

課題名 (タイトル) :

MD シミュレーションによるタンパク質凝集に関する温度・濃度依存性解析

利用者氏名 : 小須田慧司

所属 : 神戸研究所 生命システム研究センター 生命モデリングコア 計算分子設計研究グループ

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

タンパク質が凝集することによってそのタンパク質が本来持つ立体構造や機能を失ってしまう。そのため、タンパク質実験や工学・医学的利用においてタンパク質凝集を制御することは重要な課題である。一方で、タンパク質凝集の詳細な機構は明らかになっていない。

先行研究において、アミノ酸側鎖の性質による違いがペプチド凝集に与える影響について分子動力学 (MD) シミュレーションを用いて解析された。これにより、側鎖の電荷の有無や、親水性・疎水性といった違いが大きく凝集に影響していることが明らかになった。本研究では、側鎖の性質だけでなく、外部環境が与える凝集への影響について着目した。本報告では、系の温度を変えることによる変化が凝集に与える影響について解析した。さらに、アミロイド形成ペプチドを用いた凝集体の二次構造形成について新しく解析を行なったので、併せて報告する。

2. 具体的な利用内容、計算方法

ペプチド両末端の電荷をブロックした、次のような配列のペプチドを用いた。

I-I-I-I

R-R-R-R

300 K では、イソロイシン 4 残基ペプチドは大きな凝集体を形成するのに対し、アルギニン 4 残基ペプチドはほとんど凝集しないことが先行研究で明らかになっている。

各ペプチドを一辺 10.4 nm の立方体内に均等に配置した。立方体を約 30000 個の水分子 (TIP3P モデル) で満たし、ペプチド濃度を 40 mM とした。気圧は 1 atom, 温度は 300 K もしくは 273 K とした。分子動力学計算には Amber 8.0 を用い、理化学研究所の MDGRAPE-3 によって高速計算した。まず系の

エネルギー極小化を行なった。次にヒーティング処理によって系の温度を目的の温度まで引き上げた。イソロイシン 4 残基ペプチド・アルギニン 4 残基ペプチドについては 50 ナノ秒までシミュレーション得られた各原子の座標情報から原子同士の距離を算出した。異なるペプチド間の原子距離がファンデルワールス半径和以内にあるとき、そのペプチドはクラスターを形成したと定義し、凝集の指標とした。

また、アミロイドを形成する特異的なペプチド配列を用いて、ペプチドの性質が凝集に与える影響について解析した。用いた配列は NFGAILSS であり、実験でアミロイド形成が確認されている (Gazit *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001)。4 残基ペプチドと同様の条件でシミュレーション (25 ナノ秒)・解析を行なった。さらに、NFGAILSS 配列については二次構造形成を DSSP を用いて解析した。

3. 結果

273 K の系と 300 K の系では、イソロイシン 4 残基ペプチドの凝集に明らかな差が見られた。300 K では大きな凝集体を形成したのに対し、273 K ではその半分程度の凝集しか見られなかった (図 1)。低温では分子の運動性が低下し、凝集への強い駆動力が失われたと考えられる。さらに、二量体から四量体までの小さなクラスターにおける形成数について調べたところ、273 K のほうが小さなクラスターが多く出来ていることがわかった (図 2)。先行研究において、二量体がクラスター形成の核となることが示唆されている。低温で多く小さなクラスターが出来ているにも関わらず大きな凝集体への移行が観察されないことから、核形成反応に温度依存性はないが、その後の凝集反応に温度依存性があることが示唆された。一方、アルギニン 4 残基では温度条件を変えても凝集せず、また小さなクラスターの形

成にも違いは見られなかった。このことから、凝集に必要な核形成が電荷による反発に大きく影響されることが示唆された。

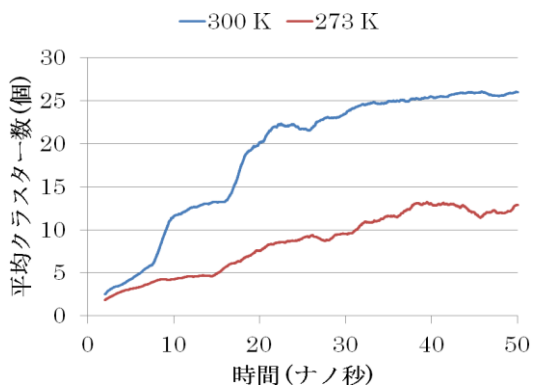


図 1. イソロイシン 4 残基ペプチドにおける温度依存的なクラスタ数の低下

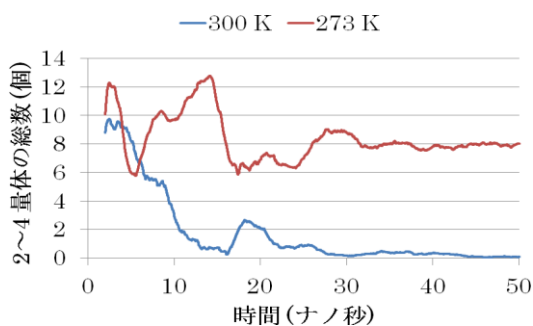


図 2. イソロイシン 4 残基ペプチドにおける小クラスタ数の温度依存的変化

次に、実験的にアミロイドを形成する NFGAILSS を用いた系について解析した。この配列では大きなクラスタが形成された。さらに、アミロイドに特徴的な β 構造形成について DSSP で解析したところ、全残基中 15 % 程度が β 構造を取っていることがわかった。これはイソロイシンの凝集体では見られず、配列による β 構造形成への影響が示唆された。

4. まとめ

強く凝集したイソロイシンにおいて温度依存的な凝集形成の低下や、核形成反応・凝集反応における温度の影響が示唆された。一方で電荷を持つアルギニンでは温度低下による核形成は見られず、電荷の強い影響が示唆された。アミロイド形成ペプチド NFGAILSS では、強い凝集能と β 構造形成が見られ、配列特異的な凝集体構造への

影響が示唆された。

5. 今後の計画・展望

今回の報告ではイソロイシン、アルギニンの 2 種類で議論した。親水基を持つアミノ酸や、部分電荷を持つアミノ酸では温度条件がどのように凝集に影響するかどうか解析が必要であると考えている。また NFGAILSS では、強い凝集能が見られたのにくわえ、イソロイシン 4 残基ペプチドでは観察されないような β 構造形成も見られた。今後は、アミロイド形成ペプチドにおける凝集過程・ β 構造形成過程についての解析も進めていきたい。今回の課題とは無関係なため省略したが、残基置換を行なった NFGAILSS 配列についての凝集シミュレーションの解析を同時に行なっており、それらの解析についても今後報告していきたいと考えている。

平成 26 年度 RICC 利用研究成果リスト

【国際会議、学会などでの口頭発表】

第 37 回日本分子生物学会年会

発表者：小須田 慧司

発表形式：ポスター

演題名：全原子 MD シミュレーションによるアラニンスキャニング変異を導入したアミロイド形成ペプチドの凝集解析

発表日：2014 年 11 月 26 日

ポスター番号：2P-0059

会場：パシフィコ横浜