

氏 名 福原 大輝

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2388 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 日

学位授与の要件 物理科学研究科 構造分子科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Development of calculation methods for proteins and their
application to the inhibition of amyloid- β fragment
aggregation

論文審査委員 主 査 加藤 晃一
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
江原 正博
構造分子科学専攻 教授
岡崎 圭一
機能分子科学専攻 准教授
宮下 尚之
近畿大学 生物理工学部 准教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏 名 福原 大輝

論文題目 Development of calculation methods for proteins and their application to the inhibition of amyloid- β fragment aggregation

タンパク質は折り畳みや変性によって様々な構造を取り得る。アミロイド β ($A\beta$) ペプチドは凝集することで、アミロイド線維を形成する。この線維はアルツハイマー病患者の老人斑に含まれ、神経毒性を引き起こすといわれている。すなわち、タンパク質の構造は生体内の機能に深く関係し、その構造の安定性や凝集過程を調べることは重要な研究課題である。分子動力学 (MD) 法は分子構造を探究するうえで有用な手法の一つである。この手法では、分子を構成する原子の運動方程式を時々刻々と解き、分子の運動や構造変化を調べることが可能である。しかしながら、タンパク質分子に対して、従来の温度を一定とする MD 法を適用すると、分子がある一つの安定構造にとどまってしまう、とり得る様々な構造を十分に探索することができないという問題がある。その問題を解決するために、拡張アンサンブル法が開発されてきた。代表的なものとしてレプリカ交換法が挙げられる。この方法では、異なる温度を割り当てた系のコピー (レプリカ) の計算を複数同時に実行し、その計算途中においてある 2 つのレプリカ間で温度の交換を行う。それぞれのレプリカにおける温度が様々に変化することで、タンパク質の多様な構造をサンプルすることができる。これを発展させた手法であるレプリカ置換法では、諏訪・藤堂法を用いることで 3 つ以上のレプリカ間で温度の置換を行うことが可能になった。また、Replica Exchange with Solute Tempering (REST) 法は、系全体ではなく溶質の温度のみをレプリカ間で交換することができる手法である。このように拡張アンサンブル法が発展してきたが、より大規模な生体分子系の計算を行う際にはいまだ計算コストの問題あり、より効率的な計算手法の開発が望まれる。以上の研究課題を踏まえて、本博士論文の研究目的は以下の三点とする。

(1) レプリカ置換法と REST 法を組み合わせ、Replica Permutation with Solute Tempering (RPST) 法の開発を行う。(2) レプリカ置換法で用いる各レプリカと各温度の組み合わせのリストの改善により、温度変化の効率化を目指す。(3) 開発した手法を $A\beta$ フラグメントとポリフェノールの水溶液系に適用し、 $A\beta$ フラグメントの凝集阻害機構について考察する。

第一章では、本博士論文の研究背景について記述する。上述のタンパク質の構造と機能の関係や、分子動力学法、拡張アンサンブル法について、より詳細に述べている。

第二章では、RPST 法の開発と、従来の手法と比較した結果について述べる。まずは従来の手法であるレプリカ交換法、レプリカ置換法、REST 法について手法の詳細を示す。これらを発展させ、新規手法である RPST 法を提示する。この手法は、3 つ以上のレプリカ間で溶質の温度のみを入れ替えることを可能にした。この手法によって温度空間・構造空間のサンプリング効率をさらに高めることを目指した。次に、 $A\beta$ フラグメント 2 分子を含む水溶液系の計算を行い、従来の手法と RPST 法の結果を比較した。温度変化の効率を表す

ために、レプリカの温度が最高温度と最低温度の間を往復する回数を解析した。RPST 法が従来の手法と比較して最も往復回数が大きく、効率的な温度変化を行うことができるとわかった。次に、構造空間について、2つの A β フラグメントが凝集と離散を繰り返す回数を解析したところ、RPST 法の結果が他の手法を上回るという結果が得られた。RPST 法を用いることで、温度空間と構造空間の両方について最も効率的なサンプリングが可能であることを示した。

