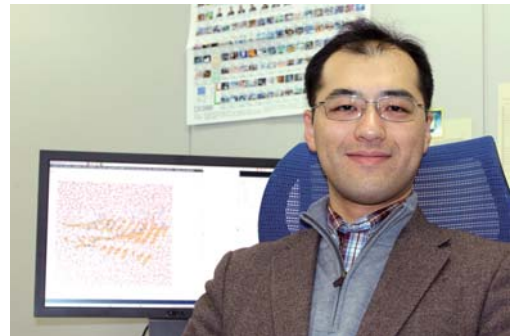


タンパク質の折りたたみ、変性、凝集、アミロイド線維：生体分子動力学シミュレーションの最前線

奥村 久士 計算科学研究センター 准教授

おくむら・ひさし

1975年東京都生まれ。1998年慶應義塾大学理工学部卒業。2002年慶應義塾大学大学院理工学研究科博士課程修了、博士（理学）。2002年東京大学工学系研究科日本学術振興会特別研究員（PD）。同年分子科学研究所助手。2006年名古屋大学理学研究科 COE 特任講師。2008年米国ラトガース大学研究助手。2009年同研究助教授。同年分子科学研究所准教授。専門は生体分子の分子動力学シミュレーション。



はじめに

タンパク質とはアミノ酸が1次元的に（枝分かれすることなく）つながったひもである。生体中でタンパク質は α ヘリックスや β シートなどの立体的な構造をとっている。天然のアミノ酸には20種類あり、これらのアミノ酸がどう並ぶかでタンパク質の安定な立体構造は変わる。アミノ酸の1次元配列情報からタンパク質の立体構造を理論的に予測する問題を「タンパク質の折りたたみ問題」と言う（図1）。この問題が注目されている理由の1つは、理論物理学の手法でタンパク質の折りたたみという生物の問題を説明できるのか？という基礎科学的な興味である。またもう1つの理由は、タンパク質が間違っただけで折りたたむことにより発病する病気の原因解明と、その治療に役立つ

てられるのではないかとという医学的応用に向けたものである。

分子動力学シミュレーションは、コンピューター上で仮想的に原子や分子を配置し、その運動を調べる理論的手法である。しかし、タンパク質などの生体分子には自由エネルギー曲面に多くの極小値があるため（図2）、通常の分子動力学シミュレーションを行ったのではこれらの極小値にトラップされてしまい、正しく構造を探索することができない。この問題を解決するために、マルチカノニカル法やレプリカ交換法などの拡張アンサンブル法と総称される手法が提案されてきた^[1]。本稿では我々が開発してきた拡張アンサンブル法や、

拡張アンサンブル法を用いたタンパク質の構造変化の研究、さらにタンパク質が間違っただけで折りたたみ凝集することによってできるアミロイド線維に関するシミュレーションについて紹介する。

拡張アンサンブル分子動力学シミュレーションとタンパク質の折りたたみ

拡張アンサンブル法の代表的手法であるレプリカ交換法^[2,3]では、系のコピー（レプリカ）を複数用意し、シミュレーションの途中で図3(a)のように2



図1 タンパク質の折りたたみ問題。

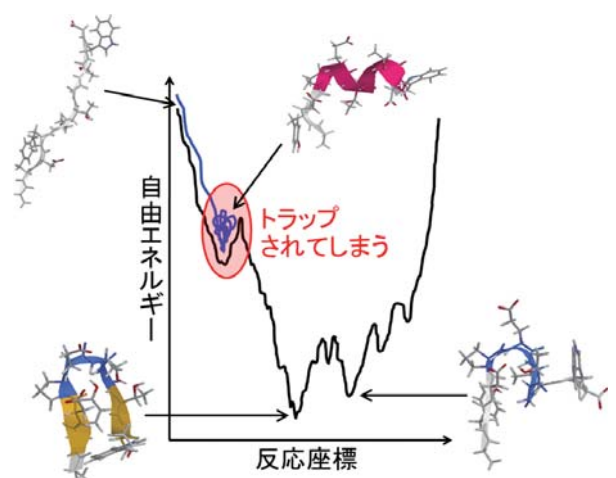


図2 タンパク質の自由エネルギーの概念図。単純に分子動力学シミュレーションを行うと途中にある極小状態にトラップされて最安定状態にたどり着けない。

つのレプリカ間で温度を交換するか否か判定する。このように各レプリカの温度を上下させることで、自由エネルギー極小状態に捕らわれることなく効率的な構造空間のサンプリングを実現できる。温度交換の際には、代表的なモンテカルロ法であるメトロポリス法^[4]を用いて温度を交換するか否か判定し、正しい統計アンサンブル（カノニカルアンサンブル）を実現させる。メトロポリス法ではモンテカルロ法の試行がアクセプトされないことがあるが、最近、モンテカルロ法の試行がほぼ確実にアクセプトされる新しいモンテカルロ法「諏訪・藤堂法」が提案された^[5]。ただし、モンテカルロ法における状態が2つしかない場合には、諏訪・藤堂法とメトロポリス法は等価になってしまう。レプリカ交換の枠組みでは、温度を交換するかしないかの2つの状態しかないため、このままでは諏訪・藤堂法の利点を活かさない。そこで図3(b)のように3つ以上の系間で温度を置換する新しい手法「レプリカ置換法」を考案した^[6]。レプリカ置換法では従来のレプリカ交換法よりも温度を2倍程度効率よく遷移させることができるし、構造空間もより効率よく探索できることが分かった。

