

高精度分子シミュレーションに基づく
アミロイド β 単量体及び二量体の安定配座探索
(State-of-the-art molecular simulations on
stable conformations and electronic properties of
amyloid- β monomer and dimer in water)

2015 年 1 月

博士 (工学)

岡本 晃澄

豊橋技術科学大学

高精度分子シミュレーションに基づく アミロイド β 単量体及び二量体の安定配座探索

要旨

アルツハイマー病(AD)は認知症の中で最も多い症状であり、現在、世界中で患者数が激増し、その治療法及び治療薬の開発は、緊急の研究課題である。ADの発症にはアミロイド β タンパク質(A β)の脳内での凝集が関係している。そのため、A β の凝集を抑制する低分子化合物はAD治療薬として有用である。しかし、A β の凝集プロセスは複雑であり、未解明な点が多く、より効果的なA β 凝集抑制薬を開発する際のボトルネックになっている。A β の凝集プロセスを解明するため、これまで多くの実験研究が行われ、A β 単量体やA β 線維の立体構造やその構造的特徴が明らかにされた。これらの研究から得られた情報は、A β 凝集抑制薬を合理的に設計する上で重要な情報である。しかし、A β の凝集プロセスは非常に速く起こるため、二量体などの低次の凝集体については、実験手法のみを用いた高分解能の構造決定は困難であり、その立体構造は明らかにされていない。そのため、分子シミュレーションが様々なA β モデルに対して実行され、立体構造や構造のダイナミクスに関する重要な情報を得ている。分子シミュレーションを用いた従来の理論研究は、A β 単量体及び二量体の様々な安定配座を明らかにした。しかし、これらの研究では分子力場が用いられており、安定配座の電子状態、安定配座の中の最安定配座、及び単量体内あるいは単量体間のアミノ酸間相互作用は、電子レベルでは未解明である。また、A β の周囲に存在する水分子がA β の安定性に与える影響は、明確にされていない。

本研究では、A β の凝集プロセスの初期ステップを解明するため、水分子を顕わに考慮した全原子レプリカ交換分子動力学シミュレーションにより、A β 単量体及び二量体の水中での安定配座を広範囲に探索した。さらに、*ab initio*フラグメント分子軌道(FMO)計算を用い、得られた安定配座の中から、単量体あるいは二量体の最安定配座を高精度に決定した。その際、A β の周囲に存在する水分子を考慮することにより、水分子がA β 構造の安定性に与える影響を明らかにした。また、*ab initio* FMO計算を用いることにより、A β 単量体内、あるいは単量体間の特異的相互作用を高精度に評価し、単量体あるいは二量体の構造が安定する上で、どのアミノ酸間の相互作用が重要であることを明らかにした。その結果、A β 単量体及び二量体の水和構造の相対的な安定性は、周囲に存在する水分子同士の凝集による安定性に、強く依存することを初めて明らかにした。従って、A β の最安定配座の決定において、周囲に存在する水和水を顕わに考慮する必要性が、本研究から明らかになった。また、最安定配座の安定には、主に、A β に

含まれる荷電アミノ酸間の強い引力相互作用が重要であり、特に、Lys16 と N 末端配列に含まれる負荷電アミノ酸（Glu3 及び Asp7）間の静電引力相互作用が、A β 二量体の安定化において重要であることを解明した。本研究により得られた知見は、AD 発症の初期段階で生じる A β の二量体形成を阻害する低分子化合物を設計する上で、非常に有用になると考える。

State-of-the-art molecular simulations on stable conformations and electronic properties of amyloid- β monomer and dimer in water

Akisumi Okamoto

Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology

Jan 2015

ABSTRACT

Amyloid β -peptides (A β s) play a key role in pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). The aggregation of A β s appears to be one of the first steps in the pathogenic process of amyloidosis that is not associated with some natural biological function. Consequently, it is expected that the inhibition of A β aggregations is an attractive therapeutic strategy for the treatment of AD. Breaking A β aggregates down by non-peptide or peptide inhibitors seems to be a promising way to combat AD. To that aim, it is crucial to understand the conformational and dynamic behaviors of A β aggregates in order to rationally design a putative AD drug. Moreover, the conformational analysis and the investigation of the structure of A β aggregates might lead to a more profound understanding of the primary pathogenesis of AD and comprehension of the development at the molecular level of this dramatic disease.

The 3D structure of the amyloid oligomers and fibrils is a focus of interest both for a molecular understanding of amyloidogenesis and for the development of innovative therapeutic and diagnostic approaches. Solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) studies have contributed substantially to the understanding of amyloid fibrils. However, only a few 3D structures of amyloid fibrils have been determined, owing in part to the non-crystalline and insoluble of the fibrils. This fact makes these structures difficult to be analyzed by established structural techniques such as X-ray crystallography or solution-state NMR. Moreover, due to the fast rate of A β aggregations, a high resolution structural determination of these early-stage A β aggregates such as a dimer is extremely difficult. In this aspect, molecular simulations provide a very powerful tool to derive valuable information regarding the secondary structures of A β aggregates. In the past few years, a variety of simulation techniques have been successfully applied to investigate the structures and dynamics of the selected small fragments and full-length A β s. In particular, replica exchange molecular dynamics (REMD) simulations obtained a variety of conformations of solvated A β s, which are comparable to the experimental structures. The idea of evaluating their electronic properties by *ab initio* molecular orbital (MO) method and

determining the most stable conformation of A β at an electronic level is worthy of consideration, since the previous REMD studies have not considered their electronic properties. Furthermore, the influence of solvating water molecules exist around A β on the stabilization of solvated A β conformations has not elucidated by the majority of the studies mentioned above.

In the present study, we performed REMD simulations with all-atom force field to obtain various conformations of full-length A β monomer and dimer in explicit water and determined the most stable conformation of the solvated A β monomer and dimer by *ab initio* fragment MO (FMO) calculations, in order to investigation the first step in the aggregation of A β s. In our present FMO calculations, by considering water molecules explicitly, we attempted to elucidate the influence of solvating water molecules on the stabilization of the A β monomer and dimer conformations. In addition, we investigated the specific interactions between amino acid residues of A β s by the inter-fragment interaction energy analysis of the FMO method at an electronic level, in order to highlight the important residues of A β for stabilization of the A β monomer and dimer.

The results showed that the relative stability of the solvated A β monomer is more dependent on the stability of the solvating water molecules around A β than that of A β itself. A similar tendency was seen in the relative stability of the solvated A β dimer. Consequently, it is concluded that the solvating water molecules should be considered explicitly for determining the most stable conformation of the solvated A β monomer and dimer. The most stable conformation of the solvated A β monomer has the turn-like structure in the Phe20–Ala30 region, being consistent with the previous studies. The present FMO calculations elucidated that the electrostatic interactions between the positively charged amino acid residue Lys28 and its neighboring residues are important for stabilizing the turn-like structure. On the other hand, in the most stable conformation of the solvated A β dimer, two inter-monomer parallel β -sheets and one intra-monomer β -hairpin structures are formed. We also found that the attractive interactions between Lys16 and the negatively charged residues of the N-terminal of A β contribute mainly to the stabilizing in the most stable conformation of the solvated A β dimer. Consequently, in the present molecular simulations elucidated that the electrostatic interactions between the charged amino acid residues of A β contribute mainly to the stabilization of the conformation of A β monomer and dimer.

In summary, the present study provides detailed information regarding the conformations of A β monomer and dimer, and the specific interactions between amino acid residues of A β . This information will be a quite helpful in rationally designing inhibitors for preventing the A β s aggregation.

[目次]

第 1 章 序論	1
1.1. 研究背景	1
1.1.1. アルツハイマー病とアミロイド β タンパク質	1
1.1.2. $A\beta$ に対する実験研究	4
1.1.3. $A\beta$ に対する理論研究	7
1.1.4. $A\beta$ の凝集プロセス	10
1.2. 従来 of 理論研究の課題	12
1.3. 研究目的と意義	14
第 2 章 計算対象	15
2.1. $A\beta$ 単量体の溶液 NMR 構造	15
2.2. $A\beta$ 多量体の固体 NMR 構造	16
第 3 章 計算手順	21
3.1. $A\beta(1-42)$ 単量体及び二量体の初期構造の作成	21
3.2. $A\beta$ の水和構造の作成及び構造緩和	23
3.3. 水和した $A\beta$ の安定配座探索	24
3.4. 水和した $A\beta$ の最安定配座の決定	26
第 4 章 計算結果と考察	29
4.1. 水和した $A\beta$ 単量体に対する計算結果	29
4.1.1. REMD 及び MM 法により得られた代表構造の最適化構造	29
4.1.2. <i>Ab initio</i> FMO 法による最安定配座の決定	34
4.1.3. 最安定配座における単量体内の特異的相互作用	38
4.1.4. 計算結果の妥当性の検証：先行研究との比較	44
4.1.5. まとめ：水和した $A\beta$ 単量体の最安定配座の特徴	46
4.2. 水和した $A\beta$ 二量体に対する計算結果	47
4.2.1. 全長の $A\beta$ 二量体の初期構造の作成	47
4.2.2. REMD 及び MM 法により得られた代表構造の最適化構造	49
4.2.3. <i>Ab initio</i> FMO 法による最安定配座の決定	54
4.2.4. 最安定配座における単量体間の特異的相互作用	58
4.2.5. $A\beta$ の二量体形成を抑制する低分子に対する考察	65

4.2.6. まとめ：水和した $A\beta$ 二量体の最安定配座の特徴	66
第 5 章 結論	67
謝辞	69
参考文献	71
附録 A. 水和した $A\beta$ 二量体における水和水の構造	83
附録 A.1. FMO 計算の際に考慮する水和水の選択範囲の決定方法	83
附録 A.2. 水和水の揺らぎを考慮した相対的な安定性の解析	84
附録 B. 本論文の基礎となる研究成果	91
附録 B.1. 査読付き学術雑誌に発表した論文	91
附録 B.2. 国際会議における発表（第一著者のみ）	92
附録 B.3. 国内学会における発表（第一著者のみ）	93

第1章 序論

1.1. 研究背景

1.1.1. アルツハイマー病とアミロイド β タンパク質

タンパク質は、生命を担う最も重要な物質のひとつであり、また、その生化学的機能の発現には、固有の立体構造の形成（フォールディング）が必須である (Figure 1^[1])。しかし、近年、多くのタンパク質がフォールディングの変化（ミスフォールディング）により、凝集体を形成することが明らかになってきた。ヒトの脳機能において、タンパク質のミスフォールディングは劇的な影響をもたらし、その結果として、深刻な脳の病気を引き起こす。実際に、タンパク質の凝集が発病に関わる例が多数報告されている。例えば、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD)、ハンチントン病 (Huntington's disease)、クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jacob disease) のようなプリオン病 (Prion disease)、そして II 型糖尿病 (type II diabetes) など、神経変性疾患に多く^[2-4]、特に、AD は現代の高齢化社会における深刻な社会問題となっている。最も広く研究されている AD は、大脳皮質表面上の老人斑、及び細胞内の神経原線維変化により特徴づけられる神経変性疾患^[5-8]である。様々な実験データ^[6, 9-13]から、アミロイド β タンパク質 (Amyloid β -protein, A β) が老人斑の主な構成要素であることが示された。A β は、 β -及び γ -セクレターゼ酵素によるアミロイド前駆体タンパク質の分解を介して生成される脳内の天然由来のペプチドである^[14-16] (Figure 2)。また、A β は、二量体からアミロイド線維形成まで、いくつかの異なる凝集体を形成し、自己組織化することが実証されている^[17-24]。生体内で豊富に生成される A β には、それぞれ 40、42 個のアミノ酸残基を含む A β (1-40) 及び A β (1-42) が存在し、後者は、老人斑の主要原因であることが観測されている^[25-28]。また、試験管内において、A β (1-42) は A β (1-40) よりもアミロイド線維を形成する傾向が劇的に増加する^[29-32]。A β (1-40) と A β (1-42) は、以下に示すアミノ酸配列では、C 末端配列の 2 つの疎水性アミノ酸残基の有無による違いだけであるが、それらの凝集能において、その僅かな差は明確な違いを持つ要因となることが知られている。

A β (1-42) のアミノ酸配列

N-terminal

C-terminal

D₁AEFRHDSGY₁₀EVHHQKLVFF₂₀AEDVGSNKGKGA₃₀IIGLMVGGVV₄₀IA₄₂

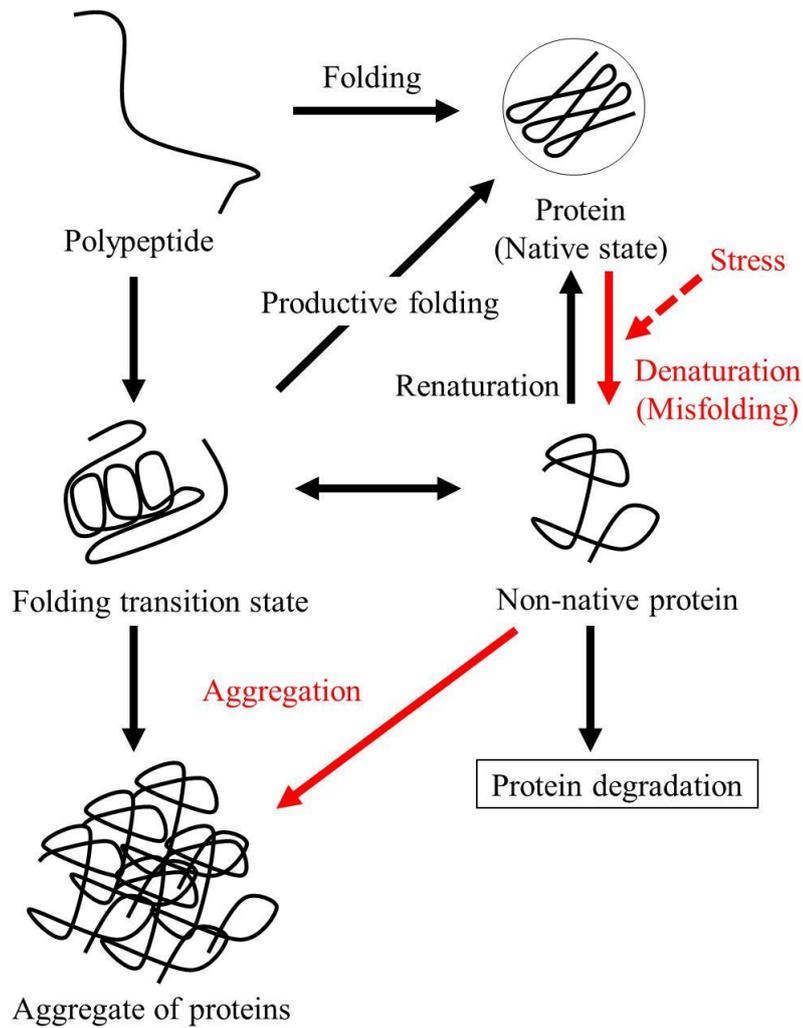


Figure 1. Schematic model for folding, misfolding and aggregation of protein.^[1]

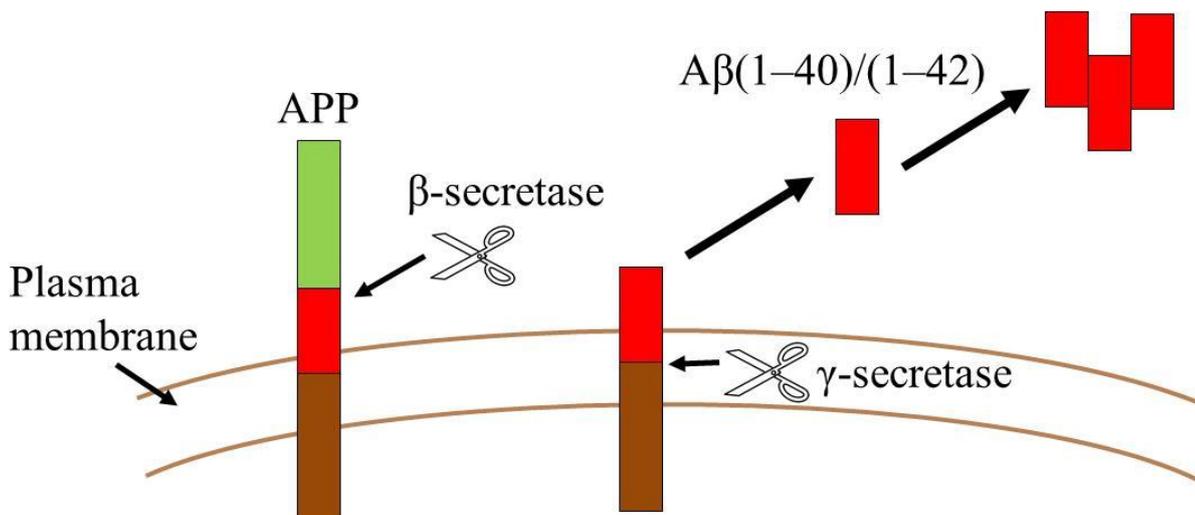


Figure 2. Schematic picture for Aβ production through the proteolytic cleavage of amyloid precursor protein (APP) by β- and γ-secretase enzymes.

様々な分野の研究^[7, 33, 34]は、脳内の A β の異常な蓄積が AD 発症に特徴的な神経病理学的カスケードを引き起こすことを実証した。ミネソタ大学の Lesne ら^[35]は、中齢（生後 6~14 ヶ月）の遺伝子操作された AD モデルマウスにおける記憶障害が、12 量体の A β (1-42)可溶性凝集体（オリゴマー）の細胞外蓄積によるものであることを明らかにした。老人斑の沈着は、本来、AD の初期段階であると考えられていた^[7]が、今日では、A β オリゴマーがシナプス、及び認知機能障害の直接的なエフェクターであると示されている^[14]。アメリカ国立衛生研究所の Petkova ら^[36]は、異なる形態と毒性を持つアミロイド線維の形成を報告し、A β のオリゴマー形成は線維成長と異なる経路を介して進行することを示唆した。また、近年の *in vivo* 実験^[37-39]は、A β オリゴマーは線維よりも神経細胞に対する毒性が強いことを明らかにした。さらに、A β オリゴマーは、新種の線維を成長させる核としての役割を持つことが解明されている^[40, 41]。A β オリゴマーが神経細胞毒性を示すのは明らかであるが、依然として、オリゴマーが神経毒性を示す正確なメカニズムは未解明^[42]である。オリゴマーを含む A β 凝集体の毒性機構は、酸化ストレス、金属結合、フリーラジカル^[43]、あるいはイオンチャネル形成^[44]と関係していると考えられている。また、タウオパチーや神経変性のような、A β 蓄積に続く AD の顕著なプロセスの根本的なメカニズムは、依存として不明である^[34, 45]。近年、放射線医学総合研究所の樋口ら^[46]により、カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインが、AD の A β 蓄積に伴う神経細胞傷害を促進するのみならず、A β 蓄積自体も促進させることを明らかにした。樋口らが解明した新たな AD 発症メカニズムにおける A β 蓄積とカルパイン活性化の悪循環メカニズムの概略図を Figure 3 に示す。A β やタウタンパク質のようなアミロイド生成性分子の過多は、細胞内のカルシウム濃度を上昇させ^[47-51]、脳内のカルシウムの乱れを引き起こす。その結果、カルパインが活性化し、 α スペクトリをはじめとする細胞骨格タンパク質が切断され、シナプスの構造が崩壊する。カルパインがシナプスの正常な構造と機能を乱した結果、A β を分解する酵素であるネプリライシンが減少し、A β の増加や蓄積が促進される。それにより、カルシウムの乱れが強まり、カルパインがさらに活性化される。従って、A β の蓄積とカルパイン活性化の間には、相互促進の関係があると考えられ、カルパイン阻害剤は神経細胞傷害の治療薬は、AD の根本的な治療につながる薬剤となり得ることが示された。

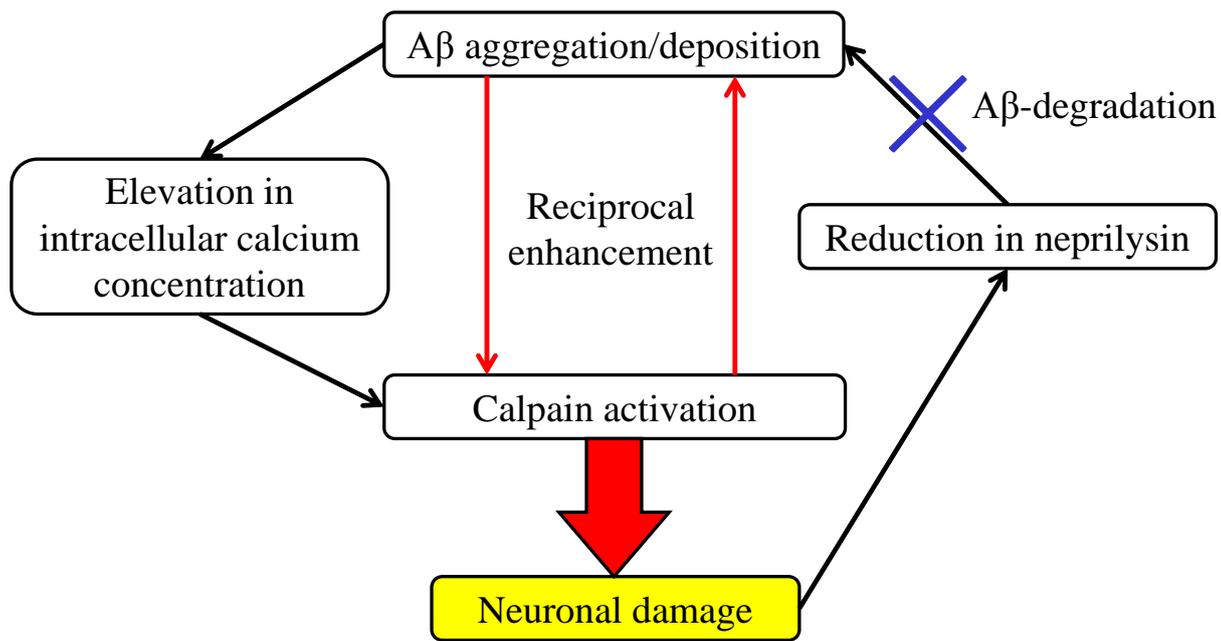


Figure 3. Schematic picture for the role of calpain on AD pathology elucidated by Higuchi et al.^[46]

1.1.2. A β に対する実験研究

A β の凝集は AD の発症プロセスにおける第一段階であると考えられているため、AD 治療に対する有効な治療戦略のひとつとして、その抑制が挙げられる^[52]。A β の凝集の阻害、あるいは凝集体の分解は、AD 治療に対する有望な手段である^[53]。従って、A β に結合し、その凝集を阻害できる低分子化合物は、AD の治療薬の候補として有用であると考えられる。AD 治療の候補薬を合理的に設計するため、A β 凝集体の立体配座、及び構造のダイナミクスを理解することが重要である。さらに、A β の配座解析や凝集体の構造の解明は、AD 発症の分子レベルでの理解を導く。全長の A β (1–42)単量体の立体構造は、溶液 NMR(Nuclear magnetic resonance)を用いた実験^[54–58]から決定された。例えば、フェデリコ 2 世・ナポリ大学の Crescenzi らが明らかにした A β (1–42)単量体^[57]は、ほとんどのアミノ酸残基が二次構造の α ヘリックスを形成するらせん構造である (Figure 4)。 α ヘリックスを形成する領域は 2 つあり、それぞれ Ser8–Gly25 残基、Lys28–Gly38 残基が対応する。これらの α ヘリックスを、Gly25–Ser26 残基によって形成されるターンがつないでいる。

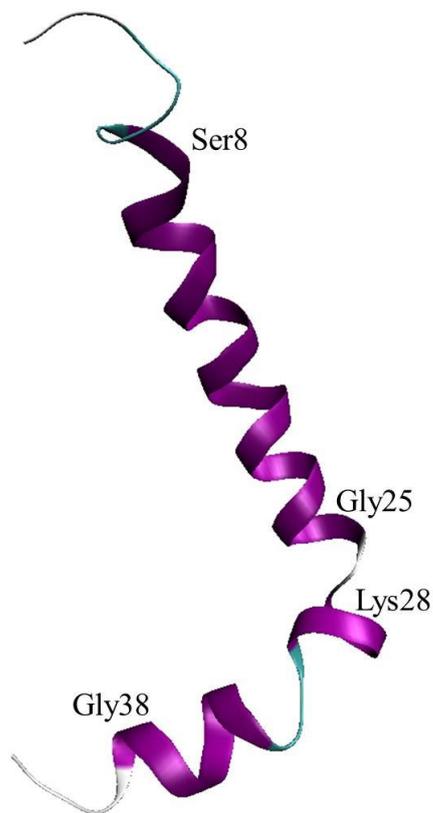


Figure 4. 3D structure model for A β (1-42) monomer determined by solution-state NMR experiment^[57].

一方、A β 線維は、非結晶性や不溶性などの性質のため、X 線結晶解析や溶液 NMR のような確立されている構造決定手法を用いた構造の決定が困難である^[59]。そのため、A β 線維の立体構造の解明においては、固体 NMR、あるいは電子スピン共鳴(Electron paramagnetic resonance; EPR)測定に基づく研究^[36, 60-78]が、大きな貢献をした。これらの研究が明らかにした A β 線維は、線維方向に平行な β シート、及び線維に対して垂直方向へ伸びた鎖を持つ立体配座で安定している。このような立体配座は、生化学的性質に関係なく、全てのアミロイド線維に共通であると信じられている^[79]。例えば、ソーグ研究所の Lührs らが決定した A β (17-42)の線維構造^[67](Figure 5 (a))では、Val18-Ala42 残基によって形成される β -strand-turn- β -strand motif を持つ A β が、線維方向に平行に集合した構造をしている。Ser26-Gly29 残基が形成するターンにより結合する 2 つの β ストランド β 1 及び β 2 は、それぞれ Val18-Ser26 残基、Ile31-Ala42 残基で構成される。 β 1 及び β 2 は、上下に重なる A β と水素結合を形成し、安定している。また、異なる単量体に含まれる Asp23 と Lys28 間では、塩橋が形成されている(Figure 5 (b))。この塩橋の形成により、Ser26-Gly29 残基のターン構造が安定していると考えられる。N 末端配列である Asp1-Leu17 残基は、揺らいだ構造をしており、実験から構造が決定されていないため、Asp1-Lys16 残基の座標情報が欠損している。また、近年、アメリカ国立衛生

研究所の Lu らにより、AD 患者の老人斑から採取した試料に対する固体 NMR 構造解析^[78]から、三回対称性を持つ全長の $A\beta(1-40)$ 線維の立体構造モデルが決定された (Figure 5 (c))。この立体構造には、Lührs らが決定した $A\beta(17-42)$ の線維構造^[67](Figure 5 (a))のように、N 末端残基の座標情報の欠損が存在しない。また、NMR データから、AD 患者の老人斑から採取された $A\beta(1-40)$ 線維は多様な構造をとらないが、患者によって、その構造が異なることが明らかにされた。

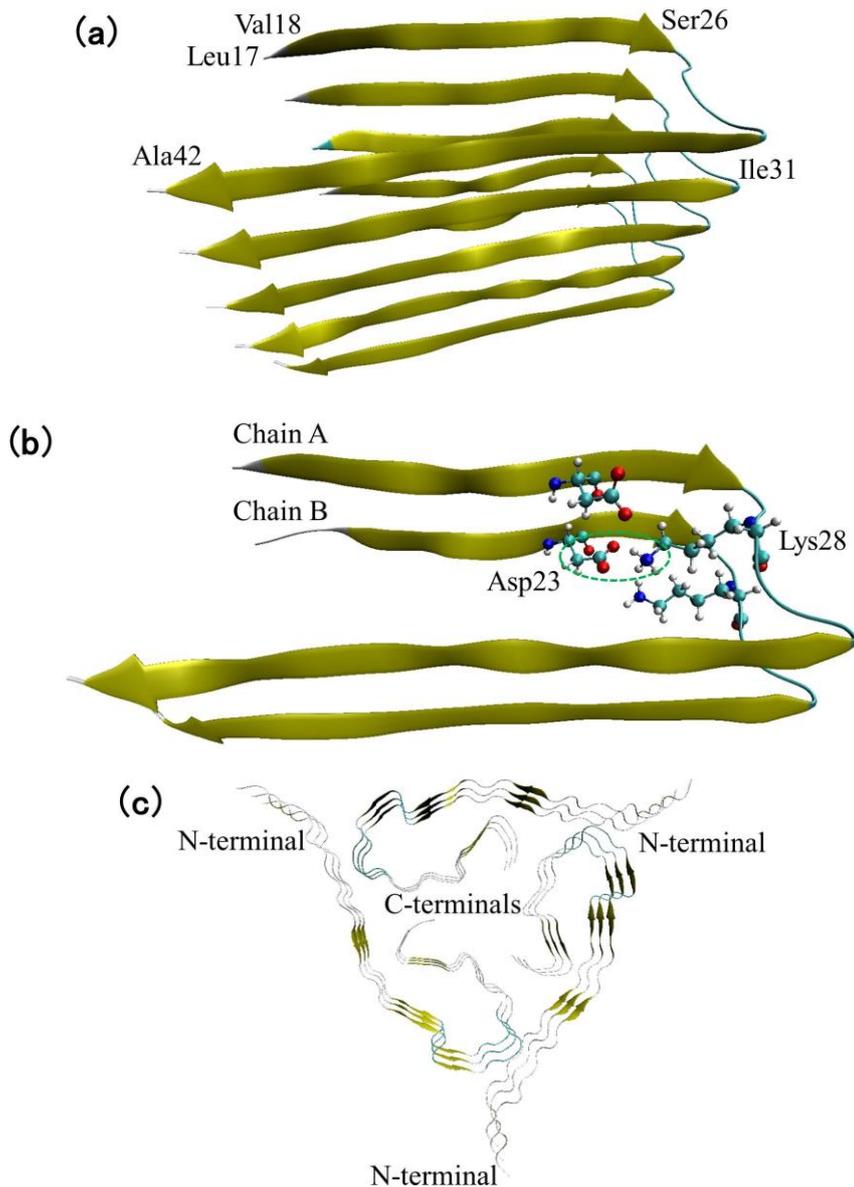


Figure 5. 3D structure models for $A\beta$ fibrils determined by solid-state NMR experiments: (a) $A\beta(17-42)$ fibril (tetramer)^[67], (b) salt-bridge between Asp23 of chain B and Lys28 of chain B in Fig. 4 (a) and (c) $A\beta(1-40)$ fibril with 3-fold symmetry (9-mer)^[78]

A β の線維構造だけでなく、凝集プロセスの初期に形成される二量体に関する実験も盛んに行われている。蛍光共鳴エネルギー移動実験^[80-82]は、A β が溶液中で安定な二量体を形成することを示した。また、A β 二量体は、ミクログリア存在下で、ニューロンに対する強い毒性を示し^[83]、シナプス可塑性や記憶を損なう最小のシナプス毒性種であることが報告された^[84]。さらに、ハーバード大学医学大学院の Walsh^[85]らは、生体内での A β 二量体の潜在的なシナプス毒性を示した。ブリガム・アンド・ウイメンズ病院の Jin らの実験研究^[86]から、A β 二量体が AD 患者の脳における最も豊富な種であり、生体内で神経炎の悪化を引き起こすことが明らかにされた。従って、A β 二量体の形成は、凝集の初期の重要なステップであり、二量体は凝集プロセスの構成要素である^[87]。しかし、二量体のような低次の A β 凝集体は、非常に速く形成されるため、実験手法のみを用いた A β 二量体の高精度な構造決定は、非常に困難であり^[32, 88, 89]、そのメカニズムは未解明である。

1.1.3. A β に対する理論研究

分子シミュレーション手法のひとつである分子動力学(Molecular dynamics; MD)シミュレーションは、A β 凝集体の立体構造に関する重要な情報を得る手段として有用である。ここ数年において、仮想溶媒ないし実溶媒モデルと組み合わせた、粗視化モデルから全原子モデルに至るまでの様々なモデルに対する分子シミュレーションが、小さなフラグメント^[87, 90-100]や全長^[101-110]の A β 二量体の立体構造やダイナミクスを解明するために適用された。パンジャブ大学の Anand らの仮想溶媒モデルを用いた A β (1-39) 二量体に対する MD シミュレーション^[102]は、平行な N 末端を持つ立体配座が支配的であり、片方の単量体に含まれる Lys28 と異なる単量体に含まれる Glu22 あるいは Asp23 間で塩橋を形成することを示した。ロスアラモス国立研究所の Gnanakaran ら^[92]は、A β (16-22)二量体に対してレプリカ交換 MD(Replica exchange MD; REMD)シミュレーションを実行し、平行に限らず逆平行の配向性を示す 6 個の安定な二量体の形成を示唆した。また、彼らは、水分子がいくつかの二量体配座の安定に関与することを示した。ボストン大学の Urbanc らによる全長の A β (1-42)の粗視化モデルに対する discrete MD(DMD)シミュレーション^[101]は、二量体配座がそれらに対応する単量体配座と比較して、高い自由エネルギーを持つことを明らかにした。パリ大学の Huet ら^[93]は、A β (9-40)線維の固体 NMR 構造を基に、A β (9-40)二量体、A β (9-42)二量体、及びそれらの Flemish 置換(A21G)型 A β の二量体構造を作成し、それぞれに対する 10 ns の MD シミュレーションを実行した。彼らは、それぞれの A β 二量体の β -strand-rich な最終構造は、異なるトポロジーを持ち、共通の構造的特徴が存在しないことを明らかにした。また、A β (9-40)二量体、及び A β (9-42)二量体における単量体内、及び単量体間の Glu22、Asp23、

及び Lys28 が関与する塩橋形成を示した。これらの研究は、様々な A β 二量体の立体構造やそれらの安定性に対して有益な見識を与えた。しかし、自然界や溶液中のペプチドの立体配座は、鎖の長さや特異的なアミノ酸配列に依存する。例えば、A β (1-40)や A β (1-42)は、2つの C 末端の疎水性残基が異なるだけだが、異なる形態の線維を形成する^[32, 111-113]。従って、実溶媒中の全長の A β (1-42)二量体構造は、それらの構造的特徴を深く理解するために重要である。

