

機関番号：32503

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770175

研究課題名(和文) 計算科学によるアミロイド形成中間体の構造解析

研究課題名(英文) Computational Analysis for Amyloid Formation

研究代表者

山本 典史 (Yamamoto, Norifumi)

千葉工業大学・工学部・助教

研究者番号：30452163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病は、正常型プリオンタンパク質PrPCが異常型PrPScに変化し、PrPScが凝集したアミロイド線維が脳内に沈着することで発症する。プリオン病の初期過程では、PrPCの一部が変性した過渡的中間体PrP\*がPrPScへの構造変化を橋渡しする役割を担う。本研究は、PrP\*の構造解析に取り組み、プリオン病の病態機序を明らかにすることを目的とした。PrP\*の構造的特徴を抽出する手段として、二次構造情報に基づく新しいカーネル主成分分析(SSPCA)を開発した。SSPCAを適用した結果、PrP\*の有力な候補として、PrPCの一部がヘリックス ストランド転位した特徴的な変性状態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The developing mechanism of prion diseases has remained unclear. In this study, based on molecular dynamics simulations, we investigated the structural instability in prion protein (PrP), which promotes a partial helix-to-sheet conformational conversion. This instability of PrP facilitates the formation of active intermediate precursors (PrP\*) that can lead to the conformational conversion of the normal prion protein (PrPC) to the pathogenic isoform (PrPSc). We propose a novel method to systematically construct a free-energy landscape by mapping massive protein structural data into a reduced space according to their secondary structures, named secondary structure principal component analysis (SSPCA). The definite existence of PrP\* was confirmed in the free-energy landscape. The existence ratio in number of PrP\* to its normal form was estimated to be 0.07. The SSPCA method has great potential to solve various challenges in studying highly flexible molecular systems, other than PrPs.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：アミロイド シミュレーション タンパク質 プリオン 分子動力学

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) アミロイド病のメカニズムを解明するための手掛かりは、タンパク質の特殊な変性状態(アミロイド形成中間体)にある

アミロイド病は、天然構造に正しく折り畳まれなかったタンパク質が凝集し、アミロイド線維を形成することで発症する疾患(例:アルツハイマー病・パーキンソン病・透析アミロイドーシス・プリオン病など)の総称であり、有効な治療法のない難病である。アミロイド病に対する予防法・治療法を確立するためには、アミロイド線維の形成機構を解明することが急務である。

アミロイド線維は、クロスβシートを基本骨格とする規則的構造を持ち、アミロイド産生には共通の分子機構があると考えられる。アミロイド形成の初期過程では、タンパク質の特定の部位が壊れた特殊な部分変性状態が、アミロイド線維の伸長や伝播を仲介する過渡的中間体の役割を果たすと考えられる。したがって、アミロイド形成機構を解明する手掛かりは、タンパク質の特殊な変性状態(アミロイド形成中間体)にある。しかし、アミロイド形成中間体の具体的な構造状態を同定する解析方法は確立されていなかった。

### (2) プリオン病の変性中間体の構造状態

クワイツフェルト・ヤコブ病に代表されるプリオン病は、脳のスポンジ状変性を特徴とする致死性の神経疾患であり、感染能を持つタンパク質性因子「プリオン」を介して伝染する人獣共通感染症の総称である。過去、牛肉などの経口摂取を介したBSEウシからヒトへの感染が疑われたことを契機として、プリオン病は食の安全にも関わる深刻な問題に発展している。プリオン病の伝染・発症メカニズムには未だ不明な点が多く、真に有効な診断法・治療法は確立していない。プリオン病のメカニズムを明らかにし、発症前早期診断法、感染予防法や抗プリオン治療薬を開発することは、重要な社会的課題である。

プリオン病のメカニズムとして、ヘリックス構造に富む正常型プリオンタンパク質(PrP<sup>C</sup>)がシート構造に富む病原性異常型(PrP<sup>Sc</sup>)に変化した結果、複数のPrP<sup>Sc</sup>が凝集することで分子間βシート構造を骨格とするアミロイド線維を形成し、脳内に沈着・毒性化することで発症すると考えられている。近年、プリオン病の初期過程では、PrP<sup>C</sup>の一部分が変性した過渡的中間体PrP\*がPrP<sup>Sc</sup>への変化を橋渡しする役割を担うことが明らかとなり、注目を集めている。したがって、プリオン病の機序を解明するための重要な手掛かりはタンパク質の特異な変性構造(アミロイド形成中間体PrP\*)にある。しかし、PrP\*の具体的な構造