第三章では、レプリカ置換法で用いる各レプリカと各温度の組み合わせのリストに着目し、リストの改善による温度変化の効率化に関する研究を記述する。多くのレプリカを用いた RPST 法による計算において、大きなレプリカ番号を持つレプリカで遷移確率が減少するという問題点が見つかった。各レプリカと各温度の組み合わせに対し状態の番号が与えられる。従来のリストの作り方では、温度とレプリカの組み合わせが状態の番号に対して系統的に並べられている。このリストでは、状態番号の遷移に伴って、レプリカ番号が小さいレプリカでは頻繁に温度の入れ替えが行われ、レプリカ番号が大きいレプリカでは温度の入れ替えが起きにくい。その問題を解決するため、状態番号に対して温度とレプリカの組み合わせをランダムに並び替えたリストを用い、RPST 法を行うことを提案する。従来のリストを用いた RPST 法では大きなレプリカ番号の遷移確率が減少し、REST 法の結果を下回っているレプリカも見られた。しかし、改善したリストを用いることで、これらの遷移確率が上昇しすべてのレプリカにおいて REST 法による確率を越えた。本章の方法を用いることで、多くのレプリカ数を用いた RPST 法により効率的な温度空間のサンプルを行うことが可能になった。

第四章では、ポリフェノールによる A β フラグメントの凝集阻害機構についての研究を記述している。ポリフェノールは A β ペプチドの凝集阻害剤として効果があると報告されている。しかしながら、なぜポリフェノールが A β ペプチドの凝集を阻害できるのかはいまだわかっていない。本章では、RPST 法を A β フラグメントとポリフェノールの系に適用して、凝集阻害のメカニズムを明らかにしたいと考えた。A β ペプチドの 16 番目から 22 番目の残基で構成されるフラグメントを用い、ミリセチン、ロスマリン酸の二種類のポリフェノールについて計算を行った。まずは、A β フラグメント間の距離に着目した。ポリフェノールがない系と比較して、ミリセチンやロスマリン酸がある場合、A β 間の距離が近い構造は少なく、距離が遠い構造は多くなっていた。さらに、A β の二次構造の解析を行った。ポリフェノールが含まれていない系では、A β 間の距離が近いときに、分子間反平行 β シートを形成している。ミリセチンやロスマリン酸がいることで、 β シートを形成する残基が減少することがわかった。また、ミリセチンを入れた系で、A β はヘリックス構造をとりやすいことが見られた。これらの結果はポリフェノールが A β フラグメントの凝集を阻害していることを表している。次に、ポリフェノールと A β フラグメントの間の接触確率を解析しその間の相互作用に着目した。ミリセチンはグルタミン酸と親水性の相互作用、フェニルアラニンと疎水性の相互作用をすることが見られた。このような相互作用が A β フラグメントのヘリックス構造形成を誘起し、 β シート構造を作りにくくすると考えられる。ロスマリン酸は、グルタミン酸およびリジンと相互作用することがわかった。すなわち、ロスマリン酸によって A β 同士の親水性相互作用が阻害されるということが考えられた。このように、ミリセチンとロスマリン酸は異なる凝集阻害機構を持っていることが示唆さ

れた。

第五章では、以上の研究を総括している。本博士論文で開発した **RPST** 法は、温度空間、構造空間ともに従来の手法と比較して最も効率よくサンプルできる手法である。さらに、各レプリカと各温度の組み合わせのリストを改善することによってより強力な手法となった。抗体など比較的大きな生体分子系の計算を行う際、従来の方法では多くのレプリカを必要としていたが、**RPST** 法を用いることでより低い計算コストでの計算が期待できる。本博士論文では、**RPST** 法を適用し、ポリフェノールによる $A\beta$ フラグメントの凝集阻害メカニズムについて明らかにした。ポリフェノールが $A\beta$ におけるグルタミン酸、リジンと親水性相互作用、フェニルアラニンと疎水性相互作用をすることによって、 $A\beta$ 間の相互作用を減少させ、凝集阻害を促すことが考えられる。この知見をもとに、アルツハイマー病の治療薬開発に向けたよりよい凝集阻害剤の設計が期待される。

