

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12115

研究課題名（和文）分子シミュレーションを用いたアルツハイマー病におけるA $\beta$ 産生の起点機構の詳細解明

研究課題名（英文）Molecular Dynamics Study on the Mechanism of Amyloid Beta Production in the Early Stages of Alzheimer's Disease.

研究代表者

宮下 尚之（Miyashita, Naoyuki）

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：20452162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アミロイド ペプチド（A $\beta$ ）は、 $\gamma$ -切断酵素によりアミロイド前駆体タンパク質（APP）の細胞外部位が切断され、続いて  $\beta$ -切断酵素により膜貫通部位が切断されることで産生される。A $\beta$ の凝集により老人斑が生成される。一方、通常のAPPは  $\alpha$ -切断酵素によりAPPの細胞外領域が切断される。現在、切断酵素、APPの全長構造はわかっていない。またAPPの切断酵素による切断に至るまでのメカニズムもわかっていない。

そこで本研究では  $\gamma$ - と  $\beta$ -切断酵素の全長構造とAPPの必要な部位の構造をREMDやAlpha Fold2などで予測し、それらのダイナミクスから、APPの切断酵素へのアプローチの仕方について調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

$\gamma$ -切断酵素と  $\beta$ -切断酵素の全長構造は実験的に解けていないが、Alpha Foldだけを用いた全長構造予測はできない難しいシステムである。複数の構造予測法を組み合わせることで、難しい構造のタンパク質の予測ができることを示したプロトコルの提案という意味で学術的な意義がある。またその構造を用いて、 $\gamma$ -切断酵素及び  $\beta$ -切断酵素全長とAPPの動的な相互作用をみることで疾患プロセスにおける重要なある1つの過程を調べられ、その点も学術的な意義がある。アルツハイマー病の分子メカニズムの詳細はわかっていないが、本研究は将来的に疾患抑制につながる薬剤の開発に繋がるという意味で、社会的な意義があると言える。

研究成果の概要（英文）：Amyloid beta peptide (A $\beta$ ) is produced by the cleavage of the extracellular region of amyloid precursor protein (APP) by  $\gamma$ -secretase, followed by the cleavage of the transmembrane region by  $\beta$ -secretase. The aggregation of A $\beta$  leads to the formation of senile plaques. On the other hand, normal APP is cleaved in its extracellular region by  $\alpha$ -secretase. Currently, the full-length structures of the secretases and APP are not known. Additionally, the mechanism leading to the cleavage of APP by these secretases is also unclear.

In this study, we aimed to (1) predict the full-length structures of  $\gamma$ - and  $\beta$ -secretases and the necessary regions of APP using REMD and AlphaFold2, and (2) investigate the approach of APP to the secretases based on their dynamics.

研究分野：生体分子シミュレーション

キーワード：構造予測 相互作用計算 分子動力学シミュレーション アルツハイマー病 アミロイド前駆体タンパク質 切断酵素

## 1. 研究開始当初の背景

研究開発当初、アルツハイマー病抑制に特に有効な薬剤・治療につながる薬剤は開発できていなかった。これはこの疾患関連タンパク質が通常の細胞活動における他の重要なプロセスと干渉してしまう事が1つの原因であると考えられた。従来の単純な機構阻害薬では不十分であり、特異的な機構阻害薬の開発が必要であると考えられる。さて、特異的な機構阻害を考えるためには、疾患に至る詳細な分子機構を知る事が近道となる。本申請課題では、この疾患の起点となるアミロイドβペプチド

(Aβ) 産生のプロセスの一番最初のプロセスにあたる、β切断酵素とアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の特異的な動的相互作用機構の詳細を、分子シミュレーションにより明らかにし、β切断酵素の APP 切断に至る機構の詳細を解明する (図1)。

