

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00421

研究課題名(和文) 分子シミュレーションによるアルツハイマー病初期分子機構への生体膜環境の影響解析

研究課題名(英文) Molecular Simulation Study of the Bio-membrane of the neuron in the early stage 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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の初期分子過程ではまずアミロイド前駆体タンパク質(APP)がベータ切断酵素によって切断される。その後ガンマ切断酵素によって切断され、アミロイドペプチドが産生される。本研究では、APPとベータ切断酵素との相互作用過程に注目した。まず、ベータ切断酵素の膜貫通部位の構造が解かれていなかったため、レプリカ交換分子動力学法(REMD)を用い立体構造を予測した。その構造を元にして粗視化モデルシミュレーションを行い、APPの膜貫通部位とベータ切断酵素の膜貫通部位の相互作用ポイントを明らかにした。更に切断酵素の膜貫通部位の構造予測をし、切断酵素とAPPの相互作用も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病の初期分子機構の詳細は未だ分かっていないことが多い。学術的意義としてはまず、切断酵素も切断酵素も膜貫通部位の構造がわかっていなかったが本予測計算で初めてその構造が明らかになった。またAPPとの生体膜中での相互作用も本研究で初めて明らかになった。通常は切断酵素がAPPと相互作用することでAPPは廃棄されるが、切断酵素によって切断されるとアルツハイマー病は進行する。本研究では切断酵素によって結合に至るメカニズムも明らかになった。社会的意義としては、本結果はアルツハイマー病の疾患進行抑制の薬剤開発に繋がると考えられ、将来的には重度の患者の減少に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the early stage of Alzheimer's disease, amyloid precursor protein (APP) is cleaved by beta-secretase, then it is cleaved by gamma-secretase, and Amyloid beta-peptide is produced. In this research, we have focused on the interaction between APP and beta-secretase in the membrane. The transmembrane (TM) regions of beta-secretase have not been solved the tertiary structure. Thus, we performed the replica exchange molecular dynamics (REMD) simulation to predict the tertiary structure of the TM domain of beta-secretase. Then, we performed coarse-grained model molecular dynamics simulations of the TM domain of beta-secretase and TM domain of APP in the bio-membrane to reveal the interaction mechanism between APP and beta-secretase. We also cleared the interaction mechanism of APP and alpha-secretase.

研究分野：分子シミュレーション・医療情報

キーワード：アルツハイマー病 切断酵素 切断酵素 生体膜 ラフト 相互作用 分子動力学シミュレーション 構造予測

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病には老人性と家族性のものがあり、近年患者が増加している傾向にある。この疾患ではアミロイド前駆体タンパク質がβ切断酵素によって切断された後、γ切断酵素によって切断され、老人斑の原因となるアミロイドβペプチドを産生し、このアミロイドβペプチドは細胞外で凝集する(図1)。この後、細胞内ではタウタンパク質が過剰リン酸化し、PHFと呼ばれる凝集体を作る。これにより神経原繊維変化、即ち神経細胞死が起きる。

アルツハイマー病進行の初期分子機構では、コレステロールが豊富なラフトとよばれる生体膜環境下でβ切断酵素がアミロイド前駆体タンパク質(APP)のβ部位を切断する。一方、疾患の進行しない通常の過程ではラフトでない生体膜環境下でα切断酵素がAPPのα部位を切断する。この機構の理解はアルツハイマー病の機構の理解と抑制の為の創薬にも繋がるが、現状、α切断酵素とβ切断酵素の膜貫通部位の構造はわかっていない。そのため、APPとの選択的結合理由の詳細もわかっていなかった。本申請課題では申請者のこれまでの研究成果を生かして、α切断酵素とβ切断酵素の膜貫通領域の構造予測と様々な脂質環境下でのAPPとの相互作用に注目した分子シミュレーション研究を実施し、アルツハイマー病進行過程に脂質環境が与える影響と原因を調べた。