近年、全長の A β (1-42)二量体構造に対する全原子 MD シミュレーション^[103, 105]が実行された。ドレクセル大学の Barz ら^[103]は、A β (1-42)単量体と二量体の構造を比較し、二次構造や塩橋形成の傾向の相違を明らかにした。また、マイアミ大学の Zhu ら^[105]は、A β (1-42)の二量体形成を解明するため、A β (1-42)単量体の NMR 構造を基に、10 個の初期構造を作成し、それぞれに MD シミュレーションを実行した。10 個の二量体に対して、単量体間の結合エネルギーを求め、そのエネルギーを基準に最安定な二量体構造(Figure 6)を決定した。彼らが決定した最安定な二量体構造は、片方の単量体の Lys28-Ala33 残基と異なる単量体の Ala30-Gly37 残基間におけるジッパー様構造の形成を示した。このようなジッパー構造は、A β を含む他のアミロイド形成タンパク質の凝集において、実験により観測されている^[90, 114]。また、この二量体構造内の異なる単量体間では、Glu22 と Lys28 間で塩橋を形成している。さらに、モントリオール大学の Côté らは、アミノ酸の主鎖を全原子、側鎖をひとつの粗視化ビーズとして表現する OPEP(Optimized potential for efficient peptide structure prediction) 力場と Hamiltonian-temperature REMD^[115]シミュレーションを組み合わせた分子シミュレーション^[104]により、A β (1-42)の Ile41-Ala42 残基の存在、及び Asp23-Lys28 間の塩橋は、A β のフォールディングに強く影響していることを明らかにした。

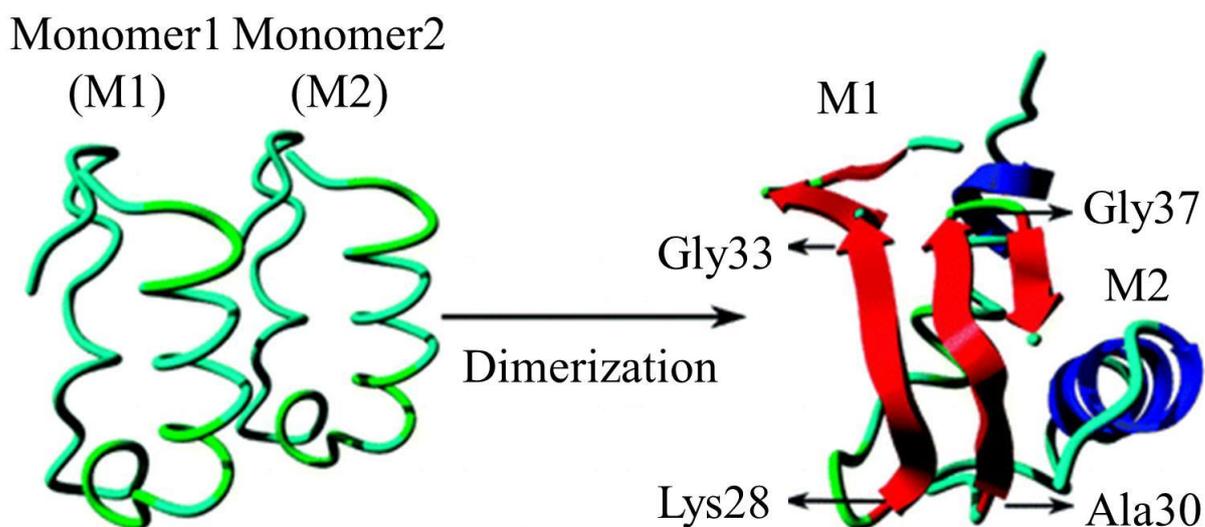


Figure 6. Cartoon presentation of initial conformation (left) and the most stable structure (right) of A β (1-42) dimer obtained by MD study^[105]

なお、MD シミュレーションは A β 二量体だけでなく、単量体^[66, 97, 103, 110, 116-142]、二量体よりも高次のオリゴマー、及び線維^[98, 108, 109, 143-164]に対しても適用され、その結果から有益な情報を得ている。カルフォルニア大学の Yang ら^[132]は、A β (1-40)と A β (1-42)の固有配座の相違点を明らかにするため、それぞれの単量体に対し、連続溶媒モデルを用いた REMD シミュレーションを実行し、A β (1-42)の追加の疎水性残基 (Ile41-Ala42 残基) は、C 末端内、及び C 末端と中央の疎水性領域 (Leu17-Ala21 残基)間のコンタクトを著しく増加させることを明らかにした。また、彼らは、A β (1-40)及び A β (1-42)の代表配座の二次構造形成の傾向を明らかにした。レンセラー工科大学の Sgourakis ら^[130]は、A β (1-42)単量体に対する顕わな水溶媒中での ff99SB 力場を用いた REMD シミュレーションにより、ff99SB 力場から生成された REMD アンサンブルが実験から得られた J-coupling 値を精度良く再現し、さらに、RDC データとも良い一致を与えることを明らかにした。また、彼らは、A β (1-42)配座の構造的特徴、及びオリゴマー化や原線維形成の経路に関連する相互作用を原子レベルで説明した。A β 線維を対象とした研究では、イリノイ大学の Han ら^[161]により、A β (17-42)線維の成長モデルが提案された (Figure 7)。Han らは、hybrid-resolution モデルに対するアンブレラサンプリング、及び REMD 法を組み合わせた分子シミュレーションから、A β (17-42)線維成長において、疎水性領域である Leu17-Ala21 残基は、他の領域と比較して、 β シートを形成し易く、この領域は初期の線維形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。Han らの提案した A β (17-42)線維成長モデルでは、Leu17-Ala21 残基、Gly37-Ala42 残基、Ile31-Val36 残基の順に、単量体と線維の間で β シートが形成された後、親水性領域である Glu22-Ala30

残基で線維形成がされ、最終的に、単量体は Figure 5 (a)に示す β -strand-turn- β -strand motif を持つ配座となる。

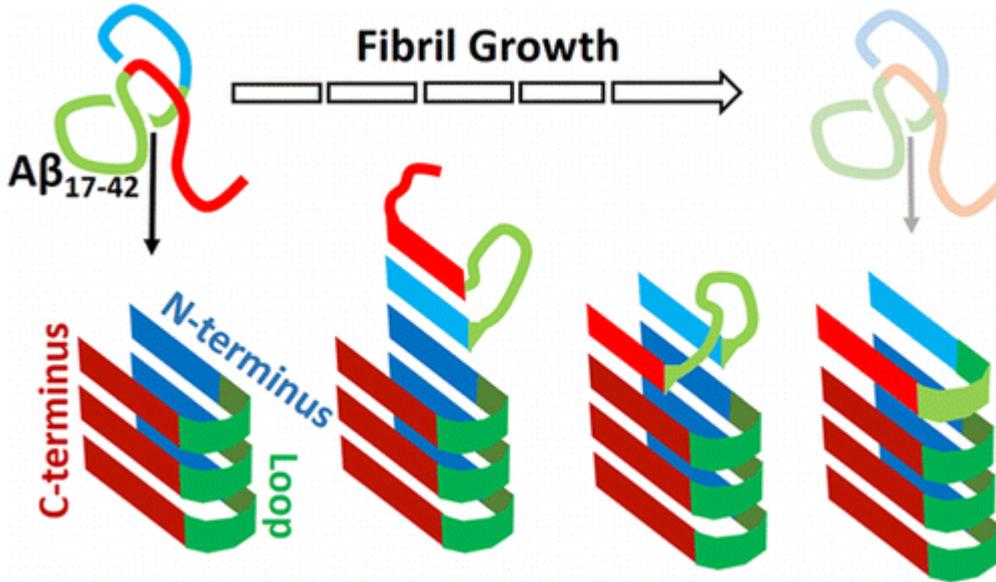


Figure 7. Schematic model for fibril elongation by $A\beta(17-42)$ proposed umbrella sampling and REMD simulations with a hybrid-resolution model^[161].

1.1.4. $A\beta$ の凝集プロセス

AD の効果的な治療法及び、治療あるいは予防薬の開発のためには、 $A\beta$ の凝集プロセスを理解することも重要である。多くの研究^[36, 63, 68, 70]は、 $A\beta$ 単量体の3つの異なる領域である Central hydrophobic core(CHC, Leu17–Ala21)、Turn region(TR, Val24–Asn27)、及び Second hydrophobic region(SHR, Gly29–Met35)が、凝集プロセスに重要な役割を果たすことを示している。単量体のこれらの領域間の疎水性相互作用は、 $A\beta$ のオリゴマー化に必須な driving/stabilizing force を与える^[64, 165-168]。さらに、 $A\beta$ ペプチドに存在する荷電アミノ酸は、凝集のダイナミクス及び β シートの安定性に影響することが報告されている^[36, 63, 67, 68, 147, 151, 169-171]。また、近年、金属イオンの存在が、 $A\beta$ を含むアミロイド形成タンパク質の凝集を増進させることが報告されている^[172]。

しかし、 $A\beta$ の線維及びオリゴマー形成の実験研究は、それらの動態解析に限られている^[87]。ケース・ウェスタン・リザーブ大学の Hou らの溶液 NMR を用いた研究^[89]から、 $A\beta$ の凝集プロセスの概略図(Figure 8)が示されているが、実験手法の制限により、プロセスの網羅的な解析は不可能であると述べられている。そのため、 $A\beta$ の凝集プロセスの全体は未解明である。また、オリゴマーを含む $A\beta$ 凝集体が神経毒性を示す正確なメカニズムについても未解明^[42]である。近年、理化学研究所の Sörgjerd らによるマ

ウスを用いた実験^[173]から、 $A\beta$ オリゴマーの表面構造が毒性に関与していることが示唆されているが、その立体構造は明らかにされていない。従って、 $A\beta$ の立体構造を原子レベルで詳細に解析できる分子シミュレーションは、 $A\beta$ の凝集メカニズム、及びオリゴマーが毒性を示すメカニズムの解明に向け、大きな貢献が期待できる。

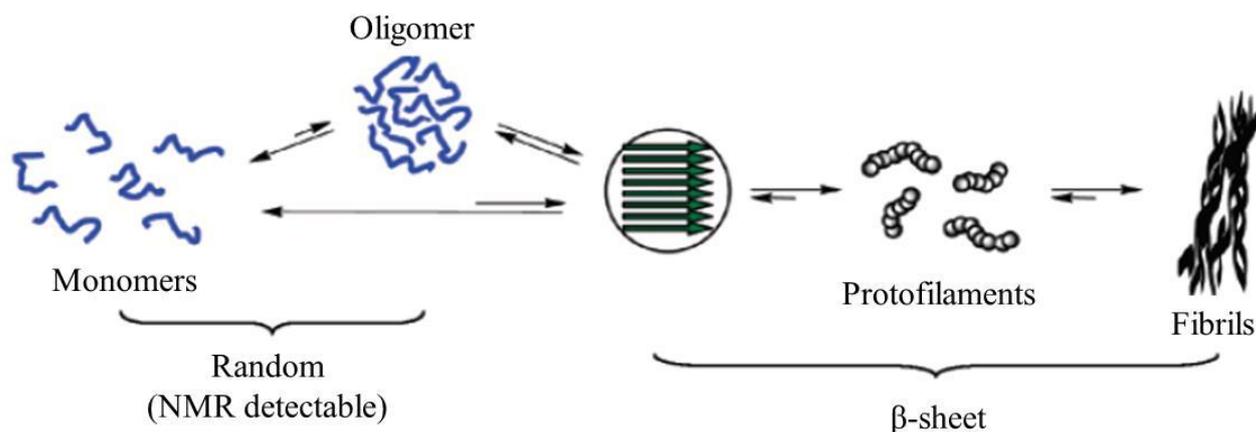


Figure 8. Schematic model proposed by solution NMR study^[89] showing the equilibrium among the different $A\beta$ aggregation states.

実際に、近年、フリードリヒ・アレクサンダー大学エアランゲン＝ニュルンベルクの Kahler らによる $A\beta$ 線維様オリゴマーに対する MD シミュレーション^[157]から、オリゴマーから線維までの成長メカニズムに関するモデルが提案されている (Figure 9)。このモデルでは、次のステップで線維が成長していく: (1)–(3) 小さいプロトフィラメント (protofilament) から大きいプロトフィラメントへの伸長; (4) 大きいプロトフィラメントが破損し、小さいプロトフィラメントへ分裂; (5)–(7) 小さいプロトフィラメント同士の結合による小さいプロトフィラメントペアの形成; (8) プロトフィラメントペアの伸長; (9) 線維形成。ステップ (4) は、大きいプロトフィラメントに起こる立体構造のねじれが原因によって引き起こされる。ステップ (5)–(7) でプロトフィラメント同士がペアを形成することにより、ねじれが発生せず、ステップ (8) のように、大きいプロトフィラメントペアを形成することができる。従って、著者らは、プロトフィラメントペアは、線維形成のための種としての役割を果たしていると結論づけている。

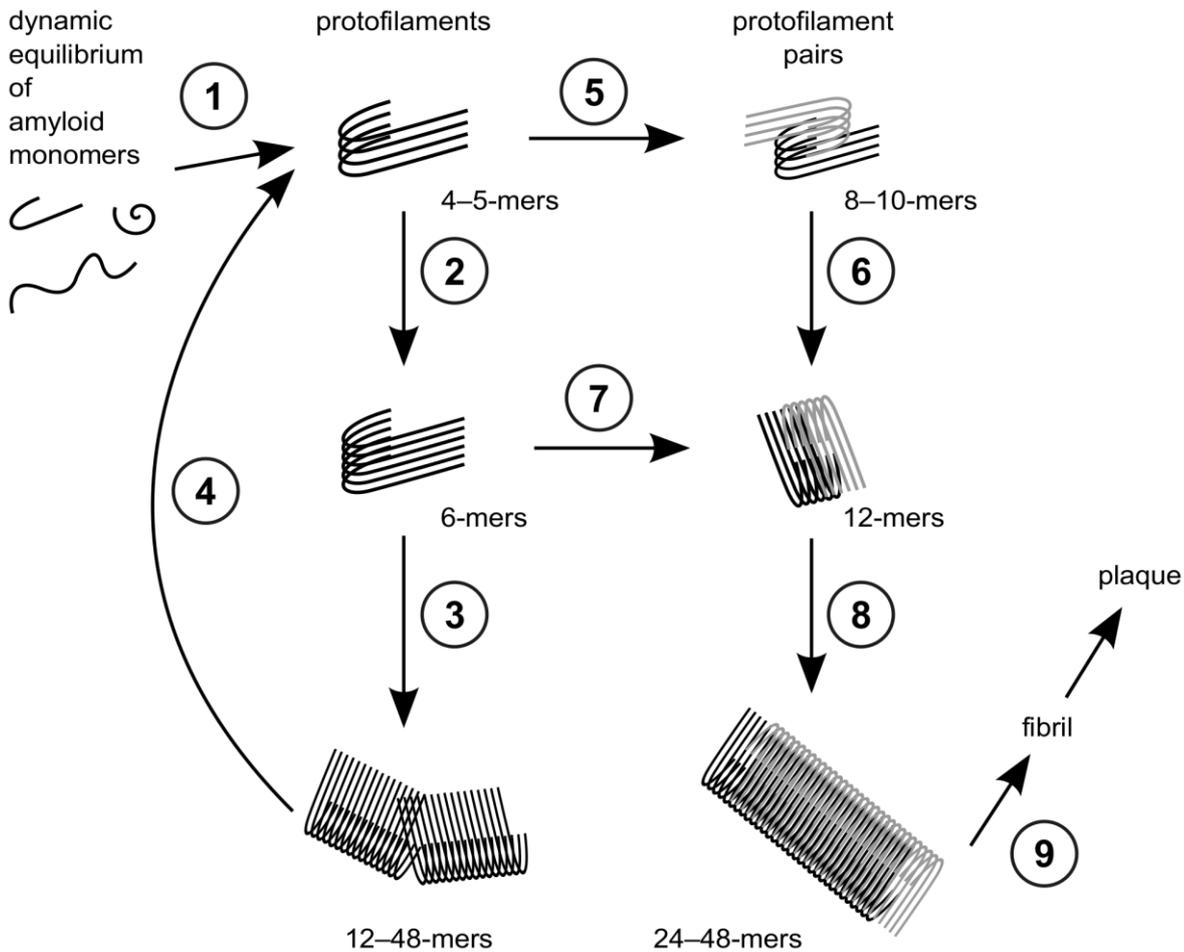


Figure 9. Schematic model for the growth mechanism of Aβ fibrillar oligomers^[157].

1.2. 従来の理論研究の課題

これまで、Aβの立体構造を明らかにするため、様々な分子シミュレーション手法を用いた多くの理論研究が行われてきた。しかし、Aβ単量体や二量体は構造柔軟性が非常に高いため、Aβに対する理論研究においては、従来のMD法よりも広範囲に配座探索が可能な最新のシミュレーション手法の適用が必要となる。特に、REMDシミュレーション^[104, 129, 130, 132, 134]は、広い温度範囲で様々な安定配座をサンプリングできる。実際に、これらのREMDシミュレーションから、NMR構造と比較可能な種々の単量体、及び二量体の安定配座が示された。しかし、それらの配座の電子状態は、電子レベルで高精度に評価されていない。また、全長のAβ二量体にREMD法の派生であるHamiltonian-temperature REMD^[115]法を適用したCôtéらの研究^[104]では、アミノ酸の側鎖を粗視化ビーズとして表現しており、全原子力場と比較して、主鎖と側鎖、及び側鎖間の相互作用の評価が不十分である。さらに、Zhuら^[105]は従来のMDシミュレーションにより様々な安定配座をサンプリングし、その中から分子力場を用いて求めた結合

エネルギーを基準に、最安定配座を決定した。しかし、分子力場は配座に依存するパラメータを用いており、分子力場から得られたエネルギーでは、異なる配座間の相対的な安定性を精度良く評価することができない。そのためには、*ab initio* 分子軌道 (Molecular orbital; MO) 計算が必要である。また、上記で挙げた研究では、A β に含まれるアミノ酸間の相互作用が電子レベルで評価されていない。

また、近年の全長の A β (1-42) 単量体、及び二量体に関する理論研究^[103, 105, 129, 130]では、A β の周囲に存在する水分子を顕わに考慮しているが、水分子が A β の安定性に与える影響は明らかにされていない。一般に、タンパク質や核酸などの生体高分子に対する分子力学 (Molecular mechanics; MM) 及び MD 計算では、水などの溶媒を考慮する。通常、生体高分子が真空中に存在することはないため、真空中の計算は、溶媒分子の影響が考慮されず、分子の形状が壊れてしまうことがある。溶媒の影響を考慮する場合、仮想溶媒モデルを用いる、あるいは系内に顕わに溶媒分子を含めてシミュレーションを行う。仮想溶媒モデルは、溶媒を連続誘電体とみなし、溶媒の影響を考慮する手法である。一方、溶媒分子を顕わに考慮する方法は、単純に溶質の周囲に溶媒分子を付加して、溶媒の影響を考慮する。仮想溶媒モデルでは、溶媒分子を顕わに扱わないため、溶媒分子を顕わに考慮する方法と比較して、計算コストは少なくて済み、摩擦や粘性などの影響が小さくなり、タンパク質のフォールディングなどの構造変化が速く起こる。しかし、溶媒を連続誘電体として扱うため、溶媒分子との相互作用、特に、水分子との水素結合などの効果を取り入れることができない。そのため、溶媒分子との相互作用により、立体構造やその安定性が変化する分子に対して、仮想溶媒モデルを用いて計算すると、立体構造の崩壊、あるいは実験結果と一致しない結果が得られる可能性がある。A β においては、Gnanakaran らの A β (16-22) 二量体に対する REMD 計算^[92]の結果から、水分子が二量体配座の安定に関与することが示唆されている。従って、全長の A β 単量体、及び二量体構造の安定性に対しても水分子が寄与する可能性が高く、A β の周囲に存在する水分子を顕わに考慮する必要がある。しかし、上述のように、従来の理論研究からは、A β の周囲に存在する水分子が全長の A β 単量体、及び二量体の安定性に与える影響は明らかにされていない。

固体 NMR 実験^[67, 68]では、A β の N 末端配列は揺らいだ構造をしており、構造が決定されていないことから、A β 線維に対する理論研究では、N 末端配列を考慮せず、N 末端に欠損のある、あるいは N 末端配列を全く持たない構造を用いた研究例が多く存在する。例えば、Huet ら^[93]は、A β (9-40) の線維から二量体構造を作成し、N 末端が欠損した状態で、MD シミュレーションを実行している。しかし、N 末端における置換^[174]、あるいは欠損^[175]は、オリゴマー形成に影響を与え、また、Lührs らの先行研究^[67]の観測結果とは対照的に、A β (1-42) の形状に関する実験、及び理論研究^[176]の結果は、N 末端配列は構造化されていないわけではないことを示した。さらに、N 末端は AD 免疫療

法の重要なエピトープ（抗原決定基）の構成要素になると考えられている^[177-179]。そのため、N末端配列を含む全長のA β に対するREMDシミュレーションが必要である。

1.3. 研究目的と意義

本研究では、従来の理論研究の課題を考慮し、A β (1-42)の凝集機構の初期段階を解明するため、実溶媒中の全原子REMDシミュレーション^[180, 181]を用い、全長のA β (1-42)単量体、及び二量体の安定配座を広範囲に探索する。また、*ab initio*フラグメント分子軌道(Fragment MO; FMO)^[182-190]計算により、得られた安定配座の中から、最安定配座を電子レベルで決定する。その際、A β の周囲に存在する水和水を顕わに考慮することにより、水和水がA β 単量体、及び二量体の安定性に与える影響を明らかにする。さらに、*ab initio* FMO計算を用いることにより、A β (1-42)に含まれるアミノ酸間相互作用を電子レベルで評価し、A β (1-42)単量体あるいは二量体が安定する上で、どのアミノ酸間相互作用が重要であるかを明らかにすることを、本研究の目的とする。

A β の二量体形成は凝集の初期の重要なステップであり、二量体は最小のシナプス毒性種である。従って、本研究から、A β (1-42)の単量体、及び二量体の最安定配座、及び最安定配座における特異的なアミノ酸間相互作用が解明できれば、A β (1-42)の二量体形成を阻害、あるいは二量体構造を崩壊させるための低分子化合物の設計する際に、非常に有用となる。これが達成できれば、ADの発症や病状の進行を抑える新薬の開発に貢献することができると考えられる。

第2章 計算対象

2.1. A β 単量体の溶液 NMR 構造

本研究では、老人斑において豊富に含まれる A β (1-40)及び A β (1-42)のうち、凝集能に優れる A β (1-42)を計算対象とした。全長の A β (1-42)単量体の安定配座を探索するため、タンパク質・核酸の構造データベース Protein Data Bank(PDB)に登録されている溶液 NMR 構造を、初期構造として採用した。PDB には、A β (1-42)の単量体の構造データが2つ登録されている(PDB ID: 1IYT^[57], 1Z0Q^[58])(Figure 10)。どちらも同じグループの溶液 NMR を用いて得られた構造であるが、Figure 10 に示すように、両者はらせん構造を形成する残基の割合が異なる。A β 単量体に含まれるアミノ酸の二次構造は、実験に用いる溶媒によって変化する^[58]ため、実験条件により異なる立体構造が得られる。これらの A β (1-42)に対する溶液 NMR の実験では、hexafluoroisopropanol(HFIP)と水の混合溶媒を用いており、1IYT と 1Z0Q では、HFIP と水の割合が異なる。HFIP : 水の割合は、1IYT と 1Z0Q において、それぞれ 80:20、30:70 %である。1IYT は HFIP が豊富に含まれる溶媒中にあり、低 pH の環境下にあると考えられる。一方、1Z0Q は周囲に水分子が豊富に存在していると考えられる。本研究では、1IYT よりも 1Z0Q の方が溶液 NMR の分解能が良いことから、1Z0Q(Figure 10 (b))を A β (1-42)単量体の初期構造として採用した。

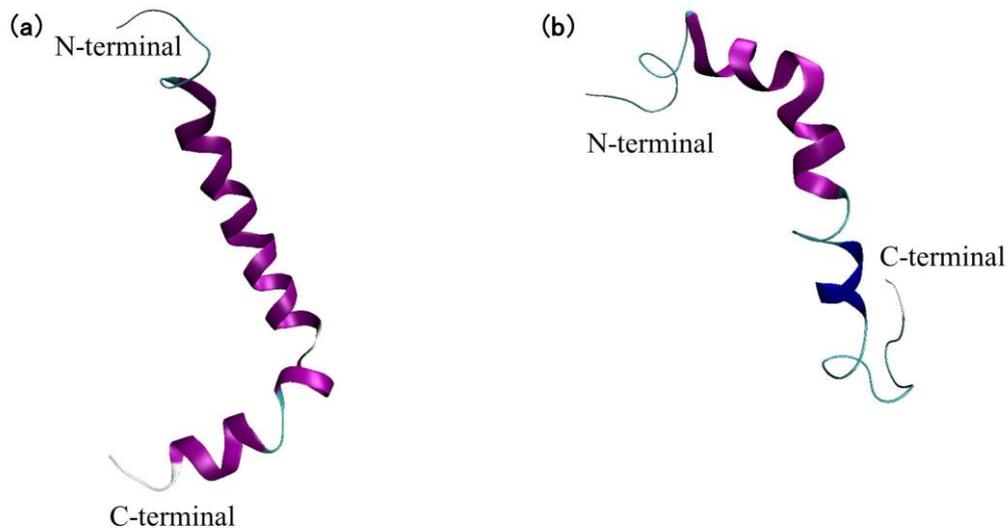


Figure 10. 3D structure models for A β (1-42) monomer determined by solution-state NMR experiments: PDB IDs (a) 1IYT^[57] and (b) 1Z0Q^[58].

2.2. A β 多量体の固体 NMR 構造

A β の凝集プロセスは非常に速いため、実験手法のみでの A β 二量体の構造決定は困難であり、現状、PDB に二量体の立体構造は存在しない。そこで、本研究では、Huet らの MD シミュレーション^[93]と同様に、固体 NMR 実験から得られた線維構造モデルを基に二量体構造を作成した。PDB には野生型の A β (9-40)線維の立体構造データが数種登録されている(PDB ID: 2LMN, 2LMO, 2LMP, 2LMQ^[68]、2M4J^[78])(Figure 11 及び Figure 5 (c))。2LMN 及び 2LMO は A β (9-40) 12 量体の線維構造であり、また、2LMP 及び 2LMQ は A β (9-40) 18 量体の線維構造である。これらはすべて固体 NMR を用いた同じ実験^[68]から得られた構造である。2LMN と 2LMO の立体構造を、線維の軸に対して上方向から見ると、Figure 11 (a)のようになり、どちらもほぼ同じ構造をしている。しかし、線維軸に対して横方向から見ると、Figure 12 に示すように、明確に異なる構造であることが分かる。これらの構造は、線維ペアの N 末端が位置する平面と基準として、C 末端が上下のどちらに位置しているかという点で異なる。2LMN の C 末端が N 末端の平面よりも上に位置するのに対し、2LMO の C 末端は下に位置する。2LMP と 2LMQ についても同様であり、線維軸に対して上方向からでは同じ構造に見えるが、横方向からでは、2LMN と 2LMO と同じ相違点がある。また、2LMP と 2LMQ の構造は、AD 患者の老人斑から直接採取され観測・決定された A β (9-40)の線維構造(2M4J)^[78](Figure 5 (c))と同様に、三回対称性を持っている。しかし、これらの構造が *in vitro* 実験から得られたものである点、また、2M4J の構造は 9 量体である点で異なる。

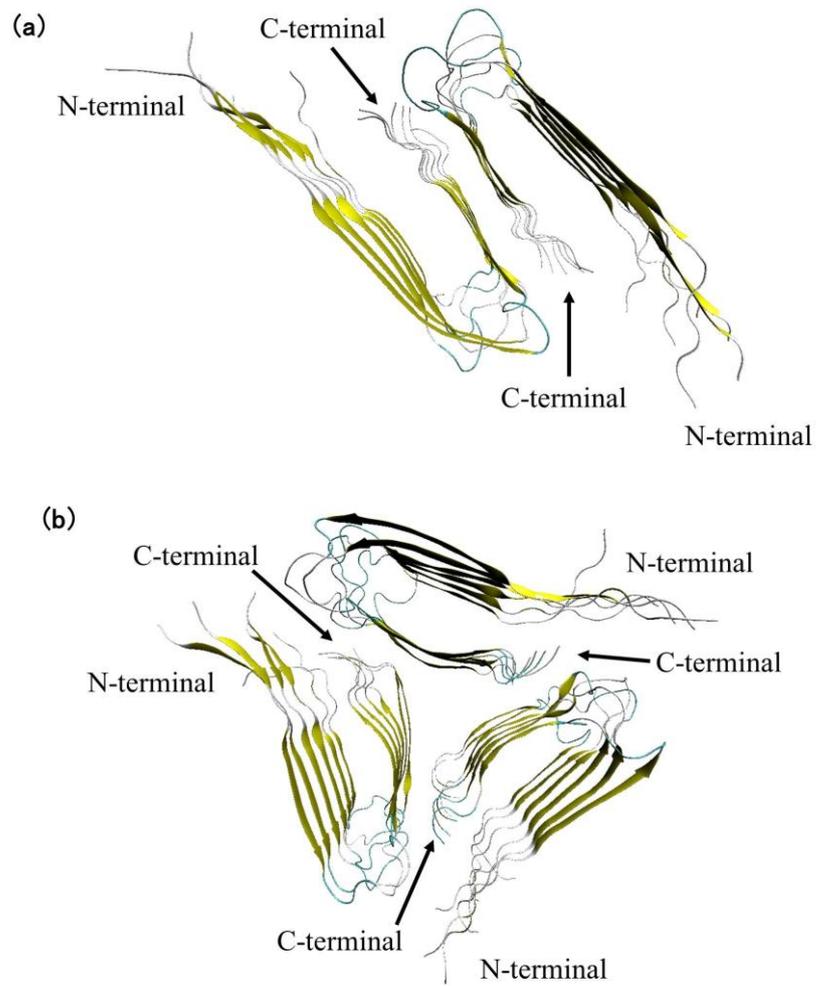


Figure 11. 3D structure models for A β (9–40) fibrils determined by solid-state NMR experiment^[68]: PDB IDs (a) 2LMN with 2-fold symmetry and (b) 2LMP with 3-fold symmetry.

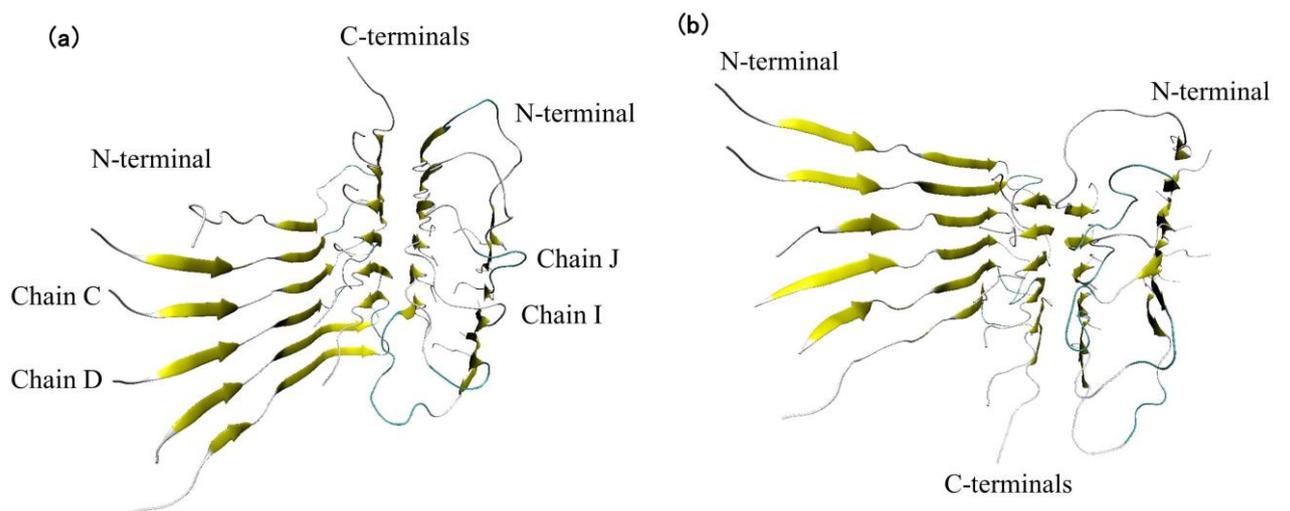


Figure 12. 3D structure models for A β (9–40) fibrils determined by solid-state NMR experiment^[68]: PDB IDs (a) 2LMN and (b) 2LMO.

$A\beta(9-40)$ 12 量体の線維構造(2LMN 及び 2LMO)から考慮できる二量体における単量体の配置パターンは、大きく分けて、単量体がそれぞれ上下(Figure 13 (a))、左右(Figure 13 (b))に位置するものである。 $A\beta(9-40)$ 18 量体の線維構造である 2LMP、及び 2LMQ(Figure 11 (b))を基に二量体構造を作成すると任意性が高くなるため、それらは除外し、 $A\beta(9-40)$ 12 量体に関する 2LMN 及び 2LMO の構造(Figure 11 (a)及び 12)を採用した。本研究では、これらの構造を基に、 $A\beta(1-42)$ 二量体の初期構造を作成する。作成手順の詳細については後述する。また、2M4J^[78](Figure 5 (c))は、AD 患者の老人斑から直接採取され観測・決定された $A\beta(1-40)$ の線維構造であるため、その他の *in vitro* 実験から決定された構造よりも、ヒトの脳内の $A\beta$ に近い構造をしていると考えられる。さらに、N 末端に残基の座標情報の欠損が存在しないため、欠損残基の補完が必要ない。しかし、2M4J の構造データは、本研究の開始後に公開されたものであるため、二量体構造の作成において考慮していない。

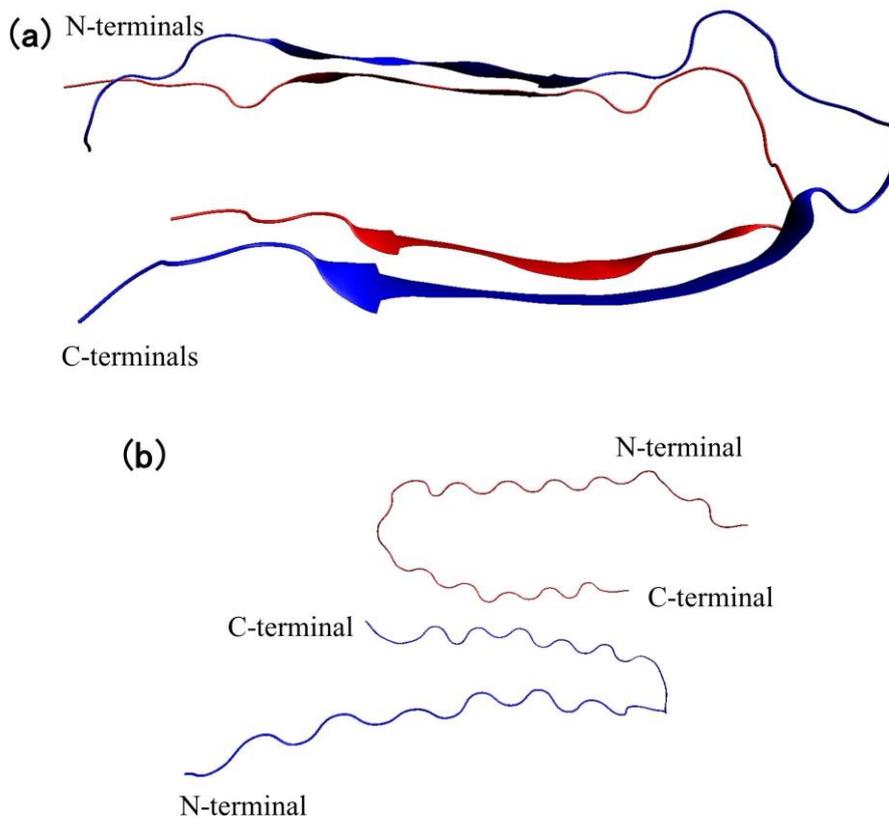


Figure 13. Schematic pictures for configurations of $A\beta$ dimer:
(a) layered dimer and (b) adjacent dimer.