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 福原 大輝Title
論文題目 Development of calculation methods for proteins and their application to the inhibition of amyloid- β fragment aggregation

タンパク質は折り畳みや変性によって様々な構造を取り得る。アミロイド β (A β) ペプチドは凝集することで、アミロイド線維を形成する。この線維はアルツハイマー病患者の老人斑に含まれ、神経毒性を引き起こすといわれている。従って、タンパク質の構造は生体内の機能に深く関係し、その構造の安定性や凝集過程を調べることは重要な研究課題である。分子動力学 (MD) 法は分子構造を探究するうえで有用な手法の一つである。この手法では、分子を構成する原子の運動方程式を時々刻々と解き、分子の運動や構造変化を調べることが可能である。しかしながら、タンパク質分子に対して、従来の温度を一定とする MD 法を適用すると、分子がある一つの安定構造にとどまってしまい、とり得る様々な構造を十分に探索することができないという問題がある。その問題を解決するために、拡張アンサンブル法が開発されてきた。代表的なものとしてレプリカ交換法が挙げられる。この方法では、異なる温度を割り当てた系のコピー (レプリカ) の計算を複数同時に実行し、その計算途中においてある 2 つのレプリカ間で温度の交換を行う。それぞれのレプリカにおける温度が様々に変化することで、タンパク質の多様な構造をサンプルすることができる。これを発展させた手法であるレプリカ置換法では、諏訪・藤堂法を用いることで 3 つ以上のレプリカ間で温度の置換を行うことが可能になった。また、Replica Exchange with Solute Tempering (REST) 法は、系全体ではなく溶質の温度のみをレプリカ間で交換することができる手法である。このように拡張アンサンブル法が発展してきたが、より大規模な生体分子系の計算を行う際にはいまだ計算コストの問題あり、より効率的な計算手法の開発が望まれる。以上の研究課題を踏まえて、出願者は以下の三点を目的に研究を行った。(1)レプリカ置換法と REST 法を組み合わせ、Replica Permutation with Solute Tempering (RPST) 法の開発を行う。(2)レプリカ置換法で用いる各レプリカと各温度の組み合わせのリストの改善により、温度変化の効率化を目指す。(3)開発した手法を A β フラグメントとポリフェノールの水溶液系に適用し、A β フラグメントの凝集阻害機構について考察する。

第一章では、本博士論文の研究背景について記述している。上述のタンパク質の構造と機能の関係や、分子動力学法、拡張アンサンブル法について、詳細に述べている。

第二章では、RPST 法の開発と、従来の手法と比較した結果について述べている。まずは従来の手法であるレプリカ交換法、レプリカ置換法、REST 法について手法の詳細を示す。これらを発展させ、新規手法である RPST 法を提示する。この手法は、3 つ以上のレプリカ間で溶質の温度のみを入れ替えることを可能にした。この手法によって温度空間・構造空間のサンプリング効率をさらに高めることを目指した。次に、A β フラグメント 2

分子を含む水溶液系の計算を行い、従来の手法と RPST 法の結果を比較した。温度変化の効率を表すために、レプリカの温度が最高温度と最低温度の間を往復する回数を解析した。RPST 法が従来の手法と比較して最も往復回数が大きく、効率的な温度変化を行うことができることがわかった。次に、構造空間について、2 つの A β フラグメントが凝集と離散を繰り返す回数を解析したところ、RPST 法の結果が他の手法を上回るという結果が得られた。RPST 法を用いることで、温度空間と構造空間の両方について最も効率的なサンプリングが可能であることを示した。

