

氏 名 山内 仁喬

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2215 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

学位授与の要件 物理科学研究科 構造分子科学  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Development and Application Studies on the  
Generalized-Ensemble Algorithms: Stability and Aggregation  
of Proteins

論文審査委員 主 査 齊藤 真司  
機能分子科学専攻 教授  
奥村 久士  
構造分子科学専攻 准教授  
西村 勝之  
機能分子科学専攻 准教授  
古賀 信康  
構造分子科学専攻 准教授  
岡本 祐幸  
名古屋大学 大学院理学研究科 教授

## 博士論文の要旨

氏 名 山内 仁喬

論文題目 Development and Application Studies on the Generalized-Ensemble Algorithms: Stability and Aggregation of Proteins

蛋白質は自由エネルギー最安定構造に折り畳まることで個々の機能を発現する。一方で、折り畳みに失敗すると凝集体やアミロイド線維を形成する。このような凝集体や線維構造は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に関係していると考えられている。したがって、タンパク質の安定性や、凝集・線維形成過程を理解することは蛋白質科学における基礎的かつ重要な課題である。分子シミュレーションは実験と理論を補完し、原子解像度の描像を明らかにする強力な研究手法である。しかし、蛋白質には多くの自由度があり、また溶媒環境という混雑した状況のため、その自由エネルギー地形は複雑である。これが分子シミュレーションによる効率的な蛋白質の構造探索が妨げられる原因となっている。本博士論文では、以上の課題に立脚した4つの研究課題をまとめている。具体的には、(1) 定温定圧アンサンブルにおけるレプリカ置換法の開発、(2) レプリカ部分置換法の開発、(3) 高圧環境下における小蛋白質シニョリンの構造安定性、(4)  $\alpha$ シヌクレインフラグメントの凝集初期過程、に関する研究を記している。

第一章では、本博士論文の背景である拡張アンサンブル法と、タンパク質の高圧変性、神経変性疾患に関連したタンパク質凝集の先行研究についてまとめている。

第二章では、マルコフ連鎖モンテカルロ法、レプリカ交換法、レプリカ置換法の理論についてまとめている。

第三章では、定温定圧アンサンブルにおけるレプリカ置換法の開発に関する研究を記述している。レプリカ交換法の発展的手法の一つであるレプリカ置換法では、シミュレーション途中で3つ以上のレプリカ間で温度を置換する。このような置換を可能にするために、詳細釣り合い条件ではなく釣り合い条件のみを満たす諏訪・藤堂のアルゴリズムを採用し、パラメータ空間と構造空間の両方で、より効率的な探索を可能とした。しかし、従来のレプリカ置換法ではカノニカルアンサンブルでしか実行することができない。すなわち、体積が一定であり、圧力が制御されていないため、部分モルエンタルピー差や部分モル体積差など、実験で得られる物理量を計算することができなかった。本研究では、定温定圧アンサンブルにおけるレプリカ置換法の理論を定式化し、温度・圧力の2次元空間においてパラメータ置換を実行するアルゴリズムを開発した。パラメータ置換の際に用いる遷移確率計算アルゴリズムによるサンプリング効率の違いを検討するために、メトロポリス法、熱浴法、諏訪・藤堂法を比較した。その結果、諏訪・藤堂法が最も効率的であることを示した。また、パラメータ置換試行におけるサブグループの導入がサンプリング効率に与える影響を検証し、サブグループを導入しない場合が最も効率的であることを示した。さらに、定温定圧レプリカ置換法はレプリカ交換法と比較して、温度・圧力空間、構造空間において効率的な探索を実現していることを示した。

第四章では、レプリカ部分置換法の開発に関する研究を記述している。レプリカ置換法では温度や圧力などのパラメータ入れ替えにレプリカ数の階乗個の置換を考える必要があるため、レプリカ数が多いと置換の実行に時間がかかるようになる。従来のレプリカ置換法では、考えるべき置換の数を抑えるために、レプリカをいくつかのサブグループに分割していた。しかし、このような分割はサンプリング効率を悪化させる。この問題を回避するために、本研究では、置換候補数を抑えるためのアルゴリズムとしてレプリカ部分置換を提案した。部分置換とは、隣接するパラメータ値への遷移のみを含む置換の集合である。まず、レプリカ部分置換法のサンプリング効率は、全置換候補を考えた場合と同程度であることを示した。したがって、サンプリング効率を犠牲にすることなく考えるべき置換候補数を大幅に減らすことに成功した。続いて、多数のレプリカが必要なシミュレーションの場合、レプリカ部分置換法はレプリカ置換法よりも効率的な構造サンプリングを実現し、物理量の見積もりの精度を向上させることを示した。レプリカ部分置換法は、これまで提案されてきたレプリカ交換/置換法の中でも最も効率的にパラメータ・構造空間を探索することができ、より大規模な系への応用を可能としている。

