

ポリペプチドのフォールディングと集積化により形成される高次構造と機能

亀山 敦* 岩岡 道夫** 森井 尚之**

Higher Order Structures and Function Formed by Polypeptide Folding and Integration

Atsushi KAMEYAMA* Michio IWAOKA** Hisayuki MORII**

1. 緒言

本プロジェクト研究は、タンパク質の線維状集積体であるアミロイドの特異な高次構造、およびポリペプチド鎖の折り畳み(フォールディング)や集積化によるユニークな構造形成過程を明らかにするとともに、それらの構造特徴から発現する機能開拓を目的とする。アミロイドは、アルツハイマー型認知症など多くの病気の原因物質として、それぞれの分子構造や発症機構の解明が進められているが、適用可能な構造解析法が存在しないため、研究議論が続いている。

2. アミロイドβのペプチドモデルの分子シミュレーション

アミロイドにおいて、集積体形成の鍵と考えられる 14 個のアミノ酸からなるペプチドモデル (CHO-QVINTF**DG**VADYLQ-NH₂) について、レプリカ交換モンテカルロ法を用いた単一アミノ酸ポテンシャル力場計算 (REMC/SAAP3D 計算) を行った。このペプチドモデルでは、四角で囲った中央のアスパラギン酸 (Asp, D) —グリシン (Gly, G) でターンが形成され、これが要となり β シート構造が生じると考えられる。本研究で用いた分子シミュレーションプログラムは、岩岡が独自に開発したものであり、アミノ酸数が 10 個程度のペプチドの分子構造を水中で良く再現できる⁽¹⁾。分子シミュレーションは、モンテカルロステップ数 4 億回、構造出力数 2 万個、レプリカ数 4 で行った。溶媒条件として水 (誘電率 78.39 で一定) と、疎水的な環境で静電相互作用が強くなることを考慮して距離依存誘電率を導入した仮想疎水条件 (誘電率 = kr ; k は定数, r は原子間距離) の 2 つの条件を適用した。2 万個の構造を統計的に解析した結果を図 1 および図 2 に示す。

構造解析から、きれいな β ターン構造は得られなかった。しかし、距離依存誘電率を用いた場合、Asp7—Gly8 を起点として変形したシート構造の形成が見られた (図 1B)。そこで、Asp7 と Gly8 の Ramachandran プロットを作成したところ、水中と仮想疎水条件では、大きな差は見られなかった (図 2)。きれいなターンをつくるためには、Asp7 の Ramachandran プロットにおいて左上、Gly8 の Ramachandran プロットにおいて右側中央にプロットが集中すると良い。そのような状況をうまく再現するためには、Asp7 の代わりに

プロリン Pro を、Gly8 の代わりに D-アミノ酸を用いると良いものと考えられる。

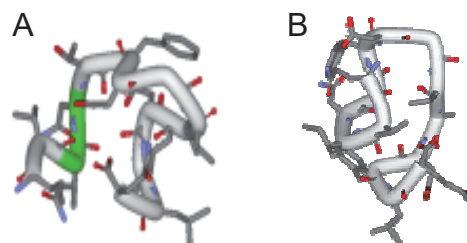


図 1. 構造クラスタリングにより得られた最も存在率が高かった構造。A, 水中, 存在率 19%. B, 距離依存誘電率 ($k=8$), 存在率 18%。

今後、疎水条件をより正確に再現するために、エーテル中 (誘電率 = 4) での力場パラメータの作成を進め、アミロイドが集積化するメカニズムの解明を行う予定である。

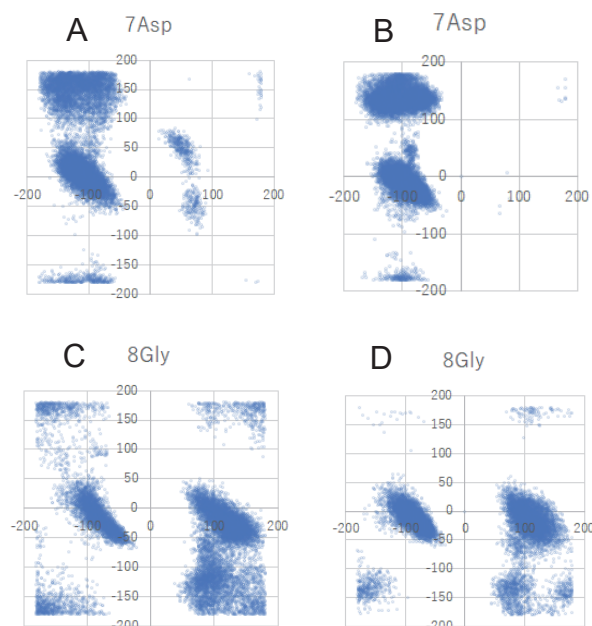


図 2. 2 万個の出力構造の Ramachandran プロット。A と C, 水中。B と D, 距離依存誘電率 ($k=8$)。

*教授 化学教室

Professor, Dept. of Chemistry

**客員教授 工学研究所

Guest Professor, Research Institute of Engineering

3. 逆平行 β シート構造の集積化によるアミロイド形成

アミロイドは、5 残基程度から 200 残基以上まで種々のペプチドやタンパク質の β 構造同士の水素結合によって形成される (図 3). 2 本の β 構造鎖は 0.47 nm の周期間隔で逆平行方向に結合しており (図 4), 各アミノ酸残基の側鎖は順に β 構造シート面の上下に伸びていて、隣接鎖の別の各側鎖と強く相互作用できる距離に位置する. これまでの研究で、各種の変異や特にアミノ酸の D,L 光学活性体の置換を系統的に施す手法により、この隣接鎖間 (図 4 の上下方向に位置する残基間) の側鎖同士は疎水性相互作用によりアミロイド形成に重要な寄与をしていることが明らかになってきた⁽²⁾.

