

ラマン光学活性によるインスリンアミロイド線維の構造解析

¹阪大院理, ² IOCB・チェコ

○山本茂樹¹, Jiří Kessler², Petr Bouř²

Structural Analysis of Insulin Amyloid Fibril on the Basis of Raman Optical Activity

○Shigeki Yamamoto¹, Jiří Kessler², Petr Bouř²

¹ *Department of Chemistry, Osaka University, Japan*

² *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech*

【Abstract】 Protein folding into insoluble amyloid fibrils is involved in a number of biological processes including neurodegenerative diseases. However, their structures are still difficult to analyze. As a simple model of amyloid-forming proteins, we have studied amyloid fibril of insulin by using Raman optical activity (ROA) to explore its secondary- and tertiary structures. ROA is sensitive to molecular conformation in solutions and applicable to aggregated proteins. We successfully measured ROA spectra of insulin amyloid in a naturing process. To connect the spectra to the protein structures, quantum mechanical simulation of the spectra was applied to both amyloid and native ones, which was achieved by applying a molecular fragment method, the Cartesian coordinate tensor transfer, combined with molecular dynamics simulations. The main changes in the experimental spectra were successfully simulated, which suggests β -roll is the preferred structure of the insulin amyloid.

【序】 不溶性のアミロイド線維の形成は、アルツハイマー病などの神経変性疾患に深く関わる。しかしアミロイド線維の構造解析は依然難しい。ラマン光学活性 (Raman Optical Activity: ROA) は分子の立体配座に鋭敏であり、アミロイド線維のような時間変化するコロイド系にも適用可能である。我々は、インスリンのアミロイド線維が天然状態へ構造変化する過程を ROA により測定した[1]。スペクトルに現れた変化をタンパク質構造と対応させる為に、量子力学スペクトル計算および分子動力学を行った。

タンパク質のように巨大な分子全体の振動スペクトルの量子力学計算は、その計算コストが莫大となり困難である。我々は分子断片化法[2,3]を適用することで、天然状態のインスリンの ROA およびラマンスペクトルの計算を可能とした[4]。分子断片化法においては、巨大分子のモデル構造を小さな分子断片に分割し、断片の力場微分、ラマンおよび ROA テンソル微分テンソルを量子計算し、元のモデルに転写することで、巨大分子全体のスペクトルを得る。断片化の自動化によって、より巨大なタンパク質 (ヒト血清アルブミンなど) のスペクトル計算も可能となった[5]。本研究においては、分子動力学 (Molecular Dynamics, MD) 計算と分子断片化法を組み合わせ、インスリンアミロイド線維の構造揺らぎをスペクトル計算に取り入れた[6]。実験において観測されたスペクトル変化を計算により良く再現することができた。インスリンアミロイド線維は β ロール構造を取ることが示された。

【方法 (実験・理論)】

ウシ膵臓由来インスリン (Sigma-Aldrich) を 100 mg/mL となるよう 0.1M HCl 水溶液に溶かした。pH は 2.5 から 3.1 であった。この溶液を 82 °C において 10-20 分加熱し、アミロイド線維を生成させた。室温 (22 °C) において放置すると、数時間かけてアミロイド線維が天然状態へ変化し、この過程の構造変化を ROA により測定した[1]。

インスリンアミロイド線維のモデル構造として、 β ロールおよび β ヘリックスを検討した (Fig. 1)。 β ロール構造をとるタンパク質 (PDB; 1VH4) の X 線結晶構造の一部 (A256-A306) から、ペプチドのねじれ角 (ϕ, ψ) をインスリン分子に写し、 β ロール構造をとるインスリンモデルを作製した。実験 pH2.5-3.1 に合わせ側鎖をプロトン化し、これを初期構造とした。同様に、 β ヘリックス構造をとるインスリンについても、タンパク質部分 (PDB; 1DAB, A113-A163) のねじれ角を基にモデルを作製した。

タンパク質構造の柔軟さと温度による揺らぎを考慮するために、MD 計算を行った。インスリン単量体または線維状の 3 量体を、水分子の存在下にて計算した (1 ns, 300 K, NVT, Amber03 ff, Amber10)。別に、インスリン単量体を用い、らせん周期境界条件 (単量体間の許容ねじれ角 0-6°) において計算を行った (0.1 ns, NVT, Amber99 ff, Tinker)。

天然およびアミロイド線維のインスリンについて、分子断片化法を用いて ROA およびラマンスペクトルを計算した。4 つのアミノ酸を含む分子断片モデルを作製し、末端をメチル基により保護した。基準振動座標において、 100 cm^{-1} 以下の基準振動モードを固定し、部分的構造最適化を行った。調和近似において力場、ラマンおよび ROA の原子テンソルを計算した。Gaussian09 と B3PW91/6-31++G**/CPCM(water) の理論を用いた。テンソルを元の構造に転写し、後方散乱 ROA およびラマン強度を求めた。

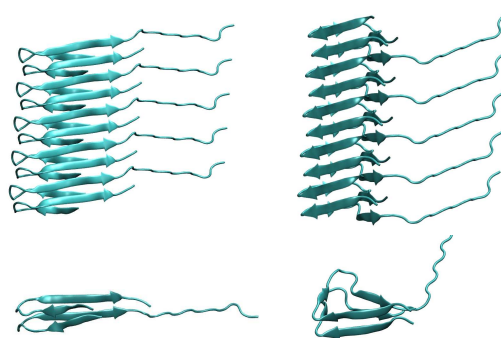


Fig. 1. Model structures of β -roll (left) and β -helix (right) of insulin

【結果・考察】

MD 計算においてインスリン単量体間の相互作用が存在する場合、 β ロール構造は初期の 3 次構造を保ったが、 β ヘリックス構造は保たなかった。このことから、インスリンアミロイド線維内において β ヘリックス構造は不安定であると予想される。

MD 計算から、 β ロール構造をとる 865 個のスナップショットを取り出し、テンソルを転写することで 865 個のスペクトルを計算し、平均化した。天然状態インスリンについても同様に行った。実験 ROA スペクトルにおいて観測された変化 (アミド I バンドの形状および位置変化、拡張アミド III バンドの半値幅の減少、アミド III バンドの高波数シフトと増強、 300 cm^{-1} 以下のバンドの符号変化) を、計算においてよく再現することができた。このことから、モデル構造が妥当だと結論できる。インスリンアミロイド線維は β ロール構造を取ることが示された。

【参考文献】

- [1] S. Yamamoto *et al.* *Chirality*, 24, 97–103, 2012
- [2] P. Bouř *et al.* *J. Comput. Chem.* 18, 646–659, 1997
- [3] S. Yamamoto *et al.* *J. Chem. Theory Comput.* 8, 977–985, 2012
- [4] S. Yamamoto *et al.* *Anal. Chem.*, 84, 2440–2451, 2012
- [5] J. Kessler *et al.* *J. Phys. Chem. Lett.*, 6, 3314–3319, 2015
- [6] J. Kessler *et al.* *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19, 13614–13621, 2017