第五章では、定温定圧レプリカ置換法を 10 個のアミノ酸で構成されるシニョリンに適用した結果について記述している。シニョリンは最安定状態としてフォールド構造、準安定状態としてミスフォールド構造を持つことが知られている。フォールド構造、準安定構造はいずれも  $\beta$  ヘアピン構造を持つ。本研究では、定温定圧レプリカ置換法をシニョリンに適用して、300–450K、0.1–500 MPa の温度・圧力における構造探索を実施した。シミュレーションから見積もったシニョリンの変性温度  $T_m$ 、部分モルエンタルピー差  $\Delta H$ 、部分モル体積差  $\Delta V$  はいずれも実験値と良い一致であった。また、これまで実験でもシミュレーションでも見積もることが困難であった定圧比熱差  $\Delta C_p$  の算出にも成功した。本シミュレーションから、高圧環境下でシニョリンのフォールド構造は不安定化するが、ミスフォールド構造は安定化することを発見した。一般にタンパク質の二次構造は高圧環境下で壊れることと、フォールド構造とミスフォールド構造は共に  $\beta$  ヘアピン構造を持つことから、ミスフォールド構造が安定化する現象は自明でない。構造解析の結果、圧力に対する安定性の違いが、Tyr2 と Trp9 のアミノ酸側鎖の配向の違いに起因することを明らかにした。フォールド構造では、 $\beta$  ヘアピン構造の形成に重要な主鎖の水素結合が水分子に露出している。したがって、圧力が高くなり水分子がシニョリンに接近すると、水分子が水素結合を破壊してしまう。一方、ミスフォールド構造では、Tyr2 と Trp9 のアミノ酸側鎖が  $\beta$  ヘアピン構造に重要な水素結合に覆い被さるように配置している。そのため、近接する水分子が水素結合に到達しづらくなっていることを明らかにした。

第六章では、定温定圧レプリカ置換法を  $\alpha$  シヌクレインのフラグメントに適用し、その二量体形成過程に関して記述している。 $\alpha$  シヌクレインは 140 残基のアミノ酸で構成された天然変性蛋白質であり、その凝集体や線維構造はパーキンソン病に関係していると考えられている。その 68–78 残基目は NACore と呼ばれ、 $\alpha$  シヌクレインの線維形成と細胞毒性に重要な領域である。NACore 領域単体でも線維構造を形成することが知られているが、初期過程における分子描像は明らかではなかった。本研究では、水中の 2 本の NACore ペプチドに定温定圧レプリカ置換法を適用し、二量体形成過程を調べた。最初に、ペプチド間の距離を反応座標とした自由エネルギー地形から、二量体構造が安定に存在す

ることを確認した。続いて、各ペプチド間距離について二次構造形成確率を解析した。二量体状態では、分子間反平行 $\beta$ ブリッジが最も存在することを明らかにした。また、二量体形成前駆状態では、ヘリックス構造や $\beta$ ヘアピン構造が安定化されることを見出した。二量体の構造解析から、分子内 $\beta$ ブリッジが形成されていると、分子内 $\beta$ ブリッジを形成しているアミノ酸残基を共有するようにして、分子間 $\beta$ ブリッジが形成されやすいことを明らかにした。この結果は、分子内 $\beta$ ブリッジ形成が分子間 $\beta$ ブリッジ形成を促進することを支持する。しかし、NACore二量体形成過程においては、このような分子内 $\beta$ ブリッジ上に分子間 $\beta$ ブリッジが形成されるよりも、特定の構造を持たないコイル構造残基間で分子間 $\beta$ ブリッジを直接形成する方が実現しやすいことを明らかにした。理由として、NACoreが本来備えている二次構造形成傾向の低さに起因していると考えた。すなわち、二量体形成前駆状態において分子内 $\beta$ ブリッジ構造が安定化するものの、それ以上にコイル構造の存在確率が高いため、結果的に、コイル構造を持つアミノ酸残基間で分子間 $\beta$ ブリッジが直接形成されやすい。本研究で得られた結果と先行研究を基にして、一般のアミロイド形成ペプチドについて、凝集初期段階の分子間 $\beta$ ブリッジ形成過程は、ペプチドの分子内二次構造形成能によって変化することを提案した。

第七章では、以上の研究を総括している。本研究で開発した定温定圧レプリカ置換法とレプリカ部分置換法は、蛋白質構造を効率的に探索し、自由エネルギーなどの物理量計算、蛋白質の安定性の評価、構造変化や凝集過程の解明に強力な手法である。また、本研究で明らかにした、蛋白質の凝集過程や高圧環境下における構造の安定・不安定化機構は、蛋白質科学に基礎的な知見を与える。