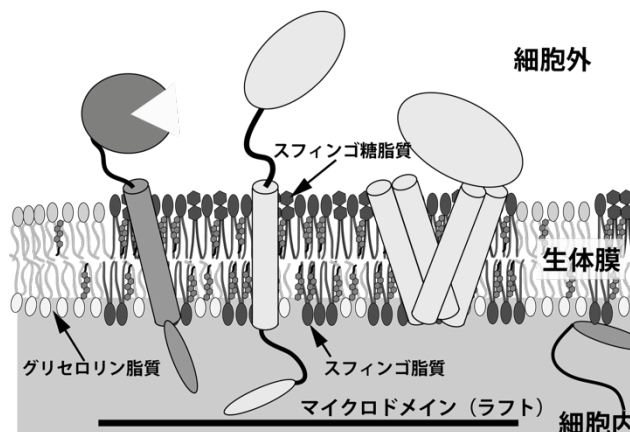


図1: 疾患が起きる場合の膜タンパク質と脂質分子。生体膜中のβ切断酵素(左)、APP(中央)、ガンマ切断酵素(右)

### 2. 研究の目的

α切断酵素とβ切断酵素の膜貫通部位の構造が解けていないので、それらの構造を予測する。また、その予測構造を用いた粗視化モデルシミュレーションを実施し、α切断酵素とβ切断酵素のラフト環境における脂質分子との相互作用を調べる。更に、生体膜上でのAPPとα切断酵素もしくはβ切断酵素との相互作用について調べた。

### 3. 研究の方法

α切断酵素とβ切断酵素の膜貫通部位の構造予測に関しては、Implicit solvent/membrane model (GBSW)を用いたレプリカ交換分子動力学法を用いて予測した。この時、レプリカ数を8とし、温度範囲を300-450Kとした。計算時間に関してα切断酵素は1レプリカあたり80ns、即ちtotalで640ns、β切断酵素は1レプリカあたり120ns、即ちtotalで960nsのシミュレーションを実施した。

脂質分子と切断酵素の相互作用の研究にはMartini 2.2P力場を用いた粗視化モデル分子動力学シミュレーションを実施した。ラフト環境を再現するために、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロール混合膜とした。コレステロールの割合を30%とした。また、切断酵素の膜貫通領域を9つ配置し、8-10μsの分子動力学シミュレーションを複数回実施した。

APPと切断酵素の相互作用計算にも同様の力場を用いた粗視化モデル分子動力学シミュレーションを実施した。この際はそれぞれ1つずつ配置した。先行研究ではα切断酵素はラフト環境に無いとのことであったので、コレステロールの割合を10%にした。

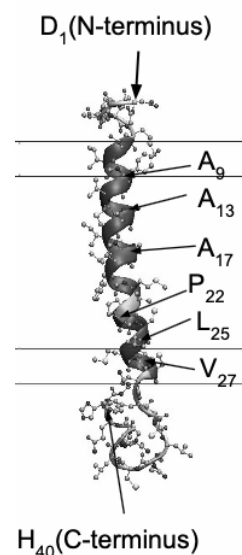


図2: β切断酵素の膜貫通部位の予測構造

#### 4. 研究成果

$\beta$ 切断酵素の膜貫通部位の立体構造を予測した。これにより膜貫通ヘリックスを持っていることがわかった。また、 $\beta$ 切断酵素はプロリンで少しバンドしていることがわかった(図2)。また、この結果から、 $\beta$ 切断酵素のA-xxx-AモチーフとAPPのG-xxx-Gモチーフが二量体インターフェースになるのでは無いかと予想された。同様に $\alpha$ 切断酵素の構造を予測した。その結果、 $\alpha$ 切断酵素のメチオニンにて僅かにバンドしていることがわかった。

この構造を粗視化し、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールで作られるラフト環境中での $\alpha$ 切断酵素と $\beta$ 切断酵素の脂質分子との相互作用について調べた(図3)。その結果、 $\beta$ 切断酵素は $\alpha$ 切断酵素よりコレステロールと強く相互作用している事がわかった。この結果は、実験で $\beta$ 切断酵素はラフト環境、 $\alpha$ 切断酵素は通常の生体膜環境でAPPは切断されると報告のある先行研究結果をサポートする。 $\beta$ 切断酵素にはコレステロールが特異的に結合する事がわかった。一方、 $\alpha$ 切断酵素も $\beta$ 切断酵素より強くはないが、ある程度の特異性を持ってコレステロールが結合する事が初めてわかった(図3)。

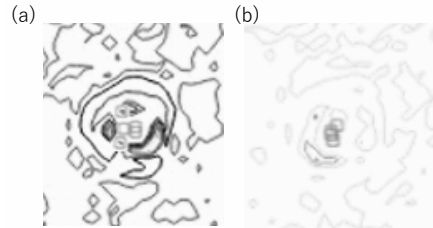


図 3: (a)  $\alpha$ 切断酵素周りのコレステロールの分布. (b)  $\beta$ 切断酵素周りのコレステロールの分布.

