

令和元年6月27日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15074

研究課題名(和文) 2ミクログロブリンアミロイド線維の構造モデル構築

研究課題名(英文) The structural analysis of beta2-microglobulin amyloid fibril

研究代表者

宗 正智 (So, Masatomo)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：40746335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：透析アミロイドーシスの原因蛋白質である 2ミクログロブリンは、これまで構造が報告されているアミロイド線維に比べアミノ酸残基数も多く非常に不均一な線維であるため解析が困難であった。本研究では均質な線維試料の作製をおこない、構造解析に耐えうる良好なスペクトルを再現よく得られることを可能とし、アミロイド線維コア領域の8割以上の信号帰属を達成した。固体NMRの解析に加え、近年目まぐるしい発展を遂げているクライオ電子顕微鏡の測定もおこない、NMRと電子顕微鏡双方の利点を活用し構造モデルの構築をおこなった。さらに生体試料を用いた線維を作製し、より生体内に近いアミロイド線維構造の理解に近づきつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイド線維構造を明らかにすることは病気の発症機序を明らかにするうえで欠かせない情報である。本研究で用いる 2ミクログロブリンはすでに報告されているアミロイドペプチドに比べ構造解析が困難であった。それを試料作製技術やクライオ電子顕微鏡など最新技術を駆使して克服し、構造モデルを構築することで、アミロイド形成機構全体を明らかにする第一歩となるとともに、他のアミロイド線維構造解析に役立つ技術を提供でき、アミロイド線維形成全体の理解に役立つ。

研究成果の概要(英文)： 2 microglobulin amyloid fibrils, which is associated to dialysis related amyloidosis, has high heterogeneity compared to other fibrils whose structure has been reported, disturbing structural analysis. In this study, I prepared the homogeneous fibrils and obtained NMR spectra with sparse signals enabling the signal assignment of more than 80 % residues of the fibril core. I further combined cryo-EM analysis, which have been developing and applied to amyloid fibrils analysis, with NMR analysis and constructed model structure. In order to increase the importance of the investigation, I will prepare fibrils samples using fibrils obtained from patients and analyze the structure of fibrils under physiological conditions.

研究分野：構造生物学

キーワード：アミロイド線維 2 ミクログロブリン 固体NMR クライオ電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病などの神経変性疾患など様々な病気に関連する蛋白質凝集のアミロイド線維構造解析はその重要性から多くの報告がなされてきた。アミロイド線維は高分子複合体であることや非結晶性であることから構造解析には固体 NMR を用いることが一般的である。これまで報告されてきたアミロイド線維の NMR 構造は短いペプチドやアミロイド線維コア領域断片が作る線維の構造がほとんどであった。透析アミロイドーシスの原因蛋白質である 2 ミクログロブリン (2m) は 99 アミノ酸残基からなる天然構造をもつ蛋白質であり、その線維は他のアミロイド原性蛋白質の作る線維に比べ不均一性が高く、NMR スペクトルが煩雑になり解析が非常に困難であった。そのため、2m の線維構造解析は世界的にもその試みは見られるが、一部断片の構造解析や、全長を用いても一部分のみの信号帰属にとどまるなど未だ構造モデルの構築には至っていなかった。一方で、クライオ電子顕微鏡の発展が目覚しく、短粒子解析など、電子顕微鏡のみを用いた原子分解能の構造解析も報告がされつつあった。研究当初はクライオ電子顕微鏡によるアミロイド線維構造解析の報告はなかったが、多くの研究者が用いることは容易に予測されたことと、所属機関で使用可能なクライオ電顕が導入されたことで、本研究でもクライオ電子顕微鏡を用いることにした。

2. 研究の目的

アルツハイマー病をはじめとする様々な疾患に関連するアミロイド線維の構造を明らかにすることは治療や創薬に非常に重要であり、研究が進められてきた。透析アミロイドーシスの原因である 2 ミクログロブリン (2m) が作るアミロイド線維の構造解析は世界中で試みられるも、まだ明らかにされていない。本研究では、固体 NMR を用い、グリセロールを用いた同位体希釈ラベルなどの種々の同位体ラベル法、RESPLUS 法などのコンピューターを用いた信号帰属、分子間 NHHC 測定などの手法を用いて、NMR スペクトル解析をおこなうとともに、最新のクライオ電子顕微鏡による電子密度情報を用いた長距離情報を取り入れることで、いまだ達成されていない 2m アミロイド線維構造モデルを構築する。

