

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：34419  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2014～2016  
 課題番号：26330341  
 研究課題名(和文) 膜タンパク質複合体予測の為に基盤ソフトウェア開発と疾患関連膜タンパク質への応用  
  
 研究課題名(英文) Development of the program module for the docking between gamma-secretase and APP  
  
 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大きな膜タンパク質と小さな膜タンパク質のドッキングインターフェースを見つけるためのプログラムモジュールの開発を実施した。直接の目的としては膜タンパク質である切断酵素とアミロイド前駆体タンパク質(APP)のドッキングインターフェースを見つけるために作成した。  
 当初の次善策であるNAMDを用いたモジュールを作成した。現在、その公開も考えている。ターゲットとなる切断酵素のシミュレーションを実施し、変異によりそのタンパク質の運動に大きな違いが生じる事がわかった。作成したプログラムモジュールを切断酵素とAPPのドッキングシミュレーションに使用した。現在、詳細な解析を実施中である。

研究成果の概要(英文)：We have developed the program module that is finding the docking interface between large membrane protein and small membrane protein. It is the module in REIN program. We had code it to find the docking interface between a gamma-secretase and a amyloid precursor protein (APP).

We developed a program module using NAMD. We also performed the simulation of a wild type gamma-secretase and a mutant gamma-secretase. The motion of the protein of the mutant was totally different from the wild type. We could get a new insight for gamma-secretase's dynamics. We used the new module for the docking simulation between the gamma-secretase and APP. We are doing more detail analysis now.

研究分野：生体分子シミュレーション

キーワード：分子動力学シミュレーション REMD 膜タンパク質 アルツハイマー病 切断酵素 APP 結合

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は細胞内外を分ける組織である。細胞表面にある生体膜は細胞のインターフェースであり、そこに存在する膜タンパク質の動力学は、細胞動態や疾患の初期過程の鍵となる。得意膜タンパク質間の結合は多くの細胞現象のきっかけとなる非常に重要なプロセスである。ところが膜タンパク質間の結合構造は、生体膜や結合構造自体の揺らぎが大きい為、実験で観測することが難しい。もし、膜タンパク質間(特に膜貫通部位)の結合(配置)予測が簡便にできれば、細胞分化などの細胞動態のきっかけの理解だけでなく、ウイルスによる免疫機構(膜タンパク質)への攻撃の解明や、アルツハイマー病などの疾患信仰の原因の解明など、創薬や医療に幅広く役立つ。

これまでの研究から、一本の膜貫通ヘリックスを持つ膜タンパク質の二量体構造予測の場合には、これまでの申請者らの結果などから温度レプリカ交換法[文献1]やアンブレラサンプリング法などが有効であることがわかって来た。しかし、複数の膜貫通ヘリックスを持つ様な比較的大きな膜貫通領域をもつタンパク質の結合予測を行う際には系が大きい為にサンプリング空間と時間をより多く必要とする。従来 of 計算方法では莫大なリソースを必要とするが、現在、それを解決した方法はない。

そこで本申請課題では、これまでの小規模系での方法を参考に新たな手法を導入し、小さな膜貫通部位を持つタンパク質と比較的大きな膜貫通領域を持つタンパク質をターゲットとした膜タンパク質間結合配置予測の新規手法開発を行う。実証研究として、切断酵素とアミロイド前駆体タンパク質(APP)との結合を想定した、大きな膜貫通部位を持つペプチドペプチターゼ(PSH)[文献2]とAPPとの結合配置予測を実施する。

本研究の背景には、アルツハイマー病の初期分子機構における過程を明らかにしたいという目標がある。特に、その中でも切断酵素とアミロイド前駆体タンパク質の結合形式を知ることが非常に重要となる。

### 2. 研究の目的

(1) 大きな膜貫通領域を持つタンパク質と小さな膜貫通領域を持つタンパク質の結合配置予測法の開発。ハイブリッド・ハミルトニアンを用いて表面電荷を変化させる分子動力学(MD)計算法と多次元レプリカ交換法(MREM)を結合させた新規な方法を提案/開発し、プログラムモジュールを一般公開する。(尚、この方法はハミルトニアン REMDではない)。

