、 $\lambda < \exp(-\Delta)$ ならばレプリカの交換を行い、それ以外ならば交換は行わない。

$$w(X \rightarrow X') = \min\left(1, \frac{W_{REM}(X')}{W_{REM}(X)}\right) = \min(1, \exp(-\Delta)) \quad (\text{式 3-12})$$

$T_m < T_n$ すなわち $\beta_m > \beta_n$ の時、 $E(q^n) < E(q^m)$ ならば $\Delta > 0$ となり、レプリカの交換は 100 % 行われる。逆に $E(q^n) > E(q^m)$ ならばレプリカの交換確率は Δ の増加に対して指数関数的に減少する (図 3-5)。

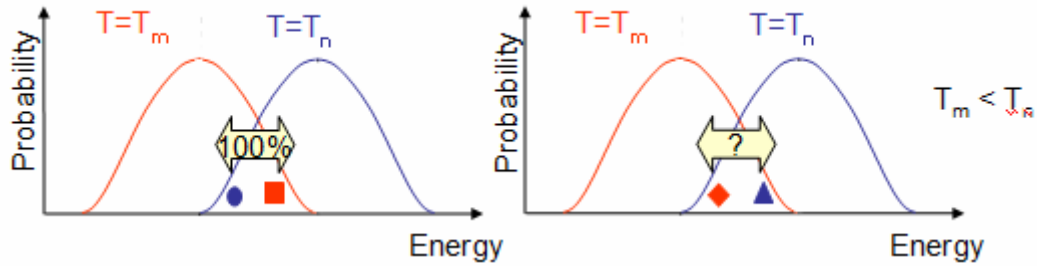


図 3-5. レプリカの交換確率の概念図

赤線はレプリカ m のカノニカル分布、青線はレプリカ n のカノニカル分布曲線を表し、 $\blacksquare$ 、 $\blacklozenge$ はレプリカ m の状態、 $\bullet$ 、 $\blacktriangle$ はレプリカ n の状態を表す。

(a) $E(q^n) < E(q^m)$ ならば 100 % 交換を行う。(b) $E(q^n) > E(q^m)$ ならば交換確率 $\exp(-\Delta)$ に従う。

実際のレプリカ交換シミュレーションは、図 3-6 に示すように 2 つのステップを交互に繰り返す。

- (1) 各レプリカ $m(1,2,3,\dots,M)$ において、一定温度 T_m の独立なカノニカルアンサンブル上の MD 計算を一定のステップ数実行する。
- (2) 隣接した温度 (T_m, T_{m+1}) に対応するレプリカ対を遷移確率に従って交換する。レプリカ交換の受け入れ確率は温度差に従って指数関数的に減少するため、交換は隣接した温度を持つレプリカ間でのみ行われる。

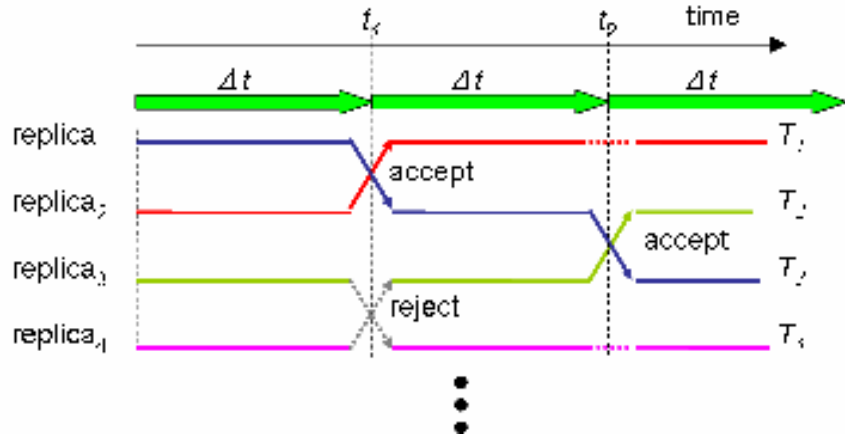


図 3-6. レプリカ交換の流れ

4 つの独立したレプリカのレプリカ交換。青・赤・緑・ピンクの線はそれぞれレプリカ 1-4 の時間の流れを示す。各レプリカはそれぞれの温度で一定時間 (Δt) 独立した MD 計算を行い、 Δt 毎に隣り合う温度を持つレプリカ同士の温度の交換を試みる。図では、時刻 t_1 ではレプリカ 1 (温度 T_1) とレプリカ 2 (温度 T_2) の温度交換が行われたが、レプリカ 3 とレプリカ 4 の交換は棄却された。時刻 t_2 ではレプリカ 1 (温度 T_2) とレプリカ 3 (温度 T_3) の交換が行われた。

物理量 A の任意の温度 T_m におけるカノニカルアンサンブル平均は次式で与えられる。

$$\langle A \rangle_{T_m} = \frac{1}{N_{\text{sim}}} \sum_{t=1}^{N_{\text{sim}}} A(x_m^{f(m;t)}(t)) \quad (\text{式 3-13})$$

N_{sim} はシミュレーションの合計ステップ数、 t はシミュレーションのタイムステップ、 $f(m;t)$ はシミュレーション時刻 t で、温度 T_m を持つレプリカのラベルを表す。実際には、REMD 計算終了後、温度 T_m を持つレプリカの軌跡を作成し、その軌跡に所属する、さまざまな性質を調べることになる。ただし、REMD 計算の軌跡はダイナミクスが途切れているため、物理量の経時変化は追えない。

3. シミュレーション結果の解析

(1) Automated histogram filtering (AHF) 法

AHF 法 (Gordon and Rothstein, 2006; Larrass et al., 2003) は、MD 計算のスナップショットのセットに対し、分子内の C_α 間距離を変数とした主成分解析 (Principal component analysis; PCA) を行い、その主成分値の分布から自動的にクラスタリングを行う手法である。AHF 法の手続きは以下のとおりである。

(i) 全ての残基の組み合わせについて、 C_α 間距離の軌跡行列 $\mathbf{R}$ を作成する。

$$\mathbf{R}(t) = \begin{bmatrix} r_1(1) & r_1(2) & \cdots & r_1(K) \\ r_2(1) & r_2(2) & \cdots & r_2(K) \\ & \ddots & & \\ & & r_m(k) & \\ & & & \ddots \\ r_M(1) & r_M(2) & \cdots & r_M(K) \end{bmatrix} \quad (\text{式 3-14})$$

$k(1,2,3,\cdots K)$ はスナップショットの番号、 $m((1,2),(1,3),\cdots,(n-1),n) = (1,2,3,\cdots,M)$ は 2 残基の組み合わせ番号を表し、 $r_m(k)$ はスナップショット番号 k における m 番目の組み合わせの C_α 間距離を表す。残基数 n の中から二つの残基を選ぶ組み合わせ数は $M = n(n-1)/2$ 個あり、スナップショットの合計数を K とすると、 $\mathbf{R}$ は $K \times M$ 次元の行列になる。

(ii) 行列 $\mathbf{R}$ から $M \times M$ 次元の分散・共分散行列 $\mathbf{A} = \text{cov}(\mathbf{R})$ を作成する。 m, n は残基間の組み合わせ番号、 σ_{mn} は $r_m(k), r_n(k)$ の分散・共分散、 $\overline{r_m}$ は $r_m(k)$ の平均値を表す。

$$\mathbf{A} = \text{cov}(\mathbf{R}) = \begin{bmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & \cdots & \\ \sigma_{12} & \sigma_{22} & \cdots & \\ & \ddots & \ddots & \\ & & \sigma_{mn} & \ddots \\ \sigma_{M1} & \sigma_{M2} & \cdots & \sigma_{MM} \end{bmatrix} \quad (\text{式 3-15a})$$

$$\sigma_{mn} = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K (r_m(k) - \bar{r}_m)(r_n(k) - \bar{r}_n) \quad (\text{式 3-15b})$$

$$\bar{r}_m = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K r_m(k) \quad (\text{式 3-15c})$$

(iii) 分散・共分散行列 $\mathbf{A}$ の固有値 λ と固有ベクトル $\mathbf{x}$ を求める。

$$\mathbf{A}\mathbf{x}_i = \lambda_i \mathbf{x}_i \quad (\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3 > \cdots; i=1,2,3,\cdots) \quad (\text{式 3-16a})$$

$$\mathbf{x}_i = [x_{i1}, x_{i2}, \cdots, x_{iM}]^t \quad (\text{式 3-16b})$$

i は固有値・固有値ベクトルの番号を表し、固有値の大きい順に、1,2,3…と番号が振られる。

(iv) MD の軌跡の各スナップショットに対応する主成分得点 $a_k^{(i)}$ を計算する。

$$a_k^{(i)} = \sum_{m=1}^M r_m(k) x_{im} \quad (\text{式 3-17})$$

(v) M 次元のパラメータ空間に主成分得点の分布をプロットし、第一主成分軸に沿って、その分布関数のヒストグラムを設定したビン数で作成する(図 3-7(a))。ヒストグラムのピーク値を検索し、二つのピーク間のくぼみが設定したピーク識別 (peak-distinction) 値より深い場合、二つのピークを分離する(図 3-7(b))。分離された各ピークは、構造に関連のあるクラスターに相当する。異なるクラスター(ピーク)が検出されると、そのクラスター内でさらに主成分解析(図 3-7(c))、ヒストグラム作成(図 3-7(d))と同様の手続きを新しいクラスターが検出されなくなるまで繰り返す。

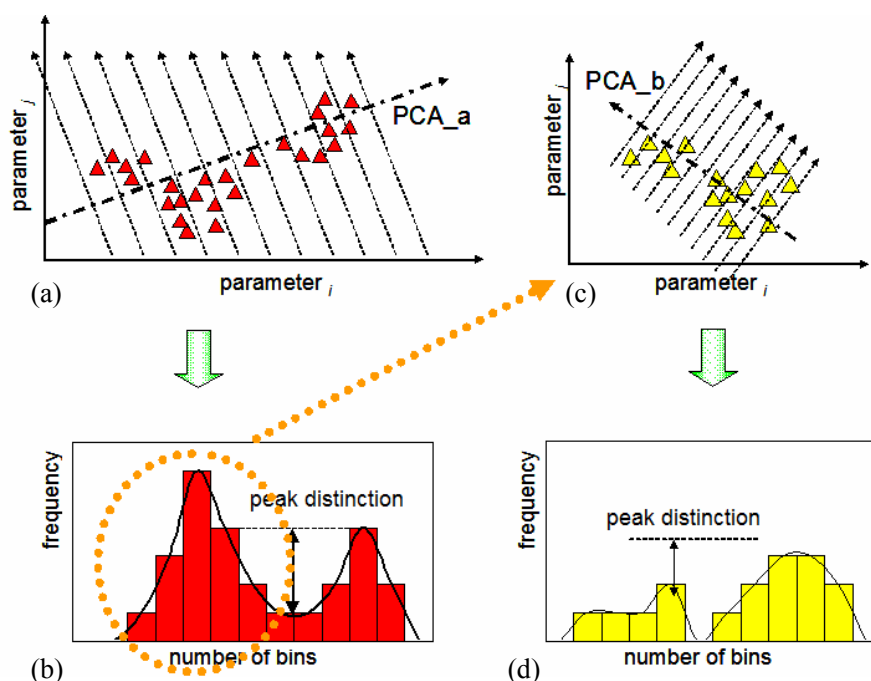


図 3-7. AHF 法の手続き

(a) M 次元のパラメータ空間に主成分得点の分布をプロットし、(b) 第一主成分軸に沿って、その分布関数のヒストグラムを作成する。ヒストグラムのピーク値を検索し、二つのピーク間のくぼみが peak-distinction より深い場合、二つのピークを分離する。(c) (b) で分離されたクラスター内でさらに主成分解析を行い、(d) 同様の手続きでクラスターを分離する。

(2) Potential of mean force (PMF) 法

温度一定のカノニカルアンサンブルでは各状態の出現確率はボルツマン因子の確率重みで実現される(式 3-4)。各状態の出現確率の比をとり、その対数をとることによって、各々の状態の自由エネルギー差を求めることができる。

$$G = G_0 + k_B T \ln(p/p_0) \quad (\text{式 3-18})$$

G は自由エネルギー、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 p は指定した反応座標でのスナップショットの出現頻度である。 G_0 はスナップショットの出現頻度が p_0 での自由エネルギー値で、基準として任意の値をとることができる。対象とする 2 つの状態 (A,B) の自由エネルギー G_A 、 G_B を

求めることにより、この状態間の自由エネルギー差 ΔG を求めることができる (図 3-8)。

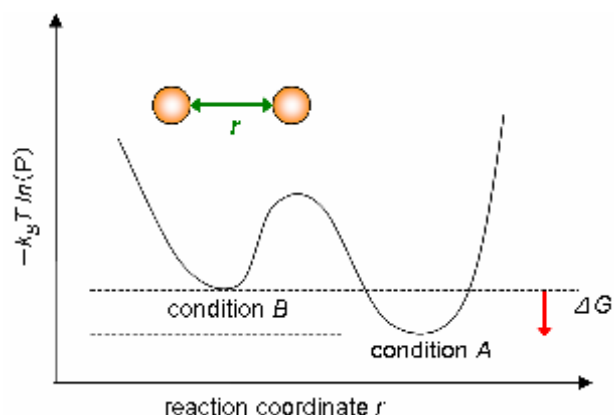


図 3-8. Potential of mean force 法

状態 A と状態 B の出現確率の対数に $k_B T$ をかけた数値の差が自由エネルギー差に相当する。

複数の状態が存在するとき、基準となる状態のエネルギー値を設定し、各状態における相対的な自由エネルギー差を計算することにより、選択した反応座標の数に応じた次元の自由エネルギー地形を描くことができる。PMF 法では、反応座標 r は対象とする系を表す代表的なパラメータを選ぶ。適切な反応座標を選ぶことにより、適切な自由エネルギー地形を描くことができる。

(3) MM-GB/SA 法

MM-GB/SA 計算 (Kollman et al., 2000) は、MD 計算で得られたスナップショットを用いて連続溶媒モデル中の分子の自由エネルギーを計算する手法である。

真空中の分子の Molecular mechanical energy (E_{vac}) は、bond、angle、dihedral を含む分子内の結合エネルギーと静電相互作用 (ELE)、ファンデルワールス相互作用 (VDW) の和で表される (式 3-19)。

$$E_{vac} = E_{bond} + E_{angle} + E_{dihedral} + E_{ELE} + E_{VDW} \quad (\text{式 3-19})$$

分子を真空中から溶媒中に移すのに必要な自由エネルギー (溶媒和自由エネルギー; ΔG_{solv}) は静電項 (ΔG_{pol}) と非静電項 (ΔG_{nonpol}) の和で表され (式 3-20)、溶媒和分子の全エネルギー

(E_{out}) は真空中の分子のエネルギーと溶媒和自由エネルギーの和で表される(式 3-21)。

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{pol} + \Delta G_{nonpol} \quad (\text{式 3-20})$$

$$E_{out} = E_{vac} + \Delta G_{solv} \quad (\text{式 3-21})$$

一般化ボルン (Generalized Born; GB) モデルは ΔG_{pol} を求めるモデルの一つである。GB 法では、分子内の各原子はその中心に電荷 q_i を持つ半径 R_i の球として表現される(図 3-9)。

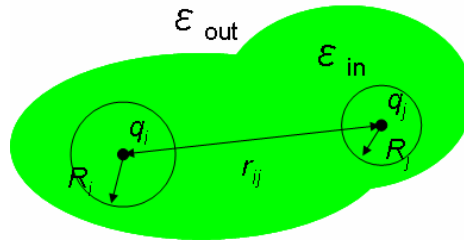


図 3-9. 誘電率 ϵ_{out} 中に浮かぶタンパク質。 ϵ_{in} はタンパク質中の誘電率。 q_i 、 q_j は分子中の原子の電荷、 R_i 、 R_j は有効ボルン半径、 r_{ij} は原子 ij 間の距離。

このとき、 ΔG_{pol} は式 3-22 で表される。

$$\Delta G_{pol} = \Delta G_{GB} = -\frac{1}{2} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{f^{GB}(r_{ij}, R_i, R_j)} \left[1 - \frac{\exp\{-\kappa f^{GB}(r_{ij}, R_i, R_j)\}}{\epsilon_{out}} \right] \quad (\text{式 3-22})$$

κ はデバイ・ヒュッケル遮蔽パラメータ(式 3-23)、 f^{GB} は変数 r_{ij} 、 R_i 、 R_j に関するなだらかな関数を表し、式 3-24 の関数形がよく用いられる。

$$\kappa = \left(\frac{2N_A e^2 I}{\epsilon_{in} k_B T} \right)^{1/2} \quad (\text{式 3-23})$$

$$f^{GB}(r_{ij}, R_i, R_j) = [r_{ij}^2 + R_i R_j \exp(-r_{ij}^2 / 4R_i R_j)]^{1/2} \quad (\text{式 3-24})$$

N_A はアボガドロ数、 e は電気粗量、 I は電解液中のイオン強度(純水では 0)、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度を表す。

有効ボルン半径 R_i は原子 i が分子内でどの程度埋まっているのかを反映している。孤立イオン

の場合、 R_i はファンデルワールス半径 ρ_i と等価、 $r_{ij}=0$ とおけるので $f^{GB}=\rho^2$ となる。この時、純水中 ($\kappa=0, \epsilon_{out}=78$) では式 3-22 は単一イオンの溶媒和エネルギーを表す下記のボルン式(式 3-25)に一致する。

$$\Delta G_{pol} = -\frac{1}{2} \left(1 - \frac{1}{\epsilon_{out}} \right) \frac{q^2}{\rho_i^2} \quad (\text{式 3-25})$$

