点変異によるAβ凝集性評価

(明治大学 総合数理学部 現象数理学科)

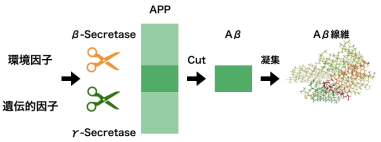
Introduction | Alzheimer病の発症前治療モデル

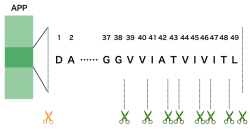
アミロイド仮説に基づく発症のメカニズム

アミロイド仮説: Aβ線維の沈着と同時に神経原線維変化が起こり, 神経細胞死による脳の萎縮が起こるという仮説.

- Aβ産生機構 -

発症は2種類の酵素によるAPPからのAβ切断が起因.





- γ-Secretaseの特異性 -

因子の種類や影響度が γ-Secretaseの切断位置を変化させる.

複数種のAβの凝集による複雑な四次構造の形成が, Alzheimer病の発症前治療を困難にしている原因である.

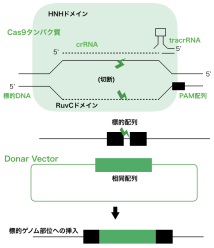
発症前治療の鍵は"Aβの凝集性の緩和"にあり

ゲノム編集技術による遺伝子変異

CRISPR-Cas9技術

編集したいRNA配列(crRNA)をCas9由来のtracrRNAと結合させたgRNAで切断.

挿入したいRNA配列をドナーベクターに結合させ, 切断部位に対して挿入を行う.



[山本 卓, "ゲノム編集入門", 裳華房(2016)]

本研究では, 元のDNA配列から1塩基だけ置換させる**点変異**をCRISPR-Cas9技術の利用により実現するモデルを作成.

点変異による凝集性緩和を目指した治療へ

Purpose | 研究目的と方針

目的 **Aβの凝集性を下げる点変異の特徴を探る.**

手法 **アミノ酸の疎水性と極性に着目し, 点変異後の立体構造の疎水性相互作用を調べることで, 配列と立体構造の両面からAβ凝集性を評価する.**

Method | 研究手法

① 配列解析 点変異による凝集性緩和 → **② 構造構築** 配列から立体構造へ → **③ 機能解析** 立体構造の凝集性評価

①: 凝集性を下げる = 疎水性の低下 & 極性の上昇[1]

疎水性指標: Kyte-Doolittle scale
極性指標: Zimmerman scale
→ 移動平均法による凝集性への各アミノ酸の寄与.

②: SWISS-MODELを用いた構造モデリング

PDBデータの構造を鋳型として, 新規構造を構築する.

③: 疎水性相互作用の低下 = 水のエントロピーの降下[2]

モデリングした構造に対してPDBePISAによる界面解析.

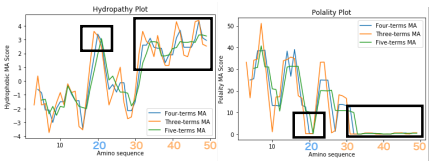
[1]: [川端, "タンパク質配列の分類と機能推定", 近畿大学(2008)]
[2]: [Luhan Zhai, et. al, "Uncovering the Networks of Topological Neighborhood in β-Strand and Amyloid β-Sheet Structures", Scientific Reports(2019)]

Result | 研究結果

① 配列解析の結果

凝集性部位の候補

- **20番周辺**
- **30番以降**

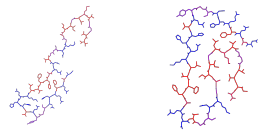


◎ 特定部分への点変異
↓
凝集性が緩和される置換アミノ酸候補の同定.

N末端からの番号	置換前	置換後
17, 34	L	R, Q, H, P, W, S, M, F
18, 36, 39, 40, 44, 46	V	D, E, M, F
19, 20	F	Y, S, C
31, 32	I	R, K, N, S, T, M, F

② 構造モデリング

①-2における点変異後の配列を入力し, Aβをモデリング.



PDB: 6shs.1.G　PDB: 5oqv.1.A

構造モデリング結果

- **Aβ38: 6shs.1.G**
- **Aβ40: 6shs.1.G**
- **Aβ42: 5oqv.1.A**

・点変異の違いが構造に現れない. ←データ不足と点変異の影響の弱さ
・Aβ38とAβ40のモデリング構造が一致. ←配列の短さ

③ 立体機能解析の結果

水のエントロピー($\Delta^s G$)が高い値ほど凝集性が強い.

この性質から立体構造の強い凝集性を持つ部分を特定.

配列解析との比較

・3次構造形成後に出現する凝集性部分(例: 右表の4番)
・C末端領域に強い凝集性
➡点変異で緩和効果が期待.

6shs.1.G

番号	アミノ酸	$\Delta^s G$
35	M	3.28
40	V	2.45
31	I	1.90
19	F	1.81

5oqv.1.A

番号	アミノ酸	$\Delta^s G$
20	P	2.14
4	P	2.05
41	I	2.04
34	L	1.89

凝集性緩和が期待される点変異の特徴を概括的に発見

Conclusion | 本研究の結論

✳ 疎水性と極性に着目した配列解析
- 点変異による凝集性緩和のアミノ酸候補を同定した.

✳ 点変異後の配列の構造モデリング
- PDBデータを鋳型構造としたAβ38, Aβ40, Aβ42の構造モデリングを実践.
- アノテーションデータ不足などの問題からタンパク質ごとの構造の違いが検出不可能.

✳ 疎水性相互作用に着目した立体機能解析
- 構造形成後に新しく出現する凝集性部位を発見.
- 立体構造における強い凝集性部位はC末端に多い.

Future Work | 今後の課題

Aβ43から49に対してPDBデータで表現が難しいため, モチーフ検索による機能解析などの別の手段が必要である.
より正確な構造のモデリングのために鋳型構造に基づかない物理化学計算を組み込んだモデリングが期待される.