この方法を用いてCペプチドの折りたたみシミュレーションを行った。このペプチドはGlu2の酸素原子とArg10の水素原子が塩橋を作ることで α ヘリックス構造を安定化させることが知られている。自由エネルギー地形（図4(a)）を計算し、伸びた状態Fから、まずGlu2とArg10が近づいて塩橋を形成し（状態B）、その後 α ヘリックス構造を形成し折りたたんだ状態Aに至ることを明らかにした（図4(b)）^[6]。

タンパク質の変性：圧力効果

タンパク質は温度や圧力などの環境が変わると変性する。拡張アンサンブル法は、温度や圧力が変化した際にタンパク質の構造がどのように変化するかを調べるのにも活用できる。通常、タンパク質は圧力をかけると変性し、ほどけてしまう^[7]。ところが、AK16ペプチドでは圧力をかけると逆に α ヘリックス構造の形成率が増えることが最近の実験で示された（図5(a)）^[8]。

そこで我々は拡張アンサンブル法のひとつである、温度・圧力に関する焼き戻し法^[9]を用いて、AK16ペプチドの構造の圧力依存性を調べた。その結果、圧力の増加にともない、 α ヘリックス構造の割合は途中までは減少するが、その後増加した。高圧力側だけとはいえ、圧力により α ヘリックス構造が増えるという実験結果を再現できたのはこれが初めてである。さらに慣性半径を計算したところ、図5(b)のように α

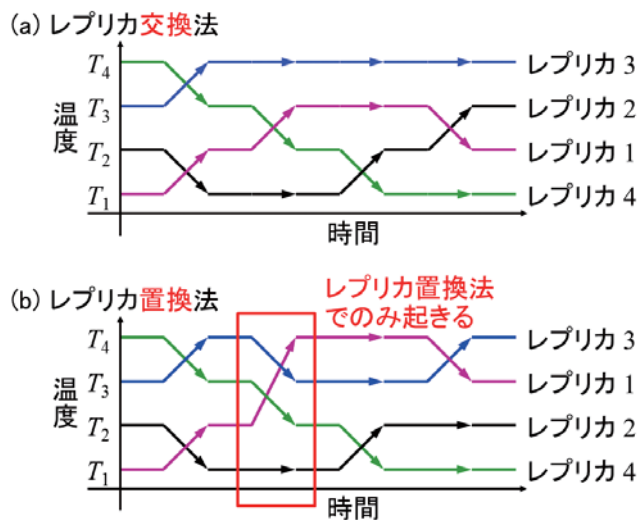


図3 (a)レプリカ交換法と(b)レプリカ置換法。レプリカ交換法では2つのレプリカの間で温度を交換するのに対し、レプリカ置換法では3つ以上のレプリカの間で温度を置換する。

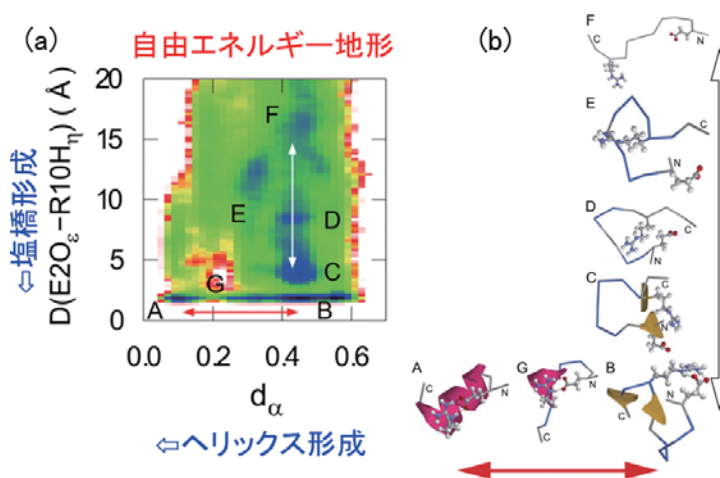


図4 Cペプチドの(a)自由エネルギー地形と(b)各自由エネルギー極小状態における典型的な構造。自由エネルギー地形の横軸は理想的な α ヘリックス構造からどれくらい離れているかを表し、縦軸は塩橋を作るGlu2の酸素原子とArg10の水素原子の距離である。

