

Award Accounts

第2回 D-アミノ酸学会奨励賞

結合型 D-アミノ酸についての計算機的研究

小田 彰史

金沢大学 医薬保健研究域薬学系、大阪大学 蛋白質研究所

1. はじめに

従来、タンパク質を構築するアミノ酸残基は L-体のみであると考えられてきた。しかし近年タンパク質中に残基として含まれる D-アミノ酸が発見されており、それが白内障やアルツハイマー型認知症など、加齢性変化と関連している可能性があることが指摘されている⁽¹⁾。このような、残基としてタンパク質中に含まれる D-アミノ酸を結合型 D-アミノ酸と呼ぶが、この結合型 D-アミノ酸はこれまでに水晶体中のクリスタリンや脳内のβアミロイドなどから検出されている。これまでに検出されている結合型 D-アミノ酸は主にアスパラギン酸 (Asp) であるが、セリン残基の反転についても観測されている。Asp については D-α-Asp だけではなく、異性化した L-β-Asp および D-β-Asp も検出されており、野生型の L-α-Asp とあわせて 4 種類の異性体が存在していることになる。

これら結合型 D-アミノ酸についての研究は未だ発展中の段階にあり、解明すべき問題が多数残されている。タンパク質中で D-アミノ酸残基がどのように生じたのか、また D-アミノ酸残基が生じることによって何が起こるのか、そして D-アミノ酸残基は体内でどのように処理されていくのか、その全てを解明する必要がある。すなわちタンパク質中での結合型 D-アミノ酸の一生について、「D-アミノ酸はどこから来たのか、D-アミノ酸は何者か、D-アミノ酸はどこへ行くのか」を取り扱わなければならない。このような場合、実際に実験を行うことなく、コンピュータに

よって様々な状況を再現しうる計算化学技術は有力な研究手段となり得る。

自然科学の研究は、従来実験と理論から成り立っていた。実験で得られたデータから普遍的な理論を導き出し、また理論から期待できる現象を実験によって実現するというサイクルで、自然科学は発達してきた。しかし科学の進歩に伴って実験・理論ともに高度に複雑化し、人間が扱うにはあまりにも多すぎるデータの得られる実験や、人間には解釈困難なほど多数の数式を駆使した理論なども珍しくなくなった。その結果、自然科学を扱うための第三の手法として計算の果たす役割が大きくなってきた。すなわち、大量の実験データを計算で処理することで普遍的な傾向を見出したり、複雑な理論を元に数値計算を行うことで現実に起こりうる現象を予測したりといった、理論と実験とを円滑につなぐための役割を計算は果たしている(図 1)。20 世紀後半以降の

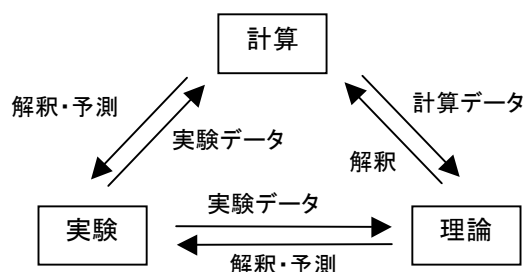


図1 自然科学を扱うための 3 つの手法。実験で得られたデータを理論で解釈したり、新たな現象を予測したりする。計算はその橋渡しとして、データの整理や解釈の手助けを行う。

コンピュータの爆発的な進歩も駆動力となり、自然科学のための計算技術は近年大きく発展しつつある。

本稿では、結合型 D-アミノ酸を研究するに当たって計算化学手法がどのように利用可能であるか、筆者らの研究成果を交えて概説する。

2. 計算化学手法

自然科学に用いられる計算手法は様々であるが、本稿では化学の領域で用いられることの多い計算手法について説明する。

計算化学手法は大きく分けて 2 つに分類することができる。1 つは量子化学計算手法で、これは量子力学を用いて分子・原子の性質を調べるための手法である。Schrödinger 方程式から得られる波動関数を用いることによってあらゆる観測可能量を求めることが可能であるため、実験を一切行うことなく量子化学計算のみによって分子・原子の様々な性質を算出することができる。また運動量の小さい物体ほど量子論効果が無視できないため、分子・原子を構成する要素のうち電子の性質を求めるには量子化学計算が必須となる。

もう 1 つの計算化学手法は分子力学法で、これは古典力学に基づいた計算手法である。すなわち、分子や原子をあたかも通常の(古典力学に従う)物体であるかのように扱って計算を行う。分子力学法では、分子の構造変化がエネルギーに与える影響についてパラメータ化した分子力場を用い、特定の構造の分子がどのようなエネルギーをもつのかを簡便に計算する。従って高速な計算が可能であり、生体高分子のような比較的大きな分子に対しても容易にエネルギーを算出することができる。