また、PDB には、固体 NMR 実験^[67]から決定された $A\beta(17-42)$ 5 量体の線維の立体構造データ(PDB ID: 2BEG)(Figure 5 (a))が存在する。しかし、 $A\beta(9-40)$ 線維と比較して、

A β (17-42)線維は N 末端配列における座標情報の欠損が多く、また、A β (9-40) 12 量体のように、二量体の配置パターン(Figure 13)を考慮できない。そこで、本研究では、この構造は採用しなかった。

分子シミュレーションにおける A β 二量体の立体構造モデルは、“top down”あるいは“bottom up”アプローチを用いて作成される^[105]。“Top down”アプローチは、本研究や Huet ら^[93]のように、A β 二量体の初期構造を高次のオリゴマー、あるいは線維構造から作成する。一方、“bottom up”アプローチは、Figure 10 のような単量体のフォールディング構造からスタートする。そのため、実際の A β 二量体形成プロセスを正確にシミュレートすることができる。しかし、考慮する二量体の初期配座のパターンは任意性が高く、Zhu ら^[105]のように、様々な初期構造を作成し、それぞれに対する MD シミュレーションが必要となる。その点において、“top down”アプローチは、初期配座の任意性は低くなるが、“top down”アプローチで作成された二量体は、初期配座の時点で、既に β シートが豊富な構造となってしまう^[91, 93]。そこで、本研究では、安定配座を広く探索できる REMD^[180, 181]シミュレーションを用いることにより、“top down”アプローチの欠点を補い、ひとつの初期配座から、様々な安定配座を探索することとした。

第3章 計算手順

3.1. A β (1-42)単量体及び二量体の初期構造の作成

本研究では、A β (1-42)単量体の安定配座を探索するため、PDB に登録されている溶液 NMR 構造(PDB ID: 1Z0Q^[58])を、A β (1-42)単量体の初期構造として採用した。A β (1-42)単量体には、3つのヒスチジン(His)残基が含まれている。His は、単体で酸解離定数 pK_a 値 6.0 を示し、体内の pH の変化により、水素(H)原子の結合状態（プロトネーション）が変化し易い、pH に sensitive なアミノ酸である。His は側鎖にイミダゾール環を持ち、この環に含まれる 2つの窒素(N)原子に H 原子が結合する。Figure 14 に示すように、His のプロトネーションには 3種類あり、その変化により Hid、Hie、Hip と呼び分けられる。Hid は δ 位の N 原子、Hie は ϵ 位の N 原子、そして Hip は両方の N 原子に H 原子が結合する。Hid 及び Hie は電荷を持たず中性であるが、His がプロトン化し Hip となると、正荷電のアミノ酸となる。従って、His のプロトネーションの変化により、タンパク質の全電荷が変化する可能性がある。また、アミノ酸単体の pK_a 値は実験により決定されているが、その値は周囲の環境により変化するため、タンパク質に含まれる His のものとは異なる可能性が高く、 pK_a 値を予測し、プロトネーションを決定する必要がある。そこで、本研究では、A β (1-42)に含まれる 3つのヒスチジン(His)残基のプロトネーションを決定するため、PROPKA Web Interface 3.0^[191]を用い、各 His 残基の pK_a 値を評価した。従来の MD 法では、シミュレーション中に、プロトンの結合・解離によるアミノ酸のプロトネーション変化を再現することが不可能であるため、本研究においては、上記で得られた pK_a 値が 6.0 以上の His を Hip とし、6.0 未満の His を Hid あるいは Hie として扱う。PROPKA Web Interface 3.0 を用いて評価した pK_a 値は、全ての His について 6.0 以上の値を示したことから、これらの His 残基を、正電荷を持つ Hip とした。それに伴い、以降の計算において、A β (1-42)単量体の全電荷を中性とした。本研究で求めた A β に含まれる His 残基の pK_a 値は、実験により決定された 6.5-6.6 の pK_a 値^[192]と定性的に一致している。

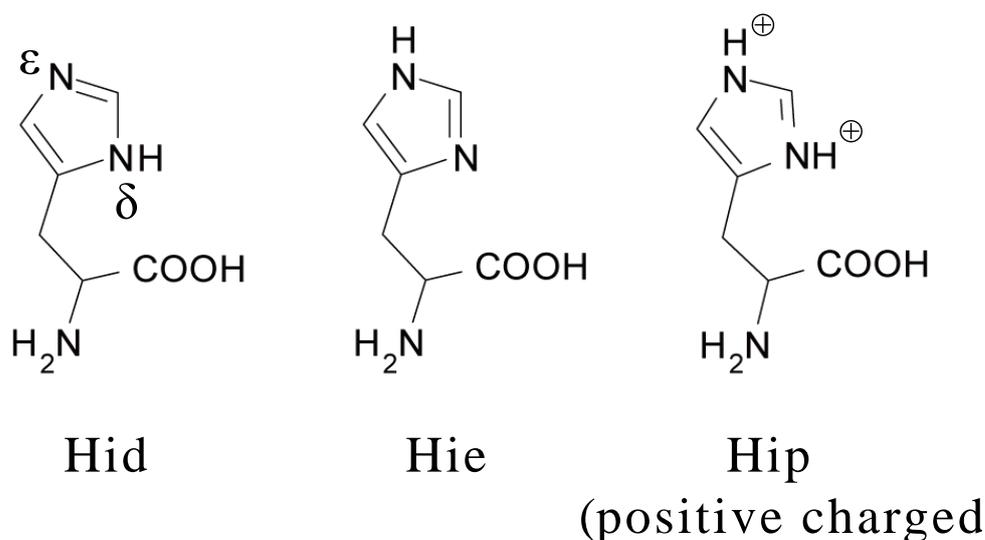


Figure 14. Schematic picture for three-type protonation states of histidine residue.

$A\beta(1-42)$ 二量体の初期構造の基となるモデルとして、PDB に登録されている $A\beta(9-40)$ 線維の固体 NMR 構造(PDB ID: 2LMN、2LMO^[68])を採用した。この構造を基に、Figure 13 に示した単量体が上下に重なった二量体、あるいは左右に並んだ二量体モデルを作成し、その後、C 末端に Ile41-Ala42 残基を付加し、 $A\beta(9-42)$ 二量体構造を作成した。線維構造の表面に位置する単量体は、溶媒分子との相互作用により、溶媒分子との接触の少ない単量体と比較して、側鎖が溶媒方向へ向いている。そのような構造の相違を可能な限り取り除くため、溶媒の影響が小さい線維の中央に位置する C、D、I、及び J 鎖(Figure 12 (a))の単量体を基に、C-D 鎖、I-J 鎖、C-I 鎖、及び D-J 鎖からなる二量体モデルを作成した。2LMN 及び 2LMO の構造から、それぞれ 4 個の二量体モデルを作成し、計 8 個の $A\beta(9-42)$ 二量体構造を得た。また、C 末端の付加には、MD シミュレーションパッケージ AMBER^[193]に含まれる LEaP(Link, edit and parm)を用い、Ile41-Ala42 残基が直線構造になるように、二面角 ϕ 及び ψ を 180° として付加した。

上記で作成した 8 個の $A\beta(9-42)$ 二量体構造をそれぞれ水和し、MD シミュレーションパッケージ GROMACS^[194] Ver.4.5.3 に実装されている MM(GROMACS-MM)法により、水中での安定構造を決定した。MM 計算において、FF99SB 全原子分子力場^[195]と TIP4P-Ew 水分子モデル^[196]を使用した。8 個の安定構造の中から、 $A\beta(1-42)$ 二量体の初期構造の基となるモデルを決定するため、*ab initio* FMO^[182-190]法を用いて電子状態を解析し、全エネルギーを高精度に評価した。そして、得られた全エネルギーを基に、 $A\beta(1-42)$ 二量体の初期構造となる $A\beta(9-42)$ 二量体の最安定構造を決定した。本計算には、FMO 計算プログラム ABINIT-MP Ver.6.0^[197]を用いた。

上記の計算から明らかにした $A\beta(9-42)$ 二量体の最安定構造を基に、欠損した N 末端

配列(Asp1–Ser8)の座標情報を補完し、A β (1–42)二量体の初期構造を作成した。N 末端配列の補完には、LEaP を用い、Asp1–Ser8 残基の直線構造が Gly9–Ala42 のシート構造と同一平面上に位置するように、且つ、上下の単量体の N 末端同士で立体障害が発生しないように、Ser8 及び Gly9 の二面角を設定した。なお、A β (1–42)二量体に含まれる His 残基のプロトネーションについては、単量体と同様に、すべての His 残基を正電荷の Hip として扱い、A β (1–42)二量体の全電荷を中性とした。この手順で作成した A β (1–42)二量体の初期構造を、以下に記述する計算に用いた。また、これ以降から A β (1–42)を A β として記述する。

3.2. A β の水和構造の作成及び構造緩和

A β の初期構造に対し、水和水を付加し、A β の水和構造を作成した。その際、A β の初期構造の X、Y、Z 辺の 2 倍の大きさになるように、水和ボックスを設定した。A β 単量体の例を Figure 15 に示す。A β 単量体の X、Y、Z 辺は、それぞれ 50.85、24.92、20.31 Å であるため、設定する水和ボックスの大きさは、101.70×49.84×40.62 Å³ となる。このボックス内に水和水を充填すると、6661 個の水和水が付加される。A β 二量体についても同様な手順を用いて水和し、その結果、179.20×75.34×38.62 Å³ のボックス内に 16115 個の水和水が付加された。それらの情報を Table 1 に要約する。A β 単量体の大きさの測定、及び水和ボックスの設定には GROMACS^[194]パッケージに含まれる editconf_d (_d は倍精度を示す)、水和水の充填には genbox_d を用いた。

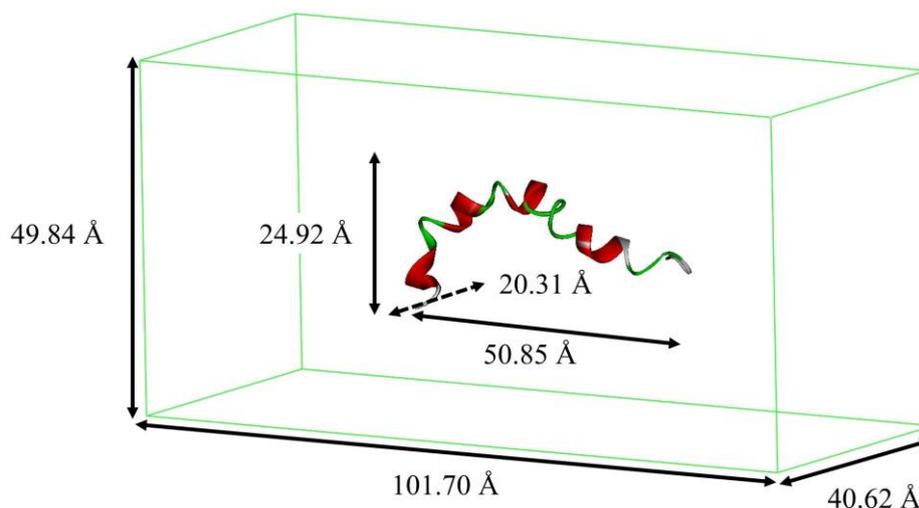


Figure 15. Schematic picture of solvated box applied to A β monomer.

Table 1. Number of solvating water molecules, A β concentration, number of atoms in the systems and simulation box dimensions for A β monomer and dimer on the present study.

System	Water molecules	A β concn. [mM]	Total atoms	Box dimensions (Å)		
				X	Y	Z
Monomer	6,661	8	20,613	101.70	49.84	40.62
Dimer	16,115	3	49,605	179.20	75.40	38.62

水和した A β に対し、GROMACS-MM^[194]法により、水中での安定構造を求めた。さらに、定温定圧条件(300 K, 1 atm)下で 1 ns の MD シミュレーションを実行し、水和水の位置、及び密度の緩和を行い、ボックスの大きさを最適化した。1 ns の MD シミュレーションにおける 900–1000 ps 範囲の平均密度を用いて求めた A β 単量体のモル濃度は、8 mM である。系の密度は、GROMACS^[194]パッケージに含まれる g_energy_d を用いた。A β 単量体に関する溶液 NMR 実験^[57, 58]における A β のモル濃度は、それぞれ 2、1 mM であるため、これらを考慮し、A β 二量体に対するシミュレーションでは、実験と同程度のモル濃度を再現する水和水を付加した。従って、A β 二量体に対するシミュレーションにおいては、A β 単量体に対して付加する水和水を増やし、結果として、A β のモル濃度を 3 mM とし計算を実行している。上記の MM、MD、及び後に続く REMD シミュレーションにおいて、FF99SB 力場^[195]を TIP4P-Ew 水分子モデル^[196]と組み合わせて使用した。カルフォルニア大学バークレー校の Fawzi らによる A β (21–30)単量体に対する REMD シミュレーション^[125]から、この組み合わせは、NMR データと良い一致を示すことが報告されている。そこで、本研究でも、FF99SB 力場と TIP4P-Ew 水分子モデルを組み合わせ用いた。

3.3. 水和した A β の安定配座探索

水和した A β の安定配座を広範囲に渡って探索するため、REMD シミュレーションを実行した。REMD^[180, 181]法は、計算する系のコピー（レプリカ）を複数個作成し、それぞれ異なる温度で独立した MD シミュレーションを並列で行う (Figure 16)。計算の途中で、メトロポリス判定法に従い、異なるレプリカ対の温度を交換し、その操作を一定間隔で繰り返す。

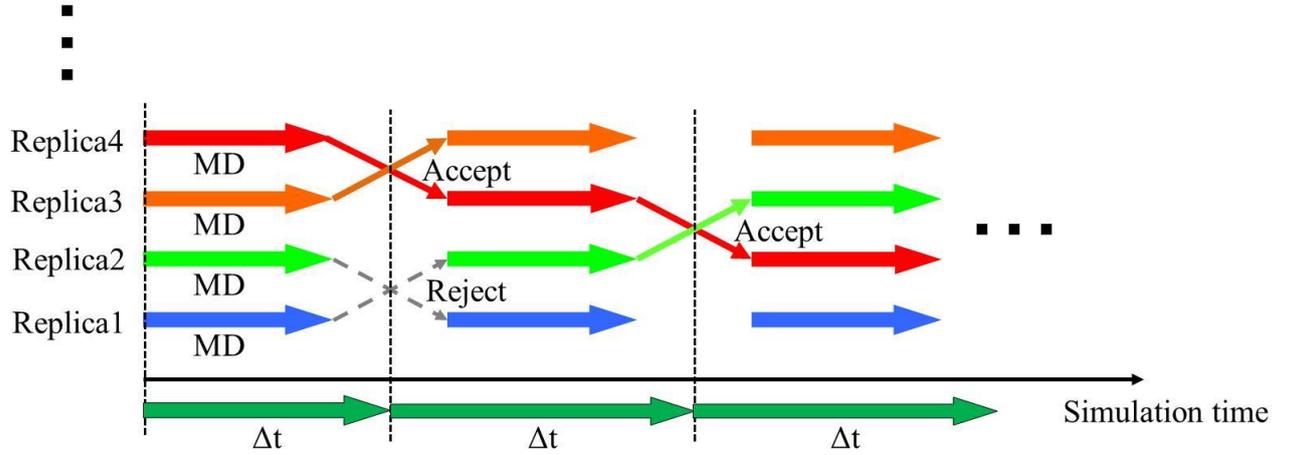


Figure 16. Schematic picture for the procedure of REMD^[180, 181] calculation.

式(1)に示すメトロポリス判定法は、レプリカ対の温度の交換確率を定義している。ここで、 X 、 X' 、 β 、及び $E(q)$ は、それぞれ現在の状態、次の状態、ボルツマン定数 κ_B と温度 T の積の逆数、各原子の位置座標 q におけるポテンシャルエネルギーを表す。現在の状態 X から次の状態 X' へのレプリカ対の交換判定は、レプリカ n 及び m に関するそれぞれの β 、 $E(q)$ によって定義される Δ の値に従う。 $\Delta \leq 0$ の場合は、現在の状態 X よりも次の状態 X' が実現される高くなるため、無条件にレプリカの交換を実施する。一方、 $\Delta > 0$ の場合には、0から1の間の一様乱数 λ を発生させ、 $\lambda < \exp(-\Delta)$ ならばレプリカの交換を行い、それ以外ならば交換は行わない。従って、レプリカ n 及び m の固有温度の関係が $T_m < T_n$ のとき、 $E(q^{[n]}) < E(q^{[m]})$ ならば $\Delta > 0$ となり、レプリカ対の温度の交換が必ず行われる。逆に、 $E(q^{[n]}) > E(q^{[m]})$ ならば、交換確率 $\exp(-\Delta)$ に従い、レプリカ対の温度交換が行われる。

$$w(X \rightarrow X') = \begin{cases} 1 & \text{for } \Delta \leq 0 \\ \exp(-\Delta) & \text{for } \Delta > 0 \end{cases} \quad \text{where } \Delta = (\beta_n - \beta_m)\{E(q^{[n]}) - E(q^{[m]})\} \quad (1)$$

レプリカ交換の受け入れ確率は、対象となるレプリカ対の温度差に従って指数関数的に減少するため、実際の REMD シミュレーションでは、Figure 16 に示したように、交換は隣接した温度を持つレプリカ間でのみ行われる。REMD 法の利点は、広い温度範囲で安定配座をサンプリングでき、レプリカ交換のタイミング以外は、互いのレプリカは相互作用せず、独立した計算となるため、計算粒度が大きく、並列計算の効率が良い点である。

本研究の REMD シミュレーションにおいては、A β 単量体については、270.0–363.4 K の温度範囲を持つ 32 個のレプリカを作成し、二量体については、270.0–363.8 K の温度範囲を持つ 52 個のレプリカを作成した。i 番目のレプリカの固有温度 T_i は、式(2)から与えられる。 T_L 、 T_H 、 N は、それぞれ下限温度、上限温度、レプリカ数である。従って、A β 単量体に対する REMD シミュレーションにおける T_L 、 T_H 、 N は、それぞれ 270.0 K、363.4 K、32 となる。以下の式から与えられる温度分布でのレプリカ交換確率の平均は、A β 単量体及び二量体において、それぞれ約 15 %、約 16 % である。

$$T_i = T_L \times \left(\frac{T_H}{T_L} \right)^{\left(\frac{i}{N-1} \right)} \quad (2)$$

また、REMD シミュレーションで使用した条件を、次に要約する。ペプチド内の水素原子の結合距離、及び水分子内の結合距離と結合角を、それぞれ LINCS^[198]、SETTLE^[199] アルゴリズムによって拘束し、MD シミュレーションの時間刻みを 2 fs とした。また、レプリカ対の交換は 4 ps 毎に試行した。非結合相互作用については、van der Waals 相互作用、及び長距離静電相互作用を、それぞれ Lenard-Jones ポテンシャル、Particle mesh Ewald(PME)^[200] 法により評価した。系の温度を一定に保つため、能勢-Hoover 温度制御^[201]法を使用した。REMD シミュレーションで用いた上記の条件は、A β 単量体、及び二量体に対する同様の計算^[107, 130, 137]でも使用され、実験結果と比較できる結果が得られている。

各レプリカに対して 50 ns の MD シミュレーションを行い、単量体及び二量体で、それぞれ合計 1.6、2.6 μ s の MD トラジェクトリを得た。本シミュレーションの結果を、室温(300 K)で行われる実験の結果と比較するため、単量体と二量体で、それぞれ 288.7–311.7 K(288.7、291.5、294.3、297.2、300.0、302.9、305.8、308.8、311.7)、289.6–310.7 K(289.6、291.3、293.0、294.7、296.5、298.2、300.0、301.7、303.5、305.3、307.1、308.9、310.7 K)の温度範囲の MD トラジェクトリに注目した。これらの MD トラジェクトリから、それぞれ最小のポテンシャルエネルギーを持つ安定配座をサンプリングし、水和した A β 単量体、あるいは二量体の代表構造とした。これらの代表構造に対し、GROMACS-MM^[194]法を用い、それぞれの水中での最適化構造を決定した。

3.4. 水和した A β の最安定配座の決定

REMD 及び MM 計算により得られた最適化構造の中から、水和した A β 単量体、あるいは二量体の最安定配座を決定するためには、それらの全エネルギーを高精度に決定する必要がある。MM 法では、配座に依存するパラメータ化された力場を用いてい

ることから、異なる配座間の相対的な安定性を精度良く評価することができない。そこで、本研究では、上記の最適化構造の全エネルギーを、*ab initio* FMO^[182-190]法を用いて高精度に評価した。そして、得られた全エネルギーを基に、水和した A β 単量体、あるいは二量体の最安定配座を決定した。

FMO 法は、その名のとおりに、系全体を比較的小さな「フラグメント」に分割し、フラグメント単体を指す「モノマー(Monomer)」及びフラグメントペアを指す「ダイマー(Dimer)」の計算のみから、全体のプロパティ（電子密度）を求める。FMO 計算において、A β の表面から周囲 8（単量体）あるいは 6 Å（二量体）以内の距離に存在する水分子のみを考慮し、A β の周囲に存在する水和水が A β 単量体、及び二量体の安定性に与える影響を解析した。水和した A β 単量体、及び二量体に対する *ab initio* FMO 計算において、それぞれ 997、1151 個の水分子を考慮している。A β の周囲に存在する水分子の数は、A β 単量体あるいは二量体の表面構造によって異なる。しかし、最適化構造間の相対的な安定性を比較するためには、全ての最適化構造で考慮する水分子の数を統一する必要がある。そのため、本 FMO 計算では、考慮する水分子の数を、周囲に存在する水分子の数が最少となる最適化構造に合わせ、統一した。また、アミノ酸間、アミノ酸と水分子間、及び水分子間の相互作用エネルギーを詳細に解析するため、各アミノ酸及び各水分子をひとつのフラグメントとして割り当てた。本 FMO 計算において、相互作用エネルギーをより高精度に評価するため、 π - π スタッキング、NH- π 、及び CH- π 相互作用を正確に評価できる *ab initio* MP2/6-31G 法を使用した。さらに、FMO 計算から得られる相互作用エネルギーを解析し、どのアミノ酸が A β 単量体あるいは二量体の安定化に重要であるかを解明した。本計算には、FMO 計算プログラム ABINIT-MP Ver.6.0^[197]を用いた。

第4章 計算結果と考察

4.1. 水和した A β 単量体に対する計算結果

4.1.1. REMD 及び MM 法により得られた代表構造の最適化構造

本研究では、実溶媒中の A β 単量体の安定配座を広く探索するため、溶液 NMR 構造^[58]を初期構造とし、270.0–363.4 K の温度範囲を持つ 32 個のレプリカを用いた REMD^[180, 181]シミュレーションを実行した。まず、REMD シミュレーション中に、レプリカが温度空間を広く移動しているかを検証するため、レプリカ交換のタイミングにおける、それぞれ下限温度(270.0K, Replica0)、及び上限温度(363.4 K, Replica31)を持つレプリカの位置を解析した。Figure 17 のグラフは、REMD シミュレーション中のレプリカインデックスの推移を示す。このグラフの縦軸はレプリカのインデックスを示し、インデックスの数が小さくなる程、レプリカは下限温度に近い固有温度を持ち、数が大きくなる程、上限温度に近い固有温度を持つレプリカとなる。また、横軸はシミュレーション時間に対応する。どちらのレプリカも約 6 ns の時点で、下限温度から上限温度まで、あるいはその逆の移動をしている。どちらのレプリカも、暫くの間、移動先の温度から中間温度(Replica index = 15 or 16)までを往復している。その後、Replica31 は 31 ns 付近で初期の上限温度(Replica index = 31)まで戻り、一方、Replica0 は 39 ns 以降に初期温度(Replica index = 0)まで移動している。従って、本研究の REMD シミュレーションにおいて、各レプリカは温度空間を効率良く移動している。

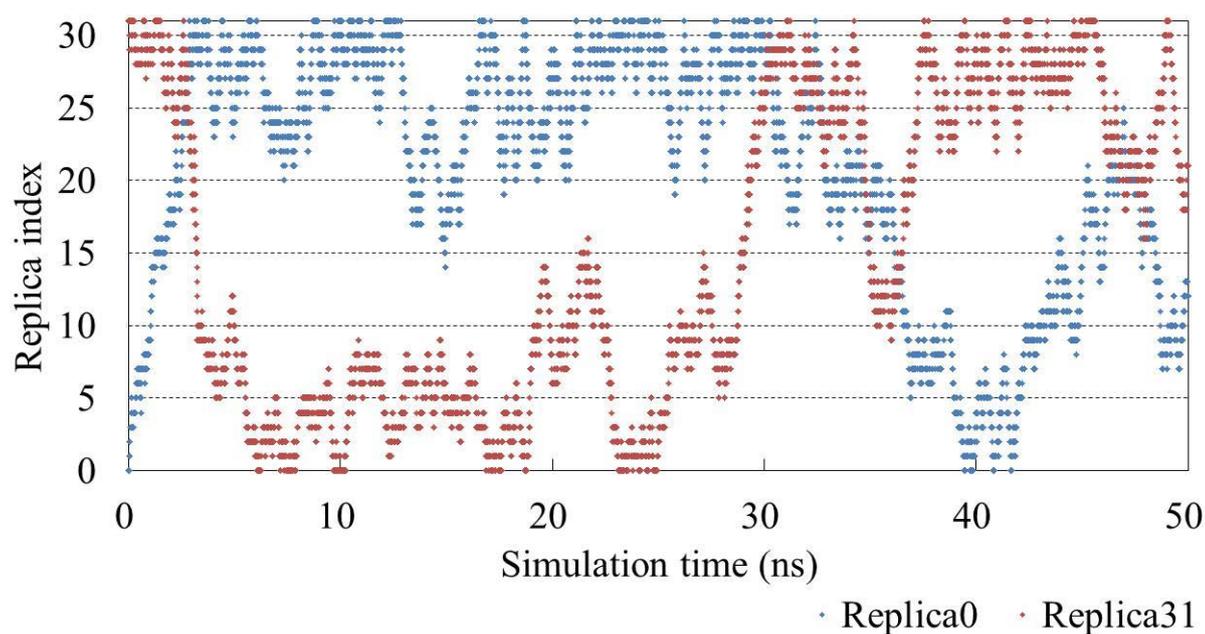


Figure 17. The time evolutions of movement of replica indexes for Replica0 and Replica31 during the 50 ns REMD simulation.

次に、288.7–311.7 K の温度範囲に対応する 9 個の MD トラジェクトリから、それぞれ最小のポテンシャルエネルギーを持つ構造を、水和した A β 単量体の代表構造としてサンプリングした。Figure 18 に示すポテンシャルエネルギーの経時変化グラフは、各トラジェクトリがそれぞれの温度において平衡化していることを示している。そこで、MD スナップショットから、最小のポテンシャルエネルギーを持つ構造を、それぞれ各温度でサンプリングし、9 個の代表構造を得た。これらの代表構造を GROMACS-MM^[194] 法を用い、水中で最適化した。それらの最適化構造を Figure 19 に示す。ここで、A β 単量体の構造を明瞭に表示するため、周囲の水和水を非表示にしている。

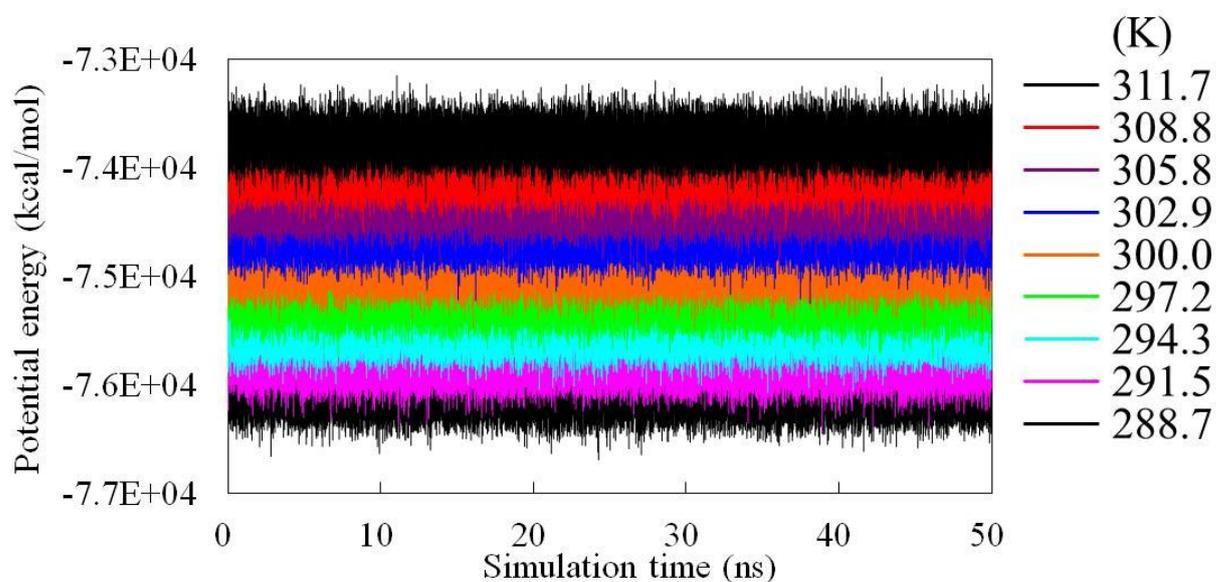


Figure 18. The time evolutions of potential energy during the 50 ns REMD simulation for the nine replicas having the 288.7–311.7 K temperatures.

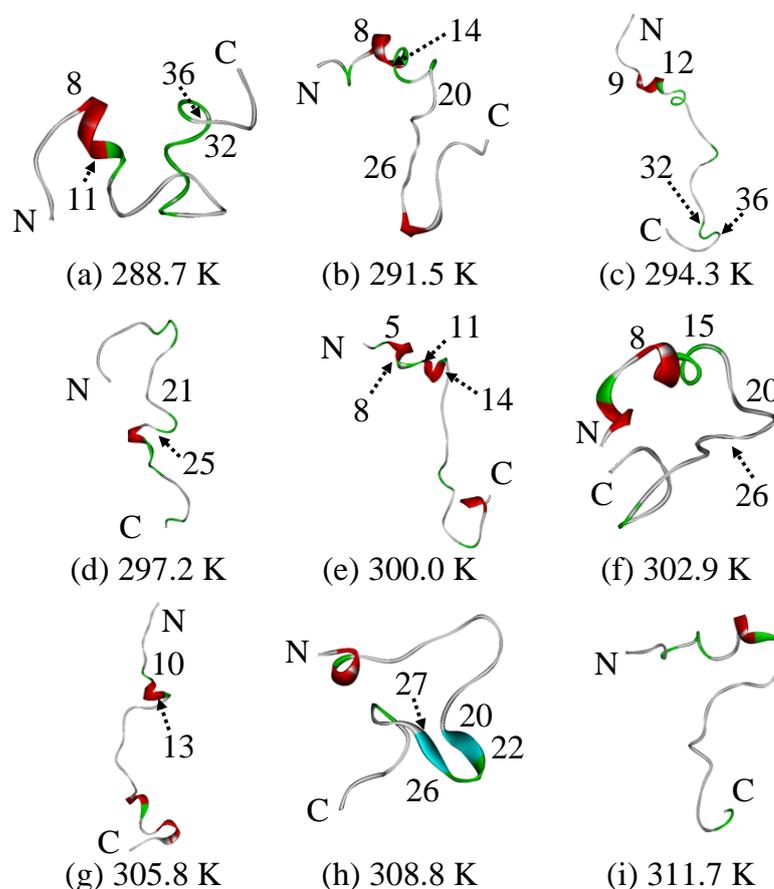


Figure 19. Optimized conformations of solvated A β monomer sampled from the 288.7–311.7 K trajectories of REMD simulations. The structures are colored by secondary structure type (red = helix, cyan = β -sheet, green = turn, and white = coil).

本研究における REMD 及び MM 計算により、水和した A β 単量体の安定配座を広範囲に探索できたことを確認するため、Figure 19 の最適化構造を初期構造である溶液 NMR 構造(PDB ID: 1Z0Q^[58])と比較した。Table 2 に列挙するように、最適化構造と初期構造 (Table 2 の Initial) 間の C α 原子に対する平均二乗偏差(root mean square deviation; RMSD)値を算出した。RMSD 値は、最適化構造の原子座標 \mathbf{r}_i と参考座標である初期構造の原子座標 \mathbf{r}_{ref} のずれの二乗を全原子に対して平均し、その平方根を取った値であり、式(3)で表される。

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{ref})^2}{N}} \quad (3)$$

ここで、 N は A β 単量体に含まれる C α 原子の総数を表す。本研究では、GROMACS^[194] パッケージに含まれる `g_rms_d` を用いた。Table 2 の RMSD 値は 7.7–11.4 Å であり、各最適化構造は初期構造から著しく配座が変化している。さらに、各代表構造間の RMSD 値を算出し、7.4–17.2 Å の値を得た。従って、本研究における REMD 及び MM 計算により、水和した A β 単量体の安定配座を広範囲に探索できた。

Table 2. RMSD values (Å) between the initial structure of solvated A β monomer (PDB ID: 1Z0Q^[58]) and the MM optimized structure for each replica with temperature of 288.7–311.7 K, and RMSD values between the optimized structures.

