

# ヒトインスリンミューテーションによる二量体の安定性解析

(東大工<sup>1</sup>、東大生研<sup>2</sup>、東大情基<sup>3</sup>) ○伊藤宏比古<sup>1</sup>、恒川直樹<sup>2</sup>、佐藤文俊<sup>3,2</sup>

## 1. はじめに

インスリンは、直接注射での血糖降下作用をもたらすホルモンである。インスリンの単量体は21残基から成るA鎖と30残基から成るB鎖で構成されており(Fig.1)、単量体の状態で血糖降下作用を発揮する。しかし、製剤中では安定に六量体や二量体を形成するため、投与後に単量体へ解離するのに時間がかかり、糖尿病患者の生活に大幅な制限を設けてしまうことが問題になっている。そのため現在では六量体から単量体への解離時間を変化させたインスリンアナログが開発され、広く用いられている。インスリンは二量体を構成するとき、お互いのB24-B26部が逆平行に並ぶβシート構造を形成しており、この間の水素結合が二量体の安定性に大きく寄与していると考えられている。しかし、超速効型のアナログであるインスリンアスパルトは

B28のProをAspに置換しており、B24-B26部の結合に直接手を加えていない。また、このミューテーションがどのようにインスリンアナログの

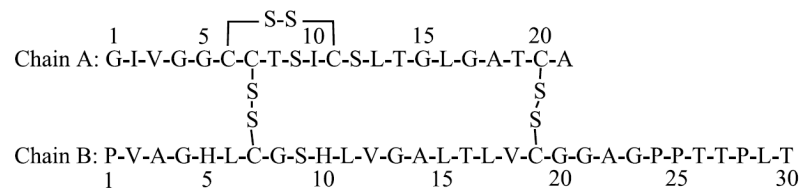


Fig.1 ヒトインスリンの一次構造

解離ダイナミクスに影響を与えているかについては未だに明らかにされていない。そこで、本研究ではより高性能なインスリンアナログの開発につながることを目標として、その解離時間が異なるメカニズムを明らかにすることを目的としている。今までの研究によって、ワイルドタイプとそのアナログの1つであるアスパルトとではβシート間の水素結合に特徴的な差異が見受けられ、アスパルトの水素結合が不安定であることが示されている<sup>1)</sup>。さらに、その水素結合の不安定さにはインスリン単量体内での塩橋が関係していると考えられることが示されている<sup>2)</sup>。しかし、これらのシミュレーションには初期構造依存性などの問題が懸念される。そのため、更なるシミュレーションを行い、この問題を取り除いて解析を行った。本発表では、ミューテーションによる二量体の安定性の変化について新たに解析した結果を報告する。

## 2. シミュレーション手法

ワイルドタイプおよびアスパルトの各インスリン二量体においてMDシミュレーションを実行した。MDシミュレーションにはAMBER<sup>3)</sup>を使用し、PARM03力場を採用した。インスリン二量体と溶媒としてのTIP3P水分子約6600個を直方体の箱に含め、周期境界条件下で、温度300Kおよび圧力1.0atomのNPT一定シミュレーションを実行した。初期構造には、Protein Data Bank(PDB)に登録されているワイルドタイプ(1GUJ)とアスパルト(1ZEH)の二量体の構

造を採用した。まず、二量体を固定した状態で溶媒の水分子のみの部分MDシミュレーションを400ps実行し、溶媒の構造を緩和した。そして二量体の固定を解き、全系でのMDシミュレーションを10ns実行した。同様にダイナミクスの初期構造依存性を調査するため、ワイルドタイプのPDB構造に対してB28残基目のProをAspに変更したワイルドタイプと同じ骨格構造を持つアスパルトを作成し、これを初期構造にしたMDシミュレーションを実行した。

### 3. シミュレーション結果

PDBの登録構造を初期構造としたワイルドタイプとアスパルトのシミュレーション結果を解析した所、両インスリンともこの時間内では解離をせず二量体の構造を維持した。また、構造全体の揺らぎを見積もるためにRMSDを計算したところ、ワイルドタイプの構造の方が大きく揺らいでいた。次に、 $\beta$ シート間で4本の水素結合を形成するB24とB26の窒素原子と酸素原子との距離変遷を調査した。その結果、ワイルドタイプは距離がほとんど変化していなかったが、アスパルトではその距離が大きく変化し水素結合が崩れているものが存在した。このことから、アスパルトはワイルドタイプに比べて、特に $\beta$ シート間の水素結合が不安定であることが示された。また、 $\beta$ シートからB鎖C末端部にかけての塩橋の変遷を調査した所、アスパルトのM1B鎖C末端部がM1A鎖N末端部と塩橋をよく結んでいた。そのため、そのM1内でのイントラな塩橋が $\beta$ シート間の水素結合を阻む作用をしていると考えられる。さらに、アスパルトの水素結合の不安定性が初期構造に依存するかを調べるため、ワイルドタイプから初期構造を作成したアスパルトのシミュレーションでの $\beta$ シート間における水素結合の距離変遷を調査した。その結果、以前のシミュレーションと同じく、距離が大きく変化し、不安定さを示す結合が存在した(Fig.2)。このことから、結果の初期依存性は少ないと考えられる。アスパルトの $\beta$ シート間の水素結合の不安定性にはB28部分のミューテーションが大きく影響していると推察され、観測された水素結合崩壊のダイナミクスはアスパルト特有のものと考えている。より詳細に解析した結果を当日発表する。

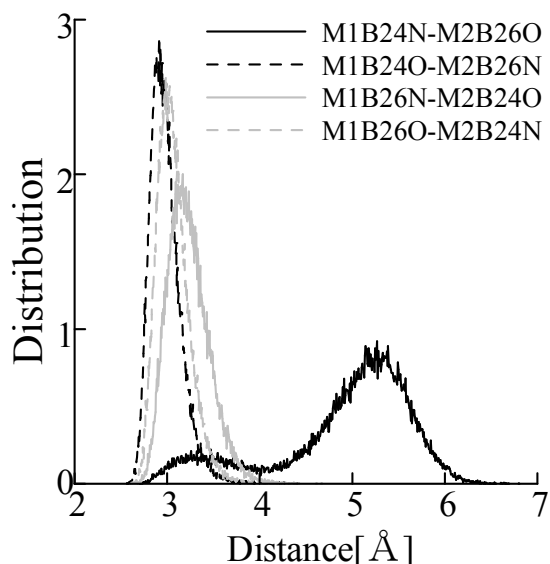


Fig.2 ワイルドタイプの構造から作成したアスパルトの $\beta$ シート間の水素結合長の分布。これらの水素結合はB24とB26の主鎖の窒素原子と酸素原子で構成される。

- 1) 伊藤宏比古, 恒川直樹, 佐藤文俊, 分子シミュレーション討論会, 219P (2006)
- 2) 伊藤宏比古, 恒川直樹, 佐藤文俊, 日本物理学会 2007 年春季大会, 19aTC-1 (2007)
- 3) D.A. Case, et. al., AMBER8, University of California, San Francisco (2004)