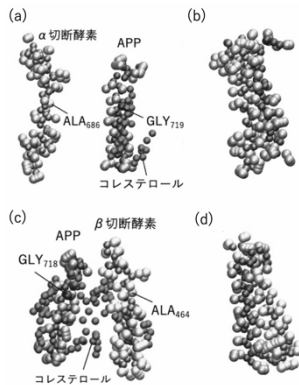


図 4:  $\alpha$ 切断酵素/ $\beta$ 切断酵素とAPPの相互作用.  $\alpha$ 切断酵素とAPPの(a)初期構造と(b)結合後、 $\beta$ 切断酵素とAPPの(c)初期構造と(d)結合後.

さて、APPと切断酵素との結合機構を調べるために、APPと $\alpha$ 切断酵素、APPと $\beta$ 切断酵素の粗視化モデルシミュレーションを実施した(図3)。その結果、APPと $\alpha$ 切断酵素に関しては結合の際にコレステロールが2つの結合サイトを仲介して結合することがわかった。今回、 $\alpha$ 切断酵素とAPPの生体分子シミュレーションではコレステロールの割合を減らしていた。それにも関わらず、APPと $\alpha$ 切断酵素が結合する際に、コレステロールが結合の間を取り持つ様子が観測できた。即ち、 $\alpha$ 切断酵素は弱いとは言え、特異的なコレステロール相互作用点がある事がわかった。一方APPと $\beta$ 切断酵素は、結合の際にコレステロールとスフィンゴ脂質が2つの結合を促進することが初めてわかった。

この結果から、アルツハイマー病の進行過程において、コレステロールとスフィンゴ脂質がAPPと $\beta$ 切断酵素の結合に重要な役割を果たしていることがわかった。また、 $\alpha$ 切断酵素も全くコレステロールと相互作用しないわけではなく、幾分か特異的な相互作用する事がわかり、これによって $\alpha$ 切断酵素とAPPの特異的な結合のサポートがなされていることがわかった。更に、 $\alpha$ 切断酵素と $\beta$ 切断酵素はAPPに対する結合位置が僅かに異なることがわかった。

本申請研究で予定していた研究は計画通り全て完了できた。現在、これらをまとめた論文を執筆中である。そのためここではさらに詳細な説明や多数の図の掲載は控えている。

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 147
2. 論文標題 On-the-fly analysis of molecular dynamics simulation trajectories of proteins using the Bayesian inference method	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 124108 ~ 124108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.4997099	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 1件）