また、 ΔG_{nonpol} は溶媒和自由エネルギーに対する疎水性の寄与として、溶媒露出表面積より決定される(式 3-26)。

$$\Delta G_{nonpol} = \sum_n \sum_i w_n A_i \quad (\text{式 3-26})$$

w_n は各原子タイプ n の溶媒和自由エネルギーの重みパラメータ、 A_i は注目するタンパク質立体構造における原子 i の部分的な溶媒露出面積を表す。

IV レプリカ交換法による単量体ポリグルタミンペプチドの特性解析

polyQ 病発症の最初のステップは異常伸長した polyQ ペプチドを含むタンパク質のミスフォールドにある。polyQ 病に共通の原因因子である polyQ ペプチドの物理化学的性質を調査し、水中での構造アンサンブルと自由エネルギー地形を求めるため、本研究では REMD 法を用いて短い単量体の polyQ ペプチドを取り扱った。同時に polyQ ペプチドの特異性を他との比較により調べるため、よく似た残基数の類似のペプチドについても同様に REMD 法による解析を行った。さらに REMD 法では軌跡が途切れてしまい、運動の経時変化を観察することができないため、単量体・多量体について初速度を変えた多重分子動力学 (MMD) 計算を行い、その軌跡を観察した。以下、その方法と結果について詳しい説明を行う。

1. 対象と方法

(1) 対象とするペプチド一覧

本研究の目的は、短い単量体の polyQ ペプチドの水中での構造アンサンブルを知ることにある。そのため、本研究の主標的ペプチドとして、グルタミン残基が 15 個つながった polyQ ペプチド (Q₁₅) を用意した。また、本研究で用いるコンピューターシミュレーションの手法、REMD 法による計算が正しく Protein data bank (PDB) 登録構造を再現するかどうか確認するために、PDB を検索し、17 残基からなる β ターン構造をとる二つのペプチド、1E0Q と 1KFP を選び出した。なお、1KFP はターン形成に関わっていない C 末端側 3 残基を切り取り、14 残基のペプチドとして計算に用いた(図 4-1)。

さらに、本研究では、定まった構造を持たないペプチド候補として、グリシン (G) が 15 残基つながったペプチド、G₁₅を用意した。15 残基という短く、単調な配列を持つペプチド Q₁₅ が定まった構造を本当にとることが可能かどうか確認するためである。さらに、Q の伸長が中断された際の影響を調べるため、Q₁₅ の途中に PG ペアを挿入した二つの変異モデル Q₇PGQ₆ と Q₃PGQ₁₀ 作成した。Q₇PGQ₆ は Q₁₅ の真ん中の QQ ペアを PG ペアに置き換え、Q₃PGQ₁₀ は Q₁₅ の N 末端側の QQ ペアを PG ペアに置き換えている。

全てのペプチドは Amber10 (Case et al., 2005) に組み込まれている leap モジュールを用いて、伸長した構造を作成した。また、全てのペプチドの N 端、C 端はそれぞれ末端の電荷がむき出しにならないよう、アセチル基 (Acetyl group; ACE: O=C-CH₃) と N メチル基 (N-methyl group;

NME: -N-CH₃) でキャップを施した。表 4-1 に、本研究で用いた 6 種類のペプチドのリストを示す。

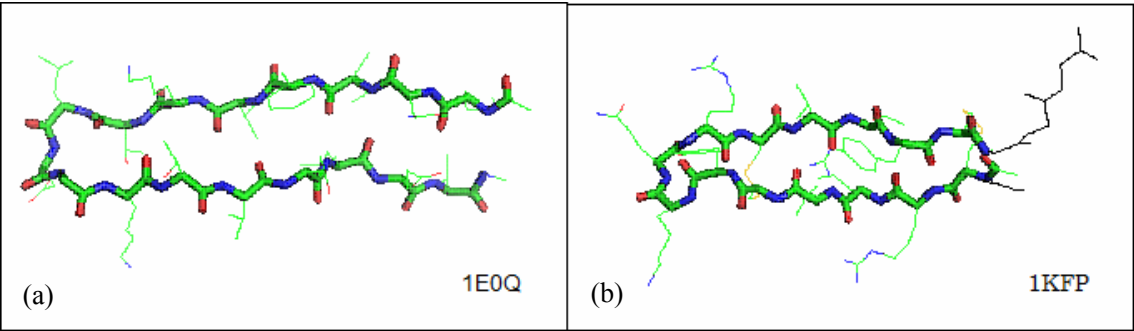


図 4-1. β ターン構造を持つペプチド (a) 1E0Q と (b) 1KFP。1KFP は β ターン形成に関わっていない C 末端側 3 残基 (灰色のラインで描画) を切り取り、14 残基のペプチドとして扱った。主鎖はスティック表示、側鎖はライン表示。炭素: 緑、窒素: 青、酸素: 赤。構造表示は pyMol (v0.99, DeLano Scientific LLC, South San Francisco, USA) を用いた。

表 4-1. 本研究で用いたペプチドの配列リスト。赤、青、緑、黒はそれぞれ酸性、塩基性、極性、疎水性残基を表す。全てのペプチドは伸長した構造を作成し、N 端、C 端はそれぞれアセチル基 (ACE)、N-メチル基 (NME) でキャップを施した。

PDB ID or peptide name	Sequences (red: acidic, blue: basic, green: polar, black: hydrophobic)
1E0Q	ACE-MQIFV K TL D G K TITLEV-NME
1KFP	ACE-C R R L CY K Q R CVTYC-NME
G ₁₅	ACE-G ₁₅ -NME
Q ₁₅	ACE-Q ₁₅ -NME
Q ₇ PGQ ₆	ACE-Q ₇ PGQ ₆ -NME
Q ₃ PGQ ₁₀	ACE-Q ₃ PGQ ₁₀ -NME

(2) 計算手順とパラメータの設定

(i) レプリカ交換分子動力学法

本研究では、広いエネルギー空間にわたってペプチドの構造を探索するために、REMD 法による計算を行った。REMD 法の詳細理論は第 III 章で述べた。

REMD の計算は Amber10 (Case et al., 2005) に含まれているモジュールを用いた。ポテンシャルの計算に必要な力場セットは parm96 force field を用い、溶媒モデルは連続溶媒モデルの一つである一般化ボルン (Generalized Born; GB; Onufriev et al., 2004) モデルを用いた。この力場セットと溶媒モデルの組み合わせは α ヘリックス、 β ターンの出現バランスがよく、PDB 構造をよく再現することが先行研究により確かめられている (Zhou, 2003; Shell et al., 2008)。レプリカ数は G_{15} 以外のペプチドに対しては 16、 G_{15} は原子数が少ないため、10 レプリカを用意した。レプリカの温度間隔は、原子数に応じてレプリカの交換確率が 30-40 % になるように設定した。各ペプチドで使用したレプリカの温度一覧を表 4-2 に示す。

表 4-2. REMD の計算に用いたレプリカ数と設定温度の一覧

PDB ID or peptide name	Number of replicas	Temperatures [K]
1E0Q	16	281.1, 300.0, 320.1, 341.6, 364.5, 389.0, 415.1, 442.9, 472.7, 504.4, 538.2, 574.3, 612.9, 654.0, 697.9, 744.7
1KFP	16	281.4, 300.0, 319.8, 340.9, 363.4, 387.3, 412.9, 440.1, 469.2, 500.1, 533.1, 568.3, 605.8, 645.7, 688.3, 733.8
G_{15}	10	270.5, 300.0, 332.7, 369.0, 409.2, 453.8, 503.2, 558.1, 618.9, 686.4
Q_{15} Q_7PGQ_6 Q_3PGQ_{10}	16	280.2, 300.0, 321.2, 343.8, 368.1, 394.0, 421.8, 451.6, 483.5, 517.6, 554.1, 593.2, 635.0, 679.8, 727.8, 779.1

REMD の計算を行う前に、各ペプチドの伸長した構造に対してエネルギー最小化(付録 1)を行った。その後、各レプリカの該当温度まで衝突頻度 1.0 ps^{-1} で Langevin 方程式を用いて昇温し、

それぞれの温度で構造緩和のために 200 ps 間の MD 計算を行った。一連のエネルギー最小化・緩和過程の後、それぞれのペプチドに対して REMD の計算を開始した。

全てのシミュレーションは時間刻み $\Delta t = 2$ fs、レプリカ交換試行頻度 1 ps^{-1} 、非結合カットオフ距離 99 Å、溶媒の誘電率 $\epsilon = 78$ で行った。温度コントロールには Langevin 方程式を用い、衝突頻度は $\gamma = 1.0 \text{ ps}^{-1}$ に設定した。また、計算中、水素原子との結合長は SHAKE アルゴリズム (付録 2; Ryckaert et al., 1977) を用いて固定し、計算の高速化を図った。それぞれのレプリカについて 300 ns 相当のシミュレーションを行った。

(ii) 多重分子動力学 (Multiple molecular dynamics; MMD) 法

REMD 法は幅広いエネルギー空間を効率的に探索する有効な方法であるが、レプリカ交換の際にダイナミクスが途切れるため、分子の構造変化の経時変化を追うことができない。我々は単量体の Q_{15} のダイナミクスと、多量体を形成した時の β ターン構造の安定性を調べるために、同じ初期構造から初期速度を変えて複数の MD 計算を行う多重分子動力学 (Multiple molecular dynamics simulation; MMD) 計算を行った。

MMD 計算は REMD 計算と同様、parm96 force field と GB 溶媒モデルの組み合わせを用い、300 K で実施した。 Q_{15} の単量体の初期構造は、REMD 計算で得られたスナップショットよりランダムコイル、 α ヘリックス、 β ターン構造を取り出して用意した。同様に REMD 計算で得られたスナップショットから選び出した β ターン構造を並べて Q_{15} - β ターン構造の単量体、二量体、三量体の初期構造とした。さらに単量体のダイナミクスの比較のため、1E0Q についても、伸びきった構造と PDB 登録構造をそれぞれ初期構造として用意し、MMD 計算を行った。

2. 結果と解析

(1) レプリカ交換分子動力学計算

(i) PDB 構造の再現

図 4-2 に 1E0Q と 1KFP の主鎖の重原子 (N, C α , C, and O) について、PDB 登録構造に対する Root mean square deviation (RMSD) 値の分布を示す。RMSD 値の計算は式 2-1 に従った。

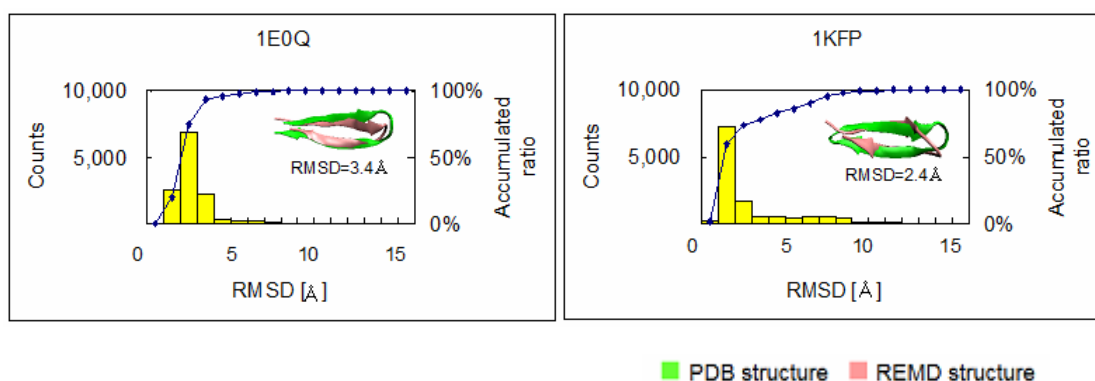


図 4-2. 主鎖の重原子 (N, C α , C, and O) についての、PDB 構造からの RMSD 値の分布。(a) 1E0Q、(b) 1KFP。300 K、50–300 ns 相当の軌跡から 12,500 枚のスナップショットを解析。ヒストグラムは PDB 構造からの RMSD 値の分布、折れ線グラフは RMSD 値の積算値[%]を表す。それぞれのペプチドについて PDB 登録構造と REMD 計算結果からの典型的な構造も表示。緑は PDB 登録構造、ピンクは REMD の計算結果を表す。構造表示には VMD (Humphrey et al., 1996) を使用。

REMD の計算は各ペプチドに対して 300 ns 行ったが、そのうち最初の 50 ns は系全体が平衡に達していないため破棄して、50–300 ns 相当、300 K の軌跡から 12500 個のスナップショットを取り出し、解析に用いた。図 4-2 には二つのペプチドの PDB 登録構造と、REMD 計算で得られた代表構造を重ねて表示した。

図 4-2 より、14–17 残基の β ターン構造を持つペプチドに対して、REMD 計算によって PDB 構造がよく再現されていることが示された。本研究で用いた REMD 計算の条件は短いペプチドに対しては PDB 登録構造をよく再現しており、PDB 登録構造を持たない Q₁₅ の解析にも十分使えると考えられる。今後は、全てのペプチドに対して、50–300 ns 相当、300 K の軌跡から取り出した 12,500 個のスナップショットについて解析した結果を示す。

(ii) 二次構造によるスナップショットの分類

我々ははじめに 6 種類のペプチドに対して、REMD 計算で得られた構造を表 4-3 に示す定義にしたがって、 α ヘリックス、 β ターン、ランダムコイルの 3 種類に分類した。各残基の二次構造の決定には The dictionary of protein secondary structure program (DSSP; Kabsch and Sander, 1983) を用いた。図 4-3 にその分類結果を示す。

表 4-3. 二次構造による構造分類の定義。二次構造の決定には DSSP を使用。

分類	定義
α ヘリックス	α ヘリックスの性質を持つ残基数が 4 以上 - 主鎖間の水素結合数が 2 以上
β ターン	- 反平行 β の性質を持つ残基数が 4 以上 3 残基以上離れた残基間の水素結合数が 1 以上
α/β	α ヘリックス/β ターン両方の定義に当てはまるもの
ランダムコイル	α ヘリックス/β ターンの定義に当てはまらないもの

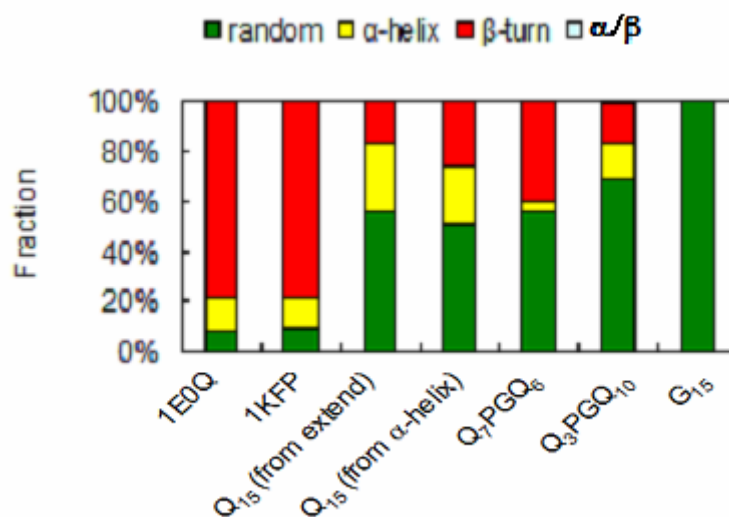


図 4-3. 二次構造による REMD 計算によるスナップショットの構造分類の結果。各構造の定義は表 4-3 に従う。緑:ランダムコイル、黄色: α ヘリックス、赤: β ターン

1E0Q と 1KFP はどちらも、80 %が PDB 登録構造である β ターン構造であった。また予想通り、G₁₅ は定まった構造をもたないランダムコイル構造しか現れなかった。Q₁₅ は水中でランダムコイル構造を好むものの、 α ヘリックスが 27 %、 β ターンが 17 %の割合で出現した。Q₁₅ の PG ペア置換モデルの一つである Q₇PGQ₆ では、 β ターン構造が 41 %まで増え、もう一方の PG ペア置換モデル Q₃PGQ₁₀ ではランダムコイル構造が 70 %まで増加した。Q₁₅ については初期構造が伸長したものと α ヘリックスの二つの状態から始めた結果を比較した。どちらもよく似た構造分布になり、REMD 計算の結果は初期構造によらないことを確認した。 α ヘリックス/ β ターン両方の定義を満たした snapshot の数は 1E0Q と 1KFP が 18、Q₁₅ が 0、Q₇PGQ₆ が 4、Q₃PGQ₁₀ が 70 であった。これらの中では Q₃PGQ₁₀ の 70 が突出しているが、それでも全体の 1 % にも満たず、ほぼ、 α ヘリックス/ β ターン/ランダムコイルの 3 種類に分類できた。

(iii) 水素結合数の集計

次に、全 6 個のペプチド、各 12,500 個のスナップショットについて、分子内の水素結合の平均数を集計した。水素結合の定義は N-H-O または O-H-O の角度が 120°–180°、N-O または O-O 間の距離が 3.3 Å 以内とした。集計結果を図 4-4 に示す。