状態を明確に同定する手法は確立されていなかった。アミロイド産生の分子機構を解明するためにも、アミロイド形成中間体PrP\*の構造解析は不可欠な課題であった。

## 2. 研究の目的

プリオン病の機序を解明するための手掛かりは、アミロイド形成中間体(PrP\*)にある。しかし、PrP\*の具体的な構造状態を明確に同定する手法は確立されていなかった。そこで本研究では、PrP\*の構造解析に取り組み、プリオン病に代表されるアミロイド病の分子機構を明らかにすることを目的とする。この目的を達成するため、タンパク質の構造的特徴を抽出する手段を新たに開発し、プリオンタンパク質の解析に適用する。

## 3. 研究の方法

プリオン形成中間体PrP\*は、二次構造はPrP<sup>C</sup>と比較的近く、α-ヘリックス構造の一部がβ-ストランド構造へと過渡的に転位した状態であると推測される。そこで、分子動力学計算などを用いた構造サンプリングで得るデータ群の中から、二次構造情報に基づいて、PrP\*の特徴に合致する構造状態を抽出する新しいカーネル主成分分析(SSPCA; Secondary Structure Principal Component Analysis)法を開発した。

はじめに、水溶液中のプリオンタンパク質を対象として、300K~400Kの範囲で温度レプリカ交換分子動力学(REMD; Replica Exchange Molecular Dynamics)を用いた構造サンプリングに取り組んだ。REMDで得たタンパク質立体構造にDSSPプログラムを適用し、アミノ酸残基ごとの二次構造要素をヘリックス、ストランド、コイルの3種類に帰属した。i番目の立体構造 $\mathbf{Q}_i$ に対して帰属したn残基目の二次構造要素を $X_{i,n}$ とした。立体構造データ $\{\mathbf{Q}\}$ 間の相関関係を二次構造要素に基づいて定量化する指標として

$$k(\mathbf{Q}_i, \mathbf{Q}_j) = \sum_n k_{ij,n} \quad k_{ij,n} = \begin{cases} 1 & (X_{i,n} = X_{j,n}) \\ 0 & (X_{i,n} \neq X_{j,n}) \end{cases}$$

を定義した。SSPCA法は、上記のように定義した $k(\mathbf{Q}_i, \mathbf{Q}_j)$ をカーネル関数と定義する主成分分析法である。カーネル関数が定める行列 $(\mathbf{K})_{ij} = k(\mathbf{Q}_i, \mathbf{Q}_j)$ について

$$\mathbf{JKU} = \lambda \mathbf{U} \quad \mathbf{J} = \mathbf{I} - \frac{1}{N} \mathbf{1}\mathbf{1}^T$$

の固有値問題を解いた。固有値の大きな2つの成分に注目し、対応する固有ベクトルに構造データを射影した成分を、それぞれ、第一主成分(SSPC1)、第二主成分(SSPC2)とした。

## 4. 研究成果

### (1) プリオンタンパク質のエネルギー地形

レプリカ交換分子動力学(REMD)計算で得られた840,056個の構造データにSSPCAを適用し、第一主成分(SSPC1)と第二主成分(SSPC2)を軸とする空間に射影した。二次元平面上に射影した構造データの300 Kにおける確率密度分布 $P(\text{SSPC1}, \text{SSPC2})$ をWHAM法によって決定した後、対応する自由エネルギー地形

$G(\text{SSPC1}, \text{SSPC2}) = -k_B T \ln P(\text{SSPC1}, \text{SSPC2})$ を得た。図1に、プリオンタンパク質の自由エネルギー地形を示す。

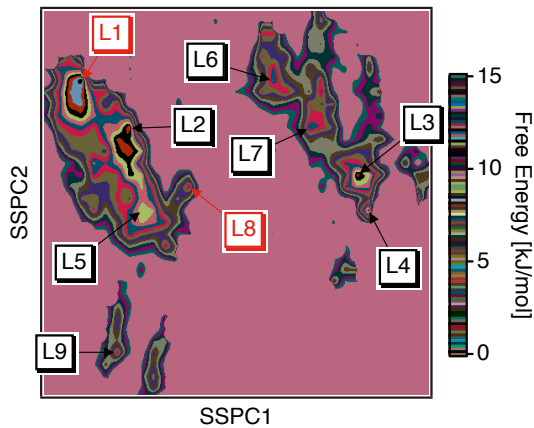


図1. プリオンタンパク質の自由エネルギー地形

図1の自由エネルギー地形は起伏に富んだ構造であり、複数の盆地を含んでいる。このうち、最も深い盆地に対応する局所安定構造をL1として、エネルギーのゼロ点に定めた。その他の特徴的な8つの盆地(対応する自由エネルギーの値は1.53 kJ/molから6.67 kJ/molの範囲)に対応する局所安定構造について、自由エネルギーの順にL2からL9とラベルした。このうち、L2からL5については、300 Kにおける熱揺らぎのエネルギー尺度(2.49 kJ/mol)程度の安定度であった。