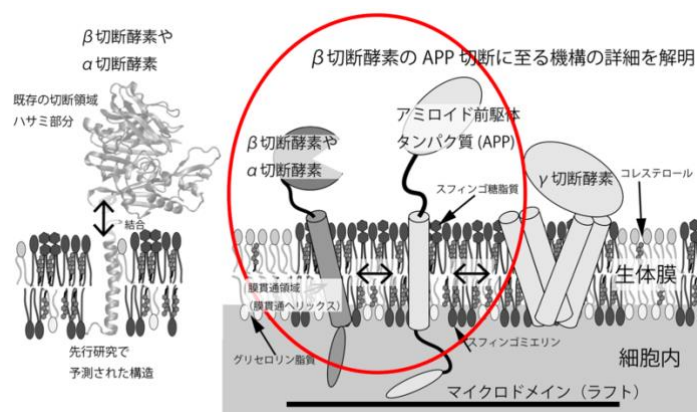


図1: α切断酵素/β切断酵素とAPPの相互作用に至る

ところがβ切断酵素は水溶性部

位の立体構造は解けていたが、膜貫通部位を含む全長構造は解けていなかった。また、疾患にならない通常の過程ではα切断酵素がAPPを切断する。このα切断酵素もまた、同様に全長構造はわかっていなかった。そのため、これら切断酵素がどのようにAPPにアクセスするのか明らかになっていなかった。このα切断酵素もしくはβ切断酵素がAPPを切断する過程は疾患の進行に繋がる分子機構の重要な分岐点として非常に重要であると考えられた。

現時点ではα切断酵素とβ切断酵素の全長の立体構造はわかっていない。そこで、先行研究(科研費・基盤C・2017-2021)で構造予測したβ切断酵素の膜貫通部位と立体構造が既知の切断部位(ハサミに当たる部位)を含む反応ドメインを組み合わせβ切断酵素の全長構造をモデリングする。また、可能であれば比較の為に、疾患の進行しないプロセスであるα切断酵素とAPPとの相互作用機構も全く同様の手法で解明し、それぞれの特異的な点を明らかにする。そしてAPPに対するβ切断酵素による切断を抑え、α切断酵素の切断を促す方法を探る。

## 2. 研究の目的

本申請研究では特に、疾患進行の最初の分岐点となるAPPとα切断酵素もしくはβ切断酵素との切断に至るまでの機構に注目した。APPはβ切断酵素による切断を受けると、疾患進行しやすい状況に陥るので、この注目点は非常に重要なポイントである。そこでα切断酵素とβ切断酵素の全長モデリングを行い、その全原子シミュレーションを実施して、APPが切断酵素に切断されるに至るまでの仕組みを調べた。また、この研究課題の「問い」は、『なぜ・どの様にβ切断酵素がAPPと相互作用し切断に至るのか?』である。その中でも申請者が考える最も核心をなす学術的「問い」は『β切断酵素とAPPの特異的な動的相互作用機構は何か?』であった。

### 3. 研究の方法

$\alpha$ 切断酵素と $\beta$ 切断酵素の全長構造は実験的に解けていないため、これらの全長構造をモデリングした。これらの膜貫通部位の構造に関しては先行研究(科研費・基盤 C・2017-2021)で予測し、そのダイナミクスについて調べた。本研究ではこれらの膜貫通部位とすでに構造が解けている細胞外領域の間である Jaxta membrane 領域および細胞内領域の構造を Alpha Fold2 およびレプリカ交換分子動力学法で予測し、組み合わせ全長構造を作成した。

$\alpha$ 切断酵素および $\beta$ 切断酵素の予測全長構造の分子動力学 (MD) シミュレーションをそれぞれ 1  $\mu$  秒実施し、先行研究で明らかになった APP と切断酵素間の膜貫通部位のインターフェースと、水溶性部位にある反応部位と APP の切断酵素によって切断される部位との関係を調べた。

### 4. 研究成果

#### 4-1) $\alpha$ 切断酵素と $\beta$ 切断酵素の全長構造モデリング

Alpha Fold2 のみでの全長構造モデリングはできなかった。これは膜貫通部位の精度の問題だと考えられる。そこで、本研究ではパーツに分けて構造予測を実施し、工夫して接続する事で $\alpha$ 切断酵素と $\beta$ 切断酵素の全長構造モデルを作成することができた (図 2)。

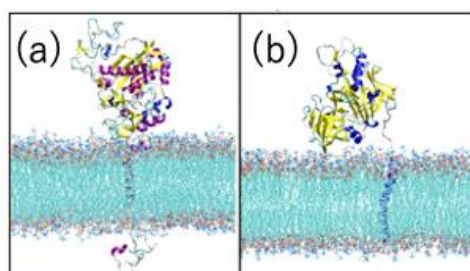


図 2 (a)  $\alpha$ 切断構造全長モデル、(b)  $\beta$ 切断酵素全長モデル。

#### 4-2) $\alpha$ 切断酵素と $\beta$ 切断酵素の反応部位のダイナミクス

$\alpha$ 切断酵素と $\beta$ 切断酵素の全原子モデルシミュレーションをそれぞれ 1 マイクロ秒実施した。その結果、 $\alpha$ 切断酵素の細胞外ドメインの反応部位の揺らぎは、 $\beta$ 切断酵素の細胞外ドメインの反応部位の揺らぎより小さいことがわかった。また、 $\beta$ 切断酵素の細胞外ドメインの反応部位は膜貫通部位に概ね垂直に配意することがわかった。したがって $\alpha$ 切断酵素と $\beta$ 切断酵素で反応ドメインのダイナミクスが異なることがわかった (図 3)。