量子化学計算と分子力学法には、それぞれ長所と短所が存在する。量子化学計算は上述の通り様々な物理量を求めることが可能で、かつ電子も扱うことができる。一方で分子・原子に対する Schrödinger 方程式を厳密に解くことはほぼ不可能であり、近似を導入したとしても莫大な量の計算コストを要する。生体高分子の量子化学計算を行うための工夫も開発されてはいるものの、溶媒効果の導入

や経時変化の観測などには困難を伴うことが多い。一方の分子力学法では迅速な計算が可能であり、生体内を模した環境中での分子の挙動をシミュレートすることなども可能であるが、一方で古典力学に基づいた手法であるために電子を扱うことが事実上不可能である。分子・原子の性質の多くが電子によって決まるため、分子力学法ではそれら性質を求めることができない。例えば化学反応は分子・原子における電子の移動を伴う現象であるが、分子力学法で化学反応を扱うのは困難である。このようにそれぞれに適用できる限界が存在するため、目的に応じて手法を使い分ける必要がある。

計算化学手法にはこの他にも情報学的な技術を化学に適用したケモインフォマティクス手法も存在し、例えば定量的構造活性相関や drug-likeness など、創薬の分野で利用されている技術などが含まれる。

3. 結合型 D-アミノ酸の計算

3. 1. D-アミノ酸はどこから来たのか

タンパク質中の結合型 D-アミノ酸の起源としては、現在主に非酵素的反応によって生じる機構が調べられている。特に多くの立体反転が観測されている Asp 残基については図 2 のような機構が提唱されている⁽¹⁾。この機構では Asp 残基の側鎖のカルボキシル基が C 端側隣接残基のアミド窒素と結合を形成し、5 員環のスクシンイミド(Suc)構造となる。Suc 構造はケト-エノール互変異性によってエノール型となるが、これによって Asp 残基の不斉炭素がキラルではなくなる。このエノール型がケト型に戻る際、炭素がキラルではなくなっているために L-体だけではなく D-体の Suc が得られることとなる。また、環が開裂する際にどちらのアミド結合が切断されるかによって α -Asp と β -Asp とが生じる。

アミノ酸残基の立体反転は化学反応であり、これを計算によって直接再現しうるのは量子化学計算のみである。量子化学計算手法には分子軌道法、原子価結合法、密度汎関数法(以下 DFT 法)があるが、我々の研究では近年広く使用されている DFT 法を用いた^(2, 3)。DFT 法は波動関数を電子密度の

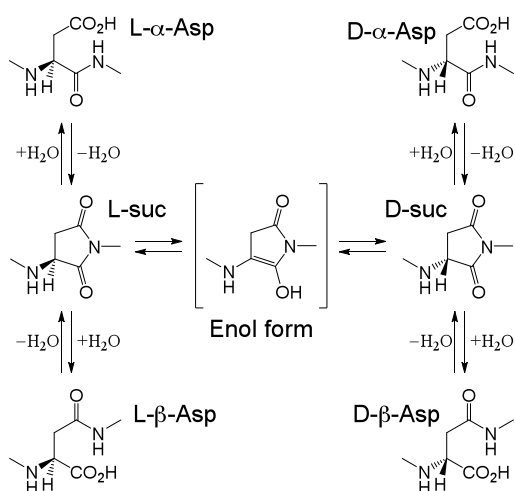


図2 アスパラギン酸の異性化機構

汎関数として表現する方法で、比較的高速に高精度な結果が得られる手法として有機物・無機物問わず様々な物質の計算に用いられている。

Asp 残基が反転する際に、最初に鍵となるのは側鎖の環化である。この反応がどのように進行するかを解明することで、Asp 残基が反転するために必要な条件を求めることができる。この反応はアミド窒素によるカルボキシル基の炭素への求核置換反応として記述される。しかし一般にアミド窒素の求核性は高くはないことが知られており、実際に量子化学計算によって求められた活性化障壁も実験結果と比較して高い値となっている。そこで我々は、アミドが互変異性化によってイミノールとなり、イミノールの窒素が求核攻撃を行う機構を考察した(図3)^(2, 3)。溶媒の水分子が触媒として機能するモデルを作成して DFT 法によって計算を行ったところ、活性化障壁が 30 kcal/mol 以下と実験データをよく再現する値となった。このことから、Asp 残基の反転にはイミ