### (2) 二次構造要素の分布図

二次元平面上に射影した構造データ中の二次構造要素(ヘリクスとストランド)の含有率をそれぞれ算出し、各地点における含有率の高低を示す図を作成した(図2, 図3)。図2と図3を見ると、二次元平面上の各地点では「二次構造が類似した構造」が集められていることが分かる。このことから、SSPCA法を用いることで、REMDにより得られた構造データが二次構造情報に基づいて分類されていることが分かる。さらに図2から、L1は立体構造中のヘリクス含有率が最も高い地点に対応し、図3から、L8はストランド含有率が最も高い地点に対応していることが分かる。

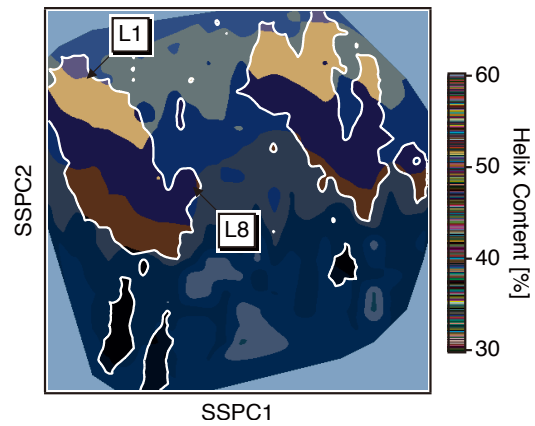


図2. 各地点でのヘリクス含有率

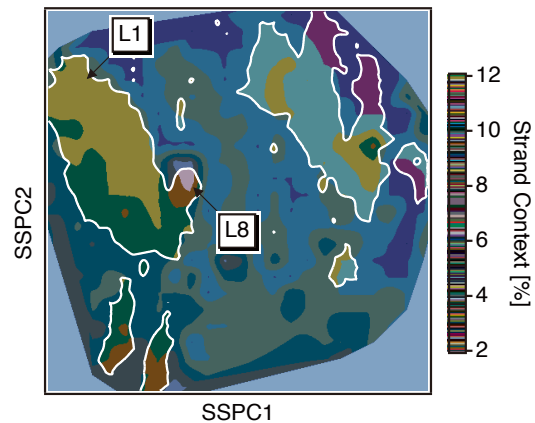


図3. 各地点でのストランド含有率

### (3) アミロイド産生機構についての考察

#### ① PrP\*はPrP<sup>C</sup>のHelix 2領域の一部がストランド構造へと変化した状態である

L1はNMR実験から決定されている天然構造PrP<sup>C</sup>とほぼ一致する二次構造の配列を持ち、ヘリクス含有率は61%、ストランド含有率は8%であり、3つのヘリクス領域(Helix 1, Helix 2, Helix 3)と2つのストランド領域(S1, S2)を形成している。一方でL8はPrP<sup>C</sup>のHelix 2領域の末端がシート構造へと変化した状態であり、ストランド含有率は51%、ヘリクス含有率は13%であった。この場合、L1に対してL8では6残基分だけストランド領域が伸長していた。

異常型PrP<sup>Sc</sup>への構造変化を橋渡しするPrP\*は、PrP<sup>C</sup>の一部が変性することでアミロイド産生能が向上した状態であると考えられる。さらに、プリオン病の分子機構では、複数のPrP<sup>Sc</sup>が分子間 $\beta$ -シート構造を形成することでアミロイド線維を産生すると予想される。これらのことから、PrP<sup>C</sup>のHelix 2領域の一部がシート構造へと転移したL8がPrP\*の有力な候補であると考えられる。