反応ドメインの動作範囲は APP が侵入しにくいと考えられる。 $\alpha$ 切断酵素の方が反応ドメインの動作範囲が狭いことから、 $\alpha$ 切断酵素の方が APP との相互作用がしやすいと考えられる。また、APP と $\alpha$ 切断酵素、APP と $\beta$ 切断酵素の複合体シミュレーションも実施したところ、APP と切断酵素の膜貫通部位の間が結合した場合に、丁度切断酵素の反応部位に APP の

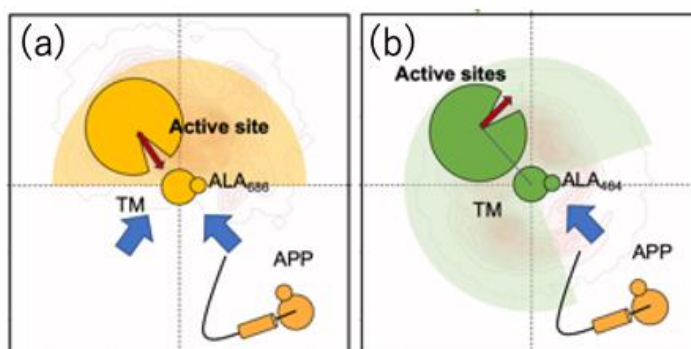


図 3 (a)  $\alpha$ 切断酵素の反応部位の可動範囲、(b)  $\beta$ 切断酵素の反応部位の可動範囲。それぞれの反応部位の向きも赤矢印で示した。

切断される部位が来る位置になることがわかった。切断ミスを防ぐためにも安定した環境が必要だと考えられるが、膜貫通部位同士の結合が切断のための安定化を図っている。

本研究課題の申請者が考える最も核心をなす学術的「問い」は『 $\beta$ 切断酵素と APP の特異的な

動的相互作用機構は何か?』であるが、本研究結果から、切断酵素と APP の膜貫通部位の相互作用・結合が重要で、それによりシステムの安定化が図られ、APP 上の正しい切断位置に反応部位が結合し切断するものであろう事がわかった。