Conformation	Initial	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
Fig. 19 (a) at 288.7 K	10.6	—	—	—	—	—	—	—	—
Fig. 19 (b) at 291.5 K	7.7	10.7	—	—	—	—	—	—	—
Fig. 19 (c) at 294.3 K	9.2	14.4	13.2	—	—	—	—	—	—
Fig. 19 (d) at 297.2 K	8.5	12.0	11.0	9.7	—	—	—	—	—
Fig. 19 (e) at 300.0 K	8.2	13.7	9.4	8.5	9.9	—	—	—	—
Fig. 19 (f) at 302.9 K	10.9	10.0	9.5	17.0	14.0	15.2	—	—	—
Fig. 19 (g) at 305.8 K	9.4	12.5	12.6	7.4	10.5	8.2	16.3	—	—
Fig. 19 (h) at 308.8 K	11.4	9.7	10.2	17.2	12.6	15.5	7.6	16.0	—
Fig. 19 (i) at 311.7 K	8.8	9.3	9.7	13.3	9.8	12.3	10.2	13.2	9.5

また、Figure 19 の水和した A β 単量体の最適化構造の構造的特徴を明らかにするため、Define Secondary Structure of Proteins(DSSP)アルゴリズム^[202]を用い、二次構造を解析した。DSSP アルゴリズムは、タンパク質の二次構造や幾何学的特徴を、与えられた原子座標を基に定義する。DSSP アルゴリズムを用いた二次構造の解析には、GROMACS^[194]パッケージに含まれる do_dssp_d を用いた。Figure 19 (a)、(b)、(c)、(e)、(f)、及び(g)の最適化構造において、Ser8–His14 残基での α ヘリックス構造の形成が見られた。従って、A β 単量体のこの領域は、水中で α ヘリックス構造を形成し易いと考えられる。一方、Figure 19 (h)の最適化構造では、Phe20–Glu22 残基と Ser26–Asn27 残基間で形成された β シート構造を持っている。さらに、Figure 19 (a)と(d)の最適化構造では、それぞれ Ala21 と Gly25 間、Ile32 と Val36 間の β ブリッジの形成が見られた。これらの結果は、A β 単量体の Phe20–Asn27 残基と Ala30–Val36 残基は、他の残基と比較して、高い確率で β 構造を形成することを示した REMD シミュレーション^[132]の結果と定性的に一致する。Figure 19 (b)と(f)の最適化構造では、Ala20–Ser26 残基がベンド構造を形成している。これらの残基は、溶液 NMR 実験^[89]からもベンドやターン構造を形成しやすいことが示されている。また、REMD 法を用いた理論研究^[86]においても、Asp23–Asn27 残基を中心とした領域におけるターン構造が高い確率で得られている。従って、本研究における REMD 及び MM 計算によって得られた A β 単量体の最適化構造は、溶液 NMR 実験^[89]や REMD 法を用いた理論研究^[86]を再現できていることが確認できた。

4.1.2. *Ab initio* FMO 法による最安定配座の決定

水和した A β 単量体の最安定配座を高精度に決定するため、*ab initio* MP2/6-31G 法を用いた FMO^[182-190] 計算により、Figure 19 の最適化構造の全エネルギーを評価した。得られた全エネルギーに基づき、最安定配座を決定する。本研究における FMO 計算には、ABINIT-MP Ver.6.0^[197] を用いた。水和した A β 単量体の FMO 計算において、A β の周囲 8 Å 程度に存在する 997 個の水分子をあらわに考慮し(Figure 20)、構造の安定性における水和水の影響を解明した。*Ab initio* FMO 法、及び GROMACS-MM^[194] 法により評価した全エネルギーを Table 3 にまとめる。GROMACS-MM 計算における最安定配座が Figure 19 (a) であるのに対し、*ab initio* FMO 計算における最安定配座は Figure 19 (f) である。従って、水和した A β 単量体の異なる配座間の相対的な安定性を比較する際には、*ab initio* FMO 計算による高精度な電子状態解析が必要であることを明らかにした。本研究の FMO 計算において、Figure 19 (f) の構造は、他の最適化構造と比較して、最低でも 147 kcal/mol 安定である。このエネルギー差は生物学的観点から考えて非常に大きい。これは主に真空中（比誘電率 $\epsilon = 1$ ）の FMO 計算に起因するものである。

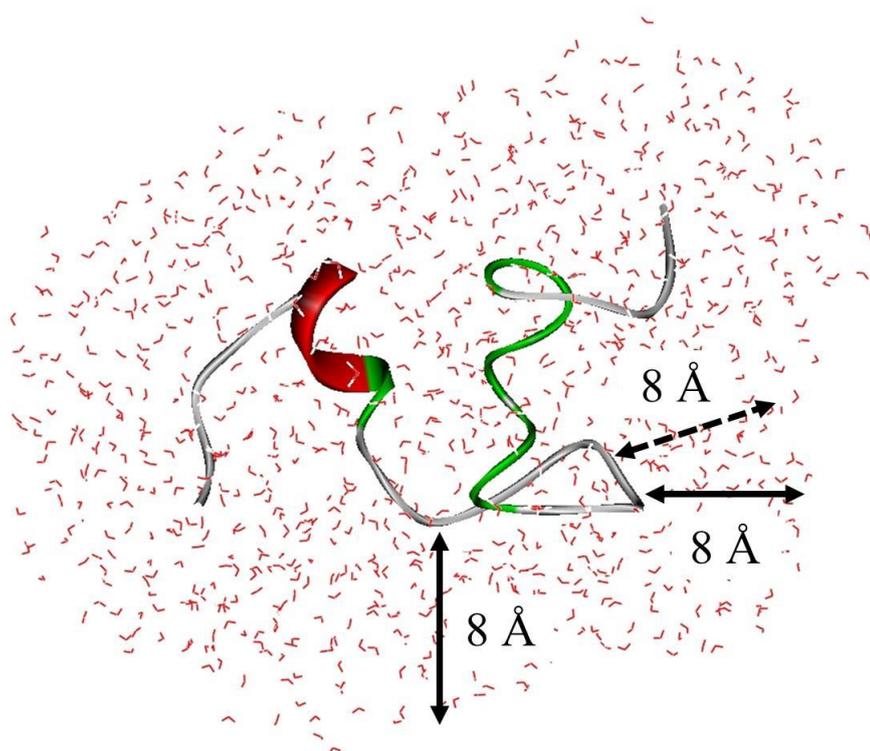


Figure 20. Schematic picture of the present FMO calculation system for solvated A β monomer.

Table 3. Total energies (TE) (kcal/mol) for the optimized conformations of the solvated A β monomer evaluated by classical GROMACS-MM method and *ab initio* MP2/6-31G of FMO method. Δ TE is TE relative to the most stable one.

Conformation	GROMACS-MM method		<i>ab initio</i> FMO method	
	TE	Δ TE	TE	Δ TE
Fig. 19 (a) at 288.7 K	-91272.5	0.0	-57534838.3	342.7
Fig. 19 (b) at 291.5 K	-91167.2	105.2	-57535034.3	146.7
Fig. 19 (c) at 294.3 K	-90994.7	277.8	-57534196.6	984.4
Fig. 19 (d) at 297.2 K	-90898.1	374.4	-57534597.0	584.0
Fig. 19 (e) at 300.0 K	-90905.4	367.1	-57533766.0	1415.0
Fig. 19 (f) at 302.9 K	-90806.5	466.0	-57535181.0	0.0
Fig. 19 (g) at 305.8 K	-90834.3	438.1	-57534065.1	1115.9
Fig. 19 (h) at 308.8 K	-90537.8	734.7	-57534863.8	317.2
Fig. 19 (i) at 311.7 K	-90531.2	741.3	-57534508.9	672.1

Figure 19 (f)の最適化構造が最安定となる要因を明らかにするため、水和した A β 単量体(A β monomer + water)を A β 単量体(A β without water)、及び水和水の系(Water)に分け、FMO 計算により、それぞれの全エネルギーを評価した。また、それらの全エネルギー(Total energy; TE)から、式(4)により、A β 単量体の水和エネルギー(Hydration energy; HE)を求めた。従って、HE の値が大きいくほど、水和による影響が大きくなる。各構造の全エネルギー、及び A β 単量体の水和エネルギーを Table 4 にまとめる。

$$HE = -TE (\text{A}\beta \text{ monomer} + \text{water}) + TE (\text{A}\beta \text{ without water}) + TE (\text{Water}) \quad (4)$$

水和した A β 単量体の全エネルギーの差(Δ TE)は最大で 1415 kcal/mol であるのに対し、A β 単量体の Δ TE は最大でも 337 kcal/mol である。また、水和水の Δ TE、及び水和エネルギーの差(Δ HE)は、それぞれ最大で 1333、691 kcal/mol である。従って、水和水の安定性は、A β 単量体自身の安定性よりも、水和した A β 単量体の安定性に強く影響を与えていると推測できる。そこで、水和水の影響を明確にするため、水和した A β 単量体の Δ TE と A β 単量体の Δ TE、水和水の Δ TE、及び Δ HE の間の相関を調べた。Figure 21 に示す結果から、水和した A β 単量体の Δ TE と A β 単量体の Δ TE 間、水和した A β 単量体の Δ TE と水和水の Δ TE 間、及び水和した A β 単量体の Δ TE と Δ HE 間の相関係数 R は、それぞれ 0.62、0.91、0.11 の値を示した。つまり、水和した A β 単量体の安定性は、A β 単量体自身の安定性よりも、周囲に存在する水和水の影響をより強く受け、安定な

水和水を持つ配座ほど、より安定になることが、本研究から明らかとなった。従って、水和した $A\beta$ 単量体の最安定配座の決定においては、 $A\beta$ 単量体の周囲に存在する水和水をあらわに考慮する必要がある。

Table 4. Total energies (TE) (kcal/mol) evaluated by *ab initio* FMO method for the solvated $A\beta$ monomer, $A\beta$ without solvating water molecules, and solvating water molecules. The hydration energies (HE) for the $A\beta$ monomer are estimated as

$HE = -TE(\text{solvated monomer}) + TE(\text{monomer in vacuum}) + TE(\text{Solvating water molecules})$.

ΔTE is TE relative to the most stable one, and ΔHE is HE relative to the most stable one.

Conformation	$A\beta$ monomer + water		$A\beta$ without water		Water (997 molecules)		Hydration energy (HE)	
	TE	ΔTE	TE	ΔTE	TE	ΔTE	HE	ΔHE
Fig. 19 (a) at 288.7 K	-57534508.2	342.7	-9900460.7	164.2	-47631475.5	499.4	2572.0	233.6
Fig. 19 (b) at 291.5 K	-57534704.3	146.7	-9900574.2	50.6	-47631850.4	124.5	2279.6	526.1
Fig. 19 (c) at 294.3 K	-57533866.5	984.4	-9900429.0	195.9	-47630696.3	1278.6	2741.2	64.4
Fig. 19 (d) at 297.2 K	-57534266.9	584.0	-9900328.9	296.0	-47631164.6	810.4	2773.5	32.2
Fig. 19 (e) at 300.0 K	-57533435.9	1415.0	-9900427.5	197.4	-47630893.3	1081.6	2115.1	690.5
Fig. 19 (f) at 302.9 K	-57534850.9	0.0	-9900624.9	0.0	-47631974.9	0.0	2251.2	554.5
Fig. 19 (g) at 305.8 K	-57533735.0	1115.9	-9900287.9	336.9	-47630641.5	1333.4	2805.6	0.0
Fig. 19 (h) at 308.8 K	-57534533.7	317.2	-9900379.5	245.4	-47631445.4	529.5	2708.8	96.8
Fig. 19 (i) at 311.7 K	-57534178.9	672.1	-9900429.7	195.2	-47631101.3	873.6	2647.9	157.8

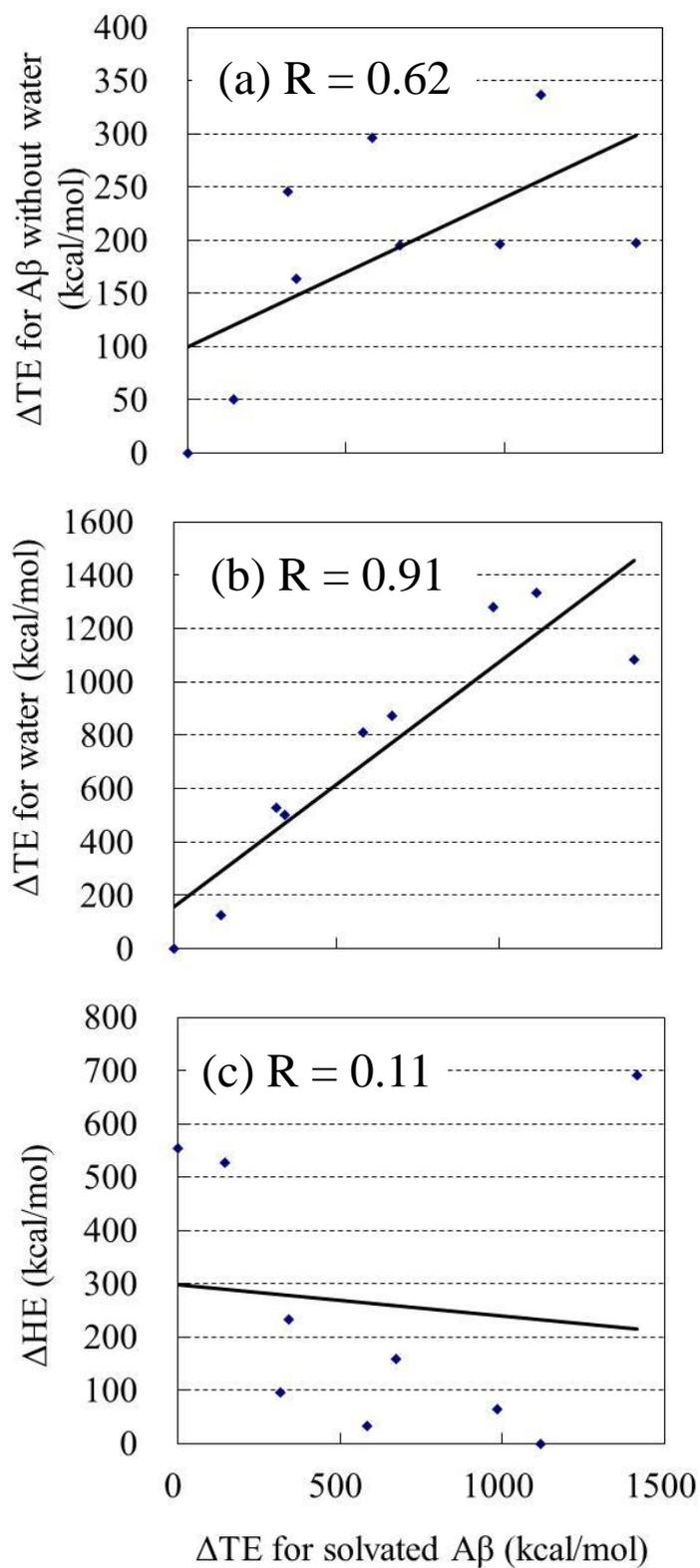
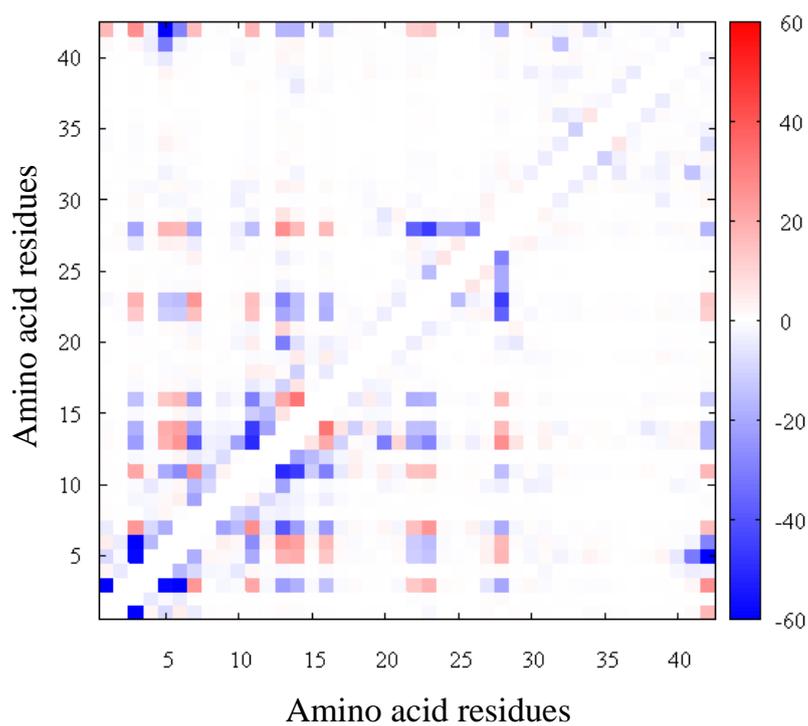


Figure 21. Correlations with (a) relative total energy (ΔTE) of solvated A β monomer and ΔTE of A β without water molecules, (b) ΔTE of solvated A β monomer and ΔTE of solvating water molecules, and (c) ΔTE of solvated A β monomer and ΔHE of A β monomer.

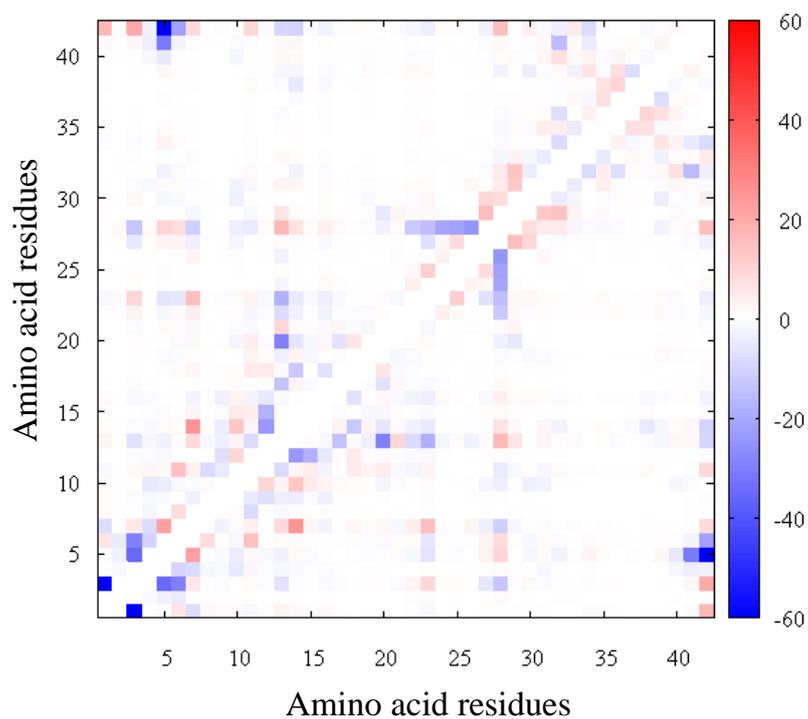
4.1.3. 最安定配座における単量体内の特異的相互作用

次に、水和した A β 単量体の最安定配座の安定化に寄与するアミノ酸間相互作用を明らかにするため、*ab initio* FMO^[182-190]計算から得られた相互作用エネルギーを解析した。Figure 22 (a)に、最安定配座の A β 単量体内の相互作用エネルギーを図示する。縦軸、及び横軸は A β 単量体のアミノ酸配列の番号を表す。単量体内相互作用であるため、Figure 22 (a)の相互作用エネルギーは対角線に対称である。正荷電アミノ酸である Lys28 は、Glu22–Ser26 の領域との強い引力相互作用を示した。Glu22–Ser26 残基や Lys28 を含む Phe20–30 領域は、Figure 23 のように、ターン様構造を形成している。この結果は、Ala21–Ala30 領域がターン様構造を形成することを示した NMR 実験^[66]の結果と定性的に一致する。このターン様構造における主な引力相互作用エネルギーを、Table 5 に列挙した。ターン様構造は、主に、荷電アミノ酸である Asp23 や Lys28 とその周囲のアミノ酸間の強い引力相互作用により、安定している。Figure 23 (a)に示したように、Asp23 の側鎖は、Gly25 の主鎖の窒素原子と静電的に引力相互作用している。Lys28 の側鎖は Val24 の主鎖の酸素原子と静電相互作用し、さらに、Gly25 及び Ser26 の主鎖の酸素原子と水素結合を形成している。加えて、Phe20 の側鎖のフェニル基と Gly29 の主鎖の NH 部位と NH- π 相互作用を形成している。上記の相互作用は、Phe20–Ala30 領域における安定なターン様構造の形成に寄与している。

また、Phe20–Ala30 領域のターン様構造の安定化には、いくつかの水分子が寄与している。Figure 23 (b)中の Water 1 及び 2 は、水素結合により、Ala21 と Lys28 の間を橋渡し（ブリッジ）するように存在している。同様に、Water 3 及び 4 は、それぞれ Asp23 と Ser26 の間、Asn27 と Ala30 の間をブリッジしている。さらに、Water 5 は水素結合により、Water 1 と 3 の間をブリッジする。これらの水素結合の相互作用エネルギーは、Table 6 に列挙するように、-10 から -19 kcal/mol 程度である。また、Figure 24 のように、他のいくつかの水分子がターン様構造と A β 単量体の他の領域をブリッジしていることを明らかにした。いくつかの水分子は、Asn27 と N 末端の Asp7 あるいは Tyr10 のコンタクトを促進している。この結果は、A β 単量体の N 末端は、Glu22–Ala30 残基と N 末端配列間の強いコンタクトの形成により安定する可能性を示唆した REMD 法を用いた先行研究^[135]の予想と比較できる。従って、水和水を顕わに考慮した本研究の分子シミュレーションにより、水分子が水和した A β 単量体の最安定配座(Figure 19 (f))の安定化に大きく寄与していることを明らかにした。



(a)



(b)

Figure 22. (a) Interaction energies (kcal/mol) between amino acid residues of A β monomer in the most stable conformation (Fig. 19 (f)) of solvated A β monomer; (b) difference in interaction energy (kcal/mol) between the most stable conformation (Fig. 19 (f)) and the less stable conformation (Fig. 19 (g)) of solvated A β monomer.

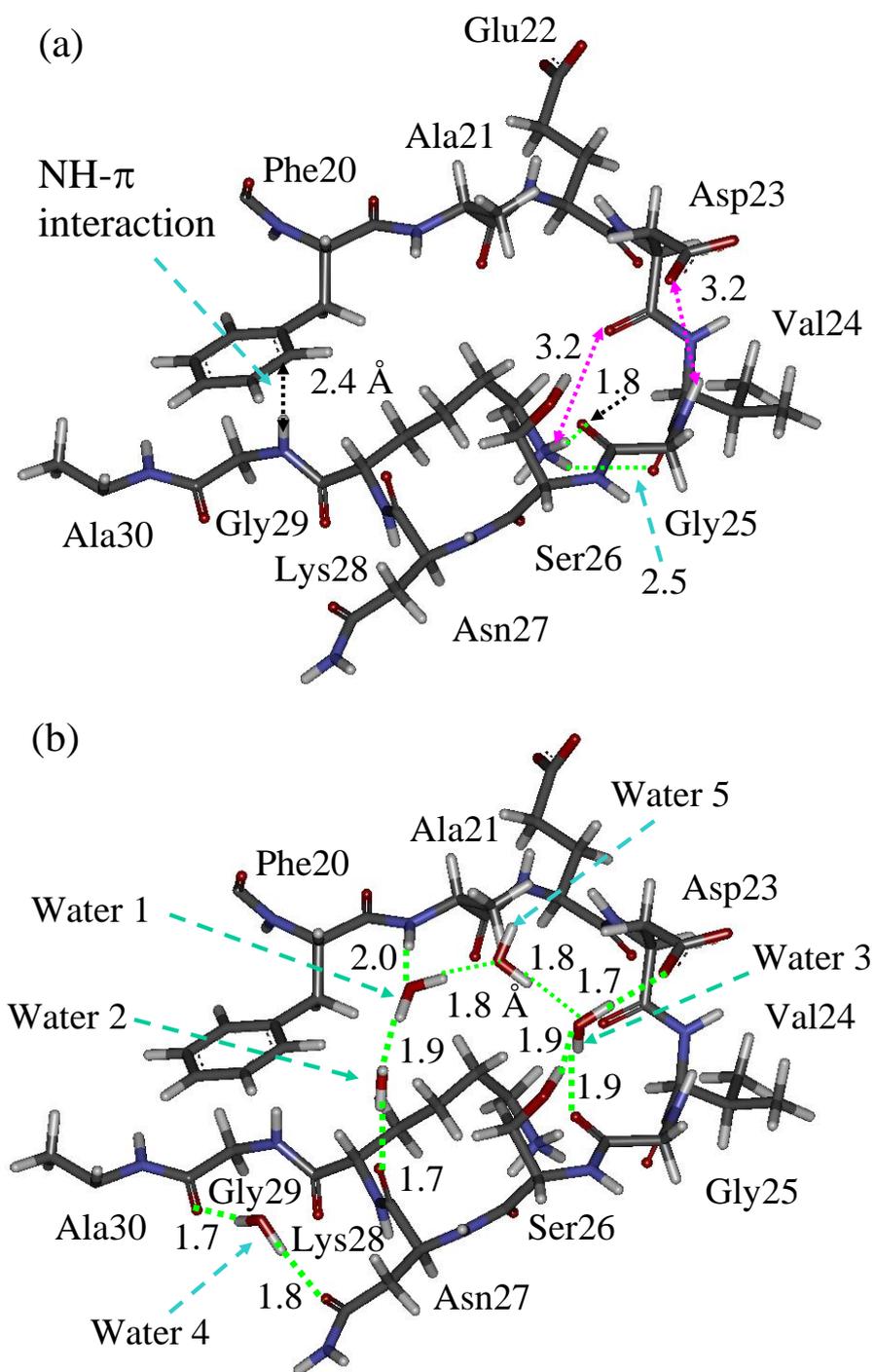


Figure 23. The turn-like structure formed by the amino acid residues of the Phe20-Ala30 domain in the most stable conformation of the solvated A β monomer (Fig. 19 (f)); (a) specific interactions between the A β residues, and (b) specific water molecules contributing to the stability of the turn-like structure. Green dot-lines indicate hydrogen bonds, while pink dot-lines indicate electrostatic attractive interactions between amino acid residues. Some water molecules contribute to the interaction.

Table 5. Interaction energies (IE) (kcal/mol) between the amino acid residues of A β monomer for the most stable conformation (Fig. 19 (f)) evaluated by *ab initio* MP2/6-31G FMO calculations.

Amino acid pair	IE
Asp23-Gly25	-15.9
Lys28-Val24	-20.2
Lys28-Gly25	-20.2
Lys28-Ser26	-29.3
Phe20-Gly29	-5.3

Table 6. Interaction energies (IE) (kcal/mol) between the amino acid residues of A β monomer and some solvating water molecules in the most stable conformation of solvated A β monomer (Fig. 19 (f)) evaluated by *ab initio* MP2/6-31G FMO calculations.

Residue or water	IE
Ala21-Water 1	-9.8
Water 1-Water 2	-10.4
Water 2-Lys28	-16.0
Asp23-Water 3	-19.3
Water 3-Ser26	-17.7
Asn27-Water 4	-11.2
Water 4-Ala30	-13.7

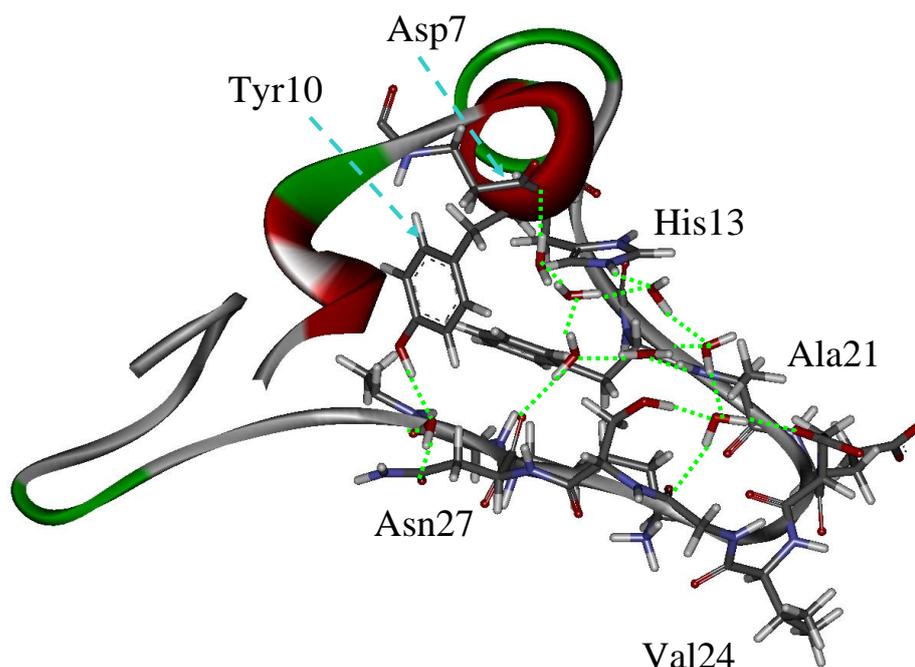


Figure 24. Hydrogen bonding network of solvating water molecules contributing to the stability of the most stable conformation (Fig. 19 (f)) of solvated A β monomer.

Green dot-lines indicate hydrogen bonds.

さらに、水和した A β 単量体の最適化構造における特異的アミノ酸間相互作用の依存性を解明するため、最安定配座(Figure 19 (f))と最安定配座との全エネルギー差の大きい Figure 19 (g)の最適化構造の相互作用エネルギーを比較した。Figure 19 (g)の最適化構造は、Figure 19 (f)の最安定配座と比較して、水和した A β 単量体の全エネルギーの差が大きく、また、A β 単量体の全エネルギーの差は最大である(Table 4)。Figure 22 (b)に、Figure 19 (f)と(g)の相互作用エネルギーの差を図示した。相互作用エネルギーの差が大きくなったアミノ酸ペアは、Asp1-Glu3、Arg5-Ala42、及び Arg5-Ile41 であり、エネルギー差は、それぞれ-76.1、-78.1、-31.3 kcal/mol である。A β 単量体の N 末端と C 末端に位置するアミノ酸のこれらの強い引力相互作用は、Phe20-Ala30 領域のターン様構造の形成を促している可能性がある。

最安定配座(Figure 19 (f))における上記のアミノ酸残基の相互作用構造を解析した。最安定配座では、Figure 24 (a)のように、N 末端である Asp1 のアミノ基が Glu3 の負に荷電した側鎖と水素結合を形成している。また、Arg5 の正に荷電した側鎖は、Ile41 の主鎖の酸素原子、及び C 末端である Ala42 のカルボキシ基と水素結合を形成している。従って、A β 単量体の荷電した末端は、A β 単量体の安定化に重要である。このような A β の末端同士の特異的相互作用は、REMD 法を用いた理論研究^[130]の結果と比較できる。さらに、別の REMD 研究^[135]から、A β の Asp1-Ala42、Ala2-Val40、及び Glu3-Val40 間

の水素結合の形成が示されている。

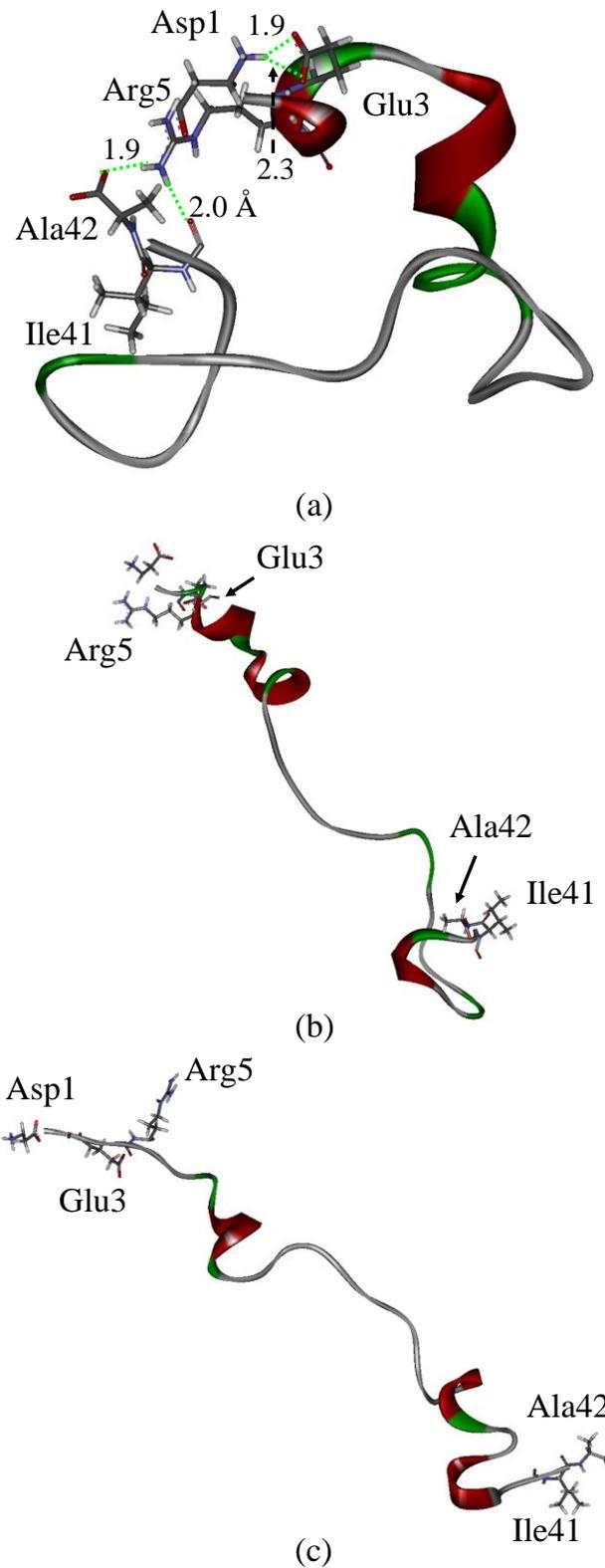


Figure 25. Interacting structures between amino acid residues of A β monomers in (a) the most stable conformation (Fig. 19 (f)), and the less stable conformations of (b) Fig. 19 (e) and (c) Fig. 19 (g).

対照的に、最安定配座と比較して、水和した A β 単量体の全エネルギーの差が大きい Figure 19 (e)及び(g)の最適化構造においては、末端の残基間の特異的相互作用は見られない(Figure 25 (b)及び(c))。最安定配座に比べ、単量体の構造が伸長しており、末端同士が離れて位置している。その結果、これらの構造は最安定配座との全エネルギー差が大きくなったと考えられる。

4.1.4. 計算結果の妥当性の検証：先行研究との比較

本研究における分子シミュレーションの妥当性を検証するため、本研究の結果を、NMR 実験^[66]、及び理論研究^[117-119, 123]の結果と比較した。NMR 実験は、Ala21–Ala30 領域がターン様構造を形成することを明らかにしており、この領域は、A β 単量体が Figure 5 (a)で示した β -strand-turn- β -strand motif を形成する際の核になると予想している。また、Ala21–Ala30 フラグメントに対する分子シミュレーション^[117, 118, 123]は、ターン様構造が Glu22 あるいは Asp23 と Lys28 間の静電相互作用、及び分子内塩橋により安定化することを明らかにした。Asp23 と Lys28 間の塩橋は、A β (10–35)フラグメントに対する理論研究^[119]においても観測されている。本研究では、REMD シミュレーションと *ab initio* FMO 計算を組み合わせ、実溶媒中の全長の A β 単量体内のアミノ酸間相互作用を電子レベルで解析した(Table 7)。水和した A β 単量体の最安定配座における Glu22 と Lys28 間の相互作用エネルギーは、他の配座と比較して、最大で 20 kcal/mol 程度大きい。従って、この相互作用は A β 単量体の安定化に重要である。Asp23 と Lys28 間の相互作用エネルギーは、A β 単量体の構造依存性がより顕著である。従って、本研究における *ab initio* FMO 計算により評価した Glu22 あるいは Asp23 と Lys28 間の相互作用エネルギーは、Lazo らの NMR 実験^[66]、及び従来の MD シミュレーション^[117-119, 123]の結果と定性的に一致する。一方、A β 単量体における Asp23 と Lys28 間の分子内塩橋については、今回の分子シミュレーションから得られた配座では形成されていない。本研究の *ab initio* FMO 計算の結果(Table 7)は、Asp23 と Lys28 が非常に強く相互作用していることを示したが、それらの側鎖間での直接的な水素結合は存在しない。

Table 7. Interaction energies (IE) between Glu22 or Asp23 and Lys28 for the nine optimized conformations of the solvated A β monomer evaluated by *ab initio* MP2/6-31G FMO calculations.