(2) 実証研究として研究当初は切断酵素に類似したプリセニリン/シグナルペプチド

ペプチターゼ(SPP)ホモログ(PSH)とAPPとの結合配置予測シミュレーションを実施する予定であった。実験によって複合体構造はまだ解けていないが、結合関連残基などの報告があり検証できる。シミュレーションによる本予測結果はSPPの切断部位選択性のこれまでの理解に新たな見解を与える予定であった。しかし、実際には切断酵素自体の構造が解けた為に、類似タンパク質であるPSHではなく、切断酵素そのもののシミュレーションとAPPとの結合研究を実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 本申請研究ではレプリカ交換法とダイナミクスを用いたシミュレーションを組み合わせた方法を開発する。数多くある分子動力学プログラムの中で、NAMDは、通常 of 全原子モデルシミュレーションだけでなく、ハイブリッドハミルトニアンを用いたシミュレーション(ダイナミクス)などにも対応している。

ダイナミクスを用いたシミュレーションは、2つのハミルトニアンを用意して、カップリングパラメータ( )を1から0の間でゆっくり変化させ、固定した で分子動力学(MD)シミュレーションを実施する方法である。本研究では、以下の手順を持つプログラムの開発を行った。通常 of 電荷パラメータと(結合)膜タンパク質の膜貫通領域表面の側鎖の電荷を0にしたパラメータ間のダイナミクスプログラムを実施(電荷を0にする)、タンパク質を移動(回転)させる。ダイナミクスで電荷を戻す。通常 of アンブレラサンプリングシミュレーション、もしくはREMDシミュレーションを実施する。

ダイナミクスは既にNAMDの機能の一つとして組み込まれており、ユーザ側は電荷用のハイブリッドなトポロジー(パラメータ)と構造を用意すればよい。本課題では申請者が作成したREIN[文献3]と呼ばれる外部分子動力学(MD)シミュレーションプログラムを用いてレプリカ交換シミュレーションを行うことができるプログラムに、NAMDのダイナミクス制御モジュールを追加し、④の手順でNAMDの動作をREIN側で制御できる様にした。

(2) 本来、(1)で作成した手法を用いて、アルツハイマー病の初期分子過程を明らかにしたいというのが目的であったが、当時、切断酵素の立体構造が解けていなかった。そこで、切断酵素に似た構造を持つプリセニリン/シグナルペプチドペプチターゼ(SPP)ホモログ(PSH)[文献2]とアミロイド前駆体タンパク質(APP)の結合配置予測シミュレーションの実施の予定であった。しかし、本研究開始後、切断酵素の立体構造が解けた[文献4]。そこで、本研究ではその切断酵素のダ

イナミクスのシミュレーション研究と、(1)を用いた結合シミュレーションの2つを実施した。

#### 4. 研究成果

本研究では、(1)結合配置予測シミュレーション用のプログラム開発、(2)切断酵素のシミュレーション研究、(3)切断酵素とAPPの結合予測シミュレーションの3つの研究を実施している。

##### (1) 結合配置予測シミュレーション用のプログラム開発

当初、CHARMMと呼ばれるMDシミュレーションプログラムをREINに組み込む予定であったが、異動などで十分な時間が取れなかった為、すでにREINで利用できるNAMDと呼ばれるMDプログラムのダイナミクス機能を使えるようにした。また、研究方法の①～③を実現できるようにした。現在、プログラム公開に向けての作業中である。