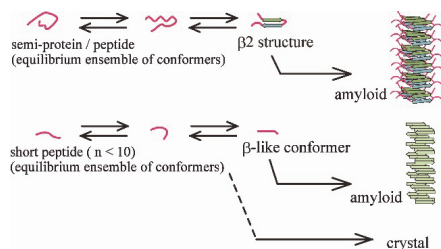


図 3. アミロイド線維形成の基本機構 (推定図)

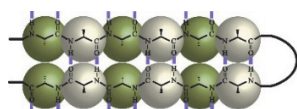


図 4. β 構造分子鎖 2 本からなるシート構造 (球: アミノ酸残基)

各種のアミロイド形成性タンパク質より、アミロイド線維の骨格となる連続 β 構造領域 (アミロイド幹形成領域) に対応するペプチドを合成し、電子顕微鏡像を調べた結果、形成されるアミロイド線維の左ねじれの周期性と線維幅の関係から、 β 構造のシート面間 (図 5, 図 6 右), 残基側鎖間の隣接分子鎖間 (図 6 左) のいずれも側鎖の疎水性相互作用が、アミロイドの分子間配向構造 (高次構造) を決定する主要因であることを明らかにした (β 構造分子鎖の長軸を x 軸, 水素結合による連続 β 構造の線維軸を z 軸, さらにこの β 構造のシートの積層 (スタッキング) 方向を y 軸として表現) ⁽²⁾⁽³⁾.

近年、アミノ酸残基レベルの分解能での構造解析法として、部位特異的に同位体ラベルしたアミロイドの固体 NMR 法による結果が報告されているが、手法自体が「限られた候補構造からの選択」であるために、その構造モデルは確定的ではない. 最近筆者らは、安定同位体ラベルしたアミロイドを IR スペクトル法で解析することにより、アミノ酸残基ごとの構造情報の収集と統合の研究を進めている. 合わせて、電子顕微鏡 (TEM) 像から得られる微細構造の解析を行い、ペプチド分子の集積配列の情報を得ることに成功した. 21 残基のペプチドのリボン状アミロイドのアミロイド線維には細かい 2.7 nm 周期の間隔で縞模様 (表面凹部) が観測される (図 7). y 軸方向のシート間の間隔周期は 1.1 nm (X 線散乱データ) であるので、単純な倍数ではない. そこで前述の疎水性相互作用によるシート間の積層を正確にモデル化した断面図 (図 5) を描くと、可能な 4 種はリボン面の法線方向に対して、 β 構造シート面は 15, 30, 15, 0 度の角度で傾いている. このことから、観測された縞模様は傾き角 30 度に対応するものであることが結論できる (図 5).

さらにはアミノ酸残基間の対合の様子まで確定できる. 別のアミロイド性ペプチドの電子顕微鏡像においては、リボンの破断面 (線) が線維に対して 90 度ではなく、カッターナイフ状に一定角で傾いていることが観測された. この角度から結論できるのは、アミロイド線維の構造単位は 2 枚の β 構造のシートが C2 対称で向き合って積層した構造 (図 8) であるということである. 「2 分子の β 構造のシートからなる C2 対称の構造単位」のモデルは、他の多くの実験データを高い整合性で説明することができる.

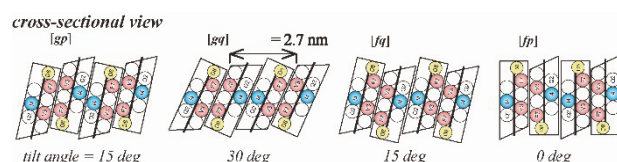


図 5. アミロイド線維の断面におけるアミノ酸残基間相互作用

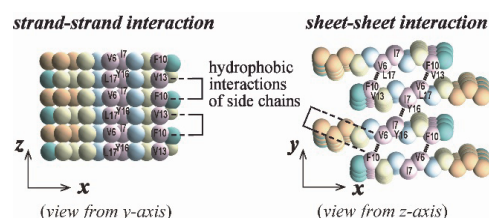


図 6. アミロイド中の疎水性相互作用

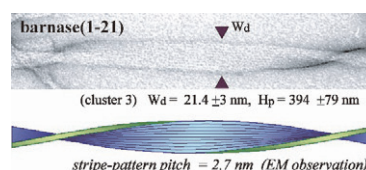


図 7. アミロイド線維の電子顕微鏡像における微細構造

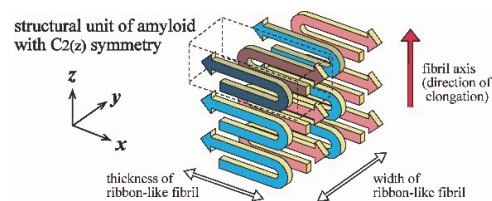


図 8. アミロイド中の分子の集積様式

(1) M. Iwaoka, T. Suzuki, Y. Shoji, K. Ddedachi, T. Shimosato, T. Minezaki, H. Hojo, H. Onuki and H. Hirota, Development of SAAP3D Force Field and the Application to Replica-Exchange Monte Carlo Simulation for Chignolin and C-Peptide, J. Comput. Aided Mol. Design, 31, 1039–1052 (2017).

(2) M. Saiki, Y. Hidaka, M. Nara, and H. Morii, Stem-forming regions that are essential for the amyloidogenesis of prion proteins, Biochemistry, 51, 1566–1576 (2012).

(3) H. Morii, M. Saiki, T. Konakahara, and M. Ishimura, M., Peripheral region for core cross- β plays important role in amyloidogenicity, Biochem. Biophys. Res. Comm., 342, 808–816 (2006).