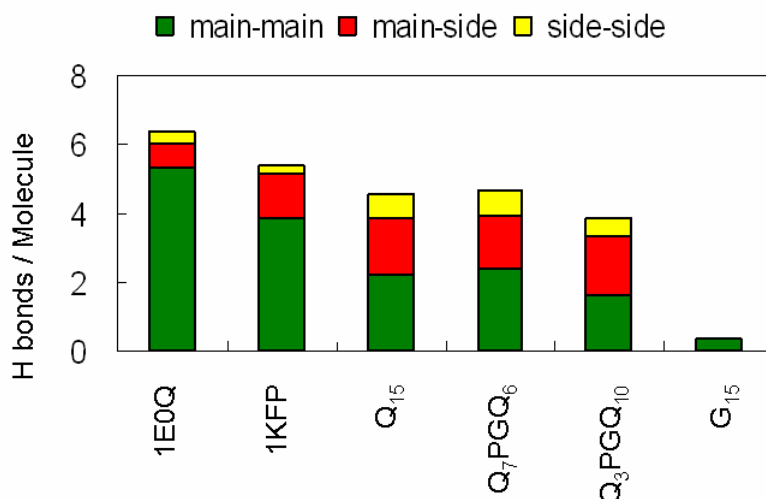


図 4-4. 1 分子あたりの水素結合数の平均値。水素結合の定義は N-H-O または O-H-O の角度が 120°–180°、N-O または O-O 間の距離が 3.3 Å 以下。緑: 主鎖間の水素結合、赤: 主鎖–側鎖間の水素結合、黄色: 側鎖間の水素結合。

Q₁₅とその PG ペア置換モデルでは、水素結合の合計は 1E0Q、1KFP よりも少ないが、全体の中で側鎖が関わる割合が高い。1E0Q、1KFP では側鎖が関わる水素結合は、それぞれ水素結合全体の 17 %、29 %であるが、Q₁₅とその PG ペア置換モデルでは 49–58 %もある。G₁₅は当然、主鎖間でだけ水素結合が形成され、その数は他に比べて少ない。

さらに水素結合についての詳しい解析を行うため、1E0Q、1KFP、Q₁₅について、各側鎖が関わっている水素結合の数の平均値を集計した。集計結果を図 4-5 に示す。1E0Q、1KFP については一部の極性残基のみが水素結合の形成に関わっているのに対し、Q₁₅ では全ての残基が水素結合の形成に関わっていることが確認できる。

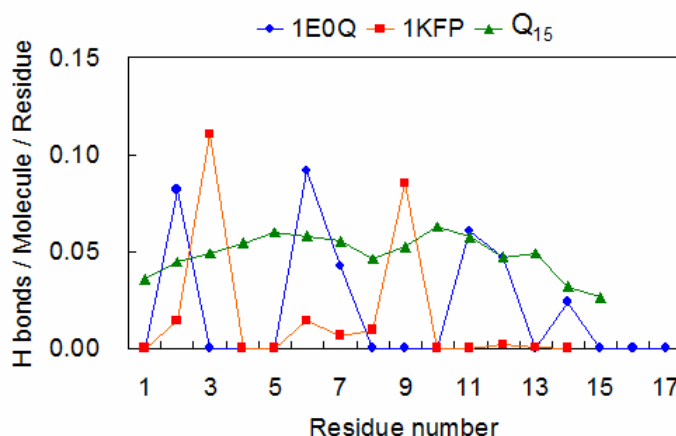


図 4-5. 側鎖間に形成された、1 分子、1 残基当たりの水素結合数の平均値の残基番号による依存。青:1E0Q、赤:1KFP、緑:Q₁₅

(iv) MM-GB/SA 解析

PDB 上で β ターン構造を持つタンパク質、1E0Q、1KFP と Q₁₅ の真空中と溶媒中の分子のエネルギーを求めるために、MM-GB/SA 解析 (III-3-(3)) を行った。計算結果を図 4-6 に示す。数値はいずれも各ペプチドについて、REMD 計算で得られた 12,500 個のスナップショットの平均値である。Q₁₅ は分子内の静電相互作用が 1E0Q、1KFP に比べ 2–3 倍強いため、真空中の Molecular mechanical energy (MM) は他の二つより安定である(図 4-6(a))。しかし溶媒和による効果は他の二つに比べて小さい(図 4-6(b); Q₁₅: 25 %, 1E0Q: 78 %, 1KFP: 66 %)。このことは、グルタミンが極性残基であるにもかかわらず polyQ ペプチドは水と馴染みが悪いことを示している。

我々はさらにグルタミンが疎水的な効果を持つことを確認するために、1E0Q、1KFP のアミノ酸配列に含まれる荷電残基を全てグルタミン (Q)、グリシン (G)、ロイシン (L) に置き換えたペ

プチドを作成し、同様の計算を行った。構造はそれぞれ PDB 登録構造を用い、荷電残基を置換後、Amber10 によってエネルギー最小化を行い初期構造とした。荷電残基を Q に置換した際の全エネルギーに対する溶媒和の効果は G、L に置換した時と同様、元の配列に比べ減少した (図 4-7)。

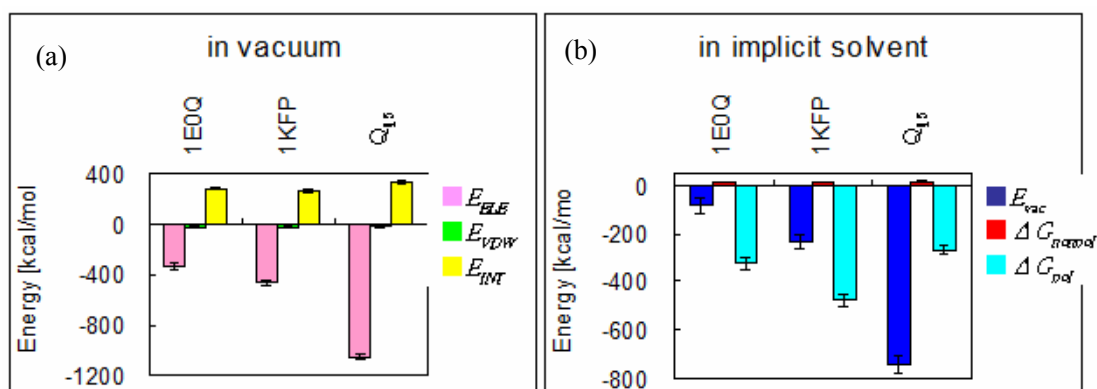


図 4-6. (a) 1E0Q、1KFP と Q15 の真空中のペプチドの Molecular mechanical energy と(b) 連続溶媒中のエネルギー

■ E_{INT} : Internal energy (= bond + angle + dihedral)

■ E_{vac} : 真空中の Molecular mechanical energy ($=E_{INT} + E_{VDW} + E_{ELE}$)

■ E_{VDW} : van der Waals 相互作用

■ E_{ELE} : 静電相互作用

■ ΔG_{pol} : 一般化ボルン法による水和自由エネルギーへの静電力の寄与

■ ΔG_{nonpol} : 溶媒露出表面積依存性。水和自由エネルギーへの疎水効果の寄与

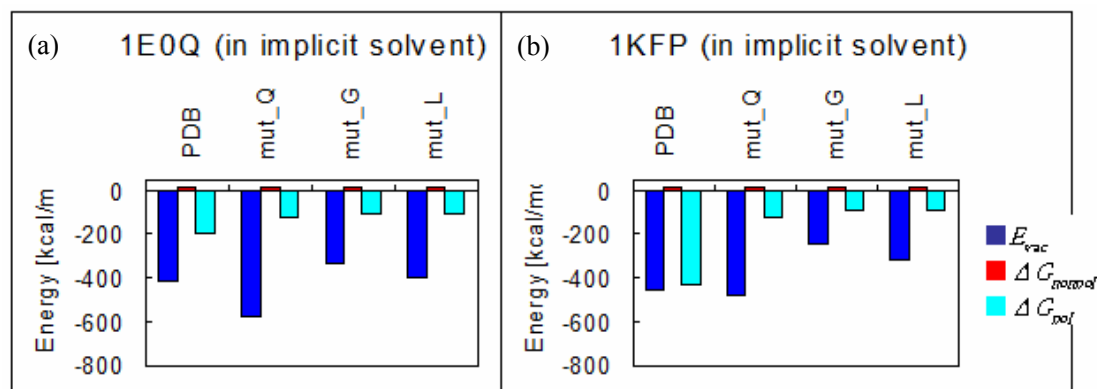


図 4-7. (a) 1E0Q、(b) 1KFP の配列中の荷電残基をグルタミン (Q)、グリシン (G)、ロイシン (L) に置換した MM-GB/SA 計算

PDB: PDB 登録配列、mut_Q: 配列中の荷電残基を全て Q に置換、mut_G: 配列中の荷電残基を全て G に置換、mut_L: 配列中の荷電残基を全て L に置換。

■ E_{vac} : 真空中の Molecular mechanical energy ($=E_{INT} + E_{VDW} + E_{ELE}$)

■ ΔG_{pol} : 一般化ボルン法による水和自由エネルギーへの静電力の寄与

■ ΔG_{nonpol} : 溶媒露出表面積依存性。水和自由エネルギーへの疎水効果の寄与

(v) AHF 解析

我々は、 Q_{15} とその PG ペア置換モデル (Q_7PGQ_6 , Q_3PGQ_{10}) の REMD 計算から得られた 12,500 スナップショットについて Automated histogram filtering (AHF) 法を用いたクラスター解析 (III-3-(1) 参照)を行った。AHF 計算では、ビン数 10、peak distinction 70 に設定した。結果を図 4-8 に示す。

図 4-8 では、さらに (ii) で行った二次構造による分類に従って、各クラスターを色分けした。 Q_{15} と Q_7PGQ_6 のクラスタリングの結果は、(ii) で行った二次構造による構造分類とよく一致し、異なるクラスターには異なる二次構造が出現している。しかしながら、 Q_3PGQ_{10} については一つのクラスターに異なる二次構造が混在していると同時に、各二次構造が異なるクラスターに散在している。 Q_3PGQ_{10} については C_α 間距離を変数としたクラスタリングでは、うまく構造を振り分けられないという結果になった。

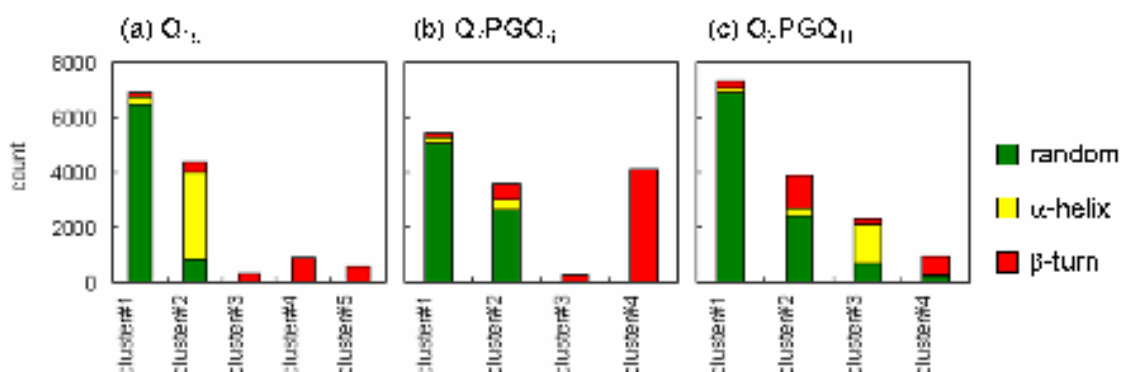


図 4-8. Q_{15} とその変異体の AHF 解析結果。bin 数= 10、peak distinction = 70。

緑:ランダムコイル、黄色: α ヘリックス、赤: β ターン

さらに我々は、一度目の主成分解析で取り出した各スナップショットの第一主成分得点 (PCA1) と第二主成分得点 (PCA2) を二次元の平面にプロットした(図 4-9)。図 4-8 と同様、図 4-9 も (ii) で行った構造分類の結果に従って色分けした。 Q_{15} の主成分解析では、第一主成分によってランダムコイル、 α ヘリックス構造、 β ターン構造に分離され、ランダムコイル構造が支配的である。 Q_7PGQ_6 では中央に β ターン構造が集中しており、これは、このペプチドでは β ターン構造が支配的なことを示している。 Q_3PGQ_{10} ではランダムコイル構造が広範囲に広がり、広い領域で α ヘリックス構造、 β ターン構造の分布と重なっている。図 4-8 による解析と同様、 Q_3PGQ_{10} については C_α 間距離を変数としたクラスタリングでは、うまく構造を振り分けられないことを示している。

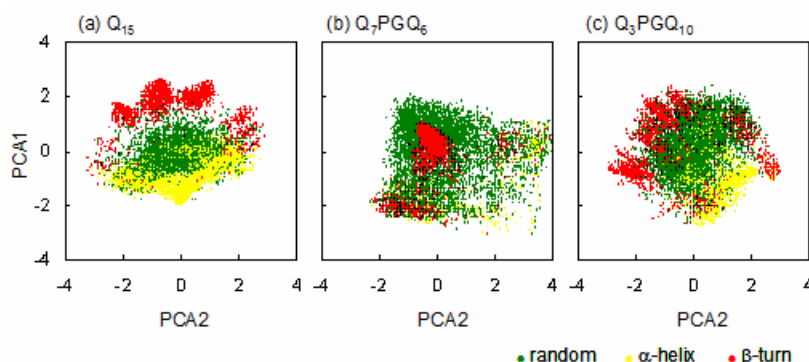


図 4-9. Q_{15} とその変異体の第一主成分得点 (PCA1) と第二主成分得点 (PCA2) による二次元プロット。色分けは二次構造による分類結果による。緑:ランダムコイル、黄色: α ヘリックス、赤: β ターン

(vi) 自由エネルギー地形

我々は、各ペプチドの REMD 計算で得られた 12,500 個のスナップショットについて、potential of mean force 法 (III-3-(2)) により自由エネルギー地形の描出を試みた。自由エネルギー地形の反応座標として、我々は慣性半径 (R_g) と水素結合の数を選んだ。ペプチドの慣性半径は以下の式で与えられる。

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |r_i - r_{center}|^2} \quad (\text{式 4-1})$$

i はペプチド内の原子の識別番号、 N はペプチド内の総原子数、 r_i は原子 i の座標、 r_{center} はペプチドの中心座標を表す。

慣性半径は分子中の質量の広がり具合を示すパラメータで、ペプチドのほどけ具合を示す指標になる。一方、水素結合の数はペプチドのエネルギー的な安定性を表す。この二つの物理量の組み合わせは、ペプチドの構造を特徴付ける二つの側面を表している。

図 4-10 に各ペプチドの 300 K での自由エネルギー地形を示す。図 4-10(a) は 3D プロット、図 4-10(b) は慣性半径と自由エネルギーを二つの軸とする平面への投影、図 4-10(c) は慣性半径と水素結合数を二つの軸とする平面への投影図である。図 4-10(c) には、各ペプチドのくぼ地の代表的な構造を示している。