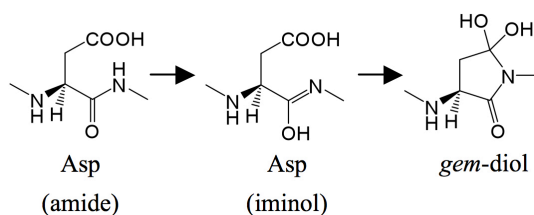


図3 イミノール型構造を経由した環化反応。アミドがイミノールとなることで求核性が増強され、四面体型中間体である gem-ジオール構造へと変化しやすくなる。

ノール体を経由する可能性があること、また水分子が触媒として働きやすい残基が立体反転を起こしやすいことが示唆された。

3. 2. D-アミノ酸は何者か

タンパク質中のアミノ酸が D-体となることで、そのアミノ酸周辺の環境が劇的に変化する。例えば Asp 残基の反転であれば、カルボキシル基を含む側鎖がα水素と入れ替わることを意味するため、かさ高さも周囲の静電ポテンシャルも大きく影響を受ける。この変化はタンパク質全体の立体構造に影響を与え、タンパク質の変性を引き起こすことがある。また、系によってはタンパク質の凝集へとつながることも考えられる。このようにタンパク質中のアミノ酸残基の立体反転は、タンパク質の構造・物性に影響を与える。

タンパク質中の D-アミノ酸残基によって何が引き起こされるかについて計算するには、分子力学法による計算が適している。アミノ酸残基の反転の影響は局所的なものに留まらず、タンパク質全体、ひいては生物個体の老化とも関係している可能性が示唆されており、周辺環境も含めたタンパク質全体の計算を行うことが望ましい。量子化学計算でタンパク質を扱う際にはタンパク質の一部のみをモデル化したり、溶媒の効果を取り入れない、あるいは簡単にしか取り入れなかったりすることがほとんどであるため、大きな系の全体構造を計算するには不適當である。アミノ酸残基の立体反転が構造に与える影響を詳しく調べるため、我々は分子動力学(MD)シミュレーションを行った^(4, 5)。MD シミュレーションはニュートンの運動方程式に基づいて系の挙動をシミュレートする手法であるが、これを用いることで 300 K の条件下でのタンパク質の構造変化を再現することが可能となる。

Asp 残基の立体反転が見られるタンパク質・ペプチドはいくつかあるが、その中で比較的良好に調べられており、かつ短いため計算の容易な系としてβアミロイド(Aβ)が挙げられる。Aβの中でもアルツハイマー型認知症と強く関連していると考えられている Aβ₁₋₄₂には、配列中に 3 つの Asp 残基が存在する(Asp1, Asp7, Asp23)。Sakai-Kato らはこの 3 つの

Asp 残基の全ての組み合わせについて網羅的に立体反転を起こしたペプチドを合成し、その二次構造および凝集性について調べた⁽⁶⁾。A β_{1-42} は通常ランダムコイルの状態であるが、Sakai-Kato らの研究によると Asp23 の立体反転によって A β_{1-42} が β 構造をとりやすくなり、凝集しやすくなると報告されている。そこで我々は Asp23 の立体反転した A β_{1-42} をコンピュータ上で作成し、その立体構造を調査した。

A β_{1-42} のとり得る配座を詳細に再現するため、計算にはレプリカ交換 MD (REMD) 法⁽⁷⁾を用いた。これは高温下でのシミュレーションの効果を取り込み、構造変化を効果的に促進することのできるシミュレーション手法である。269.7 K から 600.0 K までの 16 通りの温度を用いて計算を行ったが、解析には 300 K の結果を用いた。分子力場としては AMBER 力場の ff99SB 力場を用いた。タイムステップは 2 fs、全部で 50 ns のシミュレーションを行い、構造は 1 ps ごとに抽出した。溶媒環境としては一般化 Born 法の GB^{OBC} 法を用いた。REMD の計算には AMBER10⁽⁸⁾を、計算の準備および結果の解析には AmberTools を用いた。

REMD シミュレーションの結果を用いてペプチドの二次構造を評価してみると、全て L-アミノ酸からなるペプチドでは β 含量が 25.8%だったのに対して Asp23 を立体反転させたペプチドでは 34.5%となっており、実験データの示す通り Asp23 の立体反転によって β 構造をとりやすくなっていることがわかる。また、図 4 に示した通り A β_{1-42} の N 端側、C 端側どちらにも β 構造が現れていた。これらの結果は単量体の A β_{1-42} に対するシミュレーションによって得られており、Asp23 の立体反転が A β_{1-42} 単独での配座