Conformation	IE (kcal/mol)	
	Glu22-Lys28	Asp23-Lys28
Fig. 19 (a) at 288.7 K	-18.7	-38.5
Fig. 19 (b) at 291.5 K	-17.6	-35.0
Fig. 19 (c) at 294.3 K	-18.5	-35.5
Fig. 19 (d) at 297.2 K	-22.3	-18.5
Fig. 19 (e) at 300.0 K	-17.2	-32.2
Fig. 19 (f) at 302.9 K	-37.2	-45.8
Fig. 19 (g) at 305.8 K	-24.4	-30.7
Fig. 19 (h) at 308.8 K	-25.3	-18.7
Fig. 19 (i) at 311.7 K	-17.6	-26.9

固体 NMR データに基づき、いくつかの A β 線維のモデルが提案されている (PDB ID: 2BEG^[67], 2LMN, 2LMO, 2LMP, 2LMQ^[68], 2M4J^[78])。これらのモデルでは、 β -strand-turn- β -strand motif を持つ A β が平行な配向性で集合し、線維を形成している (Figure 5 (a), (c), Figure 11 及び 12)。このモチーフは CHC(Leu17-Ala21 残基)と C 末端配列間のコンタクトにより形成される。また、Ala21-Ala30 領域のターン様構造^[132]により、モチーフの形成が促進されると考えられる。Baumketner らの REMD シミュレーション^[123]において、Asp23 とその近傍に存在する残基間の水素結合は、このターン様構造の安定化に寄与していることが示された。本研究で明らかにした水和した A β 単量体の最安定配座は、Figure 23 及び 24 に示したように、Phe20-Ala30 残基が形成したターン様構造を持つ。さらに、本研究の FMO 計算から、Lys28 とその近傍に位置する残基間の相互作用が Phe20-Ala30 領域のターン様構造の安定化に重要であることを明らかにした。従って、本研究の結果は、NMR 実験^[67, 68, 78]の結果と定性的に一致する。

また、本研究の FMO 計算から明らかにした Glu22 あるいは Asp23 と Lys28 間の特異的相互作用は、Phe20-Ala30 領域のターン様構造の形成におけるトリガーになり得る。従って、これらの相互作用を抑制できる低分子化合物は、A β の凝集を効率的に抑制することが期待できる。

4.1.5. まとめ：水和した A β 単量体の最安定配座の特徴

本研究では、実溶媒中の全原子 REMD シミュレーションにより、全長の A β 単量体の安定配座を広く探索し、*ab initio* FMO 計算により、最安定配座(Figure 19 (f))を電子レベルで決定した。さらに、最安定配座におけるアミノ酸間相互作用を詳細に解析した。その結果、次の点を明らかにした。

- (1) Glu22 あるいは Asp23 と Lys28 残基間の静電相互作用は、Phe20–Ala30 残基が形成するターン様構造(Figure 23)の安定化に寄与する。
- (2) 上記のターン様構造は、A β 単量体の β -strand-turn- β -strand motif の形成を促す。
- (3) N 末端及び C 末端に位置する荷電アミノ酸間の静電相互作用(Figure 25 (a))は、A β 単量体の安定化に寄与する。
- (4) 水和した A β 単量体の相対的な安定性は、A β 単量体自身の安定性よりも、周囲に存在する水和水の安定性に、より強く依存する。

4.2. 水和した A β 二量体に対する計算結果

4.2.1. 全長の A β 二量体の初期構造の作成

A β の凝集プロセスは非常に速いため、PDB 上に、A β 二量体の立体構造データは存在しない。そのため、全長の A β 二量体に対する分子シミュレーションを実行するには、まず、その立体構造モデルを作成する必要がある。そこで、本研究では、全長の A β 二量体の初期構造を作成するため、PDB に登録されている A β (9-40) 12 量体の線維の固体 NMR 構造(PDB ID: 2LMN 及び 2LMO^[68])(Figure 12)を採用した。これらの構造を基に、まず、Figure 13 に示す単量体が上下に重なった二量体、及び左右に並んだ A β (9-40)二量体構造を作成した。その際、2LMN 及び 2LMO から、それぞれ C-D 鎖、I-J 鎖、C-I 鎖、及び D-J 鎖からなる二量体構造を作成し、計 8 個の A β (9-40)二量体構造を得た。これらの構造に対し、AMBER^[193]パッケージの LEaP を用い、C 末端の Ile41-Ala42 残基が直線構造となるよう付加し、A β (9-42)二量体構造を作成した。

上記の手順で作成した 8 個の A β (9-42)二量体を、3 章 2 節で述べたように、それぞれ水和し、GROMACS-MM^[194]法により、水中で最適化した。また、これらの最適化構造の中から水和した A β (9-42)二量体の最安定構造を決定するため、それぞれの最適化構造に対し、*ab initio* MP2/6-31G 法を用いた FMO^[182-190]計算により電子状態を解析し、全エネルギーを高精度に評価した。FMO 計算から得られた全エネルギーを、Table 8 に要約する。単量体間の接触面積の観点から、上下に重なった二量体(C-D 鎖及び I-J 鎖)に比べ、左右に並んだ二量体(C-I 鎖及び D-J 鎖)は不安定である。また、どちらの NMR 構造に基に作成しても、C-D 鎖と比較して、I-J 鎖の方が安定となった。全 8 構造の全エネルギーの比較から、水和した A β (9-42)二量体の最安定構造が 2LMN の I-J 鎖である。

Table 8. Total energies (TE) evaluated by *ab initio* MP2/6-31G FMO calculations for the solvated A β (9-42) dimers. Δ TE is TE relative to the most stable one.

Structure	TE (kcal/mol)	Δ TE
2LMN-CD	-84116341.6	330.5
2LMN-IJ	-84116672.0	0.0
2LMN-CI	-84114687.4	1984.6
2LMN-DJ	-84114926.0	1746.1
2LMO-CD	-84116207.0	465.0
2LMO-IJ	-84116438.0	234.0
2LMO-CI	-84115243.9	1428.1
2LMO-DJ	-84114813.1	1858.9

全長の A β (1-42)二量体の初期構造を作成するため、上記で決定した A β (9-42)二量体の最安定構造である 2LMN の I-J 鎖に対し、C 末端の付加と同様に、LEaP を用い、N 末端配列 Asp1-Ser8 を補完した。その際、Asp1-Ser8 の直線構造が、Gly9-Ala42 のシート構造と同一平面上に位置するように、且つ、補完した N 末端同士で立体障害が発生しないよう、Ser8 及び Gly9 の二面角を指定した。指定した二面角を Table 9 に列挙する。また、それにより得られた全長の A β 二量体構造を Figure26 に示す。以下に記述する計算では、上記の手順で作成した全長の A β (1-42)二量体を、初期構造として用いた。

Table 9. Dihedral angles of Ser8 and Gly9 in initial structure for A β (1-42) dimer

Chain	ϕ ($^{\circ}$)	ψ ($^{\circ}$)
I	120	-60
J	90	-60

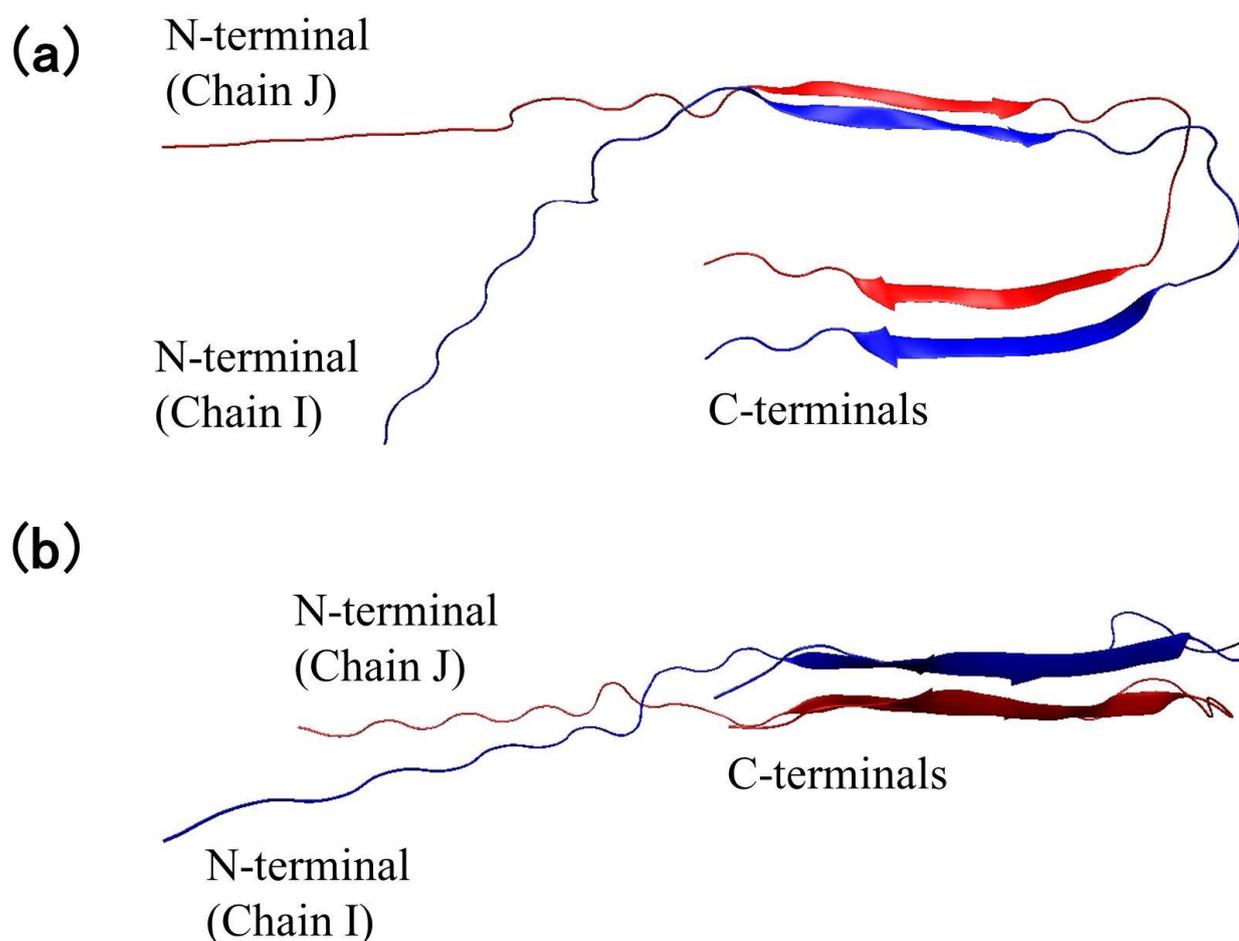


Figure 26. Initial structure for A β (1-42) dimer: (a) top view and (b) side view.

4.2.2. REMD 及び MM 法により得られた代表構造の最適化構造

本研究では、実溶媒中の全長の A β 二量体の安定配座を広範囲に探索するため、Figure 26 の A β (1-42) 二量体の初期構造に対し、270.0-363.8 K の温度範囲を持つ 52 個のレプリカを用いた REMD^[180, 181]シミュレーションを実行した。まず、4 章 1 節 1 項と同様に、REMD シミュレーション中に、レプリカが温度空間を広く移動しているかを検証するため、レプリカ交換のタイミングにおける 300.0 K の初期固有温度を持つレプリカの位置を追跡した。このレプリカは、Figure 27 に示すように、約 9 ns の時点で、初期温度である 300.0 K から上限温度(363.8 K, Replica index = 51)まで移動している。その後、約 20 ns かけて下限温度(270.0 K, Replica index = 0)まで到達している。従って、本研究の REMD シミュレーションにおいて、レプリカは温度空間を効率良く移動している。

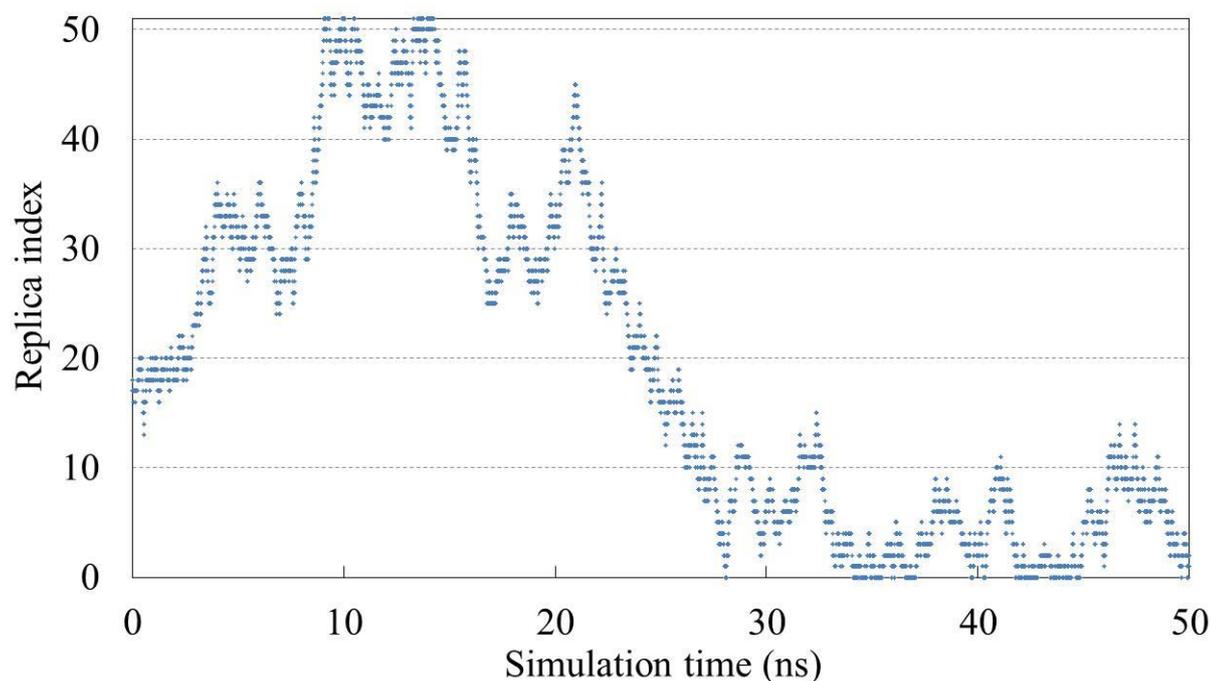


Figure 27. The time evolutions of movement of replica indexes for the replica with initial unique 300.0 K temperature during the 50 ns REMD simulation.

次に、289.6–310.7 K の温度範囲に対応する 13 個の MD トラジェクトリを対象に、それぞれ最小のポテンシャルエネルギーを持つ構造を、水和した $A\beta$ 二量体の代表構造としてサンプリングした。Figure 28 に示したポテンシャルエネルギーの経時変化グラフは、各トラジェクトリがそれぞれの温度において平衡化していることを示している。そこで、各トラジェクトリの MD スナップショットから、最小のポテンシャルエネルギーを持つ構造からサンプリングし、13 個の代表構造を得た。これらの代表構造を GROMACS-MM 法を用い、水中で最適化した。それらの最適化構造を Figure 29 に示す。ここで、 $A\beta$ 二量体の構造を明瞭に表示するため、周囲の水和水を非表示にしている。

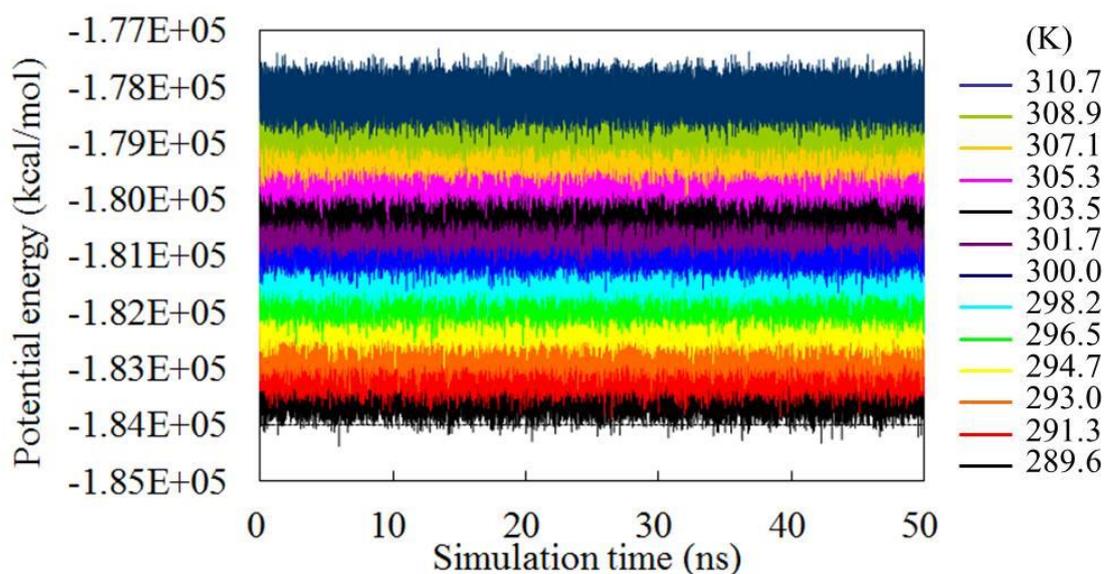


Figure 28. The time evolutions of potential energy during the 50 ns REMD simulation for the thirteen replicas having the 289.6–310.7 K temperatures.

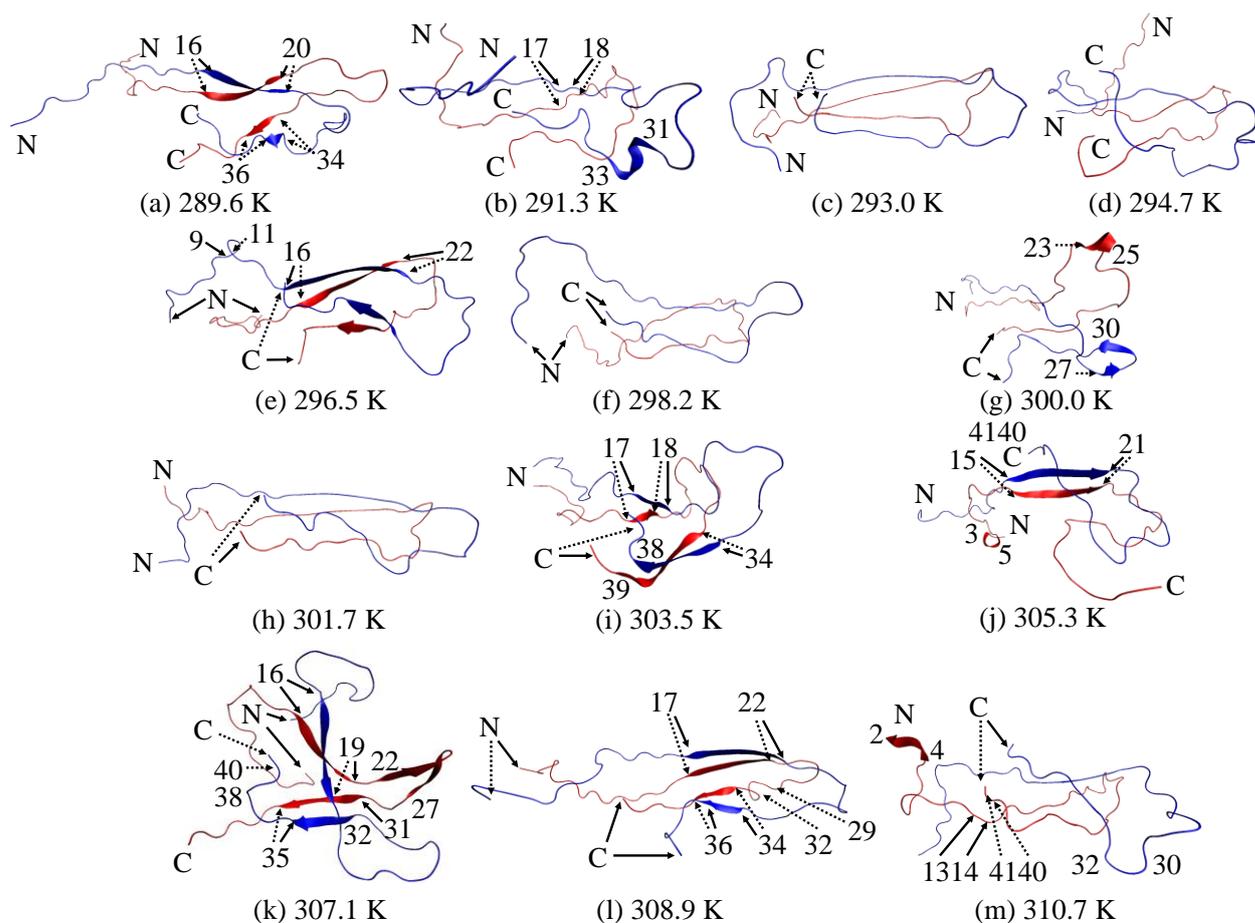


Figure 29. Optimized conformations of solvated A β dimer sampled from the 289.6–310.7 K trajectories of REMD simulations.

本研究の REMD 及び MM 計算により、水和した A β 二量体の安定配座が広く探索できたことを確認するため、Figure 29 の最適化構造を、初期構造の基となった NMR 構造 (PDB ID: 2LMN^[68]) の I-J 鎖と比較した。NMR 構造は A β (9–40) 線維であるため、最適化構造と I-J 鎖間の Gly9–Val40 の C α 原子に対する RMSD を算出した。Table 10 に列挙するように、RMSD 値は 6.8–20.5 Å となり、初期構造の基となった NMR 構造から大きく異なる配座が探索できた。さらに、各最適化構造間の RMSD 値も 6.8–24.6 Å となり、各構造は異なる配座をしている。従って、本研究の REMD 及び MM 計算から、水和した A β 二量体の様々な安定配座を探索できたことを確認した。

Table 10. RMSD values (Å) between the initial structure of solvated A β dimer (PDB ID: 2LMN^[68]) and the MM optimized structure for each replica with temperature of 289.6–310.7 K, and RMSD values between the optimized structures.

Conformation	Initial	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)	(k)	(l)
Fig. 29 (a) at 289.6 K	7.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fig. 29 (b) at 291.3 K	8.7	11.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fig. 29 (c) at 293.0 K	19.5	19.5	18.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fig. 29 (d) at 294.7 K	20.2	21.3	18.3	15.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fig. 29 (e) at 296.5 K	7.3	6.8	11.4	17.3	19.2	—	—	—	—	—	—	—	—
Fig. 29 (f) at 298.2 K	18.1	17.3	18.4	13.4	20.2	18.0	—	—	—	—	—	—	—
Fig. 29 (g) at 300.0 K	20.5	21.1	20.8	17.8	12.3	19.8	24.6	—	—	—	—	—	—
Fig. 29 (h) at 301.7 K	19.6	20.6	20.2	12.1	12.5	18.7	21.2	10.9	—	—	—	—	—
Fig. 29 (i) at 303.5 K	9.3	10.6	10.8	20.0	17.6	10.1	20.8	18.9	19.9	—	—	—	—
Fig. 29 (j) at 305.3 K	11.7	9.3	13.5	19.0	19.5	8.0	18.8	22.2	21.1	11.0	—	—	—
Fig. 29 (k) at 307.1 K	10.7	14.9	15.0	20.8	18.8	12.5	20.7	21.3	23.3	12.3	13.2	—	—
Fig. 29 (l) at 308.9 K	6.8	7.6	10.3	18.1	20.2	8.1	17.9	19.2	18.8	11.0	12.2	15.5	—
Fig. 29 (m) at 310.7 K	20.4	21.5	20.2	15.1	10.6	19.4	21.9	8.4	9.7	18.9	21.6	20.1	20.1

また、Figure 29 の水和した A β 二量体の最適化構造の構造的特徴を明らかにするため、DSSP アルゴリズム^[202]を用い、各最適化構造の二次構造を解析した。最適化構造に共通する特徴として、単量体間の β シート構造、及び Val24–Gly29 残基の領域におけるバンドやターン構造の形成が挙げられる。単量体間の β シートは、Figure 29 (a)、(b)、(e)、(i)、(j)、(k)、(l) の最適化構造において形成されている。これらの β シート構造は、主に、単量体の Lys16–Glu22 残基同士、及び Leu34–Val36 残基同士により構成される。また、単量体の様々な領域でバンドやターン構造が形成されており、特に、バンドやターン構造は、Val24–Gly29 残基の領域で形成される傾向が高い。固体 NMR 実験^[63, 69]から、この領域はバンドやターン構造を形成することが報告されている。また、全長の A β 二量体に対する理論研究^[104, 203]から、この領域やその付近の配列がターン構造を形成する傾向が高いことが明らかにされている。従って、本研究で得た水和した A β 二

量体の最適化構造は、先行研究の実験、及び理論研究の結果と比較できる妥当な構造をしている。さらに、らせん構造が Figure 29 (b)、(e)、(g)、(i)、(j)、(k)、(l)、(m)の最適化構造において形成されており、Ala30-Ile32 残基の領域で形成されやすいことが示された。

水和した A β 単量体の最適化構造(Figure 19)の二次構造と比較すると、水和した A β 二量体の最適化構造(Figure 29)においては、単量体においてほとんど形成されていない β シートを持つ最適化構造が多い。しかし、A β 二量体は、A β 線維から初期構造を作成しており、初期構造の時点で β シートが豊富に含まれている。そのため、初期構造への依存性を考慮しなければならないが、REMD 及び MM 計算から得られた最適化構造における β シートの形成は、初期構造の時点で形成されていた β シートが、熱的揺らぎに対して安定に保たれることを示唆している。従って、一度形成された β シートは熱的揺らぎに対して安定であり、線維成長プロセスにおいて、このような β シート構造の形成が非常に重要であると考えられる。また、単量体と二量体の最適化構造では、らせん構造を形成し易い領域が異なる。単量体において、Ser8-His14 残基の領域でらせん構造が形成されるのに対し、二量体では、Ala30-Ile32 残基の領域でらせん構造が形成されている。一方、ベンドやターン構造を形成する領域は類似しており、単量体と二量体において、それぞれ Ala20-Ser26 残基、Val24-Gly29 残基の領域で形成される。

さらに、水和した A β 二量体の最適化構造における Glu22 あるいは Asp23 と Lys28 間の塩橋形成を解析した。A β に含まれる荷電アミノ酸は、凝集や β シートの安定性に影響することが報告されている^[36, 63, 67, 68, 147, 151, 169-171]。また、Glu22 あるいは Asp23 と Lys28 が分子内、及び分子間の両方で塩橋を形成することが示されている^[36, 63, 68, 153]。Figure 26 (c)、(h)、(l)、(m)においては、2LMN の I 鎖に対応する単量体の Asp23 あるいは Glu22 と J 鎖に対応する単量体の Lys28 が単量体間の塩橋を形成している。これらの構造における異なる単量体の Glu22-Lys28 間及び Asp23-Lys28 間の塩橋形成は、NMR 実験^[36, 63, 67, 68, 171]及び全長の A β 、あるいは A β フラグメントの二量体に対する理論研究^[102, 105, 147, 151, 153, 169, 170]の予測と一致している。一方、Figure 29 (f)のみ、Glu22 と Lys28 間で分子内の塩橋を形成している。従って、本研究における REMD 及び MM 計算から得られた水和した A β 二量体の最適化構造(Figure 29)は、先行研究の実験、及び理論研究の結果を再現しており、妥当な安定配座である。

4.2.3. *Ab initio* FMO 法による最安定配座の決定

13個の水和したAβ二量体の最適化構造の中から、最安定配座を決定するため、Figure 29の最適化構造に対し、*ab initio* MP2/6-31G法を用いたFMO^[182-190]計算により電子状態を解析し、全エネルギーを高精度に評価した。その際、Aβ二量体の周囲6 Å程度に存在する1151個の水分子を顕わに考慮し、Aβ二量体配座の安定性における水和水の影響を解明した。本FMO計算により得られた全エネルギーに基づき、水和したAβ二量体の最安定配座を決定した。各最適化構造の全エネルギーをTable 11にまとめる。水和したAβ二量体の最安定配座はFigure 29 (k)であり、他の最適化構造と比較して、少なくとも146 kcal/mol程度安定である。この配座が最も安定になる要因を明らかにするため、水和したAβ二量体を、Aβ二量体、及び水和水の系に分け、水和したAβ二量体と同様に全エネルギーを求めた。また、それらのエネルギーに基づき、式(5)から、Aβ二量体の水和エネルギーを算出した。

$$\begin{aligned} \text{HE} = & -\text{TE} (\text{Solvated A}\beta \text{ dimer}) + \text{TE} (\text{A}\beta \text{ dimer in vacuum}) \\ & + \text{TE} (1151 \text{ water molecules}) \end{aligned} \quad (5)$$

水和したAβ二量体 (Table 11中の”Solvated Aβ dimer”)の全エネルギーの差(ΔTE)は、最大で910 kcal/molであるのに対し、Aβ二量体 (Table 11中の”Aβ dimer in vacuum”)のΔTEは、最大でも378 kcal/molである。また、水和水 (Table 11中の”1151 water molecules”)のΔTE、水和エネルギー (Table 11中の”Hydration energy (HE)”)の差(ΔHE)は、それぞれ最大で975、923 kcal/molである。従って、Aβ二量体自身の安定性は、水和水の安定性や水和エネルギーと比較して、水和したAβ二量体の安定性に与える影響は小さいと推測できる。水和水の安定性、及び水和エネルギーが水和したAβ二量体の安定性与える影響を、簡単に比較するため、水和したAβ二量体のΔTEとAβ二量体のΔTE、水和水のΔTE、及びΔHEの間の相関を調べた。Figure 30の結果から、相関係数Rは、それぞれ0.3 (水和したAβ単量体のΔTEとAβ単量体のΔTE間)、0.7 (水和したAβ単量体のΔTEと水和水のΔTE間)、0.0 (水和したAβ単量体のΔTEとΔHE間)の値を示した。つまり、水和したAβ二量体の安定性は、周囲に存在する水和水の影響を強く受ける一方、水和エネルギーは何ら関与していないことが明らかになった。従って、水和水同士が凝集し、安定する配座ほど、水和したAβ二量体の構造がより安定になる。この結果は、水和したAβ単量体における結果^[137]と一致する。

Table 11. Total energies (TE) (kcal/mol) evaluated by *ab initio* MP2/6-31G FMO calculations for the solvated A β dimer, A β dimer without solvating water molecules, and solvating water molecules. The hydration energies (HE) (kcal/mol) for the A β monomer are estimated as HE = -TE (solvated monomer) + TE (monomer in vacuum) + TE (Solvating water molecules). Δ TE is TE relative to the most stable one, and Δ HE is HE relative to the most stable one.

Conformation	Solvated A β dimer		A β dimer in vacuum		1151 water molecules		Hydration energy (HE)	
	TE (kcal/mol)	Δ TE	TE	Δ TE	TE	Δ TE	HE	Δ HE
Fig. 29 (a) at 289.6 K	-74792906.1	503.2	-19800924.2	117.8	-54986728.1	667.9	5253.8	479.5
Fig. 29 (b) at 291.3 K	-74793195.3	214.0	-19800905.7	136.3	-54986986.6	409.4	5303.1	430.2
Fig. 29 (c) at 293.0 K	-74793263.4	145.9	-19800694.7	347.2	-54986835.3	560.7	5733.3	0.0
Fig. 29 (d) at 294.7 K	-74792968.3	441.0	-19800880.2	161.8	-54986942.0	453.9	5146.1	587.2
Fig. 29 (e) at 296.5 K	-74792734.0	675.3	-19800920.0	122.0	-54986553.9	842.1	5260.2	473.1
Fig. 29 (f) at 298.2 K	-74792499.7	909.6	-19800733.8	308.2	-54986420.7	975.3	5345.3	388.1
Fig. 29 (g) at 300.0 K	-74793098.4	310.9	-19800723.1	318.9	-54986692.7	703.3	5682.6	50.7
Fig. 29 (h) at 301.7 K	-74793060.9	348.5	-19800663.8	378.2	-54986850.0	545.9	5547.0	186.3
Fig. 29 (i) at 303.5 K	-74792819.0	590.3	-19800725.9	316.0	-54986923.7	472.3	5169.4	563.9
Fig. 29 (j) at 305.3 K	-74792820.3	589.0	-19800811.9	230.0	-54986964.5	431.5	5043.9	689.4
Fig. 29 (k) at 307.1 K	-74793409.3	0.0	-19801031.3	10.7	-54987396.0	0.0	4982.0	751.3
Fig. 29 (l) at 308.9 K	-74793104.4	304.9	-19800708.8	333.2	-54986734.1	661.9	5661.5	71.9
Fig. 29 (m) at 310.7 K	-74793236.1	173.2	-19801042.0	0.0	-54987383.7	12.2	4810.4	923.0

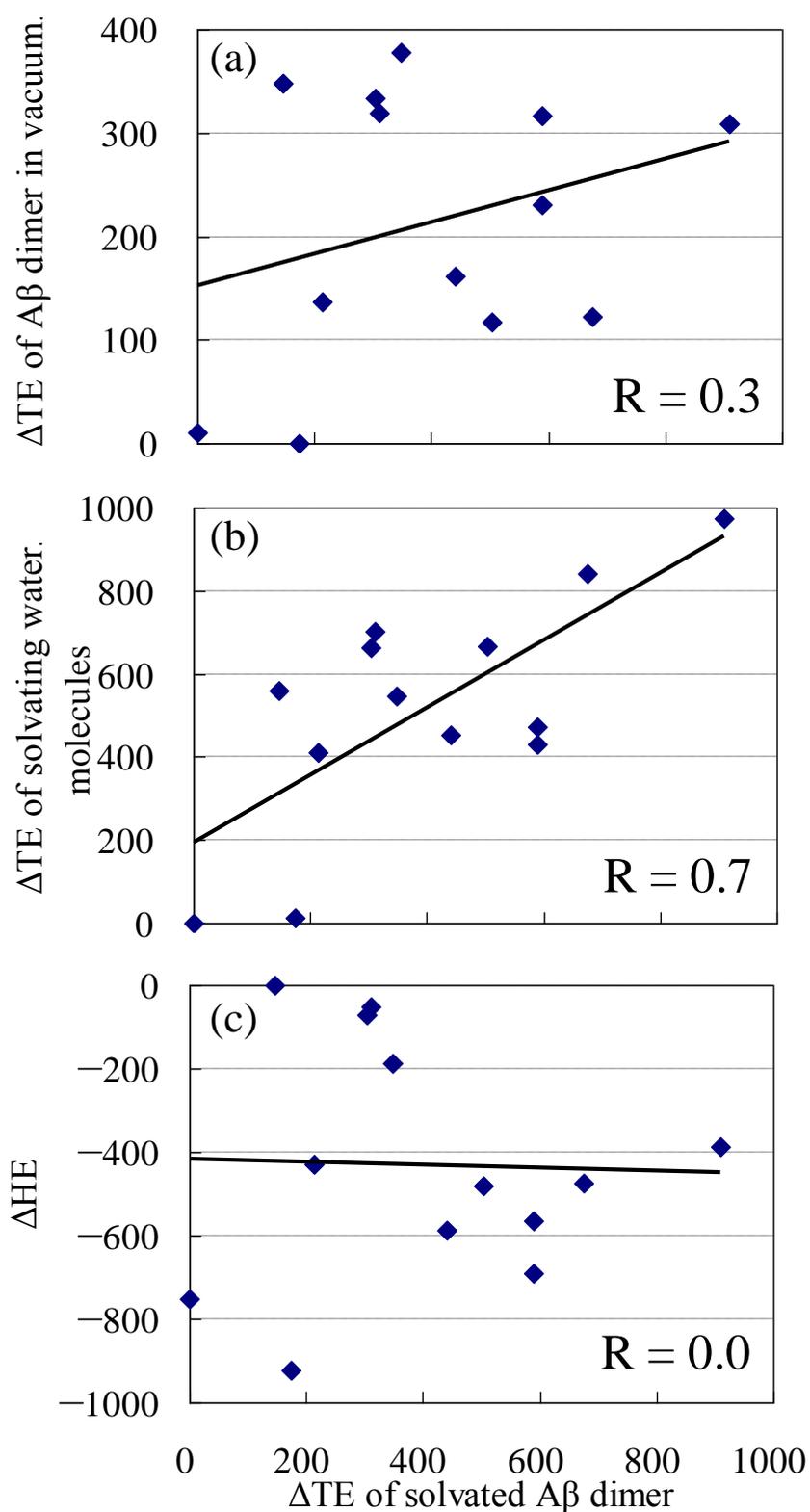


Figure 30. Correlations with (a) relative total energy (ΔTE) of solvated A β dimer and ΔTE of A β dimer without water molecules, (b) ΔTE of solvated A β dimer and ΔTE of solvating water molecules, and (c) ΔTE of solvated A β dimer and ΔHE of A β dimer.