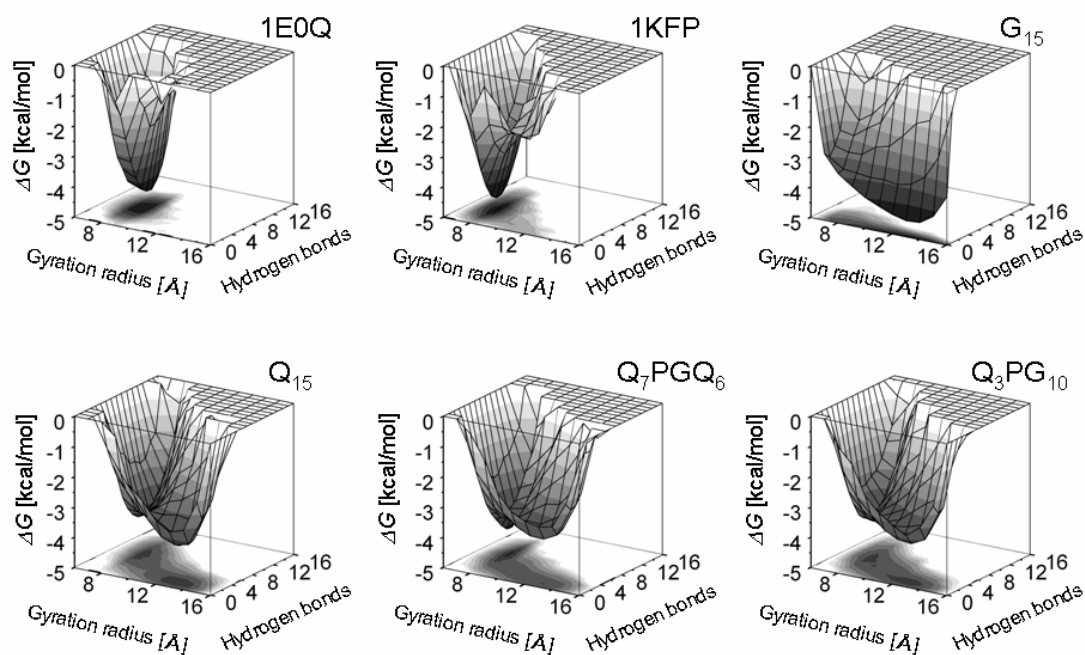


図 4-10(a) 反応座標を慣性半径と水素結合の数を反応座標とした 300 K での自由エネルギー地形の 3D プロット。

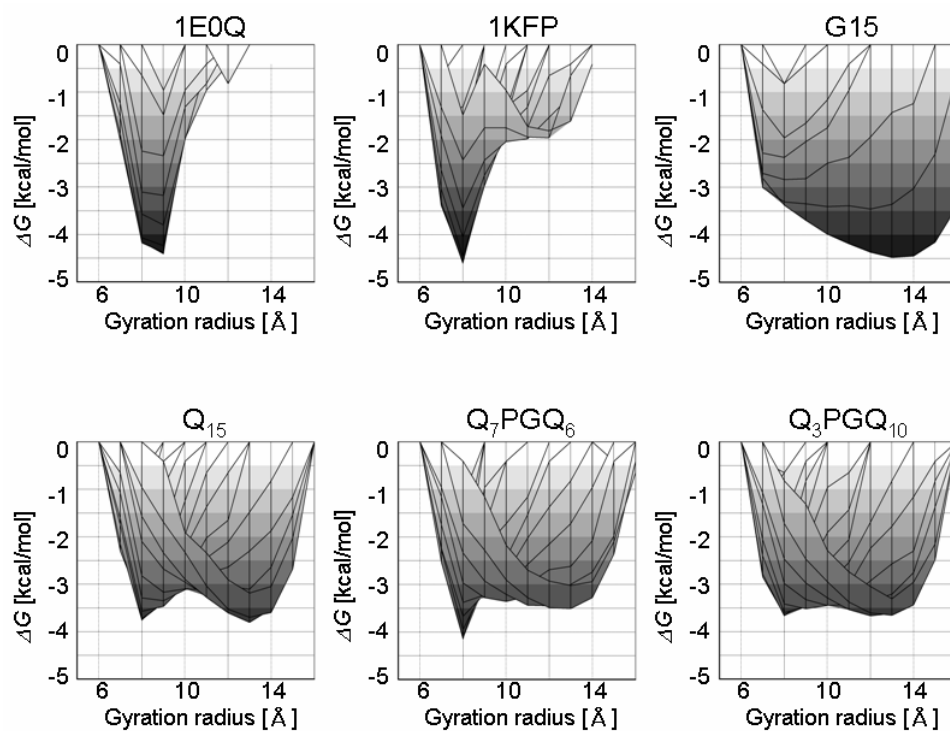


図 4-10(b) 反応座標を慣性半径と水素結合の数を反応座標とした 300 K での自由エネルギー地形。慣性半径と自由エネルギーを二つの軸とする平面への投影。

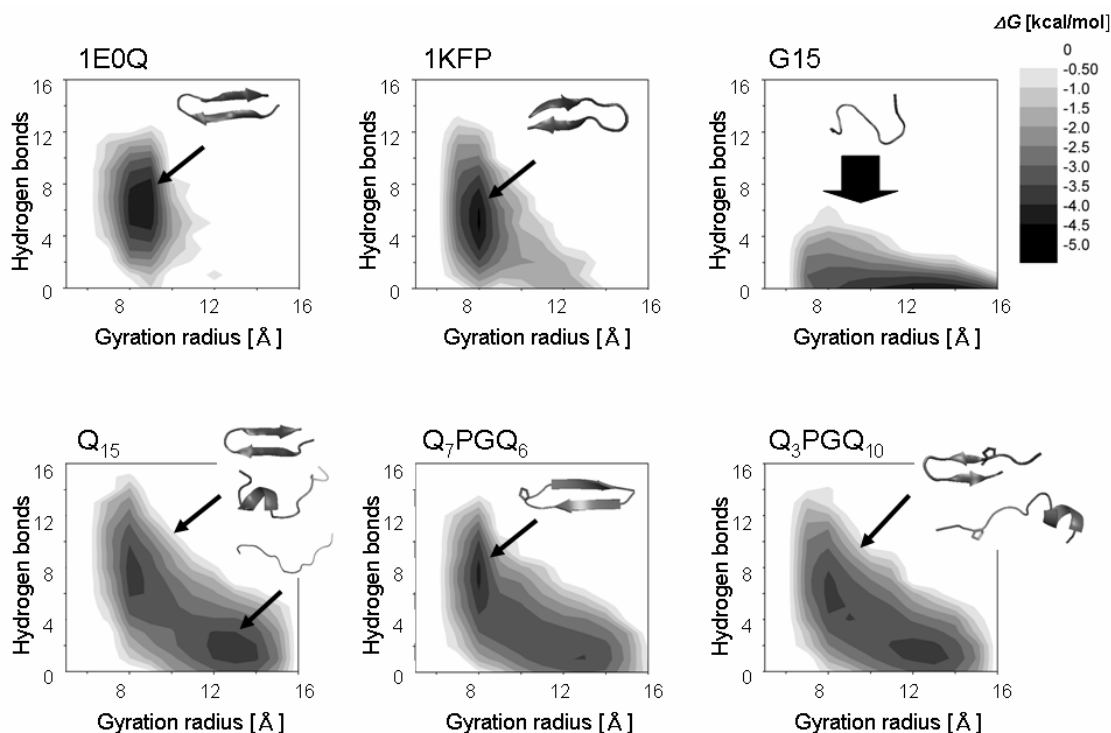


図 4-10(c) 反応座標を慣性半径と水素結合の数を反応座標とした 300 K での自由エネルギー地形。慣性半径と水素結合数を二つの軸とする平面への投影。各図のスナップショットは各ペプチドのくぼ地の代表的な構造。

1E0Q、1KFP の自由エネルギー地形は PDB 登録構造である β ターン構造に相当するくぼ地を一つだけ持つが、 Q_{15} の自由エネルギー地形では、ランダムコイルと α ヘリックス/ β ターンに相当する二つのくぼ地を持つ。ランダムコイルと α ヘリックス/ β ターンの二つのくぼ地間の自由エネルギー差は 0.6–0.7 kcal/mol 程度で、室温での熱エネルギーに相当する。 Q_7PGQ_6 では、 β ターンに相当するくぼ地の深さがランダムコイルのくぼ地より 0.6 kcal/mol 相対的に深くなっている。一方、 Q_3PGQ_{10} ではランダムコイルと α ヘリックス/ β ターンの二つのくぼ地間の自由エネルギー差が 0.2 kcal/mol 程度と小さくなっている。 G_{15} の自由エネルギー地形ではランダムコイルに相当する広い、一つのくぼ地だけが存在する。

さらに我々は、 Q_{15} とその PG ペア置換モデルについて、図 4-9 をもとに主成分得点を反応座標とした自由エネルギー地形の描出も試みた(図 4-11)。慣性半径と水素結合数を反応座標とした自由エネルギー地形では α ヘリックス/ β ターンのくぼ地が縮退していたが、主成分得点を座標とすると Q_{15} ではこの縮退が解け、三つのくぼ地が現れた。異なる構造間の活性障壁は 1–2

kcal/mol と依然小さい。Q₇PGQ₆ では β ターン構造が強調され、Q₃PGQ₁₀ ではランダムコイルとその他の構造の境界が不鮮明になっている。これらのペプチドの自由エネルギー地形の特徴は先に述べた、慣性半径と水素結合数を反応座標とした自由エネルギー地形とよく一致しており、Q₁₅ とその PG ペア置換モデルの特徴をよく反映しているものと考えられる。

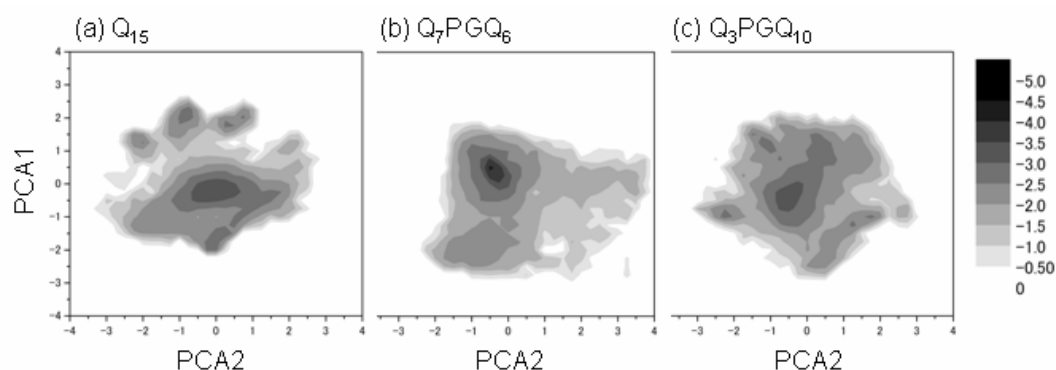


図 4-11. Q₁₅ とその変異体について、第一主成分得点と第二主成分得点を反応座標とした自由エネルギー地形。

(2) 多重分子動力学計算

REMD 計算の結果から描いた自由エネルギー地形の解析により、Q₁₅ は異なる構造に相当するくぼ地を持ち、しかもそのくぼ地間のエネルギー障壁は室温程度であることが判明した。しかし、REMD 計算の軌跡は途切れているため、分子の経時的な変化を追うことができない。そこで我々は、Q₁₅ 単量体、1E0Q 単量体、Q₁₅ β ターン構造の単量体と多量体について、それぞれ初速度を変えた多重分子動力学 (MMD) 計算を行った。

(i) Q₁₅ 単量体

III-(1)-(vi) で見られたように、Q₁₅ では異なる構造間のエネルギー障壁が十分小さいのかどうかを確認するために、Q₁₅ 単量体の MMD を行った。初期構造は REMD 計算で得られたスナップショットよりランダムコイル、 α ヘリックス、 β ターン構造を取り出し、初速度を変えた 10 ns の MD 計算をそれぞれ 100 回行った。表 4-4 にそれぞれの初期構造から始めた MD 計算の 10 ns 後の終構造の分布を示す。

ランダムコイル構造から α ヘリックス/ β ターン構造への変遷割合は 16/100、 α ヘリックス/ β タ

ーン構造からランダムコイル構造への変遷割合は 40/200 でほぼ一致している。この結果は、Q₁₅ は特定の構造を持たないランダムコイル構造と、定まった二次構造を持つ α ヘリックス/ β ターン構造の間を簡単に行き来できることを示している。さらに我々は、 β ターン構造から α ヘリックス構造へ変遷した四つの MD 計算について、その軌跡を調査した。その結果、これらの軌跡はいずれも β ターン構造がいったんランダムコイル構造へほどけた後、 α ヘリックスへと変遷していることが判明した。

これらの結果は自由エネルギー地形で示した Q₁₅ の特徴とよく一致している。すなわち、Q₁₅ は水中でランダムコイル、 α ヘリックス、 β ターンと様々な構造を取り、その構造間の活性化障壁は 300 K 程度で簡単に行き来することができるほど小さいことが確認された。

表 4-4. Q₁₅ 単量体の MMD 計算。10 ns 後の構造分布。

		初期構造		
		ランダムコイル	α ヘリックス	β ターン
初期構造	ランダムコイル	84	8	32
	α ヘリックス	12	92	4
	β ターン	4	0	64

(ii) 1E0Q 単量体

(i) で行った MMD 計算の結果が polyQ ペプチドに特有なものであることを確かめるために、我々は 1E0Q について、伸びきった構造と PDB 登録構造からそれぞれ 20 回の MD 計算を行い、PDB 登録構造に対する RMSD 値を C _{α} 原子について計算した。図 4-12(a) にそれぞれの初期構造から始めた、10 ns の MD 計算後の RMSD 値の分布を、図 4-12(b) に伸びきった構造から始めた MD 計算の RMSD 値の分布の経時変化を示す。

1E0Q の PDB 登録構造は 10 ns の MD 計算の間、極めて安定である一方、伸びきった構造から始めた MD 計算の結果は PDB 登録構造に近づいていくことがわかる。自由エネルギー地形に描かれたとおり、1E0Q は PDB 登録構造に相当するくぼ地を一つだけ持ち、異なる構造間に行き来する Q₁₅ とは対照的であることが確認できた。

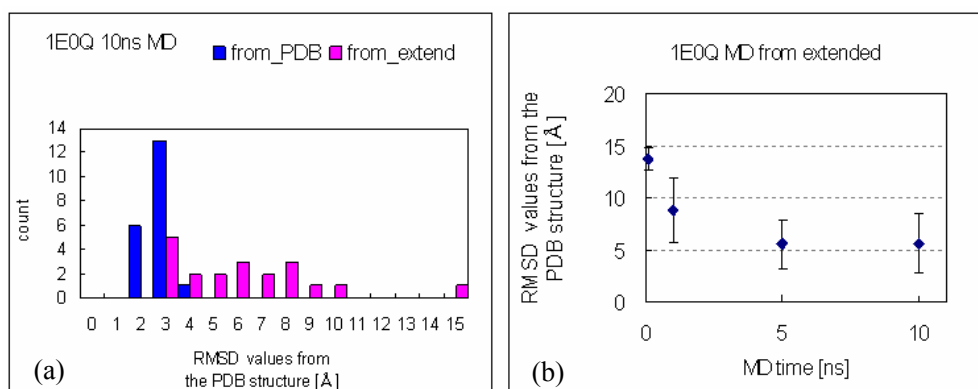


図 4-12. 1E0Q の伸びた構造からと PDB 登録構造を初期構造として、各 20 本の MMD 計算を実施した結果。(a) 10 ns 後の PDB 登録構造に対する RMSD 値の分布。(b) 伸びた構造から始めた MD 計算による、PDB 登録構造に対する RMSD 値の経時変化。RMSD 値はいずれも PDB 登録構造の C_{α} 原子に対して計算。

(iii) Q_{15} β ターン構造の単量体と多量体

さらに我々は多量体を形成した時の Q_{15} の β ターン構造の安定性を調べるために、REMD 計算で得られた β ターン構造を並べることにより、 Q_{15} の β ターン構造の二量体、三量体を作成し、それぞれ 100 回の MMD 計算を行った。これらの初期構造を図 4-13 に示す。

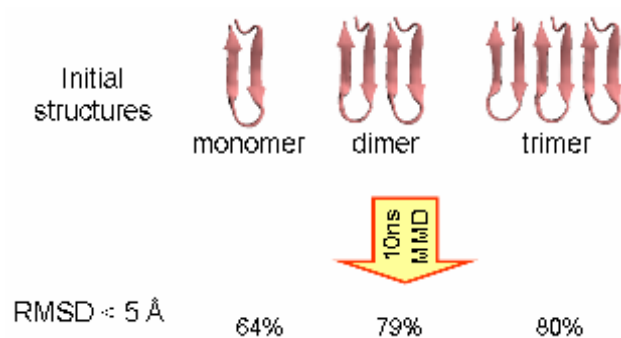


図 4-13. Q_{15} - β ターン構造で構成した、単量体・二量体・三量体の初期構造と、10 ns の MD 計算後、初期構造に対する C_{α} 原子の RMSD 値が 5 Å 以内の MD 計算の割合。それぞれの構造に対して、初速度を変えて 100 回の独立な MD 計算を行った。

MD 計算は二量体、三量体の構成要素に対して拘束をかけずに行ったため、いったん多量体の構成要素が離れると、初期構造に対する RMSD 値が極端に大きくなる。そのため我々は、初期構造に対する C_{α} 原子の RMSD 値が 5 Å 以内のスナップショットの数を計数した。図 4-13 に 10 ns

間の MD 計算後、RMSD 値が 5 Å 以内のスナップショットの割合を示す。明らかに、多量体を形成することにより Q₁₅ の β ターン構造は安定になり、初期構造をよく保っていることがわかる。図 4-14 に、単量体、二量体、三量体について、主鎖間、主鎖・側鎖間、側鎖間の水素結合数の経時変化を示す。多量体を形成することにより、主鎖に関わる水素結合の数が増え、しかも安定になっていることが分かる。さらに我々はそれぞれ 100 回の MD 計算の最終構造について、分子内 (図 4-15(a)) および分子間 (図 4-15(b)) の水素結合の数を計数した。多量体を作ることにより分子内の水素結合が共同的に増えていることが確認できた。

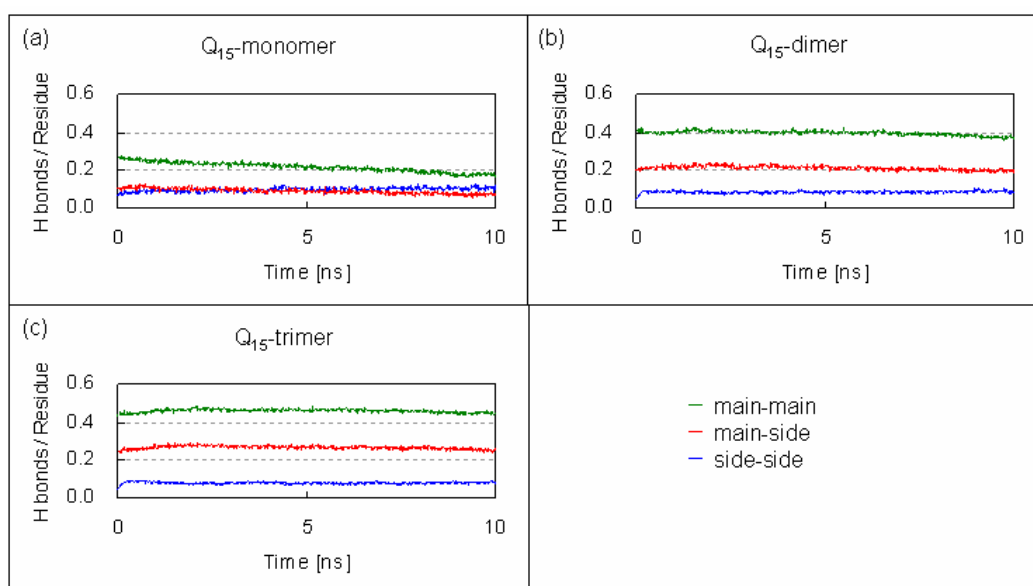


図 4-14. 各ペプチドについて、10 ns 間の MMD 計算で、1 残基当たりの水素結合の平均値の経時変化。(a) 単量体、(b) 二量体、(c) 三量体。緑:主鎖間の水素結合数、赤:主鎖-側鎖間の水素結合数、青:側鎖間の水素結合数