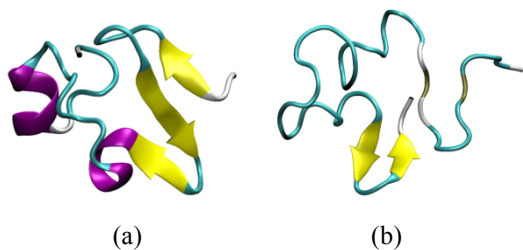


図 4 β 構造を含む配座の例。
(a) N 端側にシートがある構造 (38 ns 時点) (b) C 端側にシートがある構造 (22 ns 時点)。

に影響を与えていることを示している。A β_{1-42} の凝集のメカニズムとして、まず A β_{1-42} の C 端側のヘリックス同士が引き合い、複数の A β_{1-42} が集まった後に β 構造へと変化する機構が提唱されている⁽⁹⁾。その結果さらに多くの A β_{1-42} が凝集し、沈殿へとつながる。しかしこの計算の結果から、Asp23 を立体反転させると単量体のまま(凝集する以前に) β 構造をとりやすくなる可能性が示唆された。すなわち、これら D-Asp を含む A β_{1-42} は野生型とは異なったメカニズムで凝集する可能性があると考えられる。

3. 3. D-アミノ酸はどこへ行くのか

図 2 に示したように、Asp 残基には全部で 4 種類の異性体が存在する。しかしながら生体内では主に L- α -Asp と D- β -Asp の検出量が多く、D- α -Asp と L- β -Asp については比較的少ない量しか検出されていない⁽¹⁾。これを説明する理由の 1 つとして D- α -Asp と L- β -Asp を認識して L- α -Asp へと修復する反応が起こっているのではないかと説が提案されている。そのような反応に関与する酵素として、タンパク質 L-イソアスパラギン酸/D-アスパラギン酸メチルトランスフェラーゼ (PIMT) が挙げられることがある。

PIMT はタンパク質・ペプチド中の D- α -Asp 残基と L- β -Asp 残基を認識し、その側鎖のカルボキシル基をメチルエステル化する酵素である(図 5)⁽¹⁰⁾。メチルエステル化した側鎖は求核攻撃を受けやすくなり、環構造をとりやすくなる。スクシンイミド構造となった後は図 2 の反応が進行するため、4 種の Asp のいずれにもなる可能性がある。すなわち、PIMT によって D- α -Asp と L- β -Asp だけが中間体へと変化し、4 種いずれかの Asp になるため、結果として D- α -Asp と L- β -Asp が消費されて減少していくことになる。

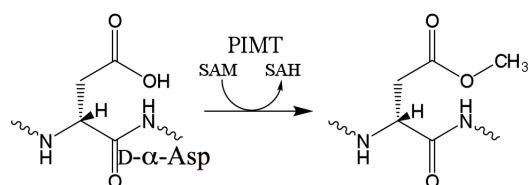


図 5 D- α -Asp 残基に対する PIMT の働き

我々はヒト PIMT が基質を認識する機構についてコンピュータを用いて検討を行った⁽¹¹⁾。その際にはコンピュータによるドッキングで PIMT-基質複合体構造を推定し、さらに MD シミュレーションによって構造緩和を行った。コンピュータによるドッキングはタンパク質とリガンドとの間の相互作用を様々な方法で見積もり、複合体構造や結合親和性を予測する。この際には分子力学法の概念を適用することが多い。我々の研究では PIMT の基質として 6 残基ペプチド VYPDHA を用いた。この 4 番目の Asp 残基に、L- α -Asp、D- α -Asp、L- β -Asp、D- β -Asp のそれぞれを用いた 4 種類のペプチドに対して複合体構造を推定した。このうち D- α -Asp および L- β -Asp を含むペプチドが実際の PIMT の基質であり、L- α -Asp および D- β -Asp を含むペプチドは基質ではない。この両者に差があるかどうかを比較した。ドッキングには Libdock⁽¹²⁾を、MD シミュレーションには AMBER9 を用いた。MD の際の力場にはタンパク質には ff03 力場を、リガンドには GAFF を使用した。タイムステップは 2 fs、全体で 20 ns のシミュレーションを行った。溶媒の水分子として TIP3P モデルを用いてあらわに扱った。

計算の結果、VYP-L- β -Asp-HA ペプチドは PIMT と多数の水素結合を形成することがわかった。VYP-D- β -Asp-HA においては VYP-L- β -Asp-HA と類似した位置および配向で PIMT と結合していたにもかかわらず、いくつかの水素結合が形成されなかった。これは VYP-D- β -Asp-HA ではペプチドの主鎖にねじれが生じているためではないかと考えられる。また、PIMT と VYP-L- β -Asp-HA との複合体構造に対する MD シミュレーションの結果、基質の結合していない状態と比べて PIMT の Pro50 の C γ と Ile212 の C γ 2 が接近することが分かった。この 2 つの残基はペプチド基質の中央から C 端側付近に近接しており、ペプチド基質を挟み込むような動きをしていた。このような induced fit 様のタンパク質の動きは他の複合体構造でも観察されており、比較的大きなペプチド基質を認識するために酵素がどのように構造を変化させているかを推測することができる。

