

アミロイド β モノマーと構造安定化剤との結合自由エネルギー評価

日大生産工(院) ○藤井 航洋 吉宗一晃

緒言

アルツハイマー病(AD)は、脳内にアミロイド β_{42} ($A\beta_{42}$) ペプチドが過剰に蓄積し、神経細胞障害や認知機能低下を引き起こす神経変性疾患である。 $A\beta_{42}$ はアミロイド前駆体タンパク質(APP)の切断によって生成され、可溶性モノマーが会合してオリゴマー、線維状アミロイドへと進行する過程で毒性を示すことが報告されている。そのため、凝集初期段階にあるモノマーの構造を安定化させることは、凝集抑制に向けた有効な研究戦略と考えられている。 $A\beta_{42}$ モノマーは構造柔軟性が高く、水溶液中で多様な構造を取りうる不安定な状態にあり、外部分子との結合によって構造安定性がどのように変化するかを解析することは、凝集抑制機構の理解に重要である。ATPは生体内で多様なタンパク質と相互作用し、 $A\beta$ の線維化挙動に影響を与える例が報告されている。¹⁾ また、界面活性剤 Tween-40 は疎水性相互作用を変化させ、タンパク質の会合状態を調整する作用を示すことが確認されている。本研究では、RCSB Protein Data Bank に登録された $A\beta_{42}$ モノマー構造(PDB ID: 1IYT, 1Z0Q, 5AEF, 6SZF, 8AZT, 8BFZ, 8KH2)を用い、AutoDock Vina による分子ドッキング解析を実施した。結合自由エネルギー(binding affinity, kcal/mol)および構造再現性を指標として、ATPとの相互作用を定量的に比較・評価を目的とする。ここで指標として用いる結合自由エネルギーとは、リガンドがリセプターと結合する際に系全体の自由エネルギーがどれだけ低下するかを示す熱力学的尺度である。値がより負であるほど結合は安定であり、相互作用が強いことを意味する。分子ドッキング解析では、この結合自由エネルギーが静電相互作用、水素結合、疎水性相互作用、立体的適合性などの要因を総合的に反映し、リガンドと標的分子との親和性を定量的に比較するための重要な指標となる。

実験方法

本研究では、AutoDock Vina を用いて $A\beta_{42}$ モノマーに対し、ATP の仮想ドッキングを実施した。すべての構造データは RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) より取得し、PyMOL および AutoDockTools を用いて前処理を行った。水分子の除去、極性水素の付加、Gasteiger 電荷の割り当て、柔軟部位の指定を行い、各リガンドの特性に応じて Grid 中心および Box サイズを最適化した。ドッキングは、結合初期状態に変化を与えるためランダムシードを変更しながら各リガンドにつき最大 20 モデルを取得し、構造が過度に歪んだモデルは除外し、binding pocket との相互作用が明瞭なポーズを優先的に評価対象とした。得られた構造モデルについては PyMOL の API を利用して構造情報を抽出し、Python により、数字でも確認を行った。評価項目は結合自由エネルギー、RMSD (構造再現性指標, Å)、リガンド構造の歪み、O-P-O 結合角、 γ リン酸屈曲角 ($P\alpha$ - $P\beta$ - $P\gamma$)、アデニン-リン酸ねじれ角、水素結合および疎水性接触の距離と残基名、ならびにリン酸基(PA, PB, PG)近傍のアミノ酸残基配置である。水素結合および疎水性接触は、原子間距離が 3.5 Å 以下のものを抽出し、関与残基名とともに記録し、すべての定量データは CSV 形式で出力、結合の妥当性、再現性及び構造安定性の三要素を指標として統合的に評価を行い、最も安定かつ現実的な結合モデルを代表として選定した。

実験結果および検討

本研究では、 $A\beta_{42}$ モノマーと ATP のドッキング評価を報告されている。7 種類の $A\beta$ の構造(PDB ID: 1IYT, 1Z0Q, 5AEF, 6SZF, 8AZT, 8BFZ, 8KH2)に対して実施した。各構造に対してそれぞれ 20 モデルを予測し、binding affinity (結合自由エネルギー)、RMSD、O-P-O 結合角、 γ リン酸屈曲角、アデニン-リン酸ねじれ角、水素結合、疎水性接触、および構造の自然さを指標として代表モデルを選定し(Table 1)、各モデルを指標を選定し、評価をした。(Table 2)