3. 研究の方法

アミロイド線維は不溶性の超分子複合体であるため、X線結晶回折を用いることができないため、固体 NMR を用いるのが一般的である。しかし、均一性の低いアミロイド凝集では NMR 信号は広幅化する。また、アミノ酸残基数の多い蛋白質では信号が重なり解析が困難である。本研究では、アミロイド線維の繰り返し増幅による試料の均質化と NMR で観測できる同位体ラベルの工夫によるスペクトルの改善をおこない、解析を容易かつ正確におこなう。同位体ラベルにはグリセロールを用いたラベル、アミノ酸特異的ラベル、重水素を用いたラベル等を用いる。また、NMR だけでは制限が困難な長距離の分子トポロジーや線維内の分子配置を決定するために、クライオ電子顕微鏡の電子密度マップを用いた全体構造の情報を取り入れる。NMR が得意とする近距離の情報とクライオ電子顕微鏡による全体構造の情報を組み合わせることにより、これまで報告されてきた構造解析にはない正確で詳細なアミロイド線維全体構造モデルを構築する。

4. 研究成果

(1) アミロイド線維試料作製の条件検討

均質なアミロイド線維試料の作製のために溶液条件検討と線維増幅条件検討をおこなった。塩濃度や種類、溶媒、温度などを様々に変えてアミロイド線維試料を作製し、透過型電子顕微鏡や原子間力顕微鏡による線維形態や NMR スペクトルを比較した。その結果、スペクトルの概形を変えることなく、線幅が改善され、解析に耐えうる NMR スペクトルを再現よく取得することに成功した (図 1)。クライオ電子顕微鏡測定においても均質な線維であることが確認され、高分解能の電子密度マップを作製した。

また、温度条件や塩濃度の検討により、アミロイド線維形成機構に関する新たな知見が得られた。本研究の最終目標とは異なるが、アミロイド線維形成機構に関する重要な知見であり、論文にまとめ発表した。

(2) NMR 信号帰属

(1) で決定したサンプル作製条件を用いて、信号帰属に必要な種々のスペクトル測定をおこなった。NMR で観測可能な同位体ラベルを減らし信号の重なりを減らすために、隣り合う炭素間の信号を減らすことで信号の重なりを減らすことを目的として、1, 3-¹³C グリセロールあ

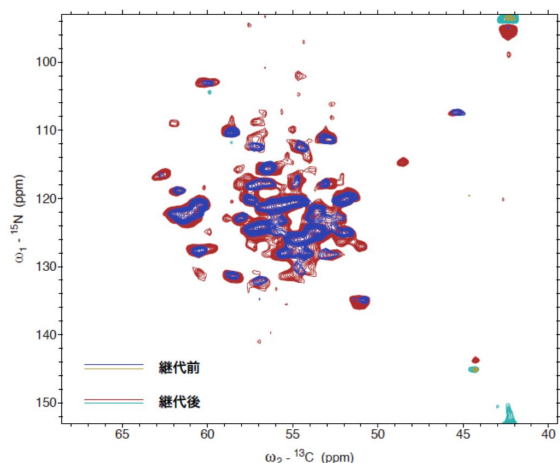


図 1. 線維形成条件検討による NMR スペクトルの先鋭化。条件検討前(赤)に比べ条件検討後(青)でスペクトルが改善された。

るいは $2\text{-}^{13}\text{C}$ グリセロールで同位体標識した 2m を大腸菌で発現・精製し、アミロイド線維のNMRスペクトル測定をおこなった。さらに、特定のアミノ酸のみをラベルするアミノ酸特異ラベル 2m や通常同位体ラベル培地に非標識のアミノ酸を混ぜることで、特定のアミノ酸を非標識にすることができるリバースラベル 2m を大腸菌で発現させ、精製した蛋白質のアミロイド線維のNMRスペクトル測定をおこなった。これらの方法により信号の先鋭化は飛躍的に向上した。その結果、アミロイド線維コア領域の8割以上の信号帰属を達成した(図2)。

(3) 正確な距離情報の取得

アミロイド線維は単一分子の繰り返し積み重ねによる複合体であり、NMRスペクトルから読み取れる距離相関情報が同一分子内のものか隣同士の分子間の情報を区別する必要がある。本研究では同位体希釈により、ラベル体蛋白質が隣同士にならないようにし、分子内の信号を取得した。また、重水素ラベルを用いた試料を作製し、分子間のみで信号が得られるような同位体ラベルを工夫して、分子間NHHC測定から情報を得た。これらの手法により多くの距離情報を正しく取得した。さらに、NMRが苦手とする線維全体構造を決めるために用いる長距