以上のように本研究は予定通りに研究を進めることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyashita Naoyuki, Yonezawa Yasushige	4. 巻 155
2. 論文標題 Mutual information analysis of the dynamic correlation between side chains in proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 044107 ~ 044107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0055662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 中条貴裕, 斎藤聖奈, 松倉里紗, 宮下尚之
2. 発表標題 Deep Neural Networkを用いたレプリカ温度調整法の開発
3. 学会等名 日本物理学会2023年春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 南知香, 宮下尚之
2. 発表標題 HPCを用いたアルツハイマー病関連タンパク質 切断酵素とコレステロールとの相互作用
3. 学会等名 超異分野学会東京大会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 南知香, 松倉里紗, 宮下尚之
2. 発表標題 切断酵素と APP の結合過程におけるコレステロールの役割
3. 学会等名 第36回分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩野和哉, 清岡亮太, 宮下尚之
2. 発表標題 Deep Neural Network を用いた形からアミノ酸配列提案するプログラムの並列学習器モデルの考察
3. 学会等名 第36回分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Kiyooka, Masaki Ottawa, Lisa Matsukura, Naoyuki Miyashita
2. 発表標題 Application of the Protein Morphing Method and the Semi-automatic Simplified Path Exploration to the Membrane Protein Dimers Dynamics
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chika Minami, Lisa Matsukura, Naoyuki Miyashita
2. 発表標題 Coarse-grained model Simulation study of the docking process of $\gamma$ -secretase and APP/ Notch
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩野和哉, 清岡亮太, 宮下尚之
2. 発表標題 Deep Neural Networkを用いたタンパク質の構造データからアミノ酸配列を提案するプログラムの開発
3. 学会等名 日本物理学会2022年秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南 知香, 松倉里紗, 宮下尚之
2. 発表標題 アミロイド前駆体タンパク質と Notch 受容体の膜貫通部位と $\gamma$ -切断酵素との相互作用とコレステロールとの関わり
3. 学会等名 日本物理学会2022年秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoyuki Miyashita, Kaori Yanagino, Lisa Matsukura, Masaki Ottawa
2. 発表標題 Interaction between Amyloid precursor protein and the transmembrane region of beta-secretase and the dynamics
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南知香, 宮下尚之
2. 発表標題 粗視化モデル分子動力学シミュレーションを用いたNotchと $\gamma$ -切断酵素の相互作用とその結合機構
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南知香, 宮下尚之
2. 発表標題 ラフト環境下における $\gamma$ -切断酵素とそれによって切断される膜タンパク質の膜貫通部位と脂質分子の相互作用
3. 学会等名 第35回分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chika Minami, Naoyuki Miyashita,
2. 発表標題 Interaction Between Cholesterol and Substrate Binding Sites of gamma-secretase
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chika Minami, Kaori Yanagino, Naoyuki Miyashita
2. 発表標題 粗視化モデルシミュレーションを用いた脂質分子と 切断酵素との相互作用研究
3. 学会等名 第23回理論化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本凌, 齊藤聖奈, 中条貴裕, 柳野賀緒梨, 宮下尚之*
2. 発表標題 The structure modeling of the whole sequence of -secretase in the membrane and the dynamics.
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮下尚之
2. 発表標題 The role of gamma-secretase and cholesterol in the molecular mechanism of A beta peptide production of the early stage of Alzheimer's disease
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 Naoyuki Miyashita*, and Chika Minami
2. 発表標題 Coarse-grained model molecular dynamics simulations of gamma-secretase and APP / Notch system
3. 学会等名 34th IUPAP Conference on Computational Physics (CCP2023), (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤本凌, 齊藤聖奈, 中条貴裕, 宮下尚之
2. 発表標題 切断酵素と 切断酵素の全長構造の構造モデリングとそのダイナミクス
3. 学会等名 日本物理学会第78回年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoyuki Miyashita
2. 発表標題 Morphing Method Using the Trajectories of Molecular Dynamics Simulations and Deep Neural Network and the Applications
3. 学会等名 The 6th International Conference on Molecular Simulation (ICMS2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 N. Miyashita*, K. Yanagino, C. Minami, R. Fujimoto, S. Shimogochi, R. Kiyooka,
2. 発表標題 Simulation Study of the Interaction Between the Transmembrane Domain of Amyloid Precursor Protein and the Transmembrane Domains of alpha-, beta- and gamma- Secretases in the Membrane During the Early Stages of Alzheimer 's Disease.
3. 学会等名 MRM2023 IUMRS-ICA2023, Advanced Material Research Grand Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoyuki Miyashita*, and Kazuya Iwano
2. 発表標題 AUTOMATED METHOD FOR PROPOSING MUTANT SEQUENCES IN A SMALL DOMAIN USING A PROTEIN STRUCTURE-BASED DEEP NEURAL NETWORK
3. 学会等名 68th Annual Meeting of the Biophysical Society, (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤本凌, 齊藤聖奈, 柳野賀緒梨, 宮下尚之
2. 発表標題 全原子モデルMDシミュレーションを用いた 切断酵素全長とAPP部分モデルとの相互作用
3. 学会等名 第24回蛋白質科学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

FY2021-2023科研費基盤研究 (C)の成果 <a href="https://www2.miyashita-lab.net/2-research/research-grant-and-commissioned-projects/fy2021-2021%E7%A7%91%E7%A0%94%E8%B2%BB%E5%9F%BA%E7%9B%A4%E7%A0%94%E7%A9%B6%E3%81%AE%E6%88%90%E6%9E%9C">https://www2.miyashita-lab.net/2-research/research-grant-and-commissioned-projects/fy2021-2021%E7%A7%91%E7%A0%94%E8%B2%BB%E5%9F%BA%E7%9B%A4%E7%A0%94%E7%A9%B6%E3%81%AE%E6%88%90%E6%9E%9C</a> FY2021-2023科研費基盤研究 (C)の成果 <a href="https://www2.miyashita-lab.net/miyashita-lab/2-research/research-grant-and-commissioned-projects">https://www2.miyashita-lab.net/miyashita-lab/2-research/research-grant-and-commissioned-projects</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------