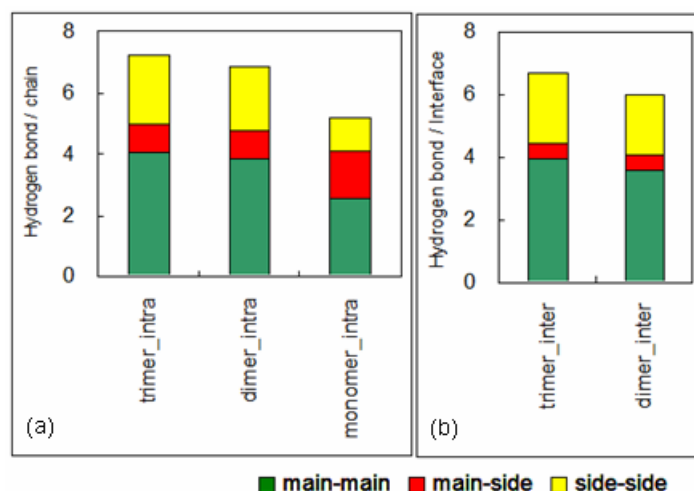


図 4-15. MMD 計算の最終構造について計数した (a) 分子内および (b) 分子間の水素結合数。緑:主鎖間の水素結合数、赤:主鎖-側鎖間の水素結合数、青:側鎖間の水素結合数

3. 考察

RMSD 値の分布から、我々の REMD 計算が 1E0Q、1KFP の PDB 登録構造を再現することが確認できた。我々が行った REMD 計算の条件は 15 残基程度のペプチドの調査には十分である。我々の予想通り、G₁₅はランダムコイル構造しかとらなかった。一方、単量体の Q₁₅は溶媒中でランダムコイル構造を好むが、一定の割合で α ヘリックス/ β ターン構造が出現することが判明した。Q₁₅ のような単調で短いペプチドがこのように定まった二次構造を取ることは驚くべき発見である。Q₁₅の PG ペア置換モデルはさらに、polyQ ペプチドが定まった二次構造をとるのに必要な Q 伸長数を示唆している。Q₁₅の真ん中の QQ ペアを PG ペアに置換した Q₇PGQ₆は β ターン構造の出現割合が増加したことは、polyQ ペプチドはある種のガイドがあれば、 β ターン構造を好むことを示している。一方、Q₁₅の N 末端側の QQ ペアを PG ペアに置換した Q₃PGQ₁₀では、ランダムコイル構造の出現割合が増加した。このことは、たとえ β ターン構造を形成するペア (Q₁₀) が存在しても、Q₃という長さは特定の二次構造を形成するには短すぎることを示している。

水素結合数について図 4-4 の解析より、Q₁₅ は側鎖に関わる水素結合の割合が 1E0Q、1KFP より大きい。このことは、図 4-5 から明らかなように、Q₁₅ では全ての残基が水素結合の形成に関与することができるためである。どの側鎖も水素結合を形成する能力を持つということは、水素結合

形成の相手を特定せず、側鎖間の水素結合を組み替えることにより様々な構造を取る可能性があることを示している。またグルタミンはその高い極性のため、その相互作用エネルギーはペプチドと溶媒間だけでなく、分子内・分子間にも強く働くことが予想される。このことはMM-GB/SAの解析により polyQ ペプチドの水和自由エネルギーへの静電力の寄与が他のペプチドより小さいことから確認された。これはグルタミンが極性残基であるにもかかわらず、polyQ ペプチドは疎水的な性質を持つことを示している。

さらに慣性半径と水素結合数を反応座標とした自由エネルギー地形の特徴は、先に述べた二次構造による分類結果とよく一致している。1E0Q、1KFP は PDB 登録構造である β ターン構造に相当するくぼ地だけを持つのに対し、 Q_{15} の自由エネルギー地形ではランダムコイル、 α ヘリックス、 β ターン構造のくぼ地が現れた。これらのくぼ地間の活性化障壁は小さく、異なる構造間を簡単に行き来することができることを示している。 Q_7PGQ_6 では β ターン構造に相当するくぼ地が強調されて深くなり、一方、 Q_3PGQ_{10} ではランダムコイル構造と定まった二次構造を持つくぼ地間の障壁が浅くなっている。 Q_{15} の PG ペア置換モデルについてのこれらの自由エネルギー地形の特徴は、二次構造による分類結果と同様に解釈できる。

我々はさらに、 Q_{15} とその PG ペア置換モデルについて、第一主成分得点と第二主成分得点を反応座標とした自由エネルギー地形を描いた。 Q_{15} については、慣性半径と水素結合数を反応座標とした自由エネルギー地形では縮退していた α ヘリックス/ β ターン構造のくぼ地を、主成分得点を反応座標とした新しい自由エネルギー地形で分離することができた。しかし、定まった二次構造を持つくぼ地と持たないくぼ地を持ち、くぼ地間の障壁が室温程度であるという特徴はどちらの反応座標でも同じであった。

REMD 計算の軌跡はレプリカの交換によってダイナミクスが途切れているため、分子構造の経時変化を観察することができない。 Q_{15} が本当にこれらのくぼ地間に行き来することが可能であるか確認するために、我々は Q_{15} と 1E0Q の MMD 計算を行い、その結果を比較した。MMD 計算の結果、1E0Q の PDB 登録構造は 10 ns 間の MD 計算の間で安定である一方、伸長した構造から始めた MD 計算では自由エネルギー地形で得られたくぼ地に沿って、PDB 登録構造へと収束することが確認できた。 Q_{15} では対照的に、10 ns という短い MD 計算の間でも、異なる構造間に行き来することが確認できた。REMD 計算により描出した自由エネルギー地形の通り、 Q_{15} では構造間の活性化障壁が小さく、くぼ地の深さもあまりかわらないことが確認できた。

さらに β ターン構造の多量体の MMD 計算の解析から、 Q_{15} は多量体を形成することにより β ターン構造が安定になることが明らかになった。水素結合数の解析から、多量体を形成する際、主

鎖間にできる水素結合が増加し、安定になることによって各分子の β ターン構造がより安定になっていることが確認できた。このことは単量体の Q_{15} が側鎖の組み換えによって多様な構造を取ることができるのと対照的である。

Q_{15} のような、単調で、疎水基を含まないペプチドは特定の二次構造をとりにくいことが知られている。にもかかわらず、我々の REMD の計算では Q_{15} は一定の割合で α ヘリックス構造や β ターン構造を形成した。この polyQ ペプチドの特異性は、多様な水素結合の組み換えと、極性残基であるにもかかわらず疎水的な性質を持つということに起因する。さらに多量体を形成する際には主鎖間の水素結合が β ターン構造をより安定化させる。

15 残基というペプチドの長さは、polyQ 病のメカニズムを解明するには確かに短すぎる。しかし我々は、 Q_{15} の REMD 計算結果の解析により、polyQ ペプチドの水素結合の役割や疎水性を明らかにすることができた。これらの結果は、polyQ ペプチドの Q 伸長数がより伸長した時に起こることを推測する助けになる。短い、単量体の polyQ ペプチドが β ターン構造を形成し、さらに二つの β ターン構造が水中で出会う確率は低いかもしれない。しかし、いったん β ターン構造の多量体が形成されるとその構造は単量体よりずっと安定になり、凝集が加速されるだろう。polyQ ペプチドの Q 伸長数の増加や濃度の上昇が起こった時、 β ターン構造の核が形成され、より凝集が加速されることが期待できる。

V 議論

1. ポリグルタミンペプチドの特異性

(1) ポリグルタミンペプチドにおける水素結合の役割

第 IV 章で示したコンピューターシミュレーションの計算結果から、我々は polyQ ペプチドの水素結合の役割を明らかにした。単量体の polyQ ペプチドは側鎖間の水素結合の多様な組み合わせから多様な二次構造をとることができる。一方、 β シートを含む polyQ ペプチドの多量体は主鎖間の水素結合の増加により、より安定化へと導かれる。

異なる配列をもつアミロイド形成タンパク質がよく似た凝集形態を持つことは、配列に関係のない、主鎖間の水素結合が重要な要素であることを示唆している。主鎖間の水素結合が β シート構造の安定化に重要な役割を果たすことは、いくつかの先行研究でも調べられている。Gordon と Meredith (2003) は、主鎖のアミド結合をエステル結合と置換することによってペプチドの凝集が阻害されることを確認し、主鎖の水素結合はアミロイド線維の集積に重要な役割を果たすことを示した。Liu ら (2006) は、 β シート間の水素結合の形成を妨げることが線維伸長阻害剤に共通の機構であることを、MD 計算と実験により示している。我々の REMD の計算でも polyQ ペプチドは主鎖間の水素結合で β 構造を安定化させており、これはアミロイド共通の性質であるといえる。

また、アミロイドを形成するタンパク質の多くがその配列中にグルタミンとアスパラギンを高い頻度で含んでいることが知られている (Chiti and Dobson, 2006)。このことは、グルタミン (Q) とアスパラギン (N) がともに側鎖にカルボニル基 (C=O) とアミド基 (NH_2) を持つことと関係あるのかもしれない。Cruzeiro (2005) は Q と N の側鎖の C=O 基が励起する amide-I 振動がペプチドの二次構造を不安定なものにしていると提案している。Cruzeiro らの提案は、Q の側鎖が形成する多様な水素結合が、単量体 polyQ ペプチドの構造の多様性を生み出しているという我々の提案と矛盾しない。polyQ ペプチドを含むアミロイド形成タンパク質は側鎖の自由な組み合わせにより多様な構造をとることが可能で、たまたま形成された β シートが、主鎖間の水素結合により強固な凝集体を形成するものと考えられる。

(2) ポリグルタミンペプチドの疎水性

Q₁₅ のような、単調で、疎水基を含まないペプチドは特定の二次構造をとりにくいことが知られている。にもかかわらず、我々の REMD の計算では Q₁₅ は一定の割合で α ヘリックス構造や β ターン構造といった特定の二次構造を形成した。このことは、グルタミンが極性残基であるにもかかわらず polyQ ペプチドは疎水的な性質を持つということに起因するものと思われる。

polyQ ペプチドの疎水性については、Crick ら (2006) が蛍光相関分光法で水と polyQ ペプチドの相互作用の観察を行い、polyQ ペプチドは水となじまず、polyQ ペプチド同士の相互作用により凝集することを示している。また、Vitalis ら (2008) は連続溶媒モデル中の MD 計算で polyQ ペプチドの機械的な性質を鎖長と温度の関数として計算を行い、polyQ ペプチドが自己相互作用を最大にして溶媒との界面を減らすことを示している。さらに Burke ら (2003) は、疎水基と親水基を区別した粗視化 MD 計算を行い、プロリンと比べて polyQ ペプチドの相対的な疎水性が、自己組織化過程の促進において重要な要素を構成すると提案している。MM-GB/SA 計算により polyQ ペプチドの疎水性を示した我々の計算はこれらの先行研究と一致する。

polyQ ペプチドはその疎水的な性質のため自分自身との相互作用を好み、polyQ ペプチド同士が出会うと水との界面を減らそうとして凝集を起こすことが予想される。いったん β シートを主体とした凝集体が形成されると、これらは主鎖間の水素結合により安定化され、容易には分解されないであろう。前章で述べたとおり、単量体の polyQ ペプチドの構造は柔軟で、短い polyQ ペプチドが β シートを形成する確率は高くない。しかし polyQ ペプチドの Q 伸長数が伸びると自分自身の相互作用により β シートを形成する確率が高くなり、それが凝集核となる可能性がある。polyQ ペプチドの凝集には、polyQ ペプチドの疎水性と水素結合形成能の双方が重要な役割を果たしているものと思われる。

(3) ポリグルタミンペプチドと天然変性タンパク質

ここまで我々は、polyQ ペプチドにおける水素結合の役割と疎水性について考察することによって、polyQ ペプチドの特徴を明らかにしてきた。これらは polyQ ペプチドの特徴であると同時に、アミロイド形成タンパク質一般にあてはまる特徴であった。他のアミロイド形成タンパク質にはない polyQ ペプチドの特異性は、polyQ ペプチドの伸長数が人によって異なり、その伸長数によって病気の発症や重症度が決まるという点にある。

polyQ 病の第一段階は、伸長した polyQ ペプチドを含むタンパク質のミスフォールドで始まると考えられている。しかし、健常人でもその伸長数にばらつきがある polyQ ペプチドに「正しい」構造があるということはそもそも考えにくい。

タンパク質は、その一次配列によって決定される立体構造に折りたたまれることによって機能を発揮すると考えられてきた。実際、多くのタンパク質の結晶構造が特定され、その構造データからリガンド、核酸、他のタンパク質との相互作用が研究されている。しかし近年、特定の立体構造をもたずに生体内で作用する天然変性タンパク質 (Intrinsic disordered protein; IDP) の存在が明らかになり、新たな研究対象として注目を集めている。

IDP に共通する特徴は (1) 単純な配列を持ち、疎水基が少ない、(2) 真核生物に多くみられ、原核生物には少ない、(3) 細胞間の信号伝達や遺伝子発現に重要な機能を持つと考えられている、(4) パートナーのタンパク質や分子との相互作用を通して特定の立体構造に折りたたまれる、などである (Dunker et al., 2001)。polyQ ペプチドはまさに (1) 単純な配列を持ち、疎水基を持たず、後で述べるように (2) 高等生物でより長い伸長数を持ち、(3) 細胞間の信号伝達に重要な役割を果たしていると考えられていることから、典型的な IDP であると考えられる。しかし、polyQ ペプチドが IDP であることが生体にどのような意味があるのか、polyQ ペプチド伸長数の多型がもたらす構造の多様性は、はたしてタンパク質の機能にとって必要なのか、必要であるとすればそれは細胞の中でどのように機能するのかという疑問については、今後の研究の課題になる。最近明らかにされてきた、IDP は複数のタンパク質と相互作用するハブタンパク質に多いという知見 (Shimizu and Toh, 2009; Dunker et al., 2005) は、一つの手がかりになるかもしれない。

さらに polyQ ペプチドについては、隣接する側鎖の配列や、他のドメイン領域が polyQ ペプチド領域の構造の安定性に大きな関わりを持っていることを示唆されている (Thakur et al, 2009; Kim et al., 2009)。5 個以上の Q の伸長を含むヒトのタンパク質は 66 個あり、そのうち Q の伸長が病気を引き起こすタンパク質は 9 個である。なぜ、66 個のタンパク質のうち 9 個だけが病気に関わるのかは興味がある問題である。病気を引き起こさない polyQ ペプチド含有タンパク質では、他のドメイン領域の構造が polyQ ペプチドの伸長に対して鈍感であるのかもしれず、もしくは、何らかの圧力が働いて、これらのタンパク質では polyQ ペプチドの伸長が起きにくくなっているのかもしれない。また、病気発症の Q 伸長数の閾値が病気の種類によって異なる (表 1-1) ことは、 β シート形成の起こりやすさが、周囲の残基の影響により微妙に異なるためかもしれない。これらの機構を詳しく調べることは、polyQ 病発症機構の新たな手掛かりになるかもしれない。

2. 長いペプチドのフォールディングシミュレーション

polyQ ペプチドの特徴は、凝集し、アミロイド線維を形成する能力をもつことと、凝集体の形成能が Q の伸長数に依存するということにある。我々は Q₁₅ という短いペプチドのシミュレーションから、単量体 polyQ ペプチドが持つ性質やその多量体系性能について多くの知見を得ることができた。しかし Q の伸長数によって病気発症の有無や重症度が異なるという polyQ 病の発症機構を解明するには、病気発症の閾値を超えた伸長数での研究が欠かせない。

しかしながら、長いペプチドの自由エネルギー地形は複雑で MD 計算による構造緩和には時間がかかる。また、タンパク質が β ターン構造に折れたたまれるには、複雑な経路を乗り越えながら、さらに 10 残基以上離れた遠くの残基と相互作用する必要がある。幅広いエネルギー領域を探索することが可能な REMD 法を用いても、局所的なエネルギー極小にとらわれずにすべての構造を探索することは、何らかの工夫が必要である。

Vitalis ら (2008) は Q を構成する原子間の結合長と角度を固定し、モンテカルロ法により効率的なサンプリングを行うことにより、5–45 残基のレプリカ交換シミュレーションを行い、長い polyQ ペプチドが低温で自発的に結合することを示した。さらに彼ら (Williamson et al., 2010) は Htt と同様、polyQ ペプチドの N 端側に Nt17 領域を配置したシミュレーションを行い、Nt17 領域が polyQ ペプチドの二量体形成を妨げることを示した。Barton ら (2007) はキモトリプシン阻害剤 2 に 35–45 残基の polyQ ペプチドを挿入し、粗視化した力場を用いて MD 計算を行い、伸長した polyQ ペプチドがタンパク質を不安定化させ凝集へと導くことを示した。Lakhani ら (2010) は同様の力場を用い、polyQ ペプチドの長さと β リッチ構造の出現率に正の相関があること、孤立した polyQ ペプチドに比べ exon1 領域を含む polyQ ペプチドは β リッチ構造の形成が抑制されることを示した。Laghaei と Mousseau (2010) もまた、粗視化された力場を用いて 30–40 残基の polyQ ペプチドの REMD 計算を行い、単量体の polyQ ペプチドが α ヘルックスやランダムコイル構造を好むのに対し、二量体では β リッチな構造を好むことを示している。

