

氏名（本籍）	山田 寛尚(東京都)
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第101号
学位授与の日付	平成29年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	分子動力学法を用いたラミニン由来ペプチドの構造解析
論文審査委員	(主査) 高須 昌子 教授 小島 正樹 教授 野水 基義 教授 森本 高子 准教授

論文内容の要旨

1. 背景

生体内を構成するオルガネラ，細胞，組織，器官は様々な分子により構成されている．それら分子は静止しているわけではなく，揺いだり，構造変化を起こしている．構造を調べる手法として核磁気共鳴法（NMR）や X 線構造解析があるが，分子の時系列に沿ったダイナミクスを調べることは非常に困難である．これを解決する方法の一つが，分子シミュレーションである．分子シミュレーションを代表する方法の一つに分子動力学法がある．分子動力学法は，分子を構成する原子一つ一つの動きを時系列に沿って追うことで構造の変化を解析することができる．

構造の形や変化は生物活性と関係している．例えば膜貫通タンパク質であるイオンチャンネルは普段閉じているが，イオンを通す時に構造が変化しチャンネルが開く．また，リガンドが特定の受容体に特異的に結合するという性質なども，例として挙げられる．本研究対象となる EF1 ペプチドはラミニンタンパク質より同定された細胞接着活性を持つペプチドであり，その接着活性と構造の関係性が示唆されている．

ラミニンは細胞接着だけでなく，細胞伸展，神経突起伸長，細胞増殖，がんの浸潤・転移，創傷治癒など，様々な生物活性を有している．そのため，ラミニンの機能や作用メカニズムを解明することによる，医薬分野への応用が期待されている．ラミニンは基底膜を構成する成分の一つであり，基底膜の生物学的な活性において重要な役割を果たしていると考えられている．ラミニンに着目した研究は以前から行われており，例として，ラミニン由来ペプチドを用いた人工基底膜の作成が行われている．人工基

底膜は基板上にラミニン由来の接着ペプチドを結合させることにより、基底膜の機能を模倣した膜である。応用例として皮膚移植が挙げられ、移植医療などに利用されることが期待されている。

2. 目的

これまで、ラミニンから多くの細胞接着ペプチドが同定されているが、上述した EF1 ペプチドは $\alpha 2\beta 1$ インテグリンを介した強い細胞接着活性を持っている。EF1 の最小活性配列である sEF1X をジスルフィド結合により環状化した cyc-sEF1Xm の活性は、EF1 の配列の活性と同程度まで増加することが明らかにされた。また、ラミニン内における EF1 配列部位はヘアピン様構造 (β -シート) を持つことが X 線構造解析より明らかとなっている。これらのことから、EF1 の活性は環状構造 (ヘアピン様構造) と関連することが実験的に示唆された。一般に相同性が高い配列ならば、同様の活性を持つ可能性が高いが、EF1 の相同配列である EF2 ペプチドは細胞接着活性を持たないことが示された。本研究では、EF1 および EF2 ペプチドが水溶液中でどのような 2 次構造を形成しているか、EF1 および EF2 の動的な構造の違いを調べるため、分子動力学法シミュレーションによる構造解析を行う。

3. 方法

EF1 ペプチドは細胞接着活性を示し、EF1 の相同配列である EF2 は活性を示さない。本研究ではこの二つのペプチドに着目し、シミュレーションによる構造解析を行った。用いた手法は次の通りである。

- a) EF1, EF2 の最安定構造および水溶液中において取り得る構造を網羅するため、拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換法を用いた計算。
- b) 水溶液中での構造安定性を調べるための等温定圧における分子動力学シミュレーション (2 μ s 実施)。

4. 結果・考察

a) レプリカ交換法を用いた構造解析

EF1 と EF2 の取り得る構造を網羅するためにレプリカ交換法によるシミュレーションを行った。図 1 にレプリカ交換法により得られた 300 K における自由エネルギー地形と底 (グローバルミニマム) 近傍における構造を示す。グローバルミニマム周辺においては EF1, EF2 とともにヘアピン様構造を持つことがわかった。しかし、出現する構造の頻度が高い領域 ($\Delta G < 20$ kJ/mol) は、EF2 の方が EF1 よりも広いことが示された。これにより、EF2 が EF1 と比べ構造に多様性を持つことが明らかとなった。また、出現頻度がより高い領域 ($\Delta G < 2.5$ kJ/mol) では、温度を上昇させても、EF1 ではあまり変化がなく、熱安定性を持つことが示唆された。一方、EF2 では、温度上

