



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。



氏 名	中野 美紀
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学 位 記 番 号	博い第 5095 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	2010 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

コンピュータ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

審 査 委 員

主 査	教 授	蛭名 邦禎
	教 授	上地 眞一
	准教授	江原 靖人
	教 授	中川 和道
	教 授	田中 成典

(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 ペプチドが取得する構造として、 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 (Q_{15}) 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 ペプチドの特異的な性質は、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で配列を持ち、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。

論文審査の結果の要旨

氏 名	中野 美紀		
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		
判 定	合 格・不 合 格		
審 査 委 員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	蛭名 邦禎 印
	副 査	教 授	上地 真一 印
	副 査	教 授	中川 和道 印
	副 査	准教授	江原 靖人 印
	副 査	システム情報学 研究科教授	田中 成典 印
要 旨			
ハンチントン病などの「ポリグルタミン (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反復によって引き起こされる「トリプレット反復病」と呼ばれる病気の一つである。病気の発症はグルタミン (Q) の反復数によって決定され、それが多いほど早期に発症し、症状は重篤である。すべて神経変性を引き起こす難病で、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病の発症に関与する生体内の様々な過程のうち、長いpolyQペプチドを含むタンパク質の折れ畳みの異常は、他の多くのアミロイド病に共通する現象であり、polyQペプチド構造とその物性を知ることは、polyQ病の治療に向けた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になるかと期待できる。 学位申請者 中野美紀の研究は、計算機シミュレーションの手法を用いてpolyQペプチドの物理化学的な性質を明らかにすることを目的とし、特に、polyQペプチドの構造と折れ畳み過程について、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ものである。 本論文は6つの章からなる本文、謝辞、付録、参考文献から構成されている。第I章は序章にあてられ、新しい遺伝子病としてのトリプレットリピート病一般についてこれまでに知られている知見を簡潔に整理し、牛海綿状脳症 (BSE) なども含めて、タンパク質フォールディング (折れ畳み) 病としての観点から注目すべきことを指摘した。また、本研究で用いられることになる計算機シミュレ-			

ションを用いた研究の特徴について述べている。また、第II章では、タンパク質折れ畳み異常とアミロイド線維の形成について、先行研究の知見を要約した後、本研究の対象であるpolyQに焦点を絞り、その構造について、X線回折を含む様々な実験手法を用いた先行研究から得られた知見を分析した。さらに、学位申請者自身が行った β ヘリックスモデルを用いた計算機シミュレーションを用いた研究からの知見を整理し、polyQ病の発症機構の解明と治療へ向けた研究戦略を議論し、このpolyQを含むペプチドの凝集メカニズムを明らかにする上で、計算機シミュレーションを用いた研究の果たすべき役割について議論している。

第III章は、本研究で用いる手法である分子動力学 (MD) 法、特に、レプリカ交換分子動力学 (REMD) 法と多重分子動力学 (MMD) 法、さらには、シミュレーションの結果の解析に用いられる自動ヒストグラムフィルター (AHF) 法、平均力ポテンシャル (PMF) 法、溶媒和自由エネルギーを計算するMM-GB/SA法等の要領のよい解説になっている。

第IV章が本研究の中心をなし、REMD法ならびにMMD法による単量体ポリグルタミン (polyQ) ペプチド (特にQ₁₅) の特性解析を行っている。対象とするペプチドのリストとREMD法およびMMD法による具体的な計算手順を述べた後、まずProtein Data Bankに登録されている類似ペプチドの構造が再現できることを示し、次いでpolyQならびにポリグリシンなどの類縁ペプチドの構造解析を行っている。二次構造による分類基準を与えた後、REMD計算によって得られた多数のスナップショットの構造分類を行い、polyQペプチドの特異性を議論した。水素結合数やMM-GB/SA、AHFなどによる詳細な解析を行い、PMF法に基づいて自由エネルギー地形を描くことにより、polyQペプチドが、ランダムコイル、 α ヘリックス、 β ターン等の構造を室温程度の活性化障壁で容易に行き来でき、それが水素結合や疎水性と関係するグルタミンの特異性と関わっていることを明らかにした。特に、極性を持ったグルタミン残基からなるポリペプチドが、水との相互作用よりも分子内側鎖の相互作用によって疎水的な性質を示すということが定量的に解明された。また、単量体だけでなく多量体に対するMMD計算を行うことによって、構造変化のダイナミクスと、polyQが分子 (主鎖) 間の水素結合を利用することで β ターン構造に基づく凝集体を形成する可能性を持つことが示唆された。

第V章では、polyQペプチドの特異性 (特に水素結合の役割、特徴的な疎水性、天然変性タンパク質との関連など)、長いペプチドの折れ畳みシミュレーション、種々のホモポリアミノ酸 (HPAA) についての一般的な考察、polyQペプチドの進化的意味 (特に、ゲノム中の種々のHPAAとQ₁₅との比較、脳の進化とpolyQペプチドの関係) などについて考察を行い、最後に第VI章で全体のまとめを行っている。

これらの研究成果の一部は、既に査読付きの論文3篇として公表されている：(1) Ogawa, H., Nakano, M., et al, *Comput. Biol. Chem.* **32**, 102 (2008), (2) Nakano, M. et. al., *Interdisip. Sci. Comput. Life Sci.*, **1**, 21 (2009), (3) Nakano, M., et al, *J Phys. Chem. B* **114**, 7056 (2010)。

本研究は、人間の病気と進化の問題に関係する人間科学的に重要であると同時に、細胞中の高分子複合体の凝集機構の解明という物質科学的・生命科学的に興味ある課題を設定し、新しい計算科学的な手法を用いて取り組み、有用な知見を生み出した。人間発達環境学という名に相応しい学術的特徴を持った研究であると認める。よって、学位申請者の中野美紀は、博士 (理学) の学位を得る資格があると認める。