我々は、本研究で得られた短い polyQ ペプチドの特徴が、病気の閾値を超えた長い polyQ ペプチドにおいてどのような形で表れるかを確認したいと思い、本研究で用いた力場と溶媒セットのもとで、長いペプチドのフォールディングシミュレーションに挑戦した。その際、遠く離れた残基間の相互作用を促すため、連続した 20 残基のペプチドが伸長した構造をとらないように拘束をかけた REMD の計算を試みた。さらに、polyQ ペプチドの配列に、定期的に PG ペアを挿入し凝集の違いを比較した Thakur と Wetzel (2002) の実験の再現を目指して、彼らの実験と同じ配列で

REMD 計算を行った。この計算では、42 残基の polyQ ペプチドを β ターン構造にフォールドさせることはできたものの、PG ペアの挿入間隔による β 構造出現確率の差は見られなかった。polyQ ペプチドの凝集は β シートが積み重なって起こるものと仮定すると、我々の計算は Thakur らの実験を再現できていないことになり、計算の仮定がどこか間違っている可能性がある。

現実的な計算資源の中での、長いペプチドの効率的なフォールディングシミュレーションの実現は、今後の課題の一つである。

3. 種々のホモポリアミノ酸 (Homopolymeric amino acid; HPAA) と Q₁₅ の比較

翻訳領域に病的なホモポリアミノ酸 (Homopolymeric amino acid; HPAA) の異常伸長を原因とするトリプレットリピート病は polyQ 病の他にポリアラニン (polyA) 病がある。polyA 病も polyQ 病と同様、現在までに 9 種類の疾患が特定されている (表 5-1)。

表 5-1. ポリアラニン病の原因遺伝子とポリアラニン領域の伸長数

病名	遺伝子	ポリアラニンの伸長数 (健常; 異常)
眼瞼縮小症候群	FOXL2	14A; 22, 24A
全前脳症 (先天性の脳分化異常)	ZIC2	15A; 25A
先天性中枢性低換気症候群	PHOX2B	20A; 25–33A
精神遅滞・てんかん	ARX	16A; 18, 23A
成長ホルモン不足による精神遅滞	SOX3	15A; 26A
鎖骨頭蓋異形成症	RUNX2	17A; 27A
手足生殖器症候群 (形成不全)	HOXA13	12A; 18A
合指症・多指症	HOXD13	15A; 22–25A, 29A
眼咽頭型筋ジストロフィー	PABPN1	10A; 12–17A

(Albrecht and Mundlos, 2005) を元に作成

Oma ら (2004) は、20 種類の HPAA を黄色蛍光タンパク質に融合して動物細胞で発現させ、HPAA の種類によって凝集を引き起こす長さに差があること、その差は疎水度によるということ、ま

た、凝集体の形成 と細胞毒性には強い関連があることなどを明らかにした。彼らは一連の実験で、polyQ ペプチド、polyA ペプチドはともにリピート領域が長くなるにつれて、これらの疎水性がより強くなる傾向があることを示した。さらに彼らは polyQ 病と polyA 病の閾値の違いは、アラニンがグルタミンより疎水的で、毒性を引き起こすのに十分疎水性になるためにより少しの残基しか必要としないためかもしれないと提案している。Oma ら (2007) はさらに、酵母ツーハイブリッド法によって HPAA 間の相互作用を検証し、HPAA の疎水性が凝集に重要な役割を果たしていることを示している。

疎水的な HPAA は自分自身、あるいは他の疎水的な HPAA と相互作用し、凝集を促進するという彼らの結論は、我々の polyQ ペプチドの疎水性に関する考察とよく一致する。Oma らの調査から、polyQ ペプチド、polyA ペプチドの HPAA は他のアミノ酸の HPAA に比べ細胞毒性が低く、進化の過程で淘汰されずに保存されてきたものと思われる。polyQ 病と polyA 病を比較すると、病気発症の伸長数の閾値は、polyA 病ではアラニンの伸長数が 10–20 程度であるのに対し、polyQ 病では Q の伸長数が 35–45 程度と倍以上長く、100 を超えることも珍しくない。このことは、Q の伸長は HD のような重篤な病気の原因にはなるが、生命の維持にとってその毒性は穏やかであることを意味している。

いくつかの実験結果から、polyA ペプチドは polyQ ペプチドと同様、 β シート構造を示すことが分かっている (Shinchuk et al., 2005; Forood et al., 1995)。また Leitgeb ら (2007) は、Simulated annealing 法を用いて polyA ペプチド、polyQ ペプチドの性質を調査し、どちらのペプチドも様々な二次構造が出現することを示している。病気に関連する二種類の HPAA がともによく似た構造を示すことは、伸長した HPAA の構造が発病機構の重要なカギであることを示唆している。

我々はアラニン (A)、アスパラギン (N)、グルタミン酸 (E) について Q₁₅と同様、15 残基の短い HPAA を作成して REMD 計算を行い、二次構造による分類(図 5-1)、水素結合数のカウント(図 5-2)、自由エネルギー地形(図 5-3)の描出を行った。

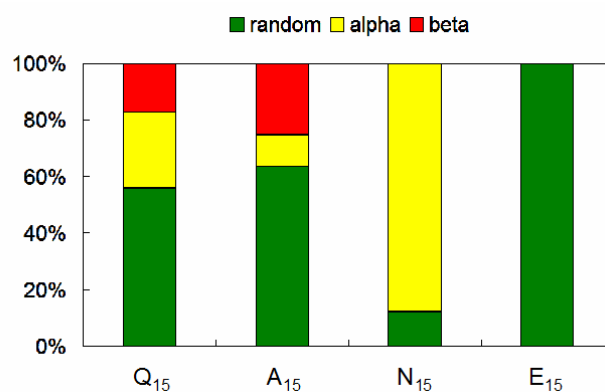


図 5-1. HPAA の REMD 計算から得られたスナップショットの二次構造による分類結果。分類基準は表 4-3 に従う。全てのペプチドについて、300 K、50–300 ns 相当、12500 スナップショットを分類。緑:ランダムコイル、黄色: α ヘリックス、赤: β ターン

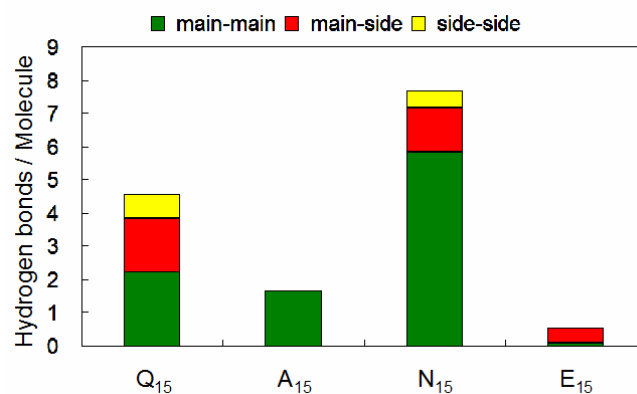


図 5-2. HPAA の REMD 計算結果より、1 分子あたりの水素結合数の平均値。水素結合の定義は図 4-4 と同じ。緑:主鎖間の水素結合、赤:主鎖-側鎖間の水素結合、黄色:側鎖間の水素結合。

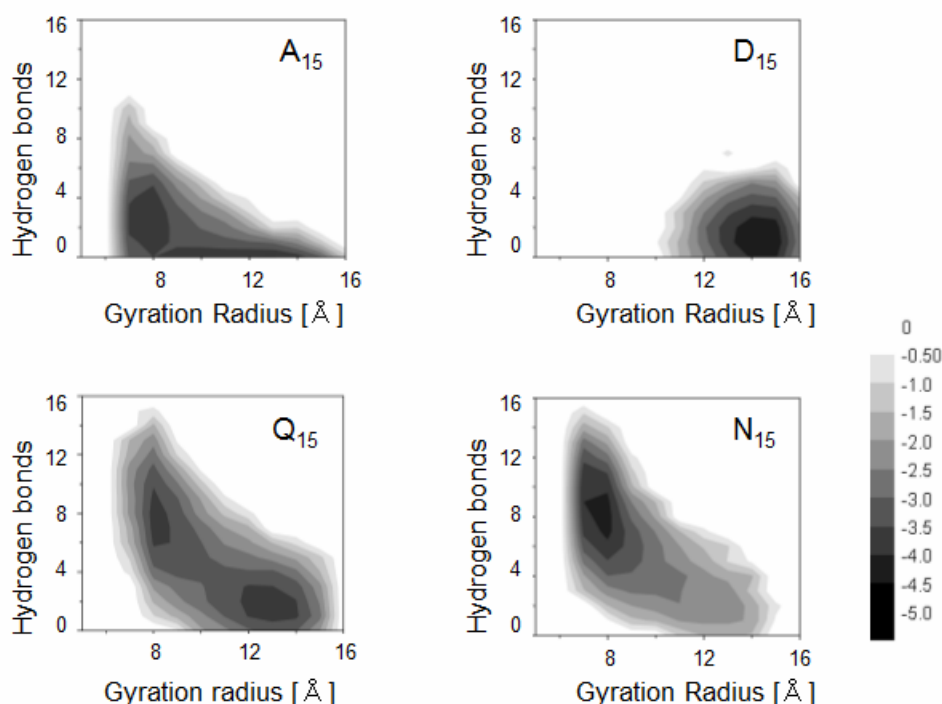


図 5-3. 反応座標を慣性半径と水素結合の数を反応座標とした 300 K での自由エネルギー地形。慣性半径と水素結合数を 2 軸とする平面への投影。

Qと同様に側鎖にC=O基とNH₂基を持つN(アスパラギン)で構成されたN₁₅は約90%が α ヘリックス構造をとり β ターン構造は出現しなかった。N₁₅では、Q₁₅と同様に水素結合の形成に側鎖が多く関わっているが、側鎖の長さの影響で、主鎖間で形成される水素結合の割合が高いためだと考えられる。またN₁₅の自由エネルギー地形がQ₁₅の自由エネルギー地形に似てランダムコイル領域に長い尾を引いているのは、Q₁₅と同様、側鎖が関わる水素結合により構造に柔軟性があるためだと考えられる。また荷電残基で構成されたD₁₅はランダムな構造しかとらず、慣性半径も大きい。これはおそらく分子内では互いの電荷で反発し、また親水性が高いためだと考えられる。A₁₅はQ₁₅と同様に α ヘリックス、 β ターンが出現し、Q₁₅とよく似た自由エネルギー地形が出現した。この結果は上にあげたpolyAペプチドの先行研究と一致する。しかし、AはQと異なり疎水残基で主鎖間では水素結合を形成しない。polyAペプチドがなぜ、polyQペプチドと同様の自由エネルギー地形を描くのか、その合理的な説明については、今後さらなる研究が必要である。

4. ポリグルタミンペプチドの進化的意味

(1) ゲノム中における種々の HPAA の発現頻度

図 5-4 はヒトのタンパク質中の、HPAA の出現頻度をその種類と伸長数別にプロットしたものである。20 以下の伸長数の HPAA を含むタンパク質では、HPAA を構成するアミノ酸は A が圧倒的に多いが、伸長数が伸びるにつれ、Q の割合が増え、全体では Q の HPAA が最も多い。このことは、polyQ ペプチドでは細胞毒性を獲得するまでの伸長数が他の HPAA に比べて大きいことを意味している。また、図 5-4 で示される HPAA の分布はトリプレットリピート病のほとんどを polyA 病、polyQ 病がしめ、病気発症の閾値が A より Q の方が長いという事実と一致する。Oma ら (2004) は前節で紹介した彼らの実験とこのデータを比較し、高い細胞毒性を示した疎水性 HPAA を含むタンパク質の数がゲノム中に少ないことを示した。これは、ホモポリマーとなった時の細胞毒性が、進化の過程において長いホモポリアミノ酸領域として保存されて こなかった理由の一つである可能性を示唆する。

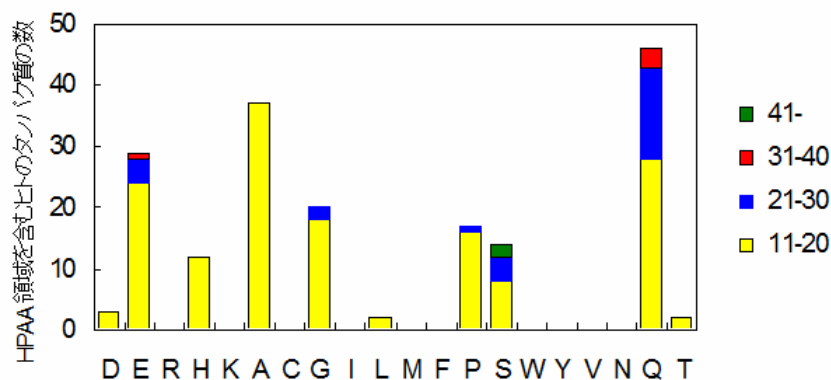


図 5-4. HPAA 領域を含むヒトのタンパク質の数。アミノ酸種類と伸長数によって分類。

(Oma et al., 2004) より作成

Faux ら (2005) は GENPEPT database から 6 以上伸長した HPAA を含むタンパク質の数を検索し、GENPEPT に含まれる全 2677049 遺伝子の 1.4 %に相当する 37355 遺伝子が HPAA を含むことを示した。さらに Faux らは、全ての HPAA において、真核生物は原核生物やウイルスに対し HPAA を含むタンパク質も HPAA の量が 10–100 倍多いことを示した(図 5-5)。一般に真核生物のゲノムサイズが原核生物のゲノムサイズより 10–100 倍大きいことを考えると、真核生物に HPAA が

多いことは当然ともいえる。興味深いことに、原核生物やウイルスではセリンやグリシンの HPAA が相対的に多いのに対し、真核生物ではグルタミンの HPAA が最も多い。

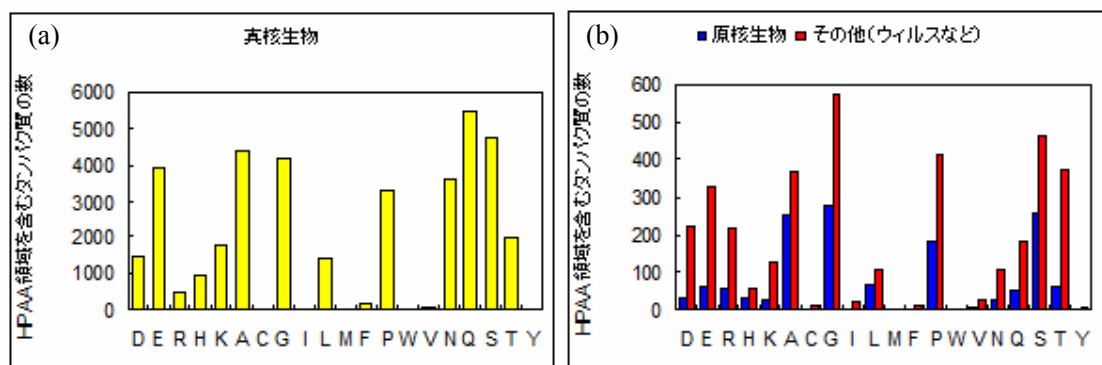


図 5-5. GENEPEPT database から 6 以上伸長した HPAA を含むタンパク質の数

(a) 真核生物、(b) 原核生物とその他(ウイルス)など。(Faux et al., 2005) より作成

Q 以外にも多数の HPAA が存在することは、トリプレットリピートを作る機構が polyQ ペプチド特有のものではないことを示す。一般にゲノムにおける大多数の変異は有益ではなく、有害である。ただし、3 塩基(トリプレット)の反復はフレームシフトを起こさず、意味のないタンパク質のコードを遺伝子に追加するだけで、生命にとって致死的な変異を起こす確率は 1 塩基変異より小さいかもしれない。Oma ら (2004) の実験で明らかのように、伸長しすぎた HPAA は細胞毒を持つが、polyQ ペプチドは他の HPAA に比べ、細胞毒を持つまでの伸長数が多い。進化の過程で polyQ ペプチドが生き残ってきた一つの理由は、細胞毒を持つまでの閾値が高く、少々の反復は、生命にとって致死的でなかったからかもしれない。

(2) 脳の進化とポリグルタミンペプチド

グルタミンとグルタミン酸は脳細胞中に高い濃度で存在し、グルタミン酸は興奮性神経伝達物質として学習に重要な役割を果たすことが知られている (Antzoulatos and Byrne, 2004)。脳内で、グルタミンとグルタミン酸は正常細胞とニューロンの間で循環し、グルタミン貯蔵庫はグルタミン酸の一次供給源となることができる (Hertz et al., 1999; Cooper, 2001; Yudkoff et al., 2005)。いくつかの種における研究から、polyQ ペプチド領域の長さは脳の高次機能の進化とよく相関していることが明らかにされている(表 5-2)。

表 5-2. Htt 相同体の polyQ ペプチド領域におけるグルタミン伸長数

生物種	Q 伸長数
Drosophila	0
Zebrafish, fugu	4
mouse, rat	7–8
nonhuman apes	9–16
mini-pig	17–18
human	20–30