昇による広がりが見られ、EF1 と比べ構造が温度上昇に対して不安定であることが予測された。

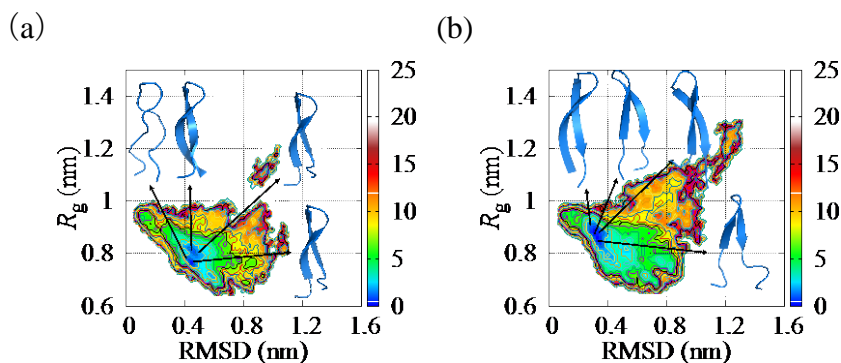


図 1 レプリカ交換法より得られた自由エネルギー地形. (a) はレプリカ交換法により得られた 300 K における EF1 ペプチドの自由エネルギー地形. (b) は EF2 の自由エネルギー地形. 矢印で示されている各構造はグローバルミニマム近傍における構造. カラーバーは自由エネルギー差を示し, 単位は kJ/mol である.

b) 等温定圧における分子動力学シミュレーションによる構造解析

EF1 と EF2 が等温定圧下の水溶液中でどのような振る舞いをするか, 分子動力学シミュレーションを 2 μ s 行った. EF1 および EF2 は折り畳まれたラミニタンパク質内では β -シート構造を持っていることが明らかとなっている. β -シートの主鎖間に形成される水素結合を解析し, 構造の安定性を検証した.

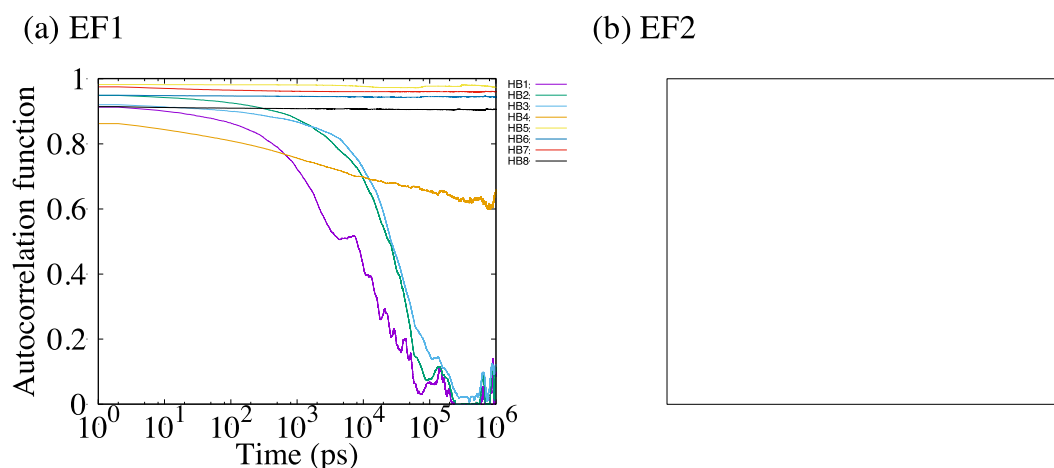


図 2 2 回のシミュレーションにおける平均した水素結合の自己相関関数.

図 2 に水素結合の自己相関関数を示す. 等温定圧下でのシミュレーションは EF1, EF2 共に 2 回ずつ行っており, 図 2 にはその平均値を示してある. また, ここで示す自己相関関数は, 水素結合が時系列に沿って連続で存在するかしないかを判定したものである. EF1 および EF2 は X 線構造解析により決定された構造内において, 水素結合のペア数はともに 8 個存在するが, シミュレーション中, EF1 は 8 個中 5 個,

EF2 は 8 個中 3 個の水素結合を維持していた。水素結合により，EF1 は構造が安定化されていると考えられる。また，EF1 は β -ストランド間に疎水性残基のペアを二つ持っているが，EF2 は一つである。さらに，EF1 は β -ストランド間のターン部位に正電荷残基と負電荷残基を持ちその二つの残基間にイオン結合を持つ可能性がある。これらの非共有結合性相互作用が EF1 の構造の揺らぎを抑え，構造の安定化に寄与しているといえる。