1. 発表者名 Kaori Yanagino, Naoyuki Miyashita*
2. 発表標題 Structure Prediction of Transmembrane domain of beta-secretase
3. 学会等名 第19回 日本蛋白質科学会年会, 神戸国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳野 賀緒梨, 宮下 尚之*
2. 発表標題 アルツハイマー病関連タンパク質である 切断酵素の膜貫通部位とラフトとの相互作用
3. 学会等名 日本物理学会2019年秋季物理学会, 岐阜大学
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaori Yanagino, Naoyuki Miyashita*
2. 発表標題 Interaction between amyloid precursor protein and beta-secretase in the bio-membrane
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会, シーガイアコンベンションセンター
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳野賀緒梨, 宮下尚之*
2. 発表標題 アルツハイマー病関連タンパク質である 切断酵素の構造予測と生体膜での相互作用
3. 学会等名 近畿大学大学院サイエンスネットワーク2019第9回院生サミット, 近畿大学東大阪キャンパス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaori Yanagino, Naoyuki Miyashita*
2. 発表標題 切断酵素と 切断酵素の膜貫通部位の構造予測とラフト環境との相互作用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳野賀緒梨, 古江祐也, 宮下尚之*
2. 発表標題 アルツハイマー病初期分子機構に関する 切断酵素の膜貫通部位の構造予測とラフトとの相互作用
3. 学会等名 第33回分子シミュレーション討論会, 名古屋市公会堂
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳野賀緒梨, 南知香, 宮下尚之*
2. 発表標題 アルツハイマー病初期過程における 切断酵素とAPPの相互作用機構
3. 学会等名 第75回日本物理学会(2020年)年次大会, 名古屋大学(名古屋)WEB開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮下尚之
2. 発表標題 近畿大学生物理工学部電算機センターHPCとアルツハイマー病初期過程の分子機構
3. 学会等名 第4回 近畿大学 認知症 Core 研究(DoIK)シンポジウムー認知症克服に向けた工学的アプローチ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳野賀緒梨, 高橋良太, 古江祐也, 宮下尚之
2. 発表標題 切断酵素の膜貫通部位の構造予測と生体膜中でのダイナミクス
3. 学会等名 日本物理学会第74回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮下尚之
2. 発表標題 アルツハイマー病の初期機構に関わる生体分子の形と動きを分子シミュレーションで見る
3. 学会等名 FS-06フォーカストセッション 「計算科学と構造生物学による神経変性疾患克服への挑戦」, CBI学会2018年大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古江祐也、宮下尚之*
2. 発表標題 機械学習を用いたテンプレートベースのタンパク質構造モデリング
3. 学会等名 日本物理学会第73回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西庸高、古江祐也、宮下尚之*、白木琢磨、米澤康滋
2. 発表標題 イオンの結合によるリボスイッチSPINACHの分子ダイナミクスへの影響
3. 学会等名 日本物理学会第73回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西庸高、古江祐也、白木琢磨、米澤康滋、宮下尚之*
2. 発表標題 薬剤の有無によるリボスイッチの構造変化
3. 学会等名 第31回分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳野賀緒梨, 宮下尚之
2. 発表標題 コンピュータシミュレーションを用いたアルツハイマー病の初期分子機構にかかわる 切断酵素のダイナミクス
3. 学会等名 第9回超異分野本大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaori Yanagino, Naoyuki Miyashita
2. 発表標題 Structure Prediction of the transmembrane domain of alpha- and beta-secretases and the structural differences
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳野賀緒梨, 宮下尚之
2. 発表標題 切断酵素とAPPの膜貫通部位の相互作用インターフェース
3. 学会等名 日本物理学会2020年秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaori Yanagino, Naoyuki Miyashita
2. 発表標題 Interaction Between beta-Secretase and APP in The Biological Membrane, and The Structure Prediction of The TM domain of alpha-Secretase.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳野賀緒梨, 宮下尚之
2. 発表標題 切断酵素と 切断酵素の膜貫通部位の構造予測とそのダイナミクス
3. 学会等名 第34回分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaori Yanagino, Naoyuki Miyashita
2. 発表標題 STRUCTURE PREDICTION OF THE TRANSMEMBRANE REGION OF ALPHA- AND BETA- SECRETASES USING REPLICA-EXCHANGE MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS, AND THE INTERACTION BETWEEN AMYLOID PRECURSOR PROTEIN AND THEM
3. 学会等名 65th Biophysical Society Annual Meeting BPS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 宮下尚之
2. 発表標題 分子シミュレーションで見るアルツハイマー病初期過程で働く膜タンパク質と脂質分子との相互作用
3. 学会等名 蛋白質研究所セミナー『生体膜上の生物化学－解析法の進展から細胞内オルガネラのバイオロジーまで－』（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳野賀緒梨, 大多和克紀, 松倉里紗, 宮下尚之
2. 発表標題 生体膜中におけるAPPと -/ -切断酵素との相互作用機構
3. 学会等名 日本物理学会第76回年次大会(2021年)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

FY2017-2020 科研費基盤研究(C)の成果 <a href="https://sites.google.com/a/miyashita-lab.net/miyashita-lab/2-research/research-grant-and-commissioned-projects/fy2017-2019-ke-yan-fei-ji-pan-yan-jiu-c-no-cheng-guo?authuser=0">https://sites.google.com/a/miyashita-lab.net/miyashita-lab/2-research/research-grant-and-commissioned-projects/fy2017-2019-ke-yan-fei-ji-pan-yan-jiu-c-no-cheng-guo?authuser=0</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
研究協力者	米澤康滋 (Yonezawa Yasushige)  (40248753)	近畿大学・先端技術総合研究所・教授  (34419)	

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
---------	---------