(Brusilow, 2006) より作成

グルタミン酸にもっとも簡単に変換することができるアミノ酸はグルタミン (Q) とプロリン (P) で、この二つのアミノ酸は Htt の N 端領域で最も多く存在する。polyQ ペプチド/polyP ペプチド領域を含むタンパク質は、グルタミン酸の安定した貯蔵庫を形成するために進化過程で伸長してきたのかもしれない。Nithianantharajah と Hannan (2007) は polyQ ペプチドのような単調な遺伝コードのリピートは、脳の発達調整において特別な役割を果たしており、進化の途上において種の多様性を生み出すために機能しているかもしれないと提案している。このことは、真核生物では圧倒的にグルタミンの HPAA が多いことと矛盾しない。

polyQ 病は単一遺伝子が原因で起こる典型的な常染色体優性遺伝である。このような遺伝子異常は一見、自然選択によって淘汰されそうな気がする。しかし、polyQ 病はほとんどが中年期以降、すなわち子孫を残した後に発病するため、進化の淘汰圧を逃れてきたと考えられる。進化における Q の伸長にはおそらく、消極的な意味と積極的な意味の双方があると考えられる。Q の伸長は他の HPAA と比較して細胞毒性が低く、発症年齢や病気の進行が遅かったため淘汰の圧力が働かなかったと同時に、高等動物では脳の進化のためにむしろ積極的に polyQ ペプチドを利用してきたのかもしれない。また、正常なヒトの遺伝子でも、その伸長数には幅がある(表 1-1 参照)ことは、生命が Q の伸長数の長短に余裕があることを示唆している。Q 伸長数のばらつきは進化の過程の試行錯誤を残しているのかもしれない、あるいはその帰結として polyQ ペプチドが IDP であることが、タンパク質の機能にとって重要な役割を果たしているのかもしれない。

VI 結論

ヒトのゲノムに含まれる HPAA の中で、polyQ ペプチドは他のアミノ酸に比べて圧倒的に頻度が高く、その半数が個人によって繰り返し長が異なる (Oma et al., 2004; Miller et al., 2009)。この事実は進化の過程で、polyQ ペプチドの伸長と多型が致命的でないだけでなく、むしろ有利に働く要素があったことを示している。しかし、polyQ ペプチドの伸長はどこまでも許されるわけではない。35–40 残基以上伸長した polyQ ペプチドは神経変性を引き起こす毒性タンパク質となる。進化の圧力は polyQ ペプチドの伸長数に対して微妙なバランスを要求してきた。

polyQ ペプチドの伸長から発病までのメカニズムは複雑で不明なことが多いが、伸長した polyQ ペプチドの構造が polyQ 病の重要な要因であることは間違いない。本研究では、幅広いエネルギー空間を探索できるシミュレーション手法の一つであるレプリカ分子動力学 (REMD) 法を用いて、短い polyQ ペプチド (Q_{15}) の水中での構造アンサンブルの解析を行った。計算の結果、我々は polyQ ペプチドの構造アンサンブルと自由エネルギー地形の特徴について、polyQ ペプチドに特有な水素結合の役割と疎水性から合理的な説明を与えることができた。本研究は polyQ ペプチドの自由エネルギー地形を探索し、他のペプチドとの比較により polyQ ペプチドの特異性を計算機シミュレーションによって解析した初めての研究である。

Q は側鎖にアミド基とカルボニル基を持ち反応性が高く、polyQ ペプチドは全ての主鎖／側鎖を通して多様な水素結合を形成することができる。単調な配列と多様な水素結合の組み合わせは、多様な構造アンサンブルを生み出し、polyQ ペプチドが特定の構造を持たない、天然変性タンパク質であることを期待させる。我々の REMD 計算の結果、確かに polyQ ペプチドは水中でランダムな構造を好むことが確認されたが、本論で述べたとおり、一定の確率で α ヘリックス、 β ターンなどの定まった二次構造をとることが判明した。15 残基という短い、しかも単調な配列を持つペプチドが、特定の二次構造に相当する準安定状態を持つという事実は大変意外で興味深い。この polyQ ペプチドの特異な性質は Q の持つ強い極性が分子内に働くことにより得られる polyQ ペプチドのある種、疎水的な性質によるものと考えられる。

polyQ ペプチドは多くのアミロイド形成タンパク質と共通の性質を持つ。polyQ ペプチドを含むアミロイド形成タンパク質は側鎖の自由な組み換えによって多様な構造をとり、自由エネルギー地形上に複数の準安定状態を持つ。この多様な構造の中から β シートを主体とした反応性の高い構造が形成され、タンパク質の持つ疎水性相互作用によって凝集体を形成する。いったん形成された β シートを主体とする凝集体は主鎖間の水素結合により安定化する。

しかし、一般のアミロイド形成タンパク質は特定の長さで配列を持ち、一種類のアミノ酸だけが 5 個以上連続していることは少ない。polyQ ペプチドの特異性は Q だけが単調に続き、その伸長数によって毒性が異なる点にあるが、その物理化学的な特徴はアミノ酸 Q としての特異性と、Q が連続した配列を持つことに起因するものと思われる。また、健康人の間でも Q の伸長数は多型をもち、特定の構造を持たない天然変性タンパク質であることは、polyQ ペプチドの機能に何か重要な役割を持つのかかもしれない。

本研究で扱った 15 残基という長さは、polyQ 病発症の臨界長 (30–40 残基) に比べて短く、病気に関わる polyQ ペプチドの性質を調べるには不十分である。しかしながら、この短いペプチドの解析により、我々は、水素結合の役割や polyQ ペプチドの疎水性、構造アンサンブルなど、polyQ ペプチドの特徴について、重要な知見を得ることができた。また、 β ターン構造の多量体の MMD 計算より、polyQ ペプチドは、いったん形成した β ターンが多量体を形成するとより安定であることが確かめられた。これらの結果は我々に、Q の伸長数が長くなったときに何が起こるか考えるヒントを与えてくれる。短い単量体の polyQ ペプチドが β ターン構造を形成し、その β ターン構造同士が出会って多量体を形成することは極めてまれかもしれない。しかしながら、いったん β ターン構造の多量体が形成されると、その構造はとても安定で、凝集が加速されることが期待できる。さらに Q の伸長数が多い時、あるいはペプチドの濃度が高い時は、凝集レートが加速されることが期待できる。

長い残基数を含むタンパク質のフォールディングシミュレーションは、原子数の増加による計算時間の増加の上に、自由エネルギー地形が複雑になり、系が平衡状態に達するまでにも時間がかかることから、現在のコンピューターの性能をもっても簡単ではない。しかし、コンピューターの性能や計算手法は日々進化しており、スーパーコンピューターの建設も世界各地で予定されており、いずれ現実的な時間とシステムサイズの計算が可能になるだろう。さらに、polyQ ペプチドを含む病因タンパク質と直接相互作用する特定のタンパク質との複合構造がわかれば、MD 計算や量子化学計算により、その相互作用をより詳しく解析することができ、薬剤設計の提案が可能になる。これら polyQ ペプチドについての研究は、他のアミロイド病にもひろく応用することが期待できる。

原因遺伝子の特定により、HD を含む polyQ 病の遺伝子診断が可能になった。しかし、この重篤な病気については、その予防法も有効な治療法も未だ確立されていない。遺伝疾患財団を設立し、HD の病因解明に大きな貢献をした心理学者 Nancy Wexler 博士は、この予言と予防の間のギャップを“painful hiatus (悲痛な隙間)”と表現した (US SANTA CRUZ Press Release April 24,

1995 (408/459-2495))。我々研究者の仕事はこの隙間を少しでも埋めることである。polyQ ペプチドの構造や polyQ 病の発症メカニズムについては、最近 10 年間で分子レベルでの研究が飛躍的に進歩した。これらの知見はコンピューターシミュレーションを行う際により現実的な仮定を与え、より信頼できる結果を得ることを可能にする。医学・実験・計算の各分野の専門家が協力し、次の 10 年にはきっと、有効な治療法が確立されているものと期待したい。

謝辞

本研究の数値計算の一部は大阪大学サイバーメディアセンターおよびカナダのシャークネットを用いて行いました。

本研究を進めるにあたり、学内外の多くの方々にご指導、ご協力いただきました。私を励まし、応援してくださった全ての方々に心から感謝いたします。特に、再チャレンジの機会を与えてくださいました、神戸大学大学院人間発達環境学研究科の皆様心から感謝申し上げます。

とりわけ、熱心にご指導いただき、多くの貴重な助言をいただきました神戸大学大学院システム情報学研究科の田中成典教授、同じく神戸大学大学院人間発達環境学研究科の蛭名邦禎教授に深く感謝いたします。また、共同研究者として多くのご指導、ご協力をいただいた、ドイツ Research Center of Karlsruhe の E.B. Starikov 博士、カナダ Brock University の Stuart M. Rothstein 教授に深く感謝いたします。また、有意義な助言と議論を頂いた、カナダ Brock University の Bryan M.B. Van Schouwen 氏、田中研究室の博士研究員として研究を助けていただきました渡邊博文博士(現・OpenEye Japan)、栗崎以久男博士(現・立命館大学)に深く感謝します。さらに、ともに研究に励み、有益な議論をして頂いた田中研究室、蛭名研究室の皆様に深く感謝いたします。また、研究を側面からサポートしてくださいました、田中研究室秘書の牛尾律子さんに深く感謝いたします。

最後に、私の研究生生活を暖かく応援し、支えてくれた夫と二人の子供たちに心から感謝いたします。

付録

1. エネルギー最小化

本研究では全ての MD 計算を始める前に、絶対温度 0K の状態で、構成原子群がもつ真空中のポテンシャルエネルギーだけを考慮して、各ペプチドの伸長した構造に対して分子力学 (Molecular Mechanics: MM) 法の適用の範囲でエネルギー最小化を行った(式 A-1)。

$$\left[\frac{\partial U(\mathbf{R}^n)}{\partial \mathbf{R}^n} \right]_{\mathbf{R}^n = \mathbf{R}_{\min}^n} = 0 \quad (\text{式 A-1})$$

$\mathbf{R}^n (= \mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \dots, \mathbf{R}_n)$ は構成原子群の位置座標、 $U(\mathbf{R}^n)$ は孤立分子系のポテンシャルエネルギー、 $\mathbf{R}_{\min}^n$ は再安定構造の位置座標を表す。エネルギー最小化は 500 step の最急降下法(下記(1))の後、1000 step の共役勾配法(下記(2))により行った。

(1) 最急降下法 (Steepest Descent Method)

任意の分子構造 $\mathbf{R}^n$ に対して、その構造が対応するポテンシャルエネルギー曲面上の点で最大傾斜の方向を持つ力 $\mathbf{F}^n$ を探し、その力に沿って分子構造変形の向きを決めて分子のエネルギーを最小化していく手続きを繰り返す。直感的でプログラミングも簡単な手法だが、収束半径が小さく、局所的極小にとらわれやすい。

(2) 共役勾配法(Conjugate Gradient Method)

ポテンシャルエネルギー関数 U のヘシアンの共役ベクトルを用いてエネルギー極小を探索する方法。一つ前のステップの探索方向と、勾配の変化が直角になる方向に向かって、新しい極小を探索するため、効率がよい。ただし、最急降下法に比べ、多くのメモリと計算時間を必要とする。

2. SHAKE 法

水素原子は質量が小さいため、水素原子を含む分子振動は他の結合に比べて周期が短くなる。例えば水の OH 振動の振動数は約 3800 cm^{-1} で、これは 10 fs (10^{-15} 秒) の周期に相当する。この短い周期の振動に対して、粗い時間刻み (2 fs 程度) の数値積分を行った場合、振動を正しく積分できず、系のエネルギーも保存されない。そのため、水素原子を含む、時間スケールの短い分子運動を拘束し、原子間距離を平均結合長で固定する方法の一つが SHAKE 法である。

SHAKE 法を用いれば、MD 計算の時間刻みを 2 fs 程度まで長く設定することができる。時間刻みを短く取れば、SHAKE 法を用いなくても正確な計算が期待できるが、当然 MD 計算にかかる時間は長くなる。

参考文献

- Albrecht, A., Mundlos, S., 2005. The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 285.
- Alder, B.J., Wainwright, T.E., 1957. Phase transition for a hard sphere system. *J. Chem. Phys.* **27**, 1208.
- Anfinsen, C.B., 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223.
- Antzoulatos, E.G., Byrne, J.H., 2004. Learning insights transmitted by glutamate. *Trends. Neurosci.* **27**, 555.
- Barton, S., Jacak, R., Khare, S.D., Ding, F., Dokholyan, N.V., 2007. The Length Dependence of the PolyQ-mediated Protein Aggregation. *J. Biol. Chem.* **282**, 25487.
- Brusilow, W.S., 2006. Is Huntington's a glutamine storage disease? *Neuroscientist* **12**, 300.
- Burke, M.G., Woscholski, R., Yaliraki, S.N., 2003. Differential hydrophobicity drives self-assembly in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13928.
- Case, D.A., Cheatham, T.E. 3rd., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K.M. Jr., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R.J., 2005. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668.
- Chen, S., Ferrone, F.A., Wetzel, R., 2002a. Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11884.
- Chen, S., Berthelie, V., Hamilton, J.B., O'Nuallain, B., Wetzel, R., 2002b. Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry* **41**, 7391.

Chiti, F., Dobson, C.M., 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333.

Cooper, J.K., Schilling, G., Peters, M.F., Herring, W.J., Sharp, A.H., Kaminsky, Z., Masone, J., Khan, F.A., Delanoy, M., Borchelt, D.R., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A., 1998. Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 783.

Cooper, A.J., 2001. Role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism and ammonia neurotoxicity. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **7**, 280.

Crick, S.L., Jayaraman, M., Frieden, C., Wetzel, R., Pappu, R.V., 2006. Fluorescence correlation spectroscopy shows that monomeric polyglutamine molecules form collapsed structures in aqueous solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 16764.

Cruzerio, L., 2005. Why are proteins with glutamine- and asparagine-rich regions associated misfolding diseases? *J. Phys. Condens. Matter.* **17**, 7833.

de Cristofaro, T., Affaitati, A., Cariello, L., Avvedimento, E.V., Varrone, S., 1999. The length of polyglutamine tract, its level of expression, the rate of degradation, and the transglutaminase activity influence the formation of intracellular aggregates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 150.

Dobson, C.M., 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884.

Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., Ausio, J., Nissen, M.S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C.R., Bailey, R.W., Griswold, M.D., Chiu, W., Garner, E.C., Obradovic, Z., 2001. Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.* **19**, 26.

Dunker, A.K., Cortese, M.S., Romero, P., Iakoucheva, L.M., Uversky, V.N., 2005. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS. J.* **272**, 5129.

Elliot, J., Starikov, E.B., Crawshaw, J., Claiden, P., Nilsson, L., Windle, A., 2006. Nucleation of polyglutamine amyloid fibres modelling using molecular dynamics. in "*Modern Methods for Theoretical Physical Chemistry of Biopolymers*" edited by Starikov, E.B., Lewis, J.P., Tanaka, S., (Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands) Chap11, p211.

Fändrich, M., Dobson, C.M., 2002. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO. J.* **21**, 5682.

Faux, N.G., Bottomley, S.P., Lesk, A.M., Irving, J.A., Morrison, J.R., de la Banda, M.G., Whisstock, J.C., 2005. Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins. *Genome. Res.* **15**, 537.

Ferreira, S.T., Vieira, M.N., De Felice, F.G., 2007. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life* **59**, 332.

Forood, B., Pérez-Payá, E., Houghten, R.A., Blondelle, S.E., 1995. Formation of an extremely stable polyalanine beta-sheet macromolecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 7.

Gordon, D.J., Meredith, S.C., 2003. Probing the role of backbone hydrogen bonding in beta-amyloid fibrils with inhibitor peptides containing ester bonds at alternate positions. *Biochemistry* **42**, 475.

Gordon, H.L., Rothstein, S.M., 2006. Protein structure generation and elucidation: applications of automated histogram filtering cluster analysis. in "*Modern Methods for Theoretical Physical Chemistry of Biopolymers*" edited by Starikov, E.B., Lewis, J.P., Tanaka, S., (Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands) Chap15, 325.

- Hands, S., Sinadinos, C., Wytenbach, A., 2008. Polyglutamine gene function and dysfunction in the ageing brain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1779**, 507.
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., Robinson, S.R., 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* **57**, 417.
- Hollenbach, B., Scherzinger, E., Schweiger, K., Lurz, R., Lehrach, H., Wanker, E.E., 1999. Aggregation of truncated GST-HD exon 1 fusion proteins containing normal range and expanded glutamine repeats. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**, 991.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33.
- Kabsch, W., Sander, C., 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577.
- Kaufman, R.J., Scheuner, D., Schröder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y., Arnold, S.M., 2002. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 411.
- Kelly, J.W., 1996. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 11.
- Khare, S.D., Ding, F., Gwanmesia, K.N., Dokholyan, N.V., 2005. Molecular origin of polyglutamine aggregation in neurodegenerative diseases. *PLoS. Comput. Biol.* **1**, 230.
- Kim, M.W., Chelliah, Y., Kim, S.W., Otwinowski, Z., Bezprozvanny, I., 2009. Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region. *Structure* **17**, 1205.
- Kollman, P.A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y.,

Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D.A., Cheatham, T.E. 3rd., 2000. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* **33**, 889.

Laghaei, R., Mousseau, N., 2010. Spontaneous formation of polyglutamine nanotubes with molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **132**, 165102.

Lakhani, V.V., Ding, F., Dokholyan, N.V., 2010. Polyglutamine induced misfolding of huntingtin exon1 is modulated by the flanking sequences. *PLoS. Comput. Biol.* **6**, e1000772.

Larrass, S.A., Pegram, L.M., Gordon, H.L., Rothstein, S.M., 2003. Efficient generation of low-energy folded states of a model protein. II. Automated histogram filtering. *J. Chem. Phys.* **119**, 13149.

Legleiter, J., Lotz, G.P., Miller, J., Ko, J., Ng, C., Williams, G.L., Finkbeiner, S., Patterson, P.H., Muchowski, P.J., 2009. Monoclonal antibodies recognize distinct conformational epitopes formed by polyglutamine in a mutant huntingtin fragment. *J. Biol. Chem.* **284**, 21647.

Leitgeb, B., Kerényi, A., Bogár, F., Paragi, G., Penke, B., Rákhely, G., 2007. Studying the structural properties of polyalanine and polyglutamine peptides. *J. Mol. Model.* **13**, 1141.