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 山内 仁喬

Title  
論文題目 Development and Application Studies on the Generalized-Ensemble Algorithms: Stability and Aggregation of Proteins

蛋白質は自由エネルギー最安定構造に折り畳まることで個々の機能を発現する。一方で、折り畳みに失敗すると凝集体やアミロイド線維を形成する。このような凝集体や線維構造は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に関係していると考えられている。したがって、タンパク質の安定性や、凝集・線維形成過程を理解することは蛋白質科学における基礎的かつ重要な課題である。分子シミュレーションは実験と理論を補完し、原子解像度の描像を明らかにする強力な研究手法である。しかし、蛋白質には多くの自由度があり、また溶媒環境という混雑した状況のため、その自由エネルギー地形は複雑である。これが分子シミュレーションによる効率的な蛋白質の構造探索が妨げられる原因となっている。本博士論文では、以上の課題に立脚した4つの研究課題をまとめている。具体的には、(1) 定温定圧アンサンブルにおけるレプリカ置換法の開発、(2) レプリカ部分置換法の開発、(3) 高圧環境下における小蛋白質シニョリンの構造安定性、(4)  $\alpha$ シヌクレインフラグメントの凝集初期過程、に関する研究を記している。

第一章では、本博士論文の背景である拡張アンサンブル法と、タンパク質の高圧変性、神経変性疾患に関連したタンパク質凝集の先行研究についてまとめている。

第二章では、マルコフ連鎖モンテカルロ法、レプリカ交換法、レプリカ置換法の理論についてまとめている。

第三章では、定温定圧アンサンブルにおけるレプリカ置換法の開発に関する研究を記述している。レプリカ交換法の発展的手法の一つであるレプリカ置換法では、シミュレーション途中で3つ以上のレプリカ間で温度を置換する。このような置換を可能にするために、詳細釣り合い条件ではなく釣り合い条件のみを満たす諏訪・藤堂のアルゴリズムを採用し、パラメータ空間と構造空間の両方で、より効率的な探索を可能とした。しかし、従来のレプリカ置換法ではカノニカルアンサンブルでしか実行することができない。すなわち、体積が一定であり、圧力が制御されていないため、部分モルエンタルピー差や部分モル体積差など、実験で得られる物理量を計算することができなかった。本研究では、定温定圧アンサンブルにおけるレプリカ置換法の理論を定式化し、温度・圧力の2次元空間においてパラメータ置換を実行するアルゴリズムを開発した。パラメータ置換の際に用いる遷移確率計算アルゴリズムによるサンプリング効率の違いを検討するために、メトロポリス法、熱浴法、諏訪・藤堂法を比較した。その結果、諏訪・藤堂法が最も効率的であることを示した。また、パラメータ置換試行におけるサブグループの導入がサンプリング効率に与える影響を検証し、サブグループを導入しない場合が最も効率的であることを示した。さらに、定温定圧レプリカ置換法はレプリカ交換法と比較して、温度・圧力空間、構造空間に

において効率的な探索を実現していることを示した。

第四章では、レプリカ部分置換法の開発に関する研究を記述している。レプリカ置換法では温度や圧力などのパラメータ入れ替えにレプリカ数の階乗個の置換を考える必要があるため、レプリカ数が多いと置換の実行に時間がかかるようになる。従来のレプリカ置換法では、考えるべき置換の数を抑えるために、レプリカをいくつかのサブグループに分割していた。しかし、このような分割はサンプリング効率を悪化させる。この問題を回避するために、本研究では、置換候補数を抑えるためのアルゴリズムとしてレプリカ部分置換を提案した。部分置換とは、隣接するパラメータ値への遷移のみを含む置換の集合である。まず、レプリカ部分置換法のサンプリング効率は、全置換候補を考えた場合と同程度であることを示した。したがって、サンプリング効率を犠牲にすることなく考えるべき置換候補数を大幅に減らすことに成功した。続いて、多数のレプリカが必要なシミュレーションの場合、レプリカ部分置換法はレプリカ置換法よりも効率的な構造サンプリングを実現し、物理量の見積もりの精度を向上させることを示した。レプリカ部分置換法は、これまで提案されてきたレプリカ交換/置換法の中でも最も効率的にパラメータ・構造空間を探索することができ、より大規模な系への応用を可能としている。