ヘリックス構造の慣性半径は圧力とともに減少するのに対し、アンフォールド状態の慣性半径はほとんど変化ないことがわかった。このことから α ヘリックス構造は加圧にともない縮むために、高圧力条件下では α ヘリックス構造が増えることを明らかにした^[10,11]。

タンパク質の凝集：アミロイド線維形成の初期過程

タンパク質は溶液中の濃度が高くなるとアミロイド線維を形成することがある。アミロイド線維は、タンパク質が間違っ折りたたみ、凝集することによってできた不溶性の線維である。アミロイド線維は20種類以上の病気の原因と考えられている。例えばアルツハイマー病はアミロイド β ペプチドが凝集してできたアミロイド線維が原因ではないかと言われている。しかし、アミロイド線維の形成メカニズムはまだわかっていない。そこでレプリカ置換法の1つである、クーロンレプリカ置換法を使ってアミロイド β ペプチドのフラグメントA β (29-42)の2量体形成機構を調べた^[12,13]。クーロンレプリカ置換法では電荷をスケールするパラメーターを導入し、温度の代わりにこのパラメーターをレプリカ間で置換することにより、2つの分子を近づけたり遠ざけたりできる。その結果、図6(a)のように2つのA β (29-42)が離れている状態Fから近づくにつれ、まず疎水性残基の多いC末部分で短い分子間 β シート構造を形成し(状態D)、その後 β シート構造を形成する残基が増えて、最終的に長い反平行 β シート構造(状態A)を作ることが明らかになった^[12]。さらに、分子間 β シート構造を作る直前には、図6(b)のように分子内での β シート構造(β ヘアピン構造)が増え、それはもう一方の分子の疎水性

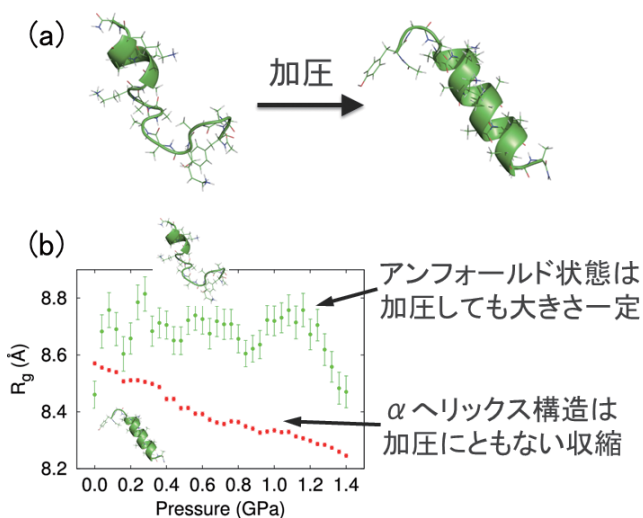


図5 (a)AK16ペプチドは加圧により、より多くの α ヘリックス構造を取ることが知られている。(b)AK16ペプチドの α ヘリックス構造は加圧により収縮する。

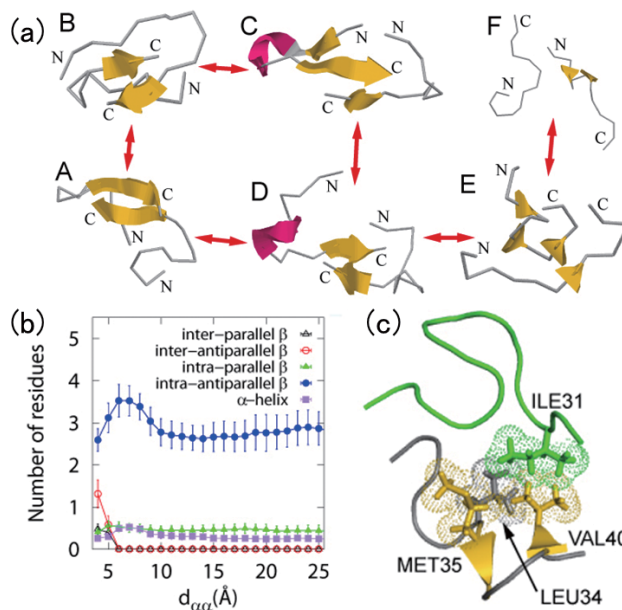


図6 (a)アミロイド β ペプチドのフラグメントの2量体化過程。(b)分子間距離 $d_{\alpha\alpha}$ と各種2次構造を取る残基数の関係。(c)分子間 β シート構造を作る直前に分子内 β シート構造をもう一方の分子の疎水性残基が安定化させている。