第三章では、レプリカ置換法で用いる各レプリカと各温度の組み合わせのリストに着目し、リストの改善による温度変化の効率化に関する研究を記述する。多くのレプリカを用いた RPST 法による計算において、大きなレプリカ番号を持つレプリカで遷移確率が減少するという問題点が見つかった。各レプリカと各温度の組み合わせに対し状態の番号が与えられる。従来のリストの作り方では、温度とレプリカの組み合わせが状態の番号に対して系統的に並べられている。このリストでは、状態番号の遷移に伴って、レプリカ番号が小さいレプリカでは頻繁に温度の入れ替えが行われ、レプリカ番号が大きいレプリカでは温度の入れ替えが起きにくい。その問題を解決するため、出願者は状態番号に対して温度とレプリカの組み合わせをランダムに並び替えたリストを用い、RPST 法を行うことを提案している。従来のリストを用いた RPST 法では大きなレプリカ番号の遷移確率が減少し、REST 法の結果を下回っているレプリカも見られた。しかし、改善したリストを用いることで、これらの遷移確率が上昇しすべてのレプリカにおいて REST 法による確率を越えた。本章の方法を用いることで、多くのレプリカ数を用いた RPST 法により効率的な温度空間のサンプルを行うことが可能になった。

第四章では、ポリフェノールによる A β フラグメントの凝集阻害機構についての研究を記述している。ポリフェノールは A β ペプチドの凝集阻害剤として効果があると報告されている。しかしながら、なぜポリフェノールが A β ペプチドの凝集を阻害できるのかはいまだわかっていない。本章では、RPST 法を A β フラグメントとポリフェノールの系に適用して、凝集阻害のメカニズムを明らかにしている。A β ペプチドの 16 番目から 22 番目の残基で構成されるフラグメントを用い、ミリセチン、ロスマリン酸の二種類のポリフェノールについて計算を行った。まず、A β フラグメント間の距離に着目した。ポリフェノールがない系と比較して、ミリセチンやロスマリン酸がある場合、A β 間の距離が近い構造は少なく、距離が遠い構造は多くなっていた。さらに、A β の二次構造の解析を行った。ポリフェノールが含まれていない系では、A β 間の距離が近いときに、分子間反平行 β シートを形成している。ミリセチンやロスマリン酸が相互作用することで、 β シートを形成する残基が減少することがわかった。また、ミリセチンを入れた系で、A β はヘリックス構造をとりやすいことが見られた。これらの結果はポリフェノールが A β フラグメントの凝集を阻害していることを示している。次に、ポリフェノールと A β フラグメントの間の接触確率を解析しその間の相互作用に着目した。ミリセチンはグルタミン酸と親水性の相互作用、フェニルアラニンと疎水性の相互作用をすることが見られた。このような相互作用が A β フラグメントのヘリックス構造形成を誘起し、 β シート構造を形成しにくくすると考えられる。ロスマリン酸は、グルタミン酸およびリジンと相互作用することがわかった。すなわち、ロスマリン酸によって A β 同士の親水性相互作用が阻害されるということが考

えられた。このように、ミリセチンとロスマリン酸は異なる凝集阻害機構を持っていることが示唆された。

第五章では、以上の研究を総括している。本博士論文で開発した **RPST** 法は、温度空間、構造空間ともに従来の手法と比較して最も効率よくサンプルできる手法である。さらに、各レプリカと各温度の組み合わせのリストを改善することによってより強力な手法となった。抗体など比較的大きな生体分子系の計算を行う際、従来の方法では多くのレプリカを必要としていたが、**RPST** 法を用いることでより低い計算コストでの計算が期待できる。また、開発した **RPST** 法を適用し、ポリフェノールによる $A\beta$ フラグメントの凝集阻害メカニズムについて明らかにした。ポリフェノールが $A\beta$ におけるグルタミン酸、リジンと親水性相互作用、フェニルアラニンと疎水性相互作用をすることによって、 $A\beta$ 間の相互作用を減少させ、凝集阻害を促すことが考えられる。この知見をもとに、アルツハイマー病の治療薬開発に向けたよりよい凝集阻害剤の設計が期待される。

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タンパク質およびその凝集体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、残りの部分は現在査読付き国際学術誌に投稿予定である。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。