第五章では、定温定圧レプリカ置換法を 10 個のアミノ酸で構成されるシニョリンに適用した結果について記述している。シニョリンは最安定状態としてフォールド構造、準安定状態としてミスフォールド構造を持つことが知られている。フォールド構造、準安定構造はいずれも  $\beta$  ヘアピン構造を持つ。本研究では、定温定圧レプリカ置換法をシニョリンに適用して、300–450K、0.1–500 MPa の温度・圧力における構造探索を実施した。シミュレーションから見積もったシニョリンの変性温度  $T_m$ 、部分モルエンタルピー差  $\Delta H$ 、部分モル体積差  $\Delta V$  はいずれも実験値と良い一致であった。また、これまで実験でもシミュレーションでも見積もることが困難であった定圧比熱差  $\Delta C_p$  の算出にも成功した。本シミュレーションから、高圧環境下でシニョリンのフォールド構造は不安定化するが、ミスフォールド構造は安定化することを発見した。一般にタンパク質の二次構造は高圧環境下で壊れることと、フォールド構造とミスフォールド構造は共に  $\beta$  ヘアピン構造を持つことから、ミスフォールド構造が安定化する現象は自明でない。構造解析の結果、圧力に対する安定性の違いが、Tyr2 と Trp9 のアミノ酸側鎖の配向の違いに起因することを明らかにした。フォールド構造では、 $\beta$  ヘアピン構造の形成に重要な主鎖の水素結合が水分子に露出している。したがって、圧力が高くなり水分子がシニョリンに接近すると、水分子が水素結合を破壊してしまう。一方、ミスフォールド構造では、Try2 と Trp9 のアミノ酸側鎖が  $\beta$  ヘアピン構造に重要な水素結合に覆い被さるように配置している。そのため、近接する水分子が水素結合に到達しづらくなっていることを明らかにした。

第六章では、定温定圧レプリカ置換法を  $\alpha$  シヌクレインのフラグメントに適用し、その二量体形成過程に関して記述している。 $\alpha$  シヌクレインは 140 残基のアミノ酸で構成された天然変性蛋白質であり、その凝集体や線維構造はパーキンソン病に関係していると考えられている。その 68–78 残基目は NACore と呼ばれ、 $\alpha$  シヌクレインの線維形成と細胞毒性に重要な領域である。NACore 領域単体でも線維構造を形成することが知られているが、初期過程における分子描像は明らかではなかった。本研究では、水中の 2 本の NACore ペプチドに定温定圧レプリカ置換法を適用し、二量体形成過程を調べた。最初に、

ペプチド間の距離を反応座標とした自由エネルギー地形から、二量体構造が安定に存在することを確認した。続いて、各ペプチド間距離について二次構造形成確率を解析した。二量体状態では、分子間反平行 $\beta$ ブリッジが最も存在することを明らかにした。また、二量体形成前駆状態では、ヘリックス構造や $\beta$ ヘアピン構造が安定化されることを見出した。二量体の構造解析から、分子内 $\beta$ ブリッジが形成されていると、分子内 $\beta$ ブリッジを形成しているアミノ酸残基を共有するようにして、分子間 $\beta$ ブリッジが形成されやすいことを明らかにした。この結果は、分子内 $\beta$ ブリッジ形成が分子間 $\beta$ ブリッジ形成を促進することを支持する。しかし、NACore二量体形成過程においては、このような分子内 $\beta$ ブリッジ上に分子間 $\beta$ ブリッジが形成されるよりも、特定の構造を持たないコイル構造残基間で分子間 $\beta$ ブリッジを直接形成する方が実現しやすいことを明らかにした。理由として、NACoreが本来備えている二次構造形成傾向の低さに起因していると考えた。すなわち、二量体形成前駆状態において分子内 $\beta$ ブリッジ構造が安定化するものの、それ以上にコイル構造の存在確率が高いため、結果的に、コイル構造を持つアミノ酸残基間で分子間 $\beta$ ブリッジが直接形成されやすい。本研究で得られた結果と先行研究を基にして、一般のアミロイド形成ペプチドについて、凝集初期段階の分子間 $\beta$ ブリッジ形成過程は、ペプチドの分子内二次構造形成能によって変化することを提案した。

第七章では、以上の研究を総括している。本研究で開発した定温定圧レプリカ置換法とレプリカ部分置換法は、蛋白質構造を効率的に探索し、自由エネルギーなどの物理量計算、蛋白質の安定性の評価、構造変化や凝集過程の解明に強力な手法である。また、本研究で明らかにした、蛋白質の凝集過程や高圧環境下における構造の安定・不安定化機構は、蛋白質科学に基礎的な知見を与えるものである。

以上の研究成果は、生物物理学の理論的研究手法の発展および蛋白質の構造安定性の理解に大きく貢献するものである。本学位論文の大半は既に2報の査読付き国際学術誌に発表されており、残りの部分も現在査読付き国際学術誌に投稿中である。その内容は国際的にも高い水準を満たしていると評価された。

以上により、本論文は博士(理学)の学位授与に値すると審査員全員一致で判断した。