Li, M., Chen, L., Lee, D.H., Yu, L.C., Zhang, Y., 2007. The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **83**, 131.

Liu, D., Xu, Y., Feng, Y., Liu, H., Shen, X., Chen, K., Ma, J., Jiang, H., 2006. Inhibitor discovery targeting the intermediate structure of beta-amyloid peptide on the conformational transition pathway: implications in the aggregation mechanism of beta-amyloid peptide. *Biochemistry* **45**, 10963.

Masino, L., Kelly, G., Leonard, K., Trottier, Y., Pastore, A., 2002. Solution structure of

polyglutamine tracts in GST-polyglutamine fusion proteins. *FEBS. Lett.* **513**, 267.

McCammon, J.A., Gelin, B.R., Karplus, M., 1977. Dynamics of folded proteins. *Nature* **267**, 585.

Merlino, A., Esposito, L., Vitagliano, L., 2006. Polyglutamine repeats and beta-helix structure: molecular dynamics study. *Proteins* **63**, 918.

Miller, J., Rutenber, E., Muchowski, P.J., 2009. Polyglutamine dances the conformational cha-cha-cha. *Structure* **17**, 1151.

Nagai, Y., Fujikake, N., Ohno, K., Higashiyama, H., Popiel, H.A., Rahadian, J., Yamaguchi, M., Strittmatter, W.J., Burke, J.R., Toda, T., 2003. Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1253.

Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H.A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H., Toda, T., 2007. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 332.

Nagai, Y., Popiel, H.A., 2008. Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: exposed beta-sheet hypothesis. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 3267.

Nakano, M., Watanabe, H., Starikov, E.B., Rothstein, S.M., Tanaka, S., 2009. Mutation effects on structural stability of polyglutamine peptides by molecular dynamics simulation. *Interdiscip. Sci. Comput. Life. Sci.* **1**, 21.

Nakano, M., Watanabe, H., Rothstein, S.M., Tanaka, S., 2010. Comparative characterization of short monomeric polyglutamine peptides by replica exchange molecular dynamics simulation. *J. Phys. Chem. B* **114**, 7056.

Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.Ø., Riekel, C., Grothe, R., Eisenberg, D., 2005. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773.

Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2007. Dynamic mutations as digital genetic modulators of brain development, function and dysfunction. *Bioessays* **29**, 525.

Ogawa, H., Nakano, M., Watanabe, H., Starikov, E.B., Rothstein, S.M., Tanaka, S., 2008. Molecular dynamics simulation study on the structural stabilities of polyglutamine peptides. *Comput. Biol. Chem.* **32**, 102.

Okamoto, Y., 2004. Generalized-ensemble algorithms: enhanced sampling techniques for Monte Carlo and molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.* **22**, 425.

Oma, Y., Kino, Y., Sasagawa, N., Ishiura, S., 2004. Intracellular localization of homopolymeric amino acid-containing proteins expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 21217.

Oma, Y., Kino, Y., Toriumi, K., Sasagawa, N., Ishiura, S., 2007. Interactions between homopolymeric amino acids (HPAAs). *Protein. Sci.* **16**, 2195.

Onufriev, A., Bashford, D., Case, D.A., 2004. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins* **55**, 383.

Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10962.

Pastor, R.W., Brooks, B.R., Szabo, A., 1988. An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms. *Mol. Phys.* **65**, 1409.

Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M., Finch, J.T., 1994. Glutamine repeats as polar zippers: their

- possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5355.
- Perutz, M.F., Finch, J.T., Berriman, J., Lesk, A., 2002. Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 5591.
- Poirier, M.A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M., Ross, C.A., 2002. Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J. Biol. Chem.* **277**, 41032.
- Poirier, M.A., Jiang, H., Ross, C.A., 2005. A structure-based analysis of huntingtin mutant polyglutamine aggregation and toxicity: evidence for a compact beta-sheet structure. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 765.
- Prusiner, S.B., 1989. Scrapie prions. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 345.
- Prusiner, S.B., 1991. Molecular biology of prions causing infectious and genetic encephalopathies of humans as well as scrapie of sheep and BSE of cattle. *Dev. Biol. Stand.* **75**, 55.
- Ross, C.A., Poirier, M.A., 2005. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 891.
- Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J.J., Chotai, K., Connarty, M., Crauford, D., Curtis, A., Curtis, D., Davidson, M.J., Differ, A.M., Dode, C., Dodge, A., Frontali, M., Ranen, N.G., Stine, O.C., Sherr, M., Abbott, M.H., Franz, M.L., Graham, C.A., Harper, P.S., Hedreen, J.C., Jackson, A., Kaplan, J.C., Losekoot, M., MacMillan, J.C., Morrison, P., Trottier, Y., Novelletto, A., Simpson, S.A., Theilmann, J., Whittaker, J.L., Folstein, S.E., Ross, C.A., Hayden, M.R., 1996. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 16.
- Ryckaert, J.P., Ciccotti, G., Berendsen, H.J.C., 1977. Numerical integration of the cartesian

- equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327.
- Saunders, H.M., Bottomley, S.P., 2009. Multi-domain misfolding: understanding the aggregation pathway of polyglutamine proteins. *Protein. Eng. Des. Sel.* **22**, 447.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., Wanker, E.E., 1997. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* **90**, 549.
- Schneider, T., Stoll, E., 1978. Molecular-dynamics study of a three-dimensional one-component model for distortive phase transitions. *Phys. Rev. B* **17**, 1302.
- Scholefield, J., Wood, M.J., 2010. Therapeutic gene silencing strategies for polyglutamine disorders. *Trends. Genet.* **26**, 29.
- Shell, M.S., Ritterson, R., Dill, K.A., 2008. A test on peptide stability of AMBER force fields with implicit solvation. *J. Phys. Chem. B* **112**, 6878.
- Shimizu, K., Toh, H., 2009. Interaction between intrinsically disordered proteins frequently occurs in a human protein-protein interaction network. *J. Mol. Biol.* **392**, 1253.
- Shinchuk, L.M., Sharma, D., Blondelle, S.E., Reixach, N., Inouye, H., Kirschner, D.A., 2005. Poly-(L-alanine) expansions form core beta-sheets that nucleate amyloid assembly. *Proteins* **61**, 579.
- Sikorski, P., Atkins, E., 2005. New model for crystalline polyglutamine assemblies and their connection with amyloid fibrils. *Biomacromolecules* **6**, 425.
- Stork, M., Giese, A., Kretschmar, H.A., Tavan, P., 2005. Molecular dynamics simulations indicate

a possible role of parallel beta-helices in seeded aggregation of poly-Gln. *Biophys. J.* **88**, 2442.

Sugita, Y., Okamoto, Y., 1999. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem. Phys. Lett.* **314**, 141.

Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B., Blake, C.C., 1997. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **273**, 729.

Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M., Onodera, O., 2008. Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 345.

Tanaka, M., Morishima, I., Akagi, T., Hashikawa, T., Nukina, N., 2001. Intra- and intermolecular beta-pleated sheet formation in glutamine-repeat inserted myoglobin as a model for polyglutamine diseases. *J. Biol. Chem.* **276**, 45470.

Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Hashikawa, T., Fujisawa, T., Nukina, N., 2003. Expansion of polyglutamine induces the formation of quasi-aggregate in the early stage of protein fibrillization. *J. Biol. Chem.* **278**, 34717.

Tanaka, M., Machida, Y., Nukina, N., 2005. A novel therapeutic strategy for polyglutamine diseases by stabilizing aggregation-prone proteins with small molecules. *J. Mol. Med.* **83**, 343.

Thakur, A.K., Wetzel, R., 2002. Mutational analysis of the structural organization of polyglutamine aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 17014.

Thakur, A.K., Jayaraman, M., Mishra, R., Thakur, M., Chellgren, V.M., Byeon, I.J., Anjum, D.H., Kodali, R., Creamer, T.P., Conway, J.F., Gronenborn, A.M., Wetzel, R., 2009. Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nat.*

Struct. Mol. Biol. **16**, 380.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971.

Van Schouwen, B.M.B., Nakano, M., Watanabe, H., Tanaka, S., Gordon, H.L., Rothstein, S.M., 2010. Molecular mechanics and all-electron fragment molecular orbital calculations on mutated polyglutamine peptides. *J. Mol. Struct.* **944**, 12.

Vitalis, A., Wang, X., Pappu, R.V., 2008. Atomistic simulations of the effects of polyglutamine chain length and solvent quality on conformational equilibria and spontaneous homodimerization. *J. Mol. Biol.* **384**, 279.

Walters, R.H., Murphy, R.M., 2009. Examining polyglutamine peptide length: a connection between collapsed conformations and increased aggregation. *J. Mol. Biol.* **393**, 978.

Williamson, T.E., Vitalis, A., Crick, S.L., Pappu, R.V., 2010. Modulation of polyglutamine conformations and dimer formation by the N-terminus of huntingtin. *J. Mol. Biol.* **396**, 1295.

Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Horyn, O., Luhovyy, B., Lazarow, A., Nissim, I., 2005. Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. *J. Nutr.* **135**, 1531S.

Zhou, R., 2003. Free energy landscape of protein folding in water: explicit vs. implicit solvent. *Proteins* **53**, 148.

後藤 祐児 2009. アミロイド線維形成とタンパク質科学 *高分子* **58**, 92.

(別紙様式3)

論文内容の要旨

氏 名 中野美紀
専 攻 人間環境学
指導教官氏名 蛭名邦禎 教授

論文題目

コンピューターシミュレーションによるポリグルタミンペプチドの特性解析

論文要旨

【本研究の背景】

ハンチントン病 (Huntington disease; HD) を含むポリグルタミン病 (polyQ 病) は原因遺伝子内で特定のアミノ酸をコードするコドンの異常伸長によって引き起こされる。病気の発症はグルタミン (Q) の伸長数によって決定され、伸長数が長いほど症状は重篤である。すべて神経変性を引き起す難病で、多くは中年期以降に発病する。現在までに有効な治療法は確立されていない。

polyQ 病の発症には生体内の様々なメカニズムが関与しているが、病気の最初のステップは異常伸長したポリグルタミン (polyQ) ペプチドを含むタンパク質のミスフォールドにある。同時に、この最初のステップは、他の多くのアミロイド病に共通する現象である。polyQ ペプチドの構造およびフォールディングの過程を知ることは、polyQ 病の治療のために有効な情報を提供するだけでなく、他のアミロイド病の発症機構にも光を当てることができる。

これまで多くの研究者が polyQ ペプチドの構造解明に取り組んできたが、polyQ ペプチドの難溶性かつ非結晶性に起因する実験的困難より、原子レベルでの構造解析は困難を極めてきた。多くの先行研究から、伸長した polyQ ペプチド領域を含むタンパク質は、 β シートを多く含む不溶性の凝集を作ることが明らかにされている。X 線回折写真やコンピューターシミュレーションでの解析から、単量体の polyQ ペプチドが取り得る構造として、 β ヘリックス構造および β ターン構造などが提案されてきた。しかし、最近の研究より、単量体の polyQ ペプチドは水中で定まった構造をもたないことが明らかになってきた。

【本研究の目的】

本論文の目的は、コンピューターシミュレーションを用いて polyQ ペプチドの物理化学的な性質を明らかにすることである。特に polyQ ペプチドの構造およびフォールディングの過程について、他のペプチドとの分子レベルでの比較により、polyQ ペプチドの特異性の解明を目指した。本研究は polyQ ペプチドの水中での構造アンサンブルと自由エネルギー地形を探索し、他のペプチドとの比較により polyQ ペプチドの特異性を計算機シミュレーションによって解析した初めての研究である。

【本研究の方法】

本研究では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 (Replica exchange molecular dynamics; REMD) 法を用い、15 残基からなる短い単量体の polyQ ペプチド (Q₁₅) の水中での構造アンサンブルと自由エネルギー地形の探索を試みた。REMD 計算の結果をもとに、構造分類・水素結合数・クラスターリング・MM-GB/SA 解析・自由エネルギー地形の描画を行った。同時に PDB に登録構造を持つ類似のペプチドの計算結果との比較により、polyQ ペプチドの特異性を検証した。さらに我々は、REMD 計算で得られた構造をもとに、多重分子動力学 (Multiple molecular dynamics simulation; MMD) 計算により単量体 polyQ ペプチドと多量体 polyQ ペプチドのダイナミクスと安定性の解析を行った。

多数の原子で構成されるタンパク質の自由エネルギー地形は複雑で、通常の分子動力学 (Molecular dynamics; MD) 計算では初期構造近傍のエネルギー状態の解析しか為し得ないという欠点があった。この困難を克服する方法として開発された方法の一つが、本研究で用いた REMD 法である。REMD 法では、互いに相互作用しない、温度の異なる複数のレプリカを用意する。それぞれのレプリカで独立した MD 計算を行い、一定の時間間隔で隣接した温度を持つレプリカ対をメトロポリス判定に従い交換する。レプリカの交換により、コンピューターシミュレーション上で、広いエネルギー空間を効率よく探索することが可能になる。

ただし、REMD 計算で得た軌跡はダイナミクスが途切れているため、物理量の経時変化を追うことができない。多重分子動力学 (Multiple molecular dynamics simulation; MMD) 法は、同じ系に対して初速度を変えた複数の MD 計算を行う手法である。我々は単量体および多量体の polyQ ペプチドと、PDB 登録構造を持つペプチドに対して MMD 計算を行い、それぞれの初期構造の安定性を検証した。

【結果と考察】

シミュレーションの結果、短いpolyQペプチド (Q₁₅) は、水中でランダムな構造を好むが、一定の確率で α -ヘリックス、 β -ターンなどの定まった二次構造をとることが判明した。その際、異なる構造間の自由エネルギー差は室温程度の熱揺らぎに相当することが判明した。Qだけで構成される、短く、単調で疎水基を含まないペプチドが、ある定まった二次構造をとることは驚くべき発見であった。このpolyQペプチドの特異な性質は、分子内のすべての側鎖が水素結合の形成に関わることができ、また、Qの持つ強い極性が分子内に働くことにより得られるpolyQペプチドの疎水的な性質によるものと考えられる。さらに β -ターンを形成したpolyQペプチドが多量体を形成すると、主鎖間に形成される水素結合により、その状態が安定になることが確認された。

本研究で用いた 15 残基というペプチドの長さは、polyQ 病のメカニズムを解明するには短すぎる。しかし我々は、この短いペプチドの解析により、polyQ ペプチドの水素結合の役割や疎水性を明らかにすることができた。これらの結果は、polyQ ペプチドのQ伸長数がより伸長した時に起こることを推測する助けになる。短い、単量体の polyQ ペプチドが β ターン構造を形成し、さらに二つの β ターン構造が水中で出会う確率は低いかもしれない。しかし、いったん β ターン構造の多量体が形成されるとその構造は単量体よりはるかに安定になり、凝集が加速されるだろう。polyQ ペプチドのQ伸長数の増加や濃度の上昇が起こった時、 β ターン構造の核が形成され、より凝集が加速されることが期待できる。

本研究により、polyQ ペプチドは多くのアミロイド形成タンパク質と共通の性質を持つことが明らかになった。polyQ ペプチドを含むアミロイド形成タンパク質は側鎖の自由な組み換えによって多様な構造をとり、自由エネルギー地形上に複数の準安定状態を持つ。この多様な構造の中から β シートを主体とした反応性の高い構造が生まれ、ペプチドの持つ疎水性相互作用によって凝集体を形成する。いったん形成された β シートを主体とする凝集体は主鎖間の水素結合により安定化される。

しかし、一般のアミロイド形成タンパク質は特定の長さや配列を持ち、一種類のアミノ酸だけが 5 個以上連続していることは少ない。polyQ ペプチドの特異性は Q だけが単調に続き、その伸長数によって毒性が異なる点にあるが、その物理化学的な特徴はアミノ酸 Q としての特異性と、Q が連続した配列を持つことに起因するものと思われる。

ヒトのタンパク質中に含まれる単一のアミノ酸のリピートは polyQ ペプチドだけではない。しかし polyQ ペプチドは他の単一のアミノ酸リピートで構成されるペプチドに比べて、ゲノム中の存在頻度が圧倒的に高く、伸長数も長いものが多い。しかも polyQ ペプチドは、その半数が個人によって

伸長数が異なる。この事実は進化の過程で、polyQ の伸長と多型が致命的でないだけでなく、むしろ有利に働く要素があったことを示している。35~40 残基を超える長さに異常伸長した polyQ は神経変性を引き起こすが、病気の発症は遅く、たいていは子孫を残した後の中年期に発病する。進化の圧力は polyQ ペプチドの伸長数に対して微妙なバランスを要求し、また、polyQ ペプチド自身も巧みな戦略で淘汰の波を生き残ってきたものと考えられる。

【結論】

本研究では、コンピューターシミュレーションにより、短い単量体の polyQ ペプチドの物理化学的性質を明らかにすることができた。polyQ の特徴は側鎖による自由な水素結合の組み換えと、疎水性による凝集促進、そして β シートの主鎖間に形成される水素結合による凝集体の安定化にある。

本研究では計算コストの制限から、15 残基という短い長さのペプチドしか扱うことができなかった。このペプチド長は、一般的な polyQ 病発症の閾値である 35~40 残基に比べると明らかに短い。しかしながら、本研究で扱った短いペプチドの研究から得た polyQ ペプチドについての知見は、polyQ ペプチドの長さが病気の閾値を超えたときにどのようなことが起こるかを想像する手助けになる。今後は病気発症の閾値を超える polyQ ペプチドの計算に取り組み、polyQ 病発症機構の解明に、さらに光を当てたいと願っている。