##### (2) 切断酵素のシミュレーション研究

アルツハイマー病の機構解明のためにはAPPと切断酵素の相互作用の研究は必須である。切断酵素は4つのモジュールタンパク質からできており、そのプニセニリン(PS)モジュールにAPPが結合することがわかっている[文献4]。しかし、本研究申請及び開始当初、切断酵素の立体構造が解けていなかった為、PSHと呼ばれる古細菌由来の切断酵素のプニセニリン(PS)に近い機能を持ったタンパク質のシミュレーションとそれに対するAPPの結合研究を考えていた。実際、PSHのMDシミュレーションも既に実施した。しかし、本課題開始後、切断酵素の立体構造が解けた為、その切断酵素の野生型と変異型に関するMDシミュレーションを実施した(図1)。

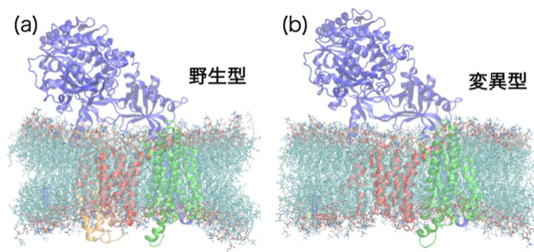


図1: 切断酵素のシミュレーション(a)野生型、(b)変異型

本報告書には切断酵素をPOPC膜に入れて200ns分子動力学シミュレーションを実施した結果のみを記載する。

結果、まず申請段階では本研究で用いる予定であったPSHは切断酵素のPSモジュールと非常に形が似ているという事が過去の論文で報告されていたが、研究開始後に発表された最新の切断酵素の立体構造に関する論文にて、PSHが切断酵素とは大きく異

なっている事がわかった。APP結合部位はPSHの構造の論文に記載されてある位置とは異なっていた。むしろ、切断酵素は4つのモジュールタンパク質からできており、そのモジュールタンパク質がPSの周りにうまく配置されている為、APPの結合部位はほぼ1方向に決まる。また、結合部位も切断部位が決まっている為に、ほぼAPPの向きを決めるだけという状況となる。

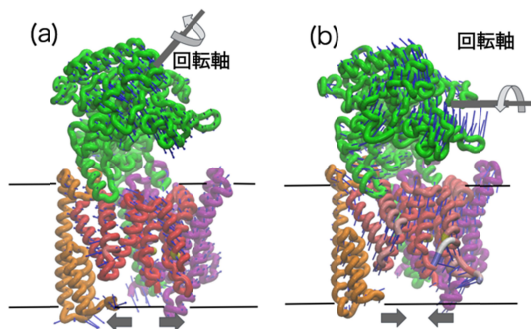


図2: 揺らぎ解析(a)野生型(b)変異型

この切断酵素のシミュレーションから野生型と変異型で揺らぎが大きく異なる事、切断場所にも変化が生じる事がわかった(図2)。即ちニカストリンの運動がアミノ酸変異によって大きく異なる。これがAPPの切断酵素への結合と切断様式の変化に影響すると考えられる。

##### (3) 切断酵素とAPPの結合予測シミュレーション

(2)の切断酵素のシミュレーション結果を踏まえて結合シミュレーションを実施した。(1)で作成したプログラムは動作した。現在細かい修正作業と、クオリティーの高い結果のまとめ作成を実施している段階である。

#### <引用文献>

Sugita, Y., & Okamoto, Y. (1999). Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters*, 314(1-2), 141-151.

Li, X. et al. Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease. *Nature* 493, 56-61 (2013).

Miyashita, N., Re, S., & Sugita, Y. (2014). REIN: Replica-exchange Interface for simulating protein dynamics and function. *International Journal of Quantum Chemistry*, 115(5), 325-332.