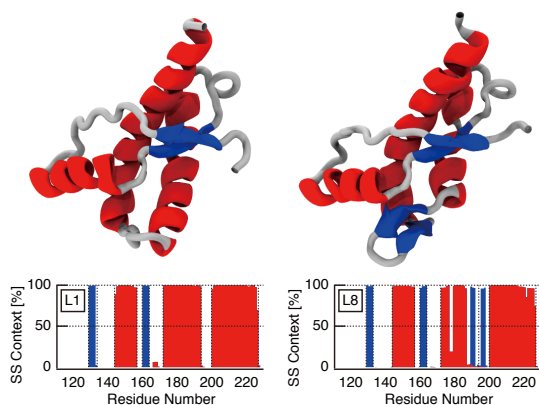


図4. L1とL2の立体構造と二次構造配列

### ② PrP<sup>C</sup>とPrP<sup>\*</sup>は生理的条件下においても1対0.07の割合で共存する

L1とL8の各構造状態の自由エネルギー差は6.32 kJ/molであった。過去のフォールディング実験ではPrP<sup>\*</sup>と思われる変性構造が観測されており、このときの自由エネルギー変化  $8.0 \pm 1.7$  kJ/mol [Zhang et al., *Biochemistry*, Vol. 36, pp. 3543–3553, 1997]の実験結果と比較的良好一致している。今回得られた自由エネルギー差から、ボルツマン分布則にしたがって算出した結果、300 Kでは、1 Mの正常型PrP<sup>C</sup>に対して0.07 Mの割合でアミロイド形成中間PrP<sup>\*</sup>が共存し得ることが明らかとなった。

### ③ PrP<sup>\*</sup>はプリオンオリゴマーを形成する

PrP<sup>\*</sup>に対応するL8の立体構造を調べると、ヘリックス→ストランド転移したHelix 2領域の一部が分子間β-シート構造を形成することで、アミロイド形成中間体のホモ多量体PrP<sup>\*</sup>/PrP<sup>\*</sup>や異常型とのヘテロ多量体PrP<sup>\*</sup>/PrP<sup>Sc</sup>などを形成することも考えられる。アミロイド形成中間体PrP<sup>\*</sup>の存在量自体は少ないが、このようなプリオンオリゴマーを形成し安定化することで、異常化への構造変化(PrP<sup>\*</sup>→PrP<sup>Sc</sup>)が誘発されることが予想される。特に、個発性プリオン病ではホモ多量体PrP<sup>\*</sup>/PrP<sup>\*</sup>の形成が、発症機序において基軸的役割を果たすと考えられる。

#### (4) まとめ

本研究では、我々が開発したSSPCA法をプリオンタンパク質に適用することで、プリオン病の発症機序において重要な役割を果たすアミロイド形成中間体PrP<sup>\*</sup>の有力な候補を明らかにすることができた。さらに、PrP<sup>\*</sup>の具体的な構造状態に基づく考察から、アミロイド産生の分子機構についての予想モデルを確立することができた。

本プロジェクトで開発したSSPCA法は、今回ターゲットとしたプリオン病以外にも、二次構造変

化が原因で引き起こされる様々なコンフォメーション病(アルツハイマー病、パーキンソン病など)の分子機構解明にも活用できる。今後、SSPCA法を用いた解析を進めることで、アミロイド形成機構のさらなる解明に取り組む予定である。

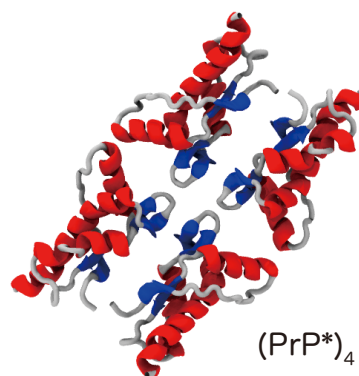


図5. プリオンオリゴマーの予想構造

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

① Norifumi Yamamoto, “Hot Spot of Structural Ambivalence in Prion Protein Revealed by Secondary Structure Principal Component Analysis”, *Journal of Physical Chemistry* (投稿中) 査読あり

② Takuya Okamoto, Takashi Ishikawa, Yoshiyuki Koyano, Norifumi Yamamoto, Kazuo Kuwata, Masataka Nagaoka, “A Minimal Implementation of the AMBER-PAICS Interface for Ab Initio FMO-QM/MM- MD Simulation”, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 86, pp. 210–222 (2013) 査読あり

[学会発表](計1件)

① 山本典史, プリオン形成中間体の構造解析, 分子科学討論会, 2013年9月27日, 京都

[図書](計1件)

① 山本典史, 他, 第一原理計算～構造最適化に向けた材料・デバイス別事例集～, 情報機構, pp. 56–71 (2012)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
山本典史 (Norifumi Yamamoto)  
千葉工業大学・工学部・助教  
研究者番号: 30452163