水和した A β 二量体の最安定配座(Figure 29 (k))は、A β 二量体のみでも比較的安定な配座である(Table 11)。そこで、最安定配座の構造的特徴を解析した。最安定配座において、単量体間で 2 つの β シート構造を形成している。それらの β シート構造は、それぞれの単量体の Lys16–Phe19 の領域、及び Monomer 1(M1)の Ile32–Met35 の領域と Monomer 2(M2)の Ile31–Met35 の領域で形成されている。ここで、M1 及び M2 は、それぞれ 2LMN の I 鎖、J 鎖に対応する単量体を表す。これらの β シート構造は、いくつかの水素結合を形成し、安定している。このような A β 二量体における β シート構造の形成は、Zhu らの A β (1–42)二量体^[105]、及び Huet らの A β (9–40)二量体に対する MD シミュレーション^[93]から得られた安定配座と一致する。また、最安定配座の M2 の単量体内では、Glu22–Asn27 の領域で β ヘアピン構造を形成している(Figure 31)。この β ヘアピン構造は、Glu22 と Asn27 間、Asp23 と Asn27 間、及び Val24 と Ser26 間で形成される水素結合により安定している。また、この領域に含まれる Asp23 と Lys28 は、同じ水分子と水素結合を形成しているため、アミノ酸間距離が近づき、強く静電相互作用している。その結果、最安定配座においては、異なる単量体間の Glu22 あるいは Asp23 と Lys28 の塩橋は形成されない。

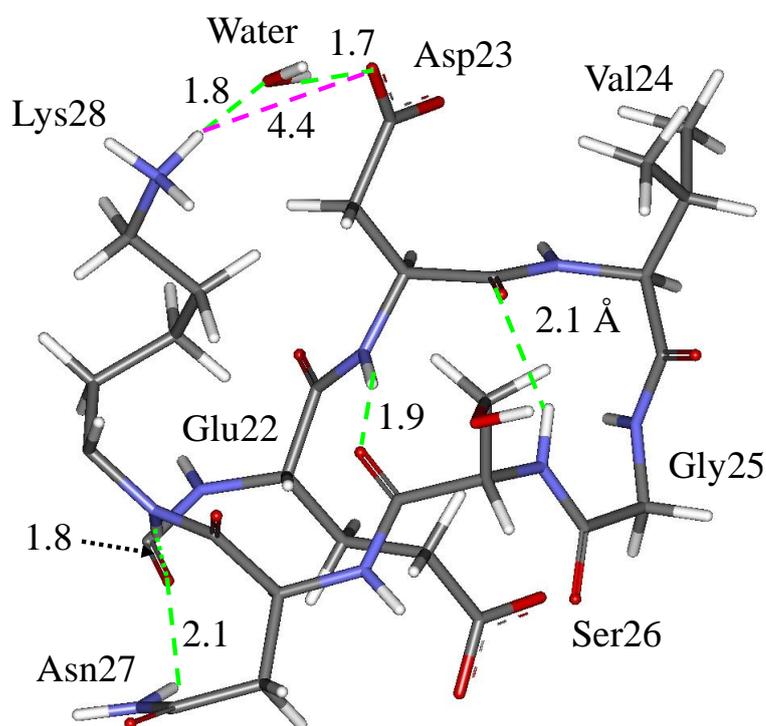
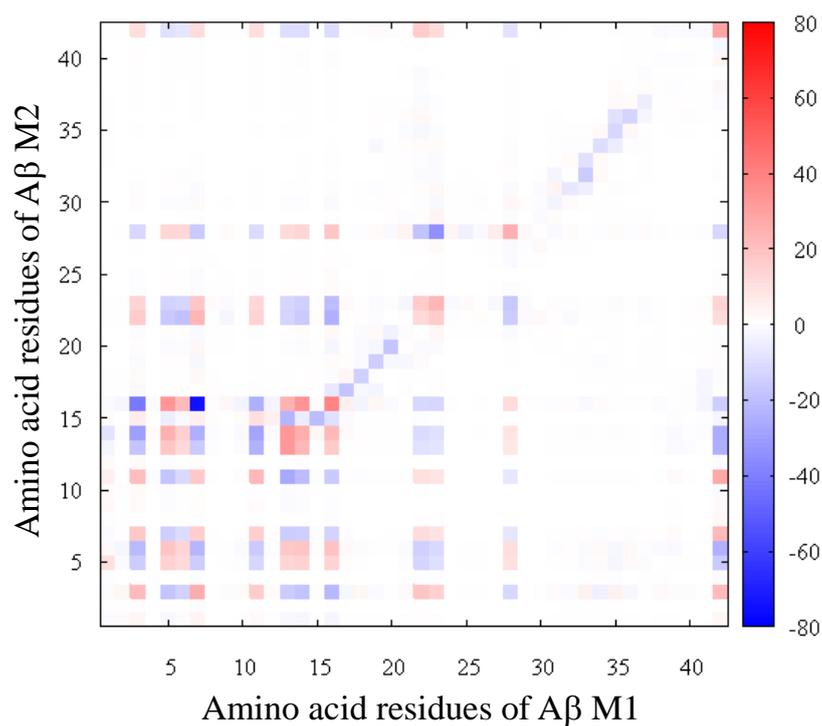


Figure 31. Interacting structure between Glu22–Lys28 region in the most stable conformation of solvated A β dimer (Fig. 29 (k)). Green dash-lines indicate hydrogen bonds, while pink dash-line indicates electrostatic attractive interactions between Asp23 and Lys28 residues.

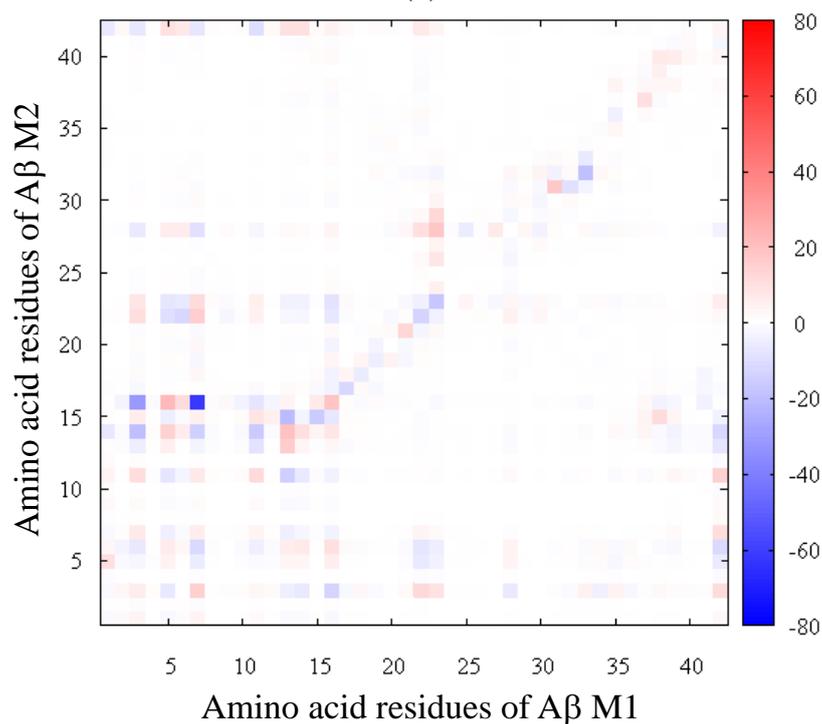
One water molecule contributes to the interaction.

4.2.4. 最安定配座における単量体間の特異的相互作用

さらに、水和した A β 二量体構造の安定化に重要なアミノ酸を明らかにするため、水和した A β 二量体の最安定配座(Figure 29 (k))における M1 と M2 の単量体間相互作用エネルギーを、*ab initio* FMO 計算の結果を用いて解析した。その相互作用エネルギーのマップを、Figure 32 (a)に図示する。横軸及び縦軸は、それぞれ M1、M2 のアミノ酸配列番号を表す。M1 の Leu17-Phe20 残基と M2 の Leu17-Phe20 残基の間、及び M1 の Gly33-Val36 残基と M2 の Gly33-Val36 残基の間の相互作用エネルギーに対応する領域において、対角線状の引力相互作用を示している。このような特徴を示す領域は、単量体の間で β シート構造を形成していることが予測できる。実際に、先述のように、最安定配座におけるこの領域では、単量体間の β シート構造を形成している。次に、強い引力、あるいは反発相互作用エネルギーを示すアミノ酸ペアに注目した。Asp7(M1)-Lys16(M2)、Glu3(M1)-Lys16(M2)、及び Asp23-Lys28(M2)のアミノ酸ペアは、強い引力相互作用を示した。一方、Lys16(M1)-Lys16(M2)、His14(M1)-Lys16(M2)、及び Arg5(M1)-Lys16(M2)のアミノ酸ペアは、強い反発相互作用を示した。これらのアミノ酸ペアの相互作用エネルギーを、Table 12 に要約する。Asp7(M1)-Lys16(M2)ペア、及び Glu3(M1)-Lys16(M2)ペアの引力方向の相互作用エネルギーは、最大の反発相互作用を示す Lys16(M1)-Lys16(M2)ペアの反発方向の相互作用エネルギーよりも絶対値の値が大きい。従って、本研究で決定した水和した A β 二量体の最安定配座では、M2 の Lys16 と M1 の N 末端配列に含まれる負に荷電したアミノ酸 (Glu3 及び Asp7) 間の引力相互作用が、主に、二量体の安定化に寄与している。また、引力相互作用エネルギーの大きい上位 3 つのペアには、すべて正荷電アミノ酸である Lys 残基が関与している。A β に対するアミノ酸置換実験^[204, 205]から、Lys は A β の凝集に重要な役割を果たしていることが報告されており、本研究の結果はこの実験の結果と定性的に一致する。最安定配座においては、先述した通り、単量体間における Asp23 と Lys28 間の塩橋は形成されていない。しかし、依然として、Asp23(M1)-Lys28(M2)ペアの引力相互作用エネルギーは、比較的大きい値を示している。従って、異なる単量体における Asp23 と Lys28 間の静電相互作用は、二量体の安定化に重要であると考えられる。



(a)



(b)

Figure 32. (a) Inter-monomer interaction energies (kcal/mol) between M1 and M2 in the most stable conformation (Fig. 29 (k)) of solvated A β dimer; (b) difference in inter-monomer interaction energies (kcal/mol) between the most stable conformation (Fig. 29 (k)) and the less stable conformation (Fig. 29 (f)) of solvated A β dimer.

Table 12. Inter-monomer interaction energies (IE) between M1 and M2 in the most stable conformation of solvated A β dimer evaluated by *ab initio* MP2/6-31G FMO calculations.

Amino acid pair	IE (kcal/mol)
Asp7(M1)-Lys16(M2)	-74.8
Glu3(M1)-Lys16(M2)	-42.2
Asp23(M1)-Lys28(M2)	-34.9
Lys16(M1)-Lys16(M2)	38.4
His14(M1)-Lys16(M2)	33.5
Arg5(M1)-Lys16(M2)	33.2

水和した A β 二量体の最安定配座(Figure 29 (k))において、強い引力相互作用を示す Glu3(M1)-Lys16(M2)、Asp7(M1)-Lys16(M2)、及び Asp23(M1)-Lys28(M2)のアミノ酸ペアの相互作用構造を解析した。Figure 33 (a)に示すように、Glu3(M1)-Lys16(M2)、及び Asp7(M1)-Lys16(M2)のペアの周囲には、いくつかの水和水が存在し、近傍のアミノ酸と水素結合を形成している。このような水分子を介したブリッジにより、Glu3(M1)-Lys16(M2)、及び Asp7(M1)-Lys16(M2)間の距離が、それぞれ 6.4、3.5 Å となり、静電的に強く引力相互作用する(Table 12)。また、これらのアミノ酸の近傍には、M2 の Lys16 と強い反発相互作用を示す M1 の Arg5 が存在する。正に荷電したアミノ酸である Arg は、同じく正荷電アミノ酸である Lys と静電的に反発するため、通常、Arg5 と Lys16 は近づきにくい。しかし、最安定配座における M1 の Arg5 は、同じ単量体の Glu3 及び Asp7 との静電引力相互作用、さらに周囲の水和水との水素結合の形成により、M2 の Lys16 との距離が 10.0 Å に近づいた。その結果、Arg5(M1)-Lys16(M2)ペアは、静電的に強く反発相互作用し、大きい反発方向の相互作用エネルギーを示した(Table 12)。Asp7(M1)-Lys16(M2)及び Glu3(M1)-Lys16(M2)ペアに次いで、強い引力相互作用を示す Asp23(M1)-Lys28(M2)ペアは、Figure 33 (b)のように、いくつかの水和水を介し、8.5 Å の距離で静電的に引力相互作用している。強い引力相互作用を示すアミノ酸ペアに水和水が存在していることから、単量体の間に存在する水分子は、M1 と M2 の単量体に含まれるアミノ酸間の距離を近づける役割を果たしていると考えられる。特に、M1 の Glu3、Arg5 及び Asp7 の間に存在する水分子は、M1 の N 末端の構造を形成する上で重要である(附録 A.2)。従って、水和水は、水和した A β 二量体構造の安定化に寄与している。

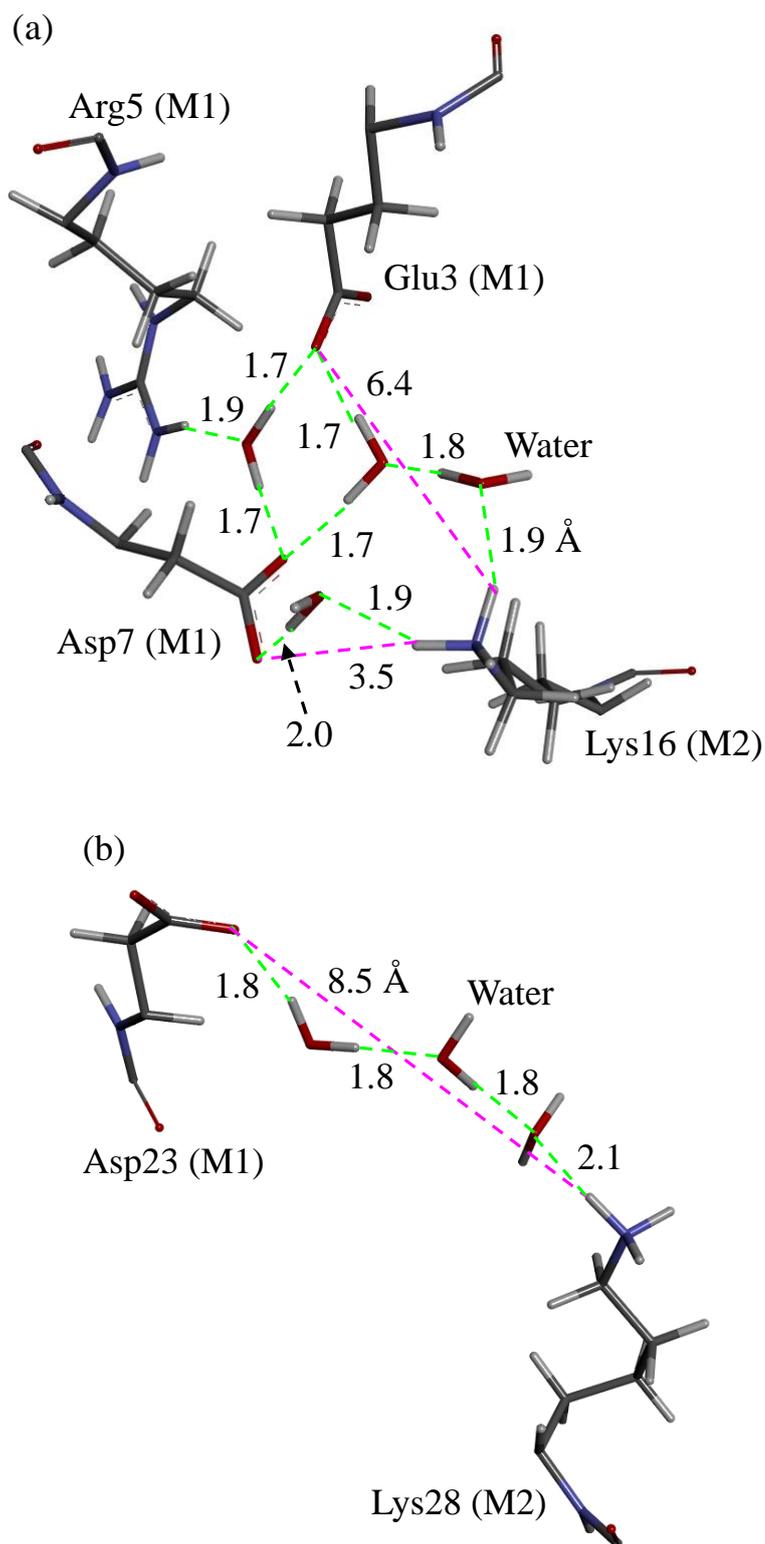


Figure 33. Inter-monomer interacting structures between M1 and M2 in the most stable conformation of solvated A β dimer. Green dash-lines indicate hydrogen bonds, while pink dash-lines indicate electrostatic attractive interactions between charged amino acid residues. Some water molecules contribute to the interactions.

一方、水和した A β 二量体の最安定配座(Figure 29 (k))において、強く反発相互作用を示すのは、Lys16(M1)-Lys16(M2)、His14(M1)-Lys16(M2)、及び Arg5(M1)-Lys16(M2)のアミノ酸ペアである(Table 12)。これらのアミノ酸は、すべて正荷電アミノ酸であるため、アミノ酸間距離が近づくと、静電的に強い反発相互作用を示す。Arg5(M1)-Lys16(M2)ペアについては、先述のように、近傍のアミノ酸や水和水の影響により、アミノ酸の間距離が近づき、強い反発相互作用エネルギーを示した。最大の反発相互作用エネルギーを示す Lys16(M1)-Lys16(M2)ペアは、Figure 34 (a)のように、M1 の主鎖の酸素原子と M2 の主鎖の水素原子間で水素結合を形成している。また、どちらの Lys16 も、M1 の Asp7 と静電相互作用し、さらに、周囲の水和水と水素結合を形成している。それらの静電相互作用や水素結合の形成により、側鎖間の距離が 7.0 Å に近づき、結果的に、大きい反発方向の相互作用エネルギーを示した(Table 12)。本研究では、His 残基のプロトネーション(Figure 14)を正荷電の Hip として扱っているため、His14(M1)-Lys16(M2)ペアについても、距離が近づくほど、強く反発相互作用する。Figure 34 (b)に示すこのペアとその近傍に存在するアミノ酸の相互作用構造では、M1 の His14 と Arg5 の側鎖同士でカチオン- π 相互作用し、さらに、His14 は同じ M1 の Asp7 と側鎖同士で水素結合を形成している。つまり、M1 の His14 と M2 の Lys16 は、それらの近傍に存在する M1 の Glu3、Arg5 及び Asp7 との相互作用を介して、アミノ酸間距離が近づいている。その結果、His14(M1)-Lys16(M2)ペアの側鎖間距離が 8.6 Å となり、大きい反発相互作用エネルギーを示した(Table 12)。従って、最安定配座において、Lys16(M1)-Lys16(M2)、His14(M1)-Lys16(M2)、及び Arg5(M1)-Lys16(M2)のアミノ酸ペアは、いずれも、それらの近傍に位置する負荷電アミノ酸 (M1 の Glu3 及び Asp7) や水和水の影響により、アミノ酸距離が近づき、強い反発相互作用することが明らかになった。

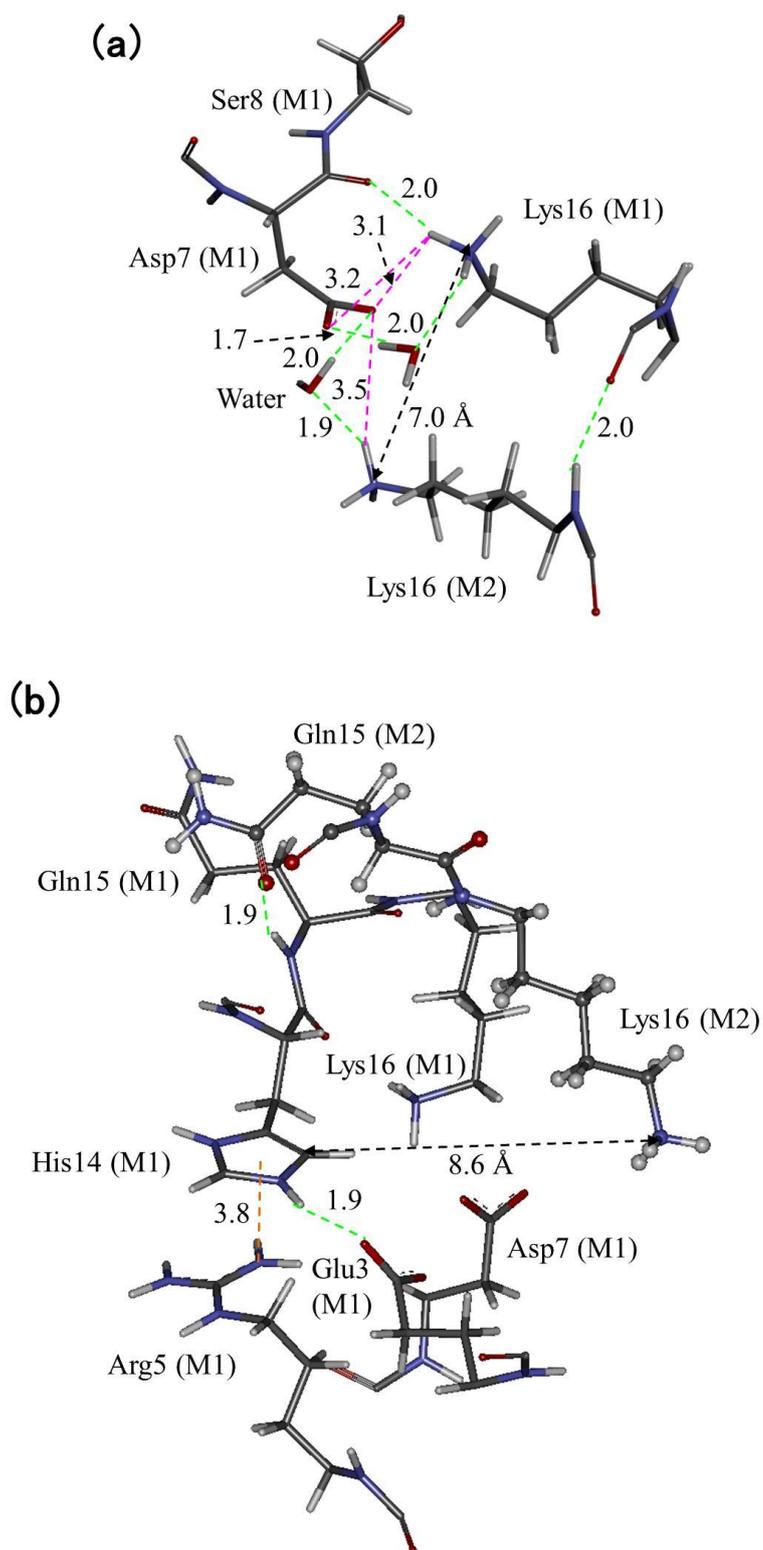


Figure 34. Inter-monomer interacting structures between M1 and M2 in the most stable conformation of solvated A β dimer. Green dash-lines indicate hydrogen bonds, while pink dash-lines indicate electrostatic attractive interactions between charged amino acid residues. Some water molecules contribute to the interactions.

さらに、水和した A β 二量体の最適化構造における特異的なアミノ酸間相互作用の配座依存性を解明するため、最安定配座(Figure 29 (k))と最安定配座との全エネルギー差が最大(Table 11)の Figure 29 (f)の最適化構造の単量体間相互作用エネルギーを比較した。Figure 32 (b)に、最安定配座と Figure 29 (f)の構造の単量体間相互作用エネルギーの差を示す。また、エネルギー差の大きいアミノ酸ペアを、Table 13 に要約する。Asp7(M1)-Lys16(M2)、及び Glu3(M1)-Lys16(M2)ペアは、最安定配座において、顕著な引力相互作用エネルギーを示しており、これらのアミノ酸ペアは配座依存性が強い。同様に、Arg5(M1)-Lys16(M2)、及び Lys16(M1)-Lys16(M2)ペアについても、配座依存性が強いと言える。従って、M2 の Lys16 と M1 の Glu3 及び Asp7 間の引力相互作用は、本研究で決定した水和した A β 二量体の最安定配座における特異的な引力相互作用であり、A β 二量体の安定には、Lys16 と N 末端配列に含まれる負荷電アミノ酸(Glu3 及び Asp7)間の引力相互作用が重要である。

Table 13. Difference in inter-monomer interaction energies (kcal/mol) between the most stable conformation (Fig. 29 (k)) and the less stable conformation (Fig. 29 (f)) of solvated A β dimer evaluated by *ab initio* MP2/6-31G FMO calculations.

Amino acid pair	IE (kcal/mol)
Asp7(M1)-Lys16(M2)	-62.6
Glu3(M1)-Lys16(M2)	-32.0
His13(M1)-Gln15(M2)	-21.3
Arg5(M1)-Lys16(M2)	21.8
His13(M1)-His14(M2)	19.5
Lys16(M1)-Lys16(M2)	18.5

最安定配座との全エネルギー差が最大である Figure 29 (f)の最適化構造において、Glu3(M1)-Lys16(M2)、及び Asp7(M1)-Lys16(M2)ペアの相互作用が小さくなる要因を明らかにするため、Figure 29 (f)の構造におけるこれらのアミノ酸ペアの相互作用構造を解析した。Figure 35 に示すように、Figure 29 (f)の構造では、M2 の Lys16 と M1 の N 末端残基間の距離が明らかに離れており、相互作用しているようには見えない。そのため、Table 13 のように、Glu3(M1)-Lys16(M2)、及び Asp7(M1)-Lys16(M2)ペアの相互作用エネルギーの差が非常に大きくなった。

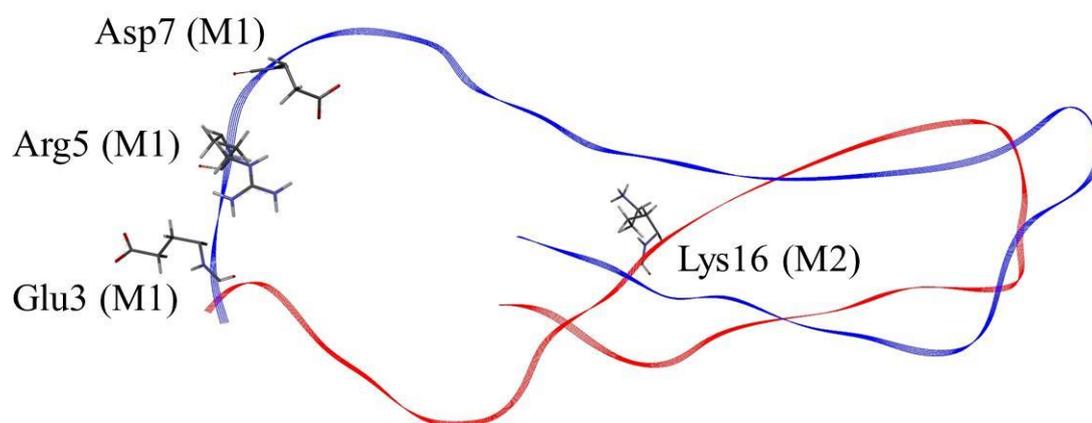


Figure 35. The less stable conformation (Fig. 26 (f)) of solvated A β dimer.