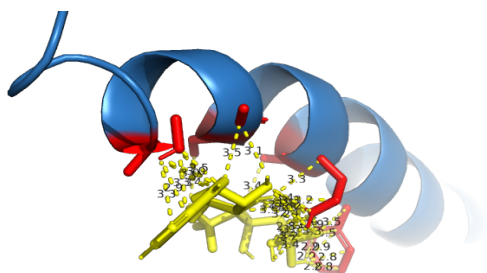
Table 1: A β_{42} -ATP ドッキング代表モデル比較

PDB ID	Model	Binding affinity(kcal/mol)	O-P-O角(°)	γ リン酸屈曲角(°)	ねじれ角(°)	RMSD(Å)	水素結合	疎水性接触
1IYT	5	-9.915	109.4	140.9	117.8	—	MET35-O2B, SER26-O2', ASN27-O1A/O3G など 11 個	59 件
1Z0Q	8	-5.4	112	135.9	126.4	—	GLN15-O3A, LYS16-O1G	—
5AEF	5	-5.3	109.4	140.9	117.8	—	GLN15-O1A/O3A/O1B (11 個)	59 件
6SZF	17	-4.576	109.5	116.5	107.9	—	PHE4, ASP7, TYR10, HIS14, GLN15 (11 個)	複数
8AZT	11	-5.124	109.5	114	104.1	—	LYS16, LEU17 (28 個)	56 件
8BFZ	2	-5.111	109.5	128.7	106.3	—	LEU17-PG 近傍	112 件
8KH2	1	-6.865	109.5	141.9	126.7	0	ARG64, TYR23 (7 個)	6 件

Table 2: 選定に用いた評価基準/判定条件^{2),3)}

優先順位	評価項目	判定条件
①	γ リン酸屈曲角 (P α -P β -P γ)	受理: 110-175° / 良好: 130-170°
②	O-P-O 結合角	受理: 100-115° / 良好: 105-112°
③	アデニン-リン酸ねじれ角	系内分布主峰に基づく (概ね 100-155°)
④	水素結合距離	強結合: ≤ 3.5 Å / 弱結合: 3.5-4.0 Å
⑤	疎水性接触距離	≤ 4.0 Å (PLIP基準)
⑥	リン酸基近傍残基	Lys / Arg / His / 金属中心 ≤ 3.5 Å
⑦	Binding affinity (ΔG)	構造整合性◎の中で比較 (低いほど良)
⑧	RMSD (最大値)	≤ 2.0 Å: 良好 / 2.0-3.0 Å: 許容 / >3.0 Å: 不良

8項目を総合的に判断基準とし、 γ リン酸屈曲角およびO-P-O結合角を最重要指標とした。ATP構造の歪みが最小で自然な立体配座を示すモデルを優先的に採用し、binding affinity (ΔG)は、構造整合性が良好なモデル同士の比較に用いた。1IYTのModel 5ではbinding affinityが-9.915 kcal/molと最も低く、熱力学的に最も安定した結合を示した。O-P-O角(109.4°)および γ リン酸屈曲角(140.9°)は理想的な四面体構造に近く、水素結合はMET35-O2B, SER26-O2', ASN27-O1A/O3Gなど11本、疎水性接触は59件確認された。これらの値は構造的歪みが少ない自然な配置を反映しており、本モデルを代表構造として採用した(Fig. 1)。

Fig. 1: A β_{42} モノマー(1iyt) にドッキングさせたATPの構造 (Model 5)

各構造で共通して ATP のリン酸基に対し GLN15 および LYS16 との水素結合が確認され

た。GLN15 は極性アミド基、LYS16 は正電荷を持ち、ATP の負電荷リン酸基に対して電子的かつ立体的に相補性を有する。また、これらの残基は α -helix 型 A β の表面に位置し、結合部位としてアクセスしやすい。⁵⁾ これらの要素が結合の再現性と妥当性を支持している。なお、本研究では β -sheet 型構造の A β は除外している。これは β 構造が凝集状態で形成され、結合ポケットが閉じていることが多く、構造歪みも生じやすいため、ATP のような分子との現実的な結合が難しいためである。⁵⁾ 以上の理由から、薬剤標的として実用性の高い α -helix 構造に限定した。今後は、ATP に加え Tween-40 や蛇毒由来ペプチドなどの候補リガンドについても同様の解析を進め、*in silico* で得られたモデルを基に ELISA による *in vitro* 評価を行う。

まとめ

本研究では、A β_{42} と ATP の相互作用に関し、構造安定性と結合様式の観点から定量的に検討を行った。特に GLN15 および LYS16 との水素結合は、全構造で共通して観察され、結合合理性の高い指標と判断された。^{2),3)} ドッキングにおいては、構造の自然さや RMSD の再現性も重要な要素であり、単に binding affinity が低いモデルではなく、構造的に破綻のないモデルを代表として採用した。 α -helix 型 A β が標的構造として有効である一方で、 β -sheet 型は構造的閉鎖性ゆえに実用的な結合モデルとして成立しにくいと結論づけられる。⁵⁾ 今後は、ATP 以外の候補分子、特に界面活性剤やペプチド類の結合評価を通じて、A β_{42} の構造制御に有効な分子を探索し、実際に A β_{42} の構造に与える影響を確認する。

参考文献

- 1) Kuramochi, R.; Ishii, H.; Yamada, S. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 1234.
- 2) Sun, Y.; Chen, M.; Zhao, Y. *JAD Rep.* **2021**, *5* (3), 156-168.
- 3) Radwan, T.; Elshenawy, M.; Youssef, M. *PLoS One* **2023**, *18* (7), e0286790.
- 4) Kobayashi, S.; Nakamura, T.; Yagi, M. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425* (22), 4392-4403.
- 5) Sasahara, K.; Okamoto, A.; Fujita, K. *Biophys. J.* **2020**, *119* (9), 1847-1862.