残基が接触することにより安定化されていることも発見した(図6(c))^[13]。

アミロイド線維の破壊

近年、超音波を使ってアミロイド線維を破壊する実験報告がいくつかなされている。その破壊メカニズムはキャピテーション(気泡生成)によるもの

ではないかと指摘されているが、水中の気泡がどのようにアミロイド線維を破壊するのか、原子レベルでの詳細は分かっていない。そこで我々はアミロイド β ペプチドからなるアミロイド線維に超音波をかけた非平衡分子動力学シミュレーションを行った^[14]。その結果を図7に示す。圧力が正の時はア

ミロイドや水の構造に大きな変化は見られないが、負圧になった時にアミロイドの周りに気泡が生じた。この気泡は疎水性残基の周りに生じることが多かった。アミロイドの周りの水がほぼ蒸発し気泡に包まれても、アミロイドは壊れなかった。その後圧力が再び正になると、気泡が崩壊し水のジェット流がアミロイドにぶつかり、アミロイドが破壊された。この時、水は主に親水性残基めがけて飛んでいることが分かった。このように生体分子系で気体・液体の相転移を含む非平衡分子シミュレーションを行い、キャビテーションによりアミロイドβ線維の破壊過程を原子レベルで解明したのは、この研究が初めてである。

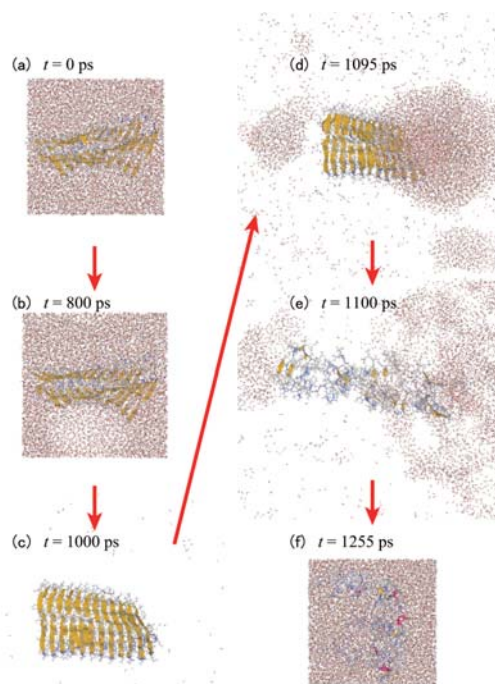


図7 超音波によるアミロイド線維の破壊過程。気泡がつぶれるときにアミロイド線維が破壊されている。

今後の展望

分子動力学シミュレーションは生体分子の運動を解明する強力なツールである。もともと分子動力学シミュレーションは今から60年近く前に、固体・流体相転移の研究として始まったが、今日では物理学や化学だけでなく、生物、医学への応用にも使われている。筆者自身、学生の頃物理学を専攻し、

今でも物理学を基礎に新しい分子動力学法の開発に取り組む一方、最近ではアミロイド病など医学的なテーマへの応用にも興味を持っている。今後も分子科学の立場から、医学・薬学への応用にも積極的に取り組んでいきたい。

ここで紹介した研究は伊藤暁助教、森義治特任助教との共同研究の成

果である。彼らの協力に感謝する。また、これらの研究は科学研究費補助金(23740325および26102550)、岡崎オリオンプロジェクトの助成を受けて行われた。シミュレーションの実行には計算科学研究センターのスパコンを利用した。

参考文献

- [1] A. Mitsutake, Y. Sugita, and Y. Okamoto: *Biopolymers* **60** (2001) 96–123.
- [2] K. Hukushima and K. Nemoto: *J. Phys. Soc. Jpn.* **65** (1996) 1604–1608.
- [3] Y. Sugita and Y. Okamoto: *Chem. Phys. Lett.* **314** (1999) 141–151.
- [4] N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, and E. Teller: *J. Chem. Phys.* **21** (1953) 1087–1092.
- [5] H. Suwa and S. Todo: *Phys. Rev. Lett.* **105** (2010) 120603.
- [6] S. G. Itoh and H. Okumura: *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 570–581.
- [7] H. Okumura: *Proteins* **80** (2012) 2397–2416.
- [8] T. Takekiyo, A. Shimizu, M. Kato, Y. Taniguchi: *Biochim. Biophys. Acta* **1750** (2005) 1–4.
- [9] Y. Mori and Y. Okamoto: *J. Phys. Soc. Jpn.* **79** (2010) 074003.
- [10] Y. Mori and H. Okumura: *J. Phys. Chem. Lett.* **4** (2013) 2079–2083.
- [11] Y. Mori and H. Okumura: *Proteins* **82** (2014), in press.
- [12] S. G. Itoh and H. Okumura: *J. Comput. Chem.* **34** (2013) 2493–2497.
- [13] S. G. Itoh and H. Okumura: *J. Phys. Chem. B*, in press.
- [14] H. Okumura and S. G. Itoh: *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014) 10549–10552.