これまで，ラミニン由来ペプチドの構造解析を行ってきた。本研究では，接着ペプチドとして EF1 に着目した。しかし，細胞接着ペプチドは EF1 だけでなく，他にもさまざまな活性配列が見つかった。細胞接着ペプチドには RGD 配列と呼ばれる Arg-Gly-Asp が並んだ共通配列を含むことが多いが，EF1 も含め，RGD 配列を含まない細胞接着ペプチドも多数見つかった。また細胞接着ペプチドには，RGD 配列のほかに，共通する性質があるかもしれない。さらに生体分子は溶液中ではゆらいでおり，形だけでなく動的性質も重要な鍵であると考えられる。本研究において，着目する細胞接着ペプチドは水溶液中でヘアピン様構造を安定して維持し，二次構造としては β -シート構造を形成していた。また，構造の安定化には β -ストランド間の水素結合や疎水性相互作用などの非共有結合性相互作用が重要であることが示された。これらのことから，構造の揺らぎを抑えることが，細胞接着活性において重要であると考えられる。

本研究が医薬品や生体材料といった分野への応用として，各々の研究に大きく貢献するものと期待される。

【研究成果】

- Yamada, H, Mori, S, Miyakawa, T, Morikawa, R., Katagiri, F., Hozumi, K., Kikkawa, Y., Nomizu, M., Takasu, M. Structural study of cell attachment peptide derived from laminin by molecular dynamics simulation. PLoS One. 2016, 11, e0149474.
- Yamada H., Fukuda, M., Miyakawa, T., Morikawa, R., Takasu, M. Conformation analysis of peptides derived from laminin alpha 1-2 chain using molecular dynamics simulation. JPS Conf. Proc., 2014, 1, 016016.

審査結果の要旨

2017年2月3日に山田寛尚氏の博士論文に関して審査を行った。

ラミニンは基底膜を構成するタンパク質であり、細胞接着をはじめ、細胞伸展、神経突起伸張、細胞増殖、がんの浸潤転移など様々な生物活性を持つ。また最近では、iPS細胞の培養における接着基質として注目されている。

山田氏はラミニン由来のペプチドのうち、接着活性を示すペプチドEF1と、アミノ酸配列は似ているが接着活性を示さないペプチドEF2の構造について、シミュレーションの手法を用いて研究した。シミュレーションの方法としては2種類を使っている。1つは、最安定構造および水溶液中においてとることができる構造を網羅するために、拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換法を用いた。もう1つは、水溶液中での構造安定性を調べるために、等温定圧における分子動力学シミュレーションを用いた。

EF1とEF2の慣性半径と根平均二乗変位を用いて自由エネルギー地形を描いた。自由エネルギー最小値付近の領域においてはEF1、EF2ともにヘアピン様構造を持つことがわかった。しかし、出現する構造の頻度が高い領域は、EF2の方がEF1よりも広いことが示された。これにより、EF2がEF1と比べ構造に多様性を持つことが明らかとなった。また、出現頻度がより高い領域では、温度を上昇させても、EF1ではあまり変化がなく、熱安定性を持つことが示唆された。一方、EF2では、温度上昇による広がりが顕著であり、EF1と比べ構造が温度上昇に対して不安定であることが予測される。

また水溶液中における平均の水素結合を比較した。折り畳まれたラミニンタンパク質内のEF1およびEF2に相当する部位では、 β シート構造を持っていることがわかっている。X線構造解析により決定された構造内において、EF1およびEF2に相当する部位には水素結合のペアはともに8個存在するが、シミュレーション中、EF1では8個中5個、EF2では8個中3個の水素結合を維持している。水素結合により、EF1は構造が安定化されていると考えられる。また、EF1は β -ストランド間に疎水性残基のペアを二つ持っているが、EF2は一つである。さらに、EF1は β -ストランド間のターン部位に正電荷残基と負電荷残基を持ち、その二つの残基間にイオン結合を持つ可能性がある。これらの非共有結合性相互作用が β -ストランドの端でEF1の構造の揺らぎを抑え、構造の安定化に寄与している。

本研究は今後、細胞接着活性を持つ新しいペプチド開発に知見を与えることが期待される。この内容は東京薬科大学生命科学研究科の課程博士学位論文として適切であると判断された。

山田氏はこの研究において、計算を行い、実験研究者との議論も重ね、学会などで発表している。また、本研究の内容は山田氏が第1稿を自ら執筆し、筆頭著者とし

て査読付英文論文誌に投稿され、2016年に掲載されている。

山田氏は博士論文の審査における講演および質疑応答において十分な見識を示した。

以上のことから、審査委員全員により、本論文は、課程博士学位論文審査に合格するに値すると判断した。