Bai, X.-C., Yan, C., Yang, G., Lu, P., Ma, D., Sun, L., et al. (2015). An atomic structure of human  $\gamma$ -secretase. *Nature*, 525(7568), 212-217.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Takaharu Mori, Naoyuki Miyashita, Wonpil Im, Michael Feig, Yuji Sugita, 「Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms」, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1858(7) 1635-1651 2016年, doi:10.1016/j.bbmem.2015.12.032

Naoyuki Miyashita, Suyon Re, Yugi Sugita, 「REIN: Replica-Exchange INterface for Simulating Protein Dynamics and Function」, International Journal of Quantum Chemistry 115(5) 325-332 2015年, doi:10.1002/qua.24785

〔学会発表〕(計13件)

(ポスター) 20aK-PS-52 ペプチドのリンカーによる構造揺らぎの制御, 松井直人, 古江祐也, 宮下尚之, 瀧真清, 渡辺信一, 日本物理学会第72回年次大会, 2017年3月20日 大阪大学(大阪府豊中市)

(招待講演) アルツハイマー病の初期分子機構と分子シミュレーション～治療薬創薬に向けて～, 宮下尚之, 第2回認知症高齢者の生活の質向上のための学術的シンポジウム, 2017年3月1日 近畿大学(大阪府東大阪市)

(招待講演) 生体分子シミュレーションと疾患機構～アルツハイマー病とコレステロール～, 宮下尚之, バイオメクフォーラム21研究会 第81回研究会, 大阪大学基礎工学部シグマホール, 2016年7月9日(大阪府豊中市)

(アウトリーチ・講演) ミクロの世界の認知症～スーパーコンピュータを活用する～, 宮下尚之, 平成28年度第4回近畿大学生物理工学部公開講座、ホテルグランピア和歌山, 2016年6月25日(和歌山県和歌山市)

(招待講演) アルツハイマー病初期機構における脂質と鍵となる膜タンパク質の相互作用, 宮下尚之, 蛋白研セミナー『膜タンパク質の構造ダイナミクス』, 大阪大学蛋白質研究所(大阪府吹田市), 2016年5月12-13日

(口頭発表) コレステロールのアミロイド前駆体タンパク質(APP)二量体形成機構への影響, 宮下尚之, 小串典子, 杉田有治, 日本物理学会 第71回年次大会(2016年), 東北学院大学(宮城県仙台市) 2016年3月21日

(ポスター) コレステロールとアミロイド前駆体タンパク質APPの相互作用, 宮下尚之, 蛋白研セミナー 構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題, 東京大学先端科学研究センター(ENEOSホール)(東京都目黒区), 2016年3月1日

(招待講演) アルツハイマー病の初期分子機構 ～コレステロールとアミロイド前駆

体タンパク質の二量体化～, 宮下尚之, 蛋白研セミナー 構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題, 東京大学先端科学研究センター(ENEOSホール)(東京都目黒区), 2016年3月1日

(招待講演) アルツハイマー病の初期分子機構と分子シミュレーション, 宮下尚之, 第6回計算統計物理学研究会(年会), 名古屋大学(愛知県名古屋市) 2015年11月21日

(ポスター) ガンやアルツハイマー病に係る膜タンパク質の二量体構造予測とラフト環境における構造揺らぎ, 宮下尚之, ～スパコン「京」がひらく科学と社会～ 第2回「京」を中核とする HPCI システム利用研究課題 成果報告会, 日本科学未来館(東京都江東区) 2015年10月26日

(招待講演) 疾患プロセスの詳細を生体分子シミュレーションで理解する～アルツハイマー病の初期過程～, 宮下尚之, 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業『地域・産学連携のためのライフイノベーション拠点形成』第1回成果評価会, 近畿大学生物理工学部(和歌山県紀の川市) 2015年2月27日

(招待講演) 脂質分子とアミロイド前駆体タンパク質(APP)との相互作用とダイナミクス, 宮下尚之, 神戸大学先端融合科学シンポジウム『生体分子のダイナミクスを眺める』, 神戸大学(兵庫県神戸市) 2015年1月19日

(招待講演) TSUBAME を用いた生体分子シミュレーション研究, 宮下尚之, GTC Japan 2014 (nVidia 社), 東京ミッドタウンホール 2014年7月14日(東京都港区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/a/miyashita-lab.net/miyashita-lab/2-research/research-grant-and-commissioned-projects/fy2014-2016-c>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

高地達也 (TAKAJI, Tatsuya)

近畿大学・生物理工学部・4年生