4.2.5. A β の二量体形成を抑制する低分子に対する考察

本研究で決定した水和した A β 二量体の最安定配座に対する解析結果から、片方の単量体に含まれる Lys16 と異なる単量体の N 末端配列の負荷電アミノ酸 (Glu3 及び Asp7) 間の特異的な引力相互作用が A β 二量体の安定化に重要であることを示した。A β に含まれる Arg5、Lys16、及び Lys28 を対象にアミノ酸置換を行った実験^[204, 205]からも、Lys 残基が A β の凝集に重要な役割を果たしていることが報告されている。特に、Lys16 は凝集だけでなく、オリゴマーや線維が持つ毒性への関与も明らかにされている。本研究の結果は、これらの実験結果と定性的に一致する。従って、A β の Lys 残基に特異的に結合し、Lys と他のアミノ酸残基間の相互作用を阻害する低分子化合物は、A β の凝集を抑制する新規の AD 治療薬として有用であると考えられる。Lys 残基に特異的に結合する化合物として、Sinha ら^[205]は、分子ピンセット CLR01 を挙げており、既に実験^[206-208]から A β 凝集を効果的に抑制することが報告されている。従って、本研究の結果は、CLR01 のような Lys 残基に特異的に結合する A β 凝集阻害剤の有用性を裏付けた。しかし、Lys はどのタンパク質においても重要なアミノ酸であるため、単純に Lys を標的とした治療薬は副作用が大きくなることが予想される。そのため、効果的な AD 治療薬として、例えば、A β の β シートを上手く認識させ、A β の Lys に特異的に結合する化合物を設計するような工夫が必要となる。

4.2.6. まとめ：水和した A β 二量体の最安定配座の特徴

本研究では、実溶媒中の全原子 REMD 及び *ab initio* FMO 計算を用い、水和した A β 二量体の最安定配座(Figure 29 (k))を決定し、さらに、最安定配座における単量体間の特異的相互作用を電子レベルで解析した。その結果から、以下の点を明らかにした。

- (1) 水和した A β 二量体の安定性は、周囲に存在する水和水の安定性に強く依存する。
この結果は、単量体に対する計算結果^[137]と同様である。
- (2) 水和した A β 二量体の最安定配座は、単量体間で 2 つの β シート構造、及び単量体内で β ヘアピン構造を形成する。
- (3) 水和した A β 二量体の最安定配座の安定化には、主に、Lys16 と N 末端配列に含まれる負荷電アミノ酸(Glu3 及び Asp7)間の引力相互作用(Figure 33 (a))が重要である。
- (4) A β 単量体の間に存在する水和水は、A β 二量体構造の安定化に寄与する。

第5章 結論

本研究では、実溶媒中の全原子 REMD シミュレーションにより、全長の A β (1-42)単量体及び二量体の安定配座を広く探索し、様々な安定配座を得た。得られた安定配座の中から、*ab initio* FMO 計算により電子状態を解析し、高精度に評価した全エネルギーに基づき、最安定配座を決定した。その際、A β の周囲に存在する水和水を考慮し、水和水が A β 構造の安定性に与える影響を明らかにした。さらに、最安定配座に対し、FMO 計算で得られたアミノ酸間の相互作用エネルギーを用い、水和構造の安定性に重要なアミノ酸間相互作用を解明した。その結果、A β の水和構造の相対的な安定性は、A β 自身の安定性や A β の水和エネルギーよりも、周囲に存在する水和水の安定性に、より強く依存することを明らかにした。この結果は、A β 単量体と二量体で共通である。従って、A β の配座探索や最安定配座の決定において、周囲に存在する水和水を顕わに考慮する必要性を、本研究から明らかにした。また、A β 単量体における Phe20-Ala30 領域のターン様構造の形成は、A β 線維に含まれる単量体が持つ β -strand-turn- β -strand motif の形成を促すことを示唆した。このモチーフを持つ A β 二量体を初期構造とした REMD 及び MM 計算から得られた安定配座は、初期構造の時点で形成されていた β シート構造を保持しており、 β シートの熱的安定性を示した。これらの結果から、次のような線維伸長モデルが提案できる：(1) 線維に近づいた A β 単量体が線維に含まれる A β と β シートを形成する；(2) Phe20-Ala30 領域におけるターン様構造の形成により、 β -strand-turn- β -strand モチーフに構造が変化する；(3) 線維状に重なる。既に、Han らによる A β (17-42)線維に対する理論研究^[161]から、類似した線維成長モデルが提案されており、妥当なモデルであると考えられる。線維に近づいてきた A β が β -strand-turn- β -strand motif の形状に変化する前に、まず、ある領域で線維と β シートを形成することは間違いないだろう。さらに、本研究の結果は、A β 構造の安定化には、荷電アミノ酸間の引力相互作用が重要であることを示した。特に、Lys と他のアミノ酸残基間の相互作用は、単量体と二量体のどちらにおいても重要であり、A β の凝集を抑制する上で標的となる相互作用である。従って、本研究の結果は、A β 凝集阻害剤の候補として、A β の Lys を特異的に認識し、結合する低分子化合物の有用性の裏付けに寄与できるものと考ええる。医学、創薬、実験、そして計算化学などの各分野の専門家が協力し、近い将来、AD に対する有効な治療法、予防法の確立や治療薬の開発がされることを期待したい。

謝辞

本研究は、豊橋技術科学大学情報・知能工学系の栗田典之准教授の懇切なる御指導の下で行われました。栗田典之准教授には、研究に関する御指導と御助言を頂くだけでなく、海外派遣や研究助成事業等への申請書類の作成にあたり、多大な御助力を頂きました。ここに心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行に際し、有益な御指導を頂き、さらに論文審査をお引き受け頂きました同系の関野秀男教授、後藤仁志准教授、及び環境・生命工学系の角田範義教授に厚く御礼申し上げます。特に、関野秀男教授、及び後藤仁志准教授には、講義や研究発表等の機会を通し、多くの御指導、御助言を頂きました。さらに、研究を進めるにあたり、有益な御助言を頂いた株式会社村田製作所の檜貝信一博士、及びみずほ情報総研株式会社の塚本貴志博士に深く感謝致します。塚本貴志博士には、在学中においても、様々な御指導、御助言を頂きました。塚本博士との出会いは、私が博士号取得を目指すきっかけとなりました。

なお、本研究は栗田研究室の学生の皆様の協力の下で行われました。特に、研究の進行にあたり、不可欠な並列計算機、及びネットワーク環境の構築・管理等に御尽力頂いた大山達也博士を始めとする研究室の学生の皆様に深く感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、公益財団法人堀科学芸術振興財団、公益財団法人村田学術振興財団、公益財団法人神野教育財団、及び豊橋技術科学大学から、研究助成あるいは海外派遣助成として、多くの御援助を頂きました。貴重な機会、経験を与えて下さった各財団及び大学、その他すべての関係者の皆様に、心から御礼申し上げます。

最後に、私の進路選択を理解し、学生生活を支援してくれた両親に、心より感謝の意を表します。

参考文献

- [1] 永田和宏, タンパク質の一生－生命活動の舞台裏, 岩波新書, **2008**.
- [2] D. G. Lynn, S. C. Meredith *Journal of Structural Biology*. **2000**, 130, 153-173.
- [3] J. C. Rochet, P. T. Lansbury *Current Opinion in Structural Biology*. **2000**, 10, 60-68.
- [4] D. J. Selkoe *Nature*. **2003**, 426, 900-904.
- [5] D. M. Holtzman, W. C. Mobley *Trends in biochemical sciences*. **1991**, 16, 140-144.
- [6] W. L. Klein, G. A. Krafft, C. E. Finch *Trends in Neurosciences*. **2001**, 24, 219-224.
- [7] J. Hardy, D. J. Selkoe *Science*. **2002**, 297, 353-356.
- [8] M. P. Mattson *Nature*. **2004**, 430, 631-639.
- [9] M. D. Kirkitadze, G. Bitan, D. B. Teplow *Journal of Neuroscience Research*. **2002**, 69, 567-577.
- [10] W. L. Klein *Neurobiology of Aging*. **2002**, 23, 231-233.
- [11] J. Hardy *Annals of Neurology*. **2003**, 54, 143-144.
- [12] W. L. Klein, W. B. Stine, D. B. Teplow *Neurobiology of Aging*. **2004**, 25, 569-580.
- [13] D. J. Selkoe *Nature Cell Biology*. **2004**, 6, 1054-1061.
- [14] C. Haass, M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B. L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schenk, D. B. Teplow, D. J. Selkoe *Nature*. **1992**, 359, 322-325.
- [15] P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schiossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst, R. McCormack, R. Wolfert, D. Selkoe, I. Lieberburg, D. Schenk *Nature*. **1992**, 359, 325-327.
- [16] M. Shoji, T. E. Golde, J. Ghiso, T. T. Cheung, S. Estus, L. M. Shaffer, X.-D. Cai, D. M. McKay, R. Tintner, B. Frangione, et al. *Science*. **1992**, 258, 126-129.
- [17] E. Levy, M. D. Carman, I. J. Fernandez-Madrid, M. D. Power, I. Lieberburg, S. G. van Duinen, G. Bots, W. Luyendijk, B. Frangione *Science*. **1990**, 248, 1124-1126.
- [18] C. J. Pike, A. J. Walencewicz, C. G. Glabe, C. W. Cotman *Brain research*. **1991**, 563, 311-314.
- [19] E. H. Corder, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, M. A. Pericakvance *Science*. **1993**, 261, 921-923.
- [20] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condon, D. B. Teplow *Journal of Biological Chemistry*. **1997**, 272, 22364-22372.
- [21] P. Westermark *Amyloid-International Journal of Experimental and Clinical*

- Investigation*. **1997**, 4, 216-218.
- [22] A. Y. Hsia, E. Masliah, L. McConlogue, G. Q. Yu, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, R. C. Malenka, R. A. Nicoll, L. Mucke *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1999**, 96, 3228-3233.
- [23] M. Bentahir, O. Nyabi, J. Verhamme, A. Tolia, K. Horre, J. Wiltfang, H. Esselmann, B. De Strooper *Journal of Neurochemistry*. **2006**, 96, 732-742.
- [24] A. Rovelet-Lecrux, D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerriere, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillette, A. Brice, M. Vercelletto, F. Dubas, T. Frebourg, D. Campion *Nature Genetics*. **2006**, 38, 24-26.
- [25] S. G. Younkin *Annals of Neurology*. **1995**, 37, 287-288.
- [26] Z. M. Suo, J. Humphrey, A. Kundtz, F. Sethi, A. Placzek, F. Crawford, M. Mullan *Neuroscience Letters*. **1998**, 257, 77-80.
- [27] T. Pillot, B. Drouet, S. Queille, C. Labeur, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, M. Pincon-Raymond, J. Chambaz *Journal of Neurochemistry*. **1999**, 73, 1626-1634.
- [28] K. N. Dahlgren, A. M. Manelli, W. B. Stine, L. K. Baker, G. A. Krafft, M. J. LaDu *Journal of Biological Chemistry*. **2002**, 277, 32046-32053.
- [29] D. Burdick, B. Soreghan, M. Kwon, J. Kosmoski, M. Knauer, A. Henschen, J. Yates, C. Cotman, C. Glabe *Journal of Biological Chemistry*. **1992**, 267, 546-554.
- [30] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury *Biochemistry*. **1993**, 32, 4693-4697.
- [31] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury in *THE C-TERMINUS OF THE BETA-PROTEIN IS CRITICAL IN AMYLOIDOGENESIS*, Vol. 695 (Eds.: R. M. Nitsch, J. H. Growdon, S. Corkin, R. J. Wurtman), New York Acad Sciences, New York, **1993**, pp.144-148.
- [32] R. Riek, P. Guntert, H. Dobeli, B. Wipf, K. Wuthrich *European Journal of Biochemistry*. **2001**, 268, 5930-5936.
- [33] C. Sturchler-Pierrat, D. Abramowski, M. Duke, K.-H. Wiederhold, C. Mistl, S. Rothacher, B. Ledermann, K. Bürki, P. Frey, P. A. Paganetti *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1997**, 94, 13287-13292.
- [34] T. C. Saido, N. Iwata *Neuroscience Research*. **2006**, 54, 235-253.
- [35] S. Lesne, M. T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C. G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, K. H. Ashe *Nature*. **2006**, 440, 352-357.
- [36] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. H. Guo, W. M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko *Science*. **2005**, 307, 262-265.
- [37] B. A. Yankner, T. Lu *Journal of Biological Chemistry*. **2009**, 284, 4754-4758.
- [38] S. M. Li, S. Y. Hong, N. E. Shephardson, D. M. Walsh, G. M. Shankar, D. Selkoe *Neuron*.

2009, 62, 788-801.

- [39] S. M. Li, G. M. Shankar, D. J. Selkoe *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **2010**, 4, 2.
- [40] P. Hamilton-Brown, I. Bekard, W. A. Ducker, D. E. Dunstan *Journal of Physical Chemistry B*. **2008**, 112, 16249-16252.
- [41] K. Ono, M. M. Condron, D. B. Teplow *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2009**, 106, 14745-14750.
- [42] M. Sakono, T. Zako *Febs Journal*. **2010**, 277, 1348-1358.
- [43] V. Chauhan, A. Chauhan *Pathophysiology*. **2006**, 13, 195-208.
- [44] A. Quist, L. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, R. Lal *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**, 102, 10427-10432.
- [45] M. Higuchi, T. Ishihara, B. Zhang, M. Hong, A. Andreadis, J. Q. Trojanowski, V. M. Y. Lee *Neuron*. **2002**, 35, 433-446.
- [46] M. Higuchi, N. Iwata, Y. Matsuba, J. Takano, T. Suemoto, J. Maeda, B. Ji, M. Ono, M. Staufenbiel, T. Suhara, T. C. Saido *Faseb Journal*. **2012**, 26, 1204-1217.
- [47] M. P. Mattson, S. L. Chan *Cell Calcium*. **2003**, 34, 385-397.
- [48] C. G. Glabe, R. Kaye *Neurology*. **2006**, 66, S74-S78.
- [49] A. Gomez-Ramos, M. Diaz-Hernandez, R. Cuadros, F. Hernandez, J. Avila *Febs Letters*. **2006**, 580, 4842-4850.
- [50] K. V. Kuchibhotla, S. T. Goldman, C. R. Lattarulo, H. Y. Wu, B. T. Hyman, B. J. Bacskai *Neuron*. **2008**, 59, 214-225.
- [51] M. A. Busche, G. Eichhoff, H. Adelsberger, D. Abramowski, K. H. Wiederhold, C. Haass, M. Staufenbiel, A. Konnerth, O. Garaschuk *Science*. **2008**, 321, 1686-1689.
- [52] P. T. Lansbury *Current Opinion in Chemical Biology*. **1997**, 1, 260-267.
- [53] A. J. Doig *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. **2007**, 10, 533-539.
- [54] H. Sticht, P. Bayer, D. Willbold, S. Dames, C. Hilbich, K. Beyreuther, R. W. Frank, P. Rosch *European Journal of Biochemistry*. **1995**, 233, 293-298.
- [55] M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik *Biochemistry*. **1998**, 37, 11064-11077.
- [56] S. Vivekanandan, J. R. Brender, S. Y. Lee, A. Ramamoorthy *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2011**, 411, 312-316.
- [57] O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A. M. D'Ursi, P. A. Temussi, D. Picone *European Journal of Biochemistry*. **2002**, 269, 5642-5648.
- [58] S. Tomaselli, V. Esposito, P. Vangone, N. A. J. van Nuland, A. Bonvin, R. Guerrini, T. Tancredi, P. A. Temussi, D. Picone *ChemBiochem*. **2006**, 7, 257-267.

- [59] L. K. Thompson *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2003**, 100, 383-385.
- [60] T. L. S. Benzinger, D. M. Gregory, T. S. Burkoth, H. Miller-Auer, D. G. Lynn, R. E. Botto, S. C. Meredith *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1998**, 95, 13407-13412.
- [61] O. N. Antzutkin, J. J. Balbach, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, J. Reed, R. Tycko *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2000**, 97, 13045-13050.
- [62] J. J. Balbach, A. T. Petkova, N. A. Oyler, O. N. Antzutkin, D. J. Gordon, S. C. Meredith, R. Tycko *Biophysical Journal*. **2002**, 83, 1205-1216.
- [63] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2002**, 99, 16742-16747.
- [64] M. Torok, S. Milton, R. Kayed, P. Wu, T. McIntire, C. G. Glabe, R. Langen *Journal of Biological Chemistry*. **2002**, 277, 40810-40815.
- [65] A. Der-Sarkissian, C. C. Jao, J. Chen, R. Langen *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, 278, 37530-37535.
- [66] N. D. Lazo, M. A. Grant, M. C. Condron, A. C. Rigby, D. B. Teplow *Protein Science*. **2005**, 14, 1581-1596.
- [67] T. Luhrs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Doeli, D. Schubert, R. Riek *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**, 102, 17342-17347.
- [68] A. T. Petkova, W. M. Yau, R. Tycko *Biochemistry*. **2006**, 45, 498-512.
- [69] T. Sato, P. Kienlen-Campard, M. Ahmed, W. Liu, H. L. Li, J. I. Elliott, S. Aimoto, S. N. Constantinescu, J. N. Octave, S. O. Smith *Biochemistry*. **2006**, 45, 5503-5516.
- [70] A. K. Paravastu, A. T. Petkova, R. Tycko *Biophysical Journal*. **2006**, 90, 4618-4629.
- [71] F. Shewmaker, R. B. Wickner, R. Tycko *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2006**, 103, 19754-19759.
- [72] R. Tycko in *Characterization of amyloid structures at the molecular level by solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy, Vol. 413* (Eds.: I. Kheterpal, R. Wetzel), Elsevier Academic Press Inc, San Diego, **2006**, pp.103-122.
- [73] R. Tycko *Quarterly Reviews of Biophysics*. **2006**, 39, 1-55.
- [74] S. Luca, W. M. Yau, R. Leapman, R. Tycko *Biochemistry*. **2007**, 46, 13505-13522.
- [75] A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W. M. Yau, R. Tycko *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2008**, 105, 18349-18354.

- [76] R. Tycko, K. L. Sciarretta, J. Orgel, S. C. Meredith *Biochemistry*. **2009**, 48, 6072-6084.
- [77] W. Qiang, W. M. Yau, Y. Q. Luo, M. P. Mattson, R. Tycko *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2012**, 109, 4443-4448.
- [78] J. X. Lu, W. Qiang, W. M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, R. Tycko *Cell*. **2013**, 154, 1257-1268.
- [79] P. Westermark *Febs Journal*. **2005**, 272, 5942-5949.
- [80] B. Soreghan, J. Kosmoski, C. Glabe *Journal of Biological Chemistry*. **1994**, 269, 28551-28554.
- [81] W. GarzonRodriguez, M. SepulvedaBecerra, S. Milton, C. G. Glabe *Journal of Biological Chemistry*. **1997**, 272, 21037-21044.
- [82] W. Garzon-Rodriguez, A. Vega, M. Sepulveda-Becerra, S. Milton, D. A. Johnson, A. K. Yatsimirsky, C. G. Glabe *Journal of Biological Chemistry*. **2000**, 275, 22645-22649.
- [83] A. E. Roher, M. O. Chaney, Y. M. Kuo, S. D. Webster, W. B. Stine, L. J. Haverkamp, A. S. Woods, R. J. Cotter, J. M. Tuohy, G. A. Krafft, B. S. Bonnell, M. R. Emmerling *Journal of Biological Chemistry*. **1996**, 271, 20631-20635.
- [84] G. M. Shankar, S. M. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini, D. J. Selkoe *Nature Medicine*. **2008**, 14, 837-842.
- [85] D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, D. J. Selkoe *Nature*. **2002**, 416, 535-539.
- [86] M. Jin, N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh, D. J. Selkoe *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2011**, 108, 5819-5824.
- [87] S. Lovas, Y. L. Zhang, J. P. Yu, Y. L. Lyubchenko *Journal of Physical Chemistry B*. **2013**, 117, 6175-6186.
- [88] S. Zhang, K. Iwata, M. J. Lachenmann, J. W. Peng, S. Li, E. R. Stimson, Y. Lu, A. M. Felix, J. E. Maggio, J. P. Lee *Journal of Structural Biology*. **2000**, 130, 130-141.
- [89] L. M. Hou, H. Y. Shao, Y. B. Zhang, H. Li, N. K. Menon, E. B. Neuhaus, J. M. Brewer, I. J. L. Byeon, D. G. Ray, M. P. Vitek, T. Iwashita, R. A. Makula, A. B. Przybyla, M. G. Zagorski *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 1992-2005.
- [90] W. Hwang, S. G. Zhang, R. D. Kamm, M. Karplus *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2004**, 101, 12916-12921.
- [91] B. Tarus, J. E. Straub, D. Thirumalai *Journal of Molecular Biology*. **2005**, 345, 1141-1156.
- [92] S. Gnanakaran, R. Nussinov, A. E. Garcia *Journal of the American Chemical Society*. **2006**, 128, 2158-2159.

- [93] A. Huet, P. Derreumaux *Biophysical Journal*. **2006**, 91, 3829-3840.
- [94] S. G. Itoh, Y. Okamoto *Journal of Physical Chemistry B*. **2008**, 112, 2767-2770.
- [95] Y. Chebaro, N. Mousseau, P. Derreumaux *Journal of Physical Chemistry B*. **2009**, 113, 7668-7675.
- [96] T. Takeda, D. K. Klimov *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*. **2009**, 77, 1-13.
- [97] Y. Lu, G. H. Wei, P. Derreumaux *Journal of Physical Chemistry B*. **2011**, 115, 1282-1288.
- [98] P. H. Nguyen, M. S. Li, P. Derreumaux *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2011**, 13, 9778-9788.
- [99] S. G. Itoh, H. Okumura *Journal of Physical Chemistry B*. **2014**, 118, 11428-11436.
- [100] M. D. Smith, J. S. Rao, L. Cruz *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2014**, 16, 13069-13073.
- [101] B. Urbanc, L. Cruz, F. Ding, D. Sammond, S. Khare, S. V. Buldyrev, H. E. Stanley, N. V. Dokholyan *Biophysical Journal*. **2004**, 87, 2310-2321.
- [102] P. Anand, F. S. Nandel, U. H. E. Hansmann *Journal of Chemical Physics*. **2008**, 129, 7.
- [103] B. Barz, B. Urbanc *Plos One*. **2012**, 7, 17.
- [104] S. Cote, R. Laghaei, P. Derreumaux, N. Mousseau *Journal of Physical Chemistry B*. **2012**, 116, 4043-4055.
- [105] X. X. Zhu, R. P. Bora, A. Barman, R. Singh, R. Prabhakar *Journal of Physical Chemistry B*. **2012**, 116, 4405-4416.
- [106] T. Zhang, J. Zhang, P. Derreumaux, Y. G. Mu *Journal of Physical Chemistry B*. **2013**, 117, 3993-4002.
- [107] A. Yano, A. Okamoto, K. Nomura, S. Higai, N. Kurita *Chemical Physics Letters*. **2014**, 595, 242-249.
- [108] B. Urbanc, L. Cruz, S. Yun, S. V. Buldyrev, G. Bitan, D. B. Teplow, H. E. Stanley *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2004**, 101, 17345-17350.
- [109] B. Urbanc, M. Betnel, L. Cruz, G. Bitan, D. B. Teplow *Journal of the American Chemical Society*. **2010**, 132, 4266-4280.
- [110] M. H. Viet, P. H. Nguyen, P. Derreumaux, M. S. Li *Acs Chemical Neuroscience*. **2014**, 5, 646-657.
- [111] G. Bitan, A. Lomakin, D. B. Teplow *Journal of Biological Chemistry*. **2001**, 276, 35176-35184.

- [112] G. Bitan, M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek, D. B. Teplow *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2003**, 100, 330-335.
- [113] G. Bitan, D. B. Teplow *Accounts of Chemical Research*. **2004**, 37, 357-364.
- [114] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. W. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riek, D. Eisenberg *Nature*. **2007**, 447, 453-457.
- [115] R. Laghaei, N. Mousseau, G. H. Wei *Journal of Physical Chemistry B*. **2010**, 114, 7071-7077.
- [116] F. Massi, J. W. Peng, J. P. Lee, J. E. Straub *Biophysical Journal*. **2001**, 80, 31-44.
- [117] J. M. Borreguero, B. Urbanc, N. D. Lazo, S. V. Buldyrev, D. B. Teplow, H. E. Stanley *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**, 102, 6015-6020.
- [118] W. Chen, N. Mousseau, P. Derreumaux *Journal of Chemical Physics*. **2006**, 125, 8.
- [119] B. Tarus, J. E. Straub, D. Thirumalai *Journal of the American Chemical Society*. **2006**, 128, 16159-16168.
- [120] G. H. Wei, J. E. Shea *Biophysical Journal*. **2006**, 91, 1638-1647.
- [121] A. Baumketner, S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, G. Bitan, D. B. Teplow, M. T. Bowers, J. E. Shea *Protein Science*. **2006**, 15, 420-428.
- [122] A. Baumketner, J. E. Shea *Journal of Molecular Biology*. **2006**, 362, 567-579.
- [123] A. Baumketner, S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, N. D. Lazo, D. B. Teplow, M. T. Bowers, J. E. Shea *Protein Science*. **2006**, 15, 1239-1247.
- [124] A. Baumketner, J. E. Shea *Journal of Molecular Biology*. **2007**, 366, 275-285.
- [125] N. L. Fawzi, A. H. Phillips, J. Z. Ruscio, M. Doucleff, D. E. Wemmer, T. Head-Gordon *Journal of the American Chemical Society*. **2008**, 130, 6145-6158.
- [126] R. Roychaudhuri, M. F. Yang, A. Deshpande, G. M. Cole, S. Frautschy, A. Lomakin, G. B. Benedek, D. B. Teplow *Journal of Molecular Biology*. **2013**, 425, 292-308.
- [127] Y. C. Xu, J. J. Shen, X. M. Luo, W. L. Zhu, K. X. Chen, J. P. Ma, H. L. Jiang *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**, 102, 5403-5407.
- [128] E. Luttmann, G. Fels *Chemical Physics*. **2006**, 323, 138-147.
- [129] N. G. Sgourakis, Y. L. Yan, S. A. McCallum, C. Y. Wang, A. E. Garcia *Journal of Molecular Biology*. **2007**, 368, 1448-1457.
- [130] N. G. Sgourakis, M. Merced-Serrano, C. Boutsidis, P. Drineas, Z. M. Du, C. Y. Wang, A. E. Garcia *Journal of Molecular Biology*. **2011**, 405, 570-583.

- [131] P. Anand, F. S. Nandel, U. H. E. Hansmann *Journal of Chemical Physics*. **2008**, 128, 5.
- [132] M. F. Yang, D. B. Teplow *Journal of Molecular Biology*. **2008**, 384, 450-464.
- [133] T. Takeda, D. K. Klimov *Journal of Physical Chemistry B*. **2009**, 113, 6692-6702.
- [134] S. Cote, P. Derreumaux, N. Mousseau *Journal of Chemical Theory and Computation*. **2011**, 7, 2584-2592.
- [135] C. Velez-Vega, F. A. Escobedo *Journal of Physical Chemistry B*. **2011**, 115, 4900-4910.
- [136] K. A. Ball, A. H. Phillips, D. E. Wemmer, T. Head-Gordon *Biophysical Journal*. **2013**, 104, 2714-2724.
- [137] A. Okamoto, A. Yano, K. Nomura, S. Higai, N. Kurita *Chemical Physics Letters*. **2013**, 577, 131-137.
- [138] I. F. Tsigelny, Y. Sharikov, V. L. Kouznetsova, J. P. Greenberg, W. Wrasidlo, T. Gonzalez, P. Desplats, S. E. Michael, M. Trejo-Morales, C. R. Overk, E. Masliah *Journal of Alzheimers Disease*. **2014**, 39, 583-600.
- [139] M. D. Smith, L. Cruz *Journal of Physical Chemistry B*. **2013**, 117, 6614-6624.
- [140] C. Lockhart, D. K. Klimov *Journal of Physical Chemistry B*. **2013**, 117, 12030-12038.
- [141] C. Lockhart, D. K. Klimov *Journal of Physical Chemistry B*. **2014**, 118, 2638-2648.
- [142] P. M. Truong, M. H. Viet, P. H. Nguyen, C. K. Hu, M. S. Li *Journal of Physical Chemistry B*. **2014**, 118, 8972-8981.
- [143] D. K. Klimov, D. Thirumalai *Structure*. **2003**, 11, 295-307.
- [144] B. Y. Ma, R. Nussinov *Biophysical Journal*. **2006**, 90, 3365-3374.
- [145] U. F. Rohrig, A. Laio, N. Tantalo, M. Parrinello, R. Petronzio *Biophysical Journal*. **2006**, 91, 3217-3229.
- [146] Y. Chebaro, P. Jiang, T. Zang, Y. G. Mu, P. H. Nguyen, N. Mousseau, P. Derreumaux *Journal of Physical Chemistry B*. **2012**, 116, 8412-8422.
- [147] B. Y. Ma, R. Nussinov *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2002**, 99, 14126-14131.
- [148] M. F. Masman, U. L. M. Eisel, I. G. Csizmadia, B. Penke, R. D. Enriz, S. J. Marrink, P. G. M. Luiten *Journal of Physical Chemistry B*. **2009**, 113, 11710-11719.
- [149] A. H. C. Horn, H. Sticht *Journal of Physical Chemistry B*. **2010**, 114, 2219-2226.
- [150] D. Meral, B. Urbanc *Journal of Molecular Biology*. **2013**, 425, 2260-2275.
- [151] F. Massi, D. Klimov, D. Thirumalai, J. E. Straub *Protein Science*. **2002**, 11, 1639-1647.
- [152] N. V. Buchete, R. Tycko, G. Hummer *Journal of Molecular Biology*. **2005**, 353, 804-821.

- [153] N. V. Buchete, G. Hummer *Biophysical Journal*. **2007**, 92, 3032-3039.
- [154] J. Zheng, H. Jang, B. Ma, C. J. Tsai, R. Nussinov *Biophysical Journal*. **2007**, 93, 3046-3057.
- [155] P. K. GhattyVenkataKrishna, B. Mostofian *Chemical Physics Letters*. **2013**, 582, 1-5.
- [156] P. K. GhattyVenkataKrishna, E. C. Uberbacher, X. L. Cheng *Febs Letters*. **2013**, 587, 2649-2655.
- [157] A. Kahler, H. Sticht, A. H. C. Horn *Plos One*. **2013**, 8, 12.
- [158] A. Sgarbossa, S. Monti, F. Lenci, E. Bramanti, R. Bizzarri, V. Barone *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. **2013**, 1830, 2924-2937.
- [159] J. Xu, J. Z. H. Zhang, Y. Xiang *Journal of Physical Chemistry A*. **2013**, 117, 6373-6379.
- [160] T. Gurry, C. M. Stultz *Biophysical Journal*. **2014**, 106, 482A-482A.
- [161] W. Han, K. Schulten *Journal of the American Chemical Society*. **2014**, 136, 12450-12460.
- [162] H. Okumura, S. G. Itoh *Journal of the American Chemical Society*. **2014**, 136, 10549-10552.
- [163] E. Socher, H. Sticht, A. H. C. Horn *Acs Chemical Neuroscience*. **2014**, 5, 161-167.
- [164] L. Xu, Y. G. Chen, X. J. Wang *Journal of Physical Chemistry B*. **2014**, 118, 9238-9246.
- [165] C. J. Pike, A. J. Walencewiczwasserman, J. Kosmoski, D. H. Cribbs, C. G. Glabe, C. W. Cotman *Journal of Neurochemistry*. **1995**, 64, 253-265.
- [166] W. P. Esler, E. R. Stimson, J. R. Ghilardi, Y. A. Lu, A. M. Felix, H. V. Vinters, P. W. Mantyh, J. P. Lee, J. E. Maggio *Biochemistry*. **1996**, 35, 13914-13921.
- [167] L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt *Journal of Biological Chemistry*. **1996**, 271, 8545-8548.
- [168] S. Shivaprasad, R. Wetzel *Biochemistry*. **2004**, 43, 15310-15317.
- [169] D. Thirumalai, D. K. Klimov, R. I. Dima *Current Opinion in Structural Biology*. **2003**, 13, 146-159.
- [170] R. I. Dima, D. Thirumalai *Bioinformatics*. **2004**, 20, 2345-2354.
- [171] K. L. Sciarretta, D. J. Gordon, A. T. Petkova, R. Tycko, S. C. Meredith *Biochemistry*. **2005**, 44, 6003-6014.
- [172] J. H. Viles *Coordination Chemistry Reviews*. **2012**, 256, 2271-2284.
- [173] K. M. Soergjerd, T. Zako, M. Sakono, P. C. Stirling, M. R. Leroux, T. Saito, P. Nilsson, M. Sekimoto, T. C. Saido, M. Maeda *Biochemistry*. **2013**, 52, 3532-3542.
- [174] K. Ono, M. M. Condrón, D. B. Teplow *Journal of Biological Chemistry*. **2010**, 285, 23184-23195.

- [175] G. Bitan, S. S. Vollers, D. B. Teplow *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, 278, 34882-34889.
- [176] Y. Miller, B. Y. Ma, C. J. Tsai, R. Nussinov *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2010**, 107, 14128-14133.
- [177] C. Haass, D. J. Selkoe *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2007**, 8, 101-112.
- [178] V. H. Finder, R. Glockshuber *Neurodegenerative Diseases*. **2007**, 4, 13-27.
- [179] R. Jakob-Roetne, H. Jacobsen *Angewandte Chemie-International Edition*. **2009**, 48, 3030-3059.
- [180] K. Hukushima, K. Nemoto *Journal of the Physical Society of Japan*. **1996**, 65, 1604-1608.
- [181] Y. Sugita, Y. Okamoto *Chemical Physics Letters*. **1999**, 314, 141-151.
- [182] K. Kitaura, T. Sawai, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayasi *Chemical Physics Letters*. **1999**, 312, 319-324.
- [183] K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayasi *Chemical Physics Letters*. **1999**, 313, 701-706.
- [184] T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, Y. Akiyama, M. Uebayasi, K. Kitaura *Chemical Physics Letters*. **2000**, 318, 614-618.
- [185] K. Kitaura, S. I. Sugiki, T. Nakano, Y. Komeiji, M. Uebayasi *Chemical Physics Letters*. **2001**, 336, 163-170.
- [186] T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, K. Fukuzawa, Y. Akiyama, M. Uebayasi, K. Kitaura *Chemical Physics Letters*. **2002**, 351, 475-480.
- [187] D. G. Fedorov, K. Kitaura *Journal of Physical Chemistry A*. **2007**, 111, 6904-6914.
- [188] M. Ito, K. Fukuzawa, T. Ishikawa, Y. Mochizuki, T. Nakano, S. Tanaka *Journal of Physical Chemistry B*. **2008**, 112, 12081-12094.
- [189] Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Murase, T. Nakano, K. Fukuzawa, K. Takematsu, H. Watanabe, S. Tanaka *Chemical Physics Letters*. **2008**, 457, 396-403.
- [190] D. G. Fedorov, T. Nagata, K. Kitaura *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2012**, 14, 7562-7577.
- [191] M. H. M. Olsson, C. R. Sondergaard, M. Rostkowski, J. H. Jensen *Journal of Chemical Theory and Computation*. **2011**, 7, 525-537.
- [192] K. Ma, E. L. Clancy, Y. B. Zhang, D. G. Ray, K. Wollenberg, M. G. Zagorski *Journal of the American Chemical Society*. **1999**, 121, 8698-8706.
- [193] D. Case, T. Darden, T. Cheatham III, C. Simmerling, J. Wang, R. Duke, R. Luo, R. Walker, W. Zhang, K. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A. Gotz, I. Kolossvary, K. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R. Wolf, J. Liu, X. Wu, S. Brozell, T.

- Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, M.-J. Hsieh, G. Cui, D. Roe, D. Mathews, M. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P. Kollman *University of California, San Francisco*. **2012**, 1, 3.
- [194] D. Van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen *Journal of Computational Chemistry*. **2005**, 26, 1701-1718.
- [195] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, C. Simmerling *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*. **2006**, 65, 712-725.
- [196] H. W. Horn, W. C. Swope, J. W. Pitera, J. D. Madura, T. J. Dick, G. L. Hura, T. Head-Gordon *Journal of Chemical Physics*. **2004**, 120, 9665-9678.
- [197] A. Yoshioka, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, E. Nobusawa, K. Nakajima, S. Tanaka *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. **2011**, 30, 110-119.
- [198] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. Fraaije *Journal of Computational Chemistry*. **1997**, 18, 1463-1472.
- [199] S. Miyamoto, P. A. Kollman *Journal of computational chemistry*. **1992**, 13, 952-962.
- [200] T. Darden, D. York, L. Pedersen *Journal of Chemical Physics*. **1993**, 98, 10089-10092.
- [201] S. Nosé *Progress of Theoretical Physics Supplement*. **1991**, 103, 1-46.
- [202] W. Kabsch, C. Sander *Biopolymers*. **1983**, 22, 2577-2637.
- [203] S. Mitternacht, I. Staneva, T. Hard, A. Irback *Journal of Molecular Biology*. **2011**, 410, 357-367.
- [204] Y. Yoshiike, T. Akagi, A. Takashima *Biochemistry*. **2007**, 46, 9805-9812.
- [205] S. Sinha, D. H. J. Lopes, G. Bitan *Acs Chemical Neuroscience*. **2012**, 3, 473-481.
- [206] R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe *Science*. **2003**, 300, 486-489.
- [207] S. Sinha, D. H. J. Lopes, Z. M. Du, E. S. Pang, A. Shanmugam, A. Lomakin, P. Talbiersky, A. Tennstaedt, K. McDaniel, R. Bakshi, P. Y. Kuo, M. Ehrmann, G. B. Benedek, J. A. Loo, F. G. Klarner, T. Schrader, C. Y. Wang, G. Bitan *Journal of the American Chemical Society*. **2011**, 133, 16958-16969.
- [208] S. Sinha, Z. M. Du, P. Maiti, F. G. Klarner, T. Schrader, C. Y. Wang, G. Bitan *Acs Chemical Neuroscience*. **2012**, 3, 451-458.