4. おわりに

本稿では、結合型 D-アミノ酸について計算化学手法を用いて解析を行った研究について紹介した。最初に述べたように結合型 D-アミノ酸に関する研究は現在進展中であり、そのような分野においては実際に実験を行うことなく様々な条件下での系の性質を調べることのできる計算技術が有効に働く。またタンパク質中のアミノ酸残基が立体反転を起こすことで凝集してしまう場合など、構造生物学的実験が困難な系に対しても、計算化学手法を用いることでタンパク質の立体構造について検討することが可能となる。このようにして得られた成果をさらに実験へとフィードバックし、理論・実験・計算の各分野が協同して研究を進めることで、結合型 D-アミノ酸について様々な知見を得ることが可能になると期待している。

謝 辞

本研究の一部は科研費(23790137)の助成を受けたものである。

文 献

1. Fujii N, Saito T. 2004. Homochirality and life. *Chem Rec* 4:267-278.
2. Takahashi O, Oda A. 2012. Amide-iminol tautomerization of the C-terminal peptide groups of aspartic acid residues: two-water-assisted mechanism, cyclization from the iminol tautomer leading to the tetrahedral intermediate of succinimide formation, and implication to peptide group hydrogen exchange. In *Tyrosine and Aspartic Acid: Properties, Sources and Health Benefits* ed. JE Jones, DE Morano, pp. 131-147. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Inc.
3. Takahashi O. Just three water molecules can trigger the undesired nonenzymatic reactions of aspartic acid residues: new insight from a quantum-chemical study. *J Phys Conf Ser*, in press.

4. Oda A, Kobayashi K, Takahashi O. 2010. Molecular-dynamics simulations for amyloid β_{1-42} monomer with D-aspartic acid residues using continuous solvent. *Chem Biodivers* 7:1357-1363.
5. Oda A, Kobayashi K, Takahashi O. 2011. Comparison of molecular dynamics simulation methods for amyloid β_{1-42} monomers containing D-aspartic acid residues for predicting retention times in chromatography. *J Chromatogr B* 873:3337-3343.
6. Sakai-Kato K., Naito M., Utsunomiya-Tate N. 2007. Racemization of the amyloid β Asp¹ residue blocks the acceleration of fibril formation caused by racemization of the Asp²³ residue. *Biochem Biophys Res Commun* 364:464-469.
7. Sugita Y, Okamoto Y. 1999. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem Phys Lett* 314: 141-151.
8. Case DA, et al. 2008. *AMBER10*, San Francisco, CA: University of California.
9. Kirkitadze M, Condrón MM, Teplow DB. 2001. Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid β -protein fibrillogenesis. *J Mol Biol* 312:1103-1119.
10. Furuchi T, Homma H. 2007. The role of isomerized protein repair enzyme, PIMT, in cellular functions. *Yakugaku Zasshi* 127:1927-1936.
11. Noji I, Oda A, Kobayashi K, Takahashi O. 2011. Computational investigation of the substrate recognition mechanism of protein D-aspartyl (L-isoaspartyl) O-methyltransferase by docking and molecular dynamics simulation studies and application to interpret size exclusion chromatography data. *J Chromatogr B* 873:3310-3316.
12. Diller DJ, Merz KM. 2001. High throughput docking for library design and library prioritization. *Proteins: Struct Funct Genet*

43:113-124.



小田 彰史 (おだ あきふみ) 氏

略 歴

- | | |
|-----------|--------------------------------------|
| 1991-1995 | 大阪大学理学部化学科 |
| 1995-1997 | 大阪大学大学院理学研究科
無機及び物理化学専攻
博士前期課程 |
| 1997-2000 | 大阪大学大学院理学研究科
化学専攻博士後期課程 |
| 2000-2006 | 富山化学工業株式会社 |
| 2006-2007 | 東北薬科大学薬学部助手 |
| 2007-2011 | 東北薬科大学薬学部助教 |
| 2007-2008 | 大阪大学蛋白質研究所
特任助教 (兼任) |
| 2008-現在 | 大阪大学蛋白質研究所
共同研究員 (兼任) |
| 2011-2012 | 東北薬科大学薬学部講師 |
| 2012-現在 | 金沢大学医薬保健研究域薬学
系准教授 |