附録 A. 水和した A β 二量体における水和水の構造

本章では、本研究の *ab initio* FMO 計算の際に考慮した水和水の選択範囲の決定方法、及び水和水の揺らぎを考慮した安定配座間の相対的な安定性の解析について述べる。

附録 A.1. FMO 計算の際に考慮する水和水の選択範囲の決定方法

本研究の *ab initio* FMO 計算において、A β の周囲に存在する水和水が A β 二量体の水和水構造の安定性に与える影響を明らかにするため、A β 二量体の表面から 6 Å 程度に存在する水和水のみを顕わに考慮した。

まず、Figure 29 の最適化構造に対し、ABINIT-MP Ver.6.0^[197] に実装されている Poisson-Boltzmann 方程式に基づく連続溶媒モデルにより、溶媒効果を考慮した。計算手法は MP2/6-31G であり、溶媒の分極率を 80.0、溶質の分極率を 1.0 として計算した。その結果、Table A.1 に示すように、Figure 29 (k) の最適化構造が最安定となった。次に、Figure 29 の最適化構造に対し、A β 二量体の表面から 3、4、5 及び 6 Å 程度に存在する水和水を顕わに考慮した水和水構造をそれぞれ作成し、それらの水和水構造に対し、*ab initio* MP2/6-31G 法を用いた FMO 計算により電子状態を解析し、全エネルギーを評価した。考慮する水和水の数は、A β 二量体の表面からの距離毎に統一した。周囲 3、4、5 及び 6 Å 程度に存在する水和水の数は、それぞれ 452、647、857、1151 個である。得られた全エネルギーを Table A.1 に要約する。周囲 3 Å 程度の水和水を考慮した系では Figure 29 (b)、周囲 4 あるいは 5 Å 程度の水和水を考慮した系では、Figure 29 (m) の最適化構造が最安定である。周囲 6 Å 程度に存在する水和水を顕わに考慮した水和水構造では、連続溶媒モデルにより溶媒効果を考慮した場合と同様に、Figure 29 (k) の最適化構造が最安定である。さらに、連続溶媒モデルにより溶媒効果を考慮した系の相対的な全エネルギー (Table A.1 の A β dimer in PB solvent の ΔTE) と水和水を顕わに考慮した水和水構造の相対的な全エネルギー (Table A.1 の Solvated A β dimer (3–6 Å) の ΔTE) の相関を調べた。連続溶媒モデルにより溶媒効果を考慮した系と周囲 3、4、5 及び 6 Å 程度の水和水を考慮した系の相関係数 R は、それぞれ 0.17、0.19、0.24、0.36 である。従って、周囲 6 Å 程度に存在する水和水を顕わに考慮することで、バルクな溶媒構造を再現できる可能性がある。そのため、本研究の FMO 計算では、A β 二量体の表面から 6 Å 程度に存在する水和水のみを顕わに考慮し、電子状態を解析した。

Table A.1 Total energies (TE) evaluated by *ab initio* MP2/6-31G FMO calculations for A β dimer without solvating water molecules, A β dimer in Poisson-Boltzmann (PB) solvent and solvated A β dimer. Δ TE is TE relative to the most stable one.

Conformation	A β dimer in vacuum		A β dimer in PB solvent		Solvated A β dimer (6 Å)		Solvated A β dimer (5 Å)		Solvated A β dimer (4 Å)		Solvated A β dimer (3 Å)	
	TE (kcal/mol)	Δ TE	TE	Δ TE	TE	Δ TE	TE	Δ TE	TE	Δ TE	TE	Δ TE
Fig. 29 (a)	-19800924.2	117.8	-19802424.0	19.1	-74792906.1	503.2	-60746066.8	360.2	-50712247.6	557.4	-41395292.3	499.2
Fig. 29 (b)	-19800905.7	136.3	-19802406.5	36.6	-74793195.3	214.0	-60746401.4	25.5	-50712648.0	157.1	-41395791.5	0.0
Fig. 29 (c)	-19800694.7	347.2	-19802394.9	48.2	-74793263.4	145.9	-60746279.9	147.1	-50712558.2	246.8	-41395440.6	351.0
Fig. 29 (d)	-19800880.2	161.8	-19802392.8	50.3	-74792968.3	441.0	-60746043.4	383.6	-50712368.0	437.1	-41395380.6	410.9
Fig. 29 (e)	-19800920.0	122.0	-19802440.9	2.2	-74792734.0	675.3	-60745840.9	586.1	-50712155.6	649.5	-41395385.7	405.8
Fig. 29 (f)	-19800733.8	308.2	-19802372.0	71.1	-74792499.7	909.6	-60745718.4	708.6	-50712059.0	746.1	-41395153.5	638.0
Fig. 29 (g)	-19800723.1	318.9	-19802386.2	56.9	-74793098.4	310.9	-60746116.7	310.3	-50712487.9	317.2	-41395581.1	210.4
Fig. 29 (h)	-19800663.8	378.2	-19802416.3	26.8	-74793060.9	348.5	-60746024.3	402.7	-50712291.4	513.6	-41395171.6	620.0
Fig. 29 (i)	-19800725.9	316.0	-19802320.0	123.1	-74792819.0	590.3	-60746065.3	361.6	-50712484.3	320.8	-41395470.8	320.7
Fig. 29 (j)	-19800811.9	230.0	-19802404.1	39.0	-74792820.3	589.0	-60745822.5	604.5	-50712395.0	410.0	-41395309.1	482.4
Fig. 29 (k)	-19801031.3	10.7	-19802443.1	0.0	-74793409.3	0.0	-60746357.7	69.3	-50712753.4	51.7	-41395665.3	126.2
Fig. 29 (l)	-19800708.8	333.2	-19802370.0	73.1	-74793104.4	304.9	-60746111.9	315.1	-50712322.4	482.7	-41395444.0	347.5
Fig. 29 (m)	-19801042.0	0.0	-19802431.5	11.6	-74793236.1	173.2	-60746427.0	0.0	-50712805.1	0.0	-41395723.4	68.1

附録 A.2. 水和水の揺らぎを考慮した相対的な安定性の解析

本研究では、REMD 及び MM 計算から得られた安定配座に対し、*ab initio* FMO 計算により、全エネルギーを評価し、最安定配座を決定した。その結果、A β の水和水の安定性は、水和水の安定性に強く依存することを明らかにした (Figure 21 及び 30)。そこで、水和水の揺らぎを考慮した安定配座間の相対的な安定性を解析するため、真空中における最安定配座 (Figure 29 (k)) とその次に安定な配座 (Figure 29 (m)) に対し、A β 二量体を拘束した状態で、水和水のみを動かした 100 ns の MD シミュレーションを実行した。その際、10 ps 毎に MD スナップショットを出力した。

それぞれの 10,000 個の MD スナップショットの中から、ポテンシャルエネルギー (Figure A.1) を基準に、値の小さい順から 100 個の配座をサンプリングし、水中で MM 法により、最適化した後、MP2/6-31G 法を用いた *ab initio* FMO 計算により電子状態を解析し、全エネルギーを評価した。頭わに考慮する水和水は、A β 二量体の表面から 6 Å 程度に存在するものを選択し、その数を 1151 個に統一した。その結果、Table A.2 に示すように、MD 及び MM 計算から、MD シミュレーションの初期構造よりも安定な水和水の配置を持つ水和水構造が得られた。また、より安定な水和水を持つ構造の中では、Figure 29 (k) の最適化構造を初期構造とした MD シミュレーションの 83.54 ns のスナップショットが最安定構造となった。そのため、Figure 29 (k) と (m) の最適化構造間の相対的な安定性は、最安定な水和水を持つ水和水構造同士で比較しても同様である。

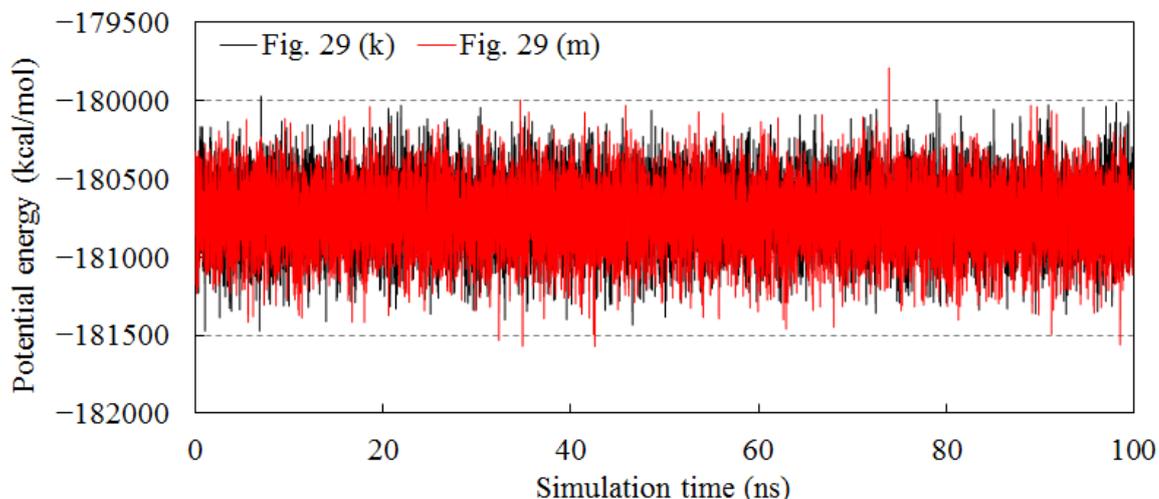


Figure A.1. The time evolutions of potential energy during 100 ns MD simulations for the solvated A β dimer.

Table A.2 Total energies (TE) evaluated by *ab initio* MP2/6-31G FMO calculations for solvated A β dimer

Conformation	TE (kcal/mol)	Δ TE
Fig. 29 (k) Initial	-74793409.3	349.0
Fig. 29 (k) Most stable	-74793758.3	0.0
Fig. 29 (m) Initial	-74793236.1	522.2
Fig. 29 (m) Most stable	-74793591.5	166.8

水和水の相対的な安定性を決定する要因を明らかにするため、Figure 29 (k)の 83.54 ns の構造と他の構造間の全エネルギー差（水和水の Δ TE）、A β 単量体間の相互作用エネルギーの総和の差（A β 単量体間の Δ IFIE）、水和水間の相互作用エネルギーの総和の差（水和水間の Δ IFIE）、A β 二量体と水和水間の相互作用エネルギーの総和の差（A β 二量体と水和水間の Δ IFIE）を求め、水和水の Δ TE と各要素の Δ IFIE 間の相関関係を調べた。Figure A.2 の横軸は、水和水の Δ TE であり、グラフの左方向へプロットされている構造ほど、より安定な A β 二量体の水和水構造である。一方、Figure A.2(a)、(b)及び(c)の縦軸は各要素の Δ IFIE であり、例えば、Figure A.2 (b)であれば、グラフの下方にプロットされているものほど、より安定な水和水を持つ水和水構造である。また、Figure 29 (k)の 83.54 ns の構造における相互作用エネルギーの総和を基準としているため、この構造よりも小さい相互作用エネルギーの総和を示す

構造は、縦軸の負の方向へプロットされる。また、緑色の菱形、及び青い丸のプロットは、それぞれ Figure 29 (k)、(m)の初期構造を示す。水和した A β 二量体の ΔTE と A β 単量体間の $\Delta IFIE$ の間、水和水間の $\Delta IFIE$ の間、及び A β 二量体と水和水間の $\Delta IFIE$ の間の相関係数 R は、それぞれ 0.44(Figure A.2(a))、0.87(Figure A.2 (b))、0.32(Figure A.2 (c)) である。水和した A β 二量体の ΔTE と水和水間の $\Delta IFIE$ は強い相関を示しており、水和した A β 二量体の相対的な安定性は、水和水の安定性に強く依存する。つまり、水和水の構造が安定になるほど、より安定な A β 二量体の水和構造となる。従って、Figure 29 (k)の安定配座は、Figure 29 (m)の安定配座よりも水和水同士が安定し易い配座である。

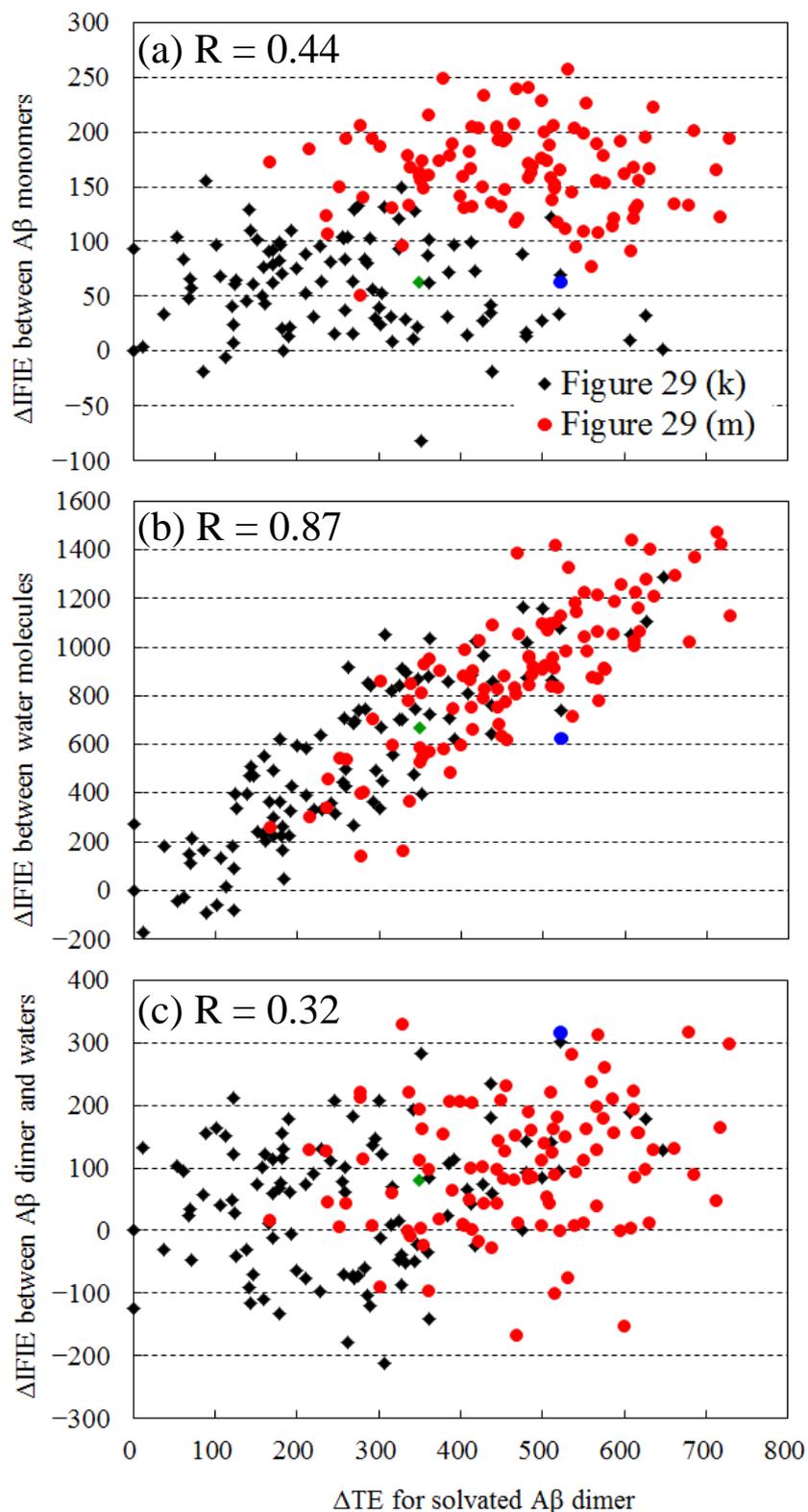
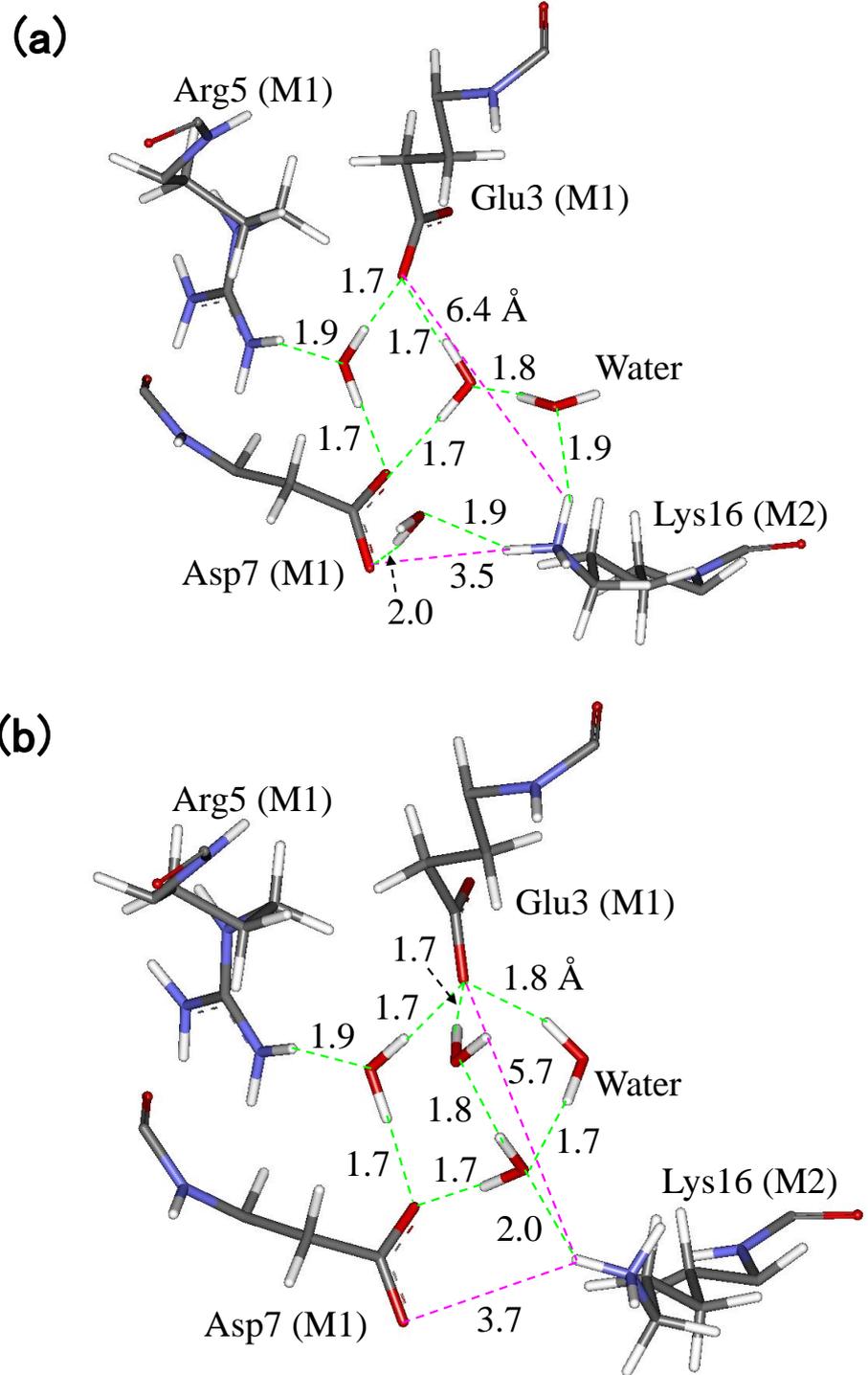


Figure A.2. Correlations with (a) relative total energy between the most stable conformation and others (ΔTE) of solvated A β dimer and relative IFIE summation ($\Delta IFIE$) between A β monomers, (b) ΔTE of solvated A β dimer and $\Delta IFIE$ between solvating water molecules, and (c) ΔTE of solvated A β dimer and $\Delta IFIE$ between A β dimer and water molecules.

Figure 29 (k)に対する MD 及び MM 計算から得られた水和構造においては、83.54 ns のスナップショットの構造が最安定である。しかし、59.81 及び 36.00 ns の構造は、最安定構造との Δ TE がそれぞれ 0.6、11.9 kcal/mol であり、Figure 29 (k)に対する計算では、最安定構造と微小な差を持つ構造が得られた(Figure A.1)。一方、Figure 29 (m)に対する計算から得られた構造においては、81.78 ns のスナップショットの構造が最安定であり、他の構造と比較して、最低でも 49 kcal/mol 程度安定である。両者の最安定構造の TE を比較すると、Figure 29 (k)の 83.54 ns の構造の方が 167 kcal/mol 程度安定である。Figure A.2 から分かるように、水和水構造の変化により、両者の水和構造の安定性の順序が変化する可能性がある。しかし、Figure 29 (k)及び(m)の最も安定な水和水を持つ構造間の相対的な安定性は、REMD 及び MM 計算で決定した最適化構造間の相対的な安定性(Table 11 及び Table A.1)と同様である。従って、水和水の揺らぎを考慮しても、安定配座間の相対的な安定性は変化しない。

Figure 29 (k)の MD シミュレーションの初期構造において、M1 の単量体の Glu3、Arg5、Asp7、及び M2 の単量体の Lys16 の間に、いくつかの水分子が位置している(Figure 33 (a))。この構造が MD シミュレーション中に保持されているかを確認するため、最安定構造である 83.54 ns のスナップショット、最安定構造との全エネルギー差の小さい 59.81 及び 36.00 ns の構造に対し、Glu3(M1)、Arg5(M1)、Asp7(M1)及び Lys16(M2)周辺の水分子の位置を確認した。Figure A.3 に、それぞれの相互作用構造を示す。どのスナップショットの構造においても、初期構造と同様に、Glu3(M1)、Arg5(M1)、Asp7(M1)及び Lys16(M2)の間に水分子が存在しており、アミノ酸間をブリッジするように位置している。Glu3(M1)と Lys16(M2)の間、及び Asp7(M1)と Lys16(M2)の間に存在する水分子は、特定の水分子が留まらずに、水分子同士で位置の入れ替えが起きている。一方、Glu3(M1)、Arg5(M1)及び Asp7(M1)の間に存在する水分子については、MD シミュレーション中で、同じ水分子がほぼ同じ位置に留まっている。この水分子は、Glu3(M1)、Arg5(M1)及び Asp7(M1)と水素結合しており、初期構造におけるこれらのアミノ酸との相互作用エネルギーは、それぞれ-19.8、-18.9、-17.2 kcal/mol である。従って、この水分子は M1 の N 末端の構造を形成する水分子として、Glu3(M1)、Arg5(M1)及び Asp7(M1)と計 3 本の水素結合を形成することにより、位置が固定化されている。Asp7(M1)の近傍には、MD シミュレーション中で位置が固定化されている水分子がもうひとつ存在している。この水分子は、Asp7(M1)及び Lys16(M1)と水素結合を形成することにより、他の水分子と位置の入れ替えをせず、MD シミュレーション中で、ほぼ同じ位置に留まっている。これらの水分子は、M1 の N 末端の構造を形成する上で重要な水分子である。



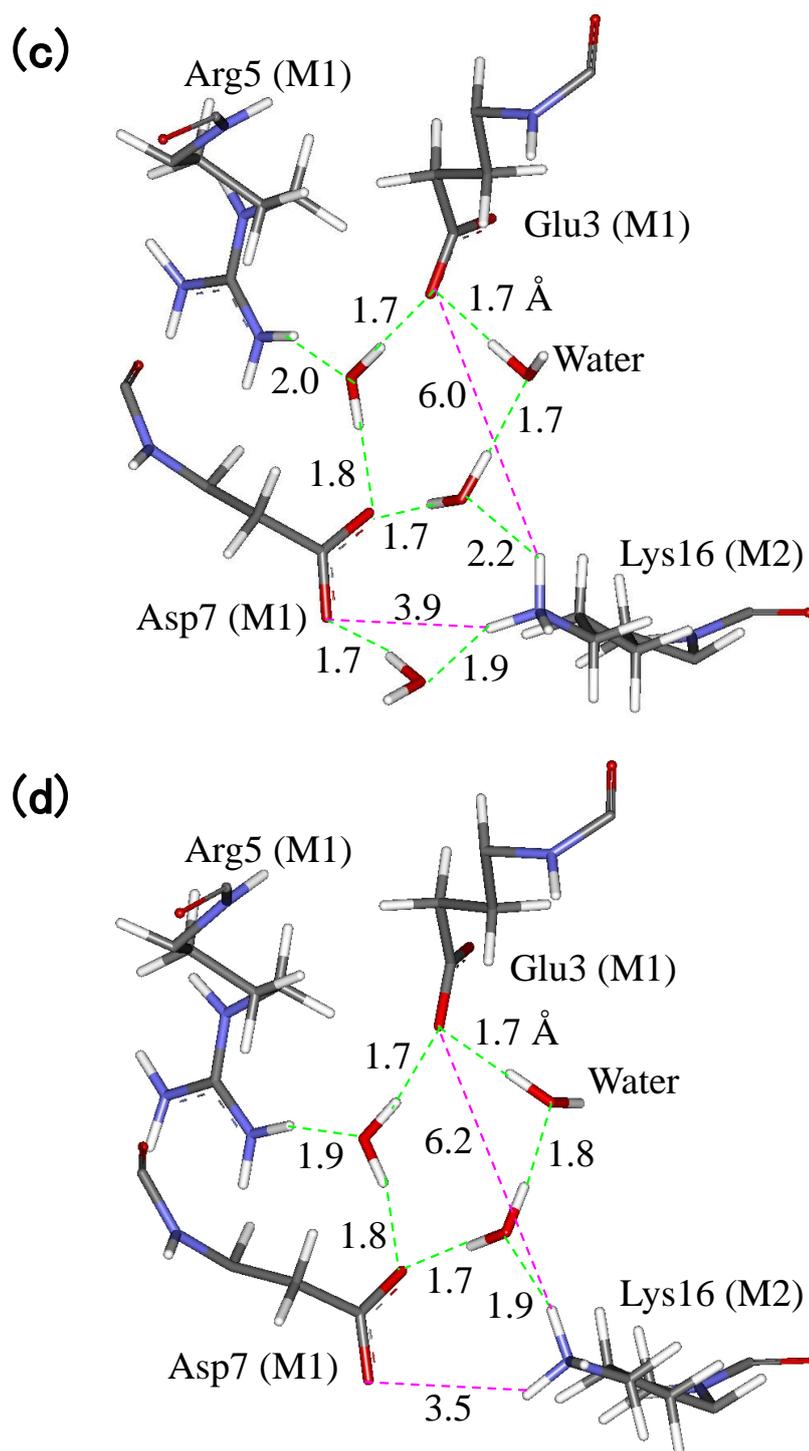


Figure A.3. Inter-monomer interacting structures between Glu3/Arg5/Asp7 of M1 and Lys16 of M2 in the stable conformations of solvated A β dimer;

(a) Initial structure, (b) 83.54 ns, (c) 59.81 ns and (d) 36.00 ns snapshots

Green dash-lines indicate hydrogen bonds, while pink dash-lines indicate electrostatic attractive interactions between charged amino acid residues.

Some water molecules contribute to the interactions.

附録 B. 本論文の基礎となる研究成果

附録 B.1. 査読付き学術雑誌に発表した論文

第一著者として、以下の論文を査読付き学術雑誌に発表した。

- [A1] **A. Okamoto**, Y. Maeda, T. Tsukamoto, Y. Ishikawa, N. Kurita,
 "A combined nonequilibrium Green's function/density-functional theory study of
 electrical conducting properties of artificial DNA duplexes",
Computational Materials Science, **2012**, 53, 416–424.
- [A2] **A. Okamoto**, K. Nomura, A. Yano, S. Higai, T. Kondo, S. Kamba, N. Kurita,
 "Stable conformation of full-length amyloid- β (1–42) monomer in water:
 replica exchange molecular dynamics and *ab initio* molecular orbital simulations",
Chemical Physics Letters, **2013**, 577, 131–137.
- [A3] **A. Okamoto**, A. Yano, K. Nomura, S. Higai, N. Kurita,
 "Effect of D23N mutation on the dimer conformation of amyloid β -proteins:
ab initio molecular simulations in water",
Journal of Molecular Graphics and Modelling, **2014**, 50, 113–124.

また、以下の論文を査読付き国際会議議事録に発表した。

- [A4] **A. Okamoto**, K. Nomura, A. Yano, S. Higai, T. Kondo, S. Kamba, N. Kurita,
 "Proposal for an inhibitor of Alzheimer's disease blocking aggregation of
 amyloid- β peptides: *ab initio* molecular simulations",
Journal of Physics Conference Series, **2013**, 433, 012033.

さらに、共著者として以下の論文を査読付き学術雑誌に発表した。

- [A5] Y. Maeda, **A. Okamoto**, Y. Hoshiba, T. Tsukamoto, Y. Ishikawa, N. Kurita,
 "Effect of hydration on electrical conductivity of DNA duplex:
 Green's function study combined with DFT",
Computational Materials Science, **2012**, 53, 314–320.

- [A6] K. Nomura, **A. Okamoto**, A. Yano, S. Higai, T. Kondo, S. Kamba, N. Kurita,
"Ab initio molecular simulations on specific interactions between amyloid beta
and monosaccharides",
Chemical Physics Letters, **2012**, 547, 89–96.
- [A7] A. Yano, **A. Okamoto**, K. Nomura, S. Higai, N. Kurita,
"Difference in dimer conformation between amyloid- β (1–42) and (1–43) proteins:
replica exchange molecular dynamics simulations in water",
Chemical Physics Letters, **2014**, 595, 242–249.
- [A8] T. Sugimoto, T. Mizushima, **A. Okamoto**, N. Kurita,
"Structures and electronic properties of metal organic frameworks:
DFT and *ab initio* FMO calculations for model systems",
Chemical physical Letters, **2014**, 612, 295–301.

附録 B.2. 国際会議における発表（第一著者のみ）

- [I1] **A. Okamoto**, T. Tsukamoto, Y. Maeda, Y. Ishikawa, N. Kurita,
"Molecular simulations of electrical conducting properties of artificial DNA duplexes
using nonequilibrium Green's function coupled with DFT",
Chem-Bio Infomatics (CBI) Annual Meeting 2010, P1-05, **2010**, September,
Tokyo, Japan.
- [I2] **A. Okamoto**, Y. Maeda, T. Tsukamoto, Y. Ishikawa, N. Kurita,
"A combined Green's function and density-functional study of electrical conductivity of
artificial DNA duplexes",
The World Association of Theoretical and Computational Chemists (WATOC) 2011,
PI-047, **2011**, July, Compostela, Spain.
- [I3] **A. Okamoto**, K. Nomura, A. Yano, S. Higai, T. Kondo, S. Kamba, N. Kurita,
"Ab initio molecular simulations for proposing potent inhibitors of
amyloid- β aggregations",
Theory and Applications of Computational Chemistry (TACC)-2012,
Poster Session 2-24, **2012**, September, Pavia, Italy.
- [I4] **A. Okamoto**, K. Nomura, A. Yano, S. Higai, T. Kondo, S. Kamba, N. Kurita,
"Proposal for an inhibitor of Alzheimer's disease blocking aggregation of
amyloid- β peptides: *ab initio* molecular simulations",
The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference (AP-IRC) 2012,
15P-85, **2012**, November, Aichi, Japan.

- [I5] **A. Okamoto**, K. Nomura, A. Yano, S. Higai, N. Kurita,
 "Stability of full-length amyloid- β (1-42) monomer in water:
 Replica exchange molecular dynamics and *ab initio* molecular simulations",
53rd Sanibel Symposium, Poster V-18, **2013**, February, Georgia, U.S.A.
- [I6] **A. Okamoto**, K. Nomura, A. Yano, S. Higai, N. Kurita,
 "Replica exchange molecular dynamics and *ab initio* MO simulations
 for searching stable structures of full-length amyloid- β peptide",
*3rd RIKEN Advanced Institute for Computational Science (AICS)
 International Symposium*, P45, **2013**, February–March, Kobe, Japan.
- [I7] **A. Okamoto**, A. Yano, K. Nomura, S. Higai and N. Kurita,
 "Global search for stable conformation of amyloid- β peptide in explicit water
 by replica exchange MD simulations combined with *ab initio* MO method",
9th European Conference on Computational Chemistry (EUCC-9), Poster-44,
2013, September, Sopron, Hungary.
- [I8] **A. Okamoto**, A. Yano, K. Nomura, S. Higai, N. Kurita,
 "Replica exchange MD and *ab initio* fragment MO calculations on effects of
 solvating water molecules on stable conformations of amyloid- β dimer",
3rd International Conference on Molecular Simulation (ICMS2013), 3P03, **2013**,
 November, Kobe, Japan.
- [I9] **A. Okamoto**, A. Yano, K. Nomura, S. Higai, N. Kurita,
 "Effects of solvating water molecules on stability of full-length amyloid- β (1–42) dimer:
 Replica exchange molecular dynamics and *ab initio* molecular orbital simulations",
54th Sanibel Symposium, Poster III – No.11, **2014**, February, Georgia, U.S.A.
- [I10] **A. Okamoto**, A. Yano, K. Nomura, N. Kurita,
 "Replica Exchange MD And *Ab Initio* FMO Calculations for Searching Stable
 Conformations of Amyloid-B (1–42) Dimer And (9–42) Dimer",
WATOC2014, PP412, **2014**, October, Santiago, Chile.

附録 B.3. 国内学会における発表（第一著者のみ）

- [D1] **岡本晃澄**, 村山陽平, 塚本貴志, Y. Ishikawa, 栗田典之,
 "DNA と人工バックボーンを持つ核酸から成る二重鎖の電子状態及び
 電気伝導特性の解析",
 第 23 回分子シミュレーション討論会, 135P, 2009 年 11–12 月, 愛知県.

- [D2] 岡本晃澄, 前田躍, 干場靖浩, 清水栄佑, Y. Ishikawa, 栗田典之,
"密度汎関数法による人工核酸塩基を含む DNA 2 重鎖の電気伝導特性の解析",
第 5 回分子科学討論会, 2P118, 2011 年 9 月, 北海道.
- [D3] 岡本晃澄, 野村和哉, 矢野篤志, 檜貝信一, 近藤孝志, 神波誠治, 三浦佳子,
栗田典之,
"アミロイド β タンパク質とトリアジン誘導体間の特異的結合特性の解析:
古典分子力学及びフラグメント分子軌道計算",
第 25 回分子シミュレーション討論会, 215P, 2011 年 12 月, 東京都.
- [D4] 岡本晃澄, 野村和哉, 矢野篤志, 檜貝信一, 近藤孝志, 神波誠治, 三浦佳子,
栗田典之,
"アミロイド β タンパク質とその凝集抑制剤間の特異的結合特性:
高精度分子シミュレーションを用いた解析",
神戸大学先端融合科学シンポジウム, P18, 2012 年 1-2 月, 兵庫県.
- [D5] 岡本晃澄, 野村和哉, 矢野篤志, 檜貝信一, 近藤孝志, 神波誠治, 栗田典之,
"分子シミュレーションによるアミロイド β タンパク質とその凝集抑制剤間
の特異的結合特性の解析",
第 6 回分子科学討論会, 2P086, 2012 年 9 月, 東京都.
- [D6] 岡本晃澄, 矢野篤志, 野村和哉, 檜貝信一, 栗田典之,
"レプリカ交換 MD 及び *Ab initio* フラグメント MO 計算を用いた
アミロイド β 二量体の水中での安定配座探索",
第 7 回分子科学討論会, 2P132, 2013 年 9 月, 京都府.
- [D7] 岡本晃澄, 石村大海, 矢野篤志, 野村和哉, 栗田典之,
"レプリカ交換 MD 及び *ab initio* フラグメント MO 計算を用いた
アミロイド β (1-42)二量体及び(9-42)二量体の水中での安定配座探索",
第 8 回分子科学討論会, 2P118, 広島県, 2014 年 9 月.
- [D8] 岡本晃澄, 石村大海, 矢野篤志, 野村和哉, 栗田典之,
"アミロイド β 二量体の水中での安定配座探索:レプリカ交換 MD 及び
ab initio フラグメント MO 計算",
第 37 回情報化学討論会, O09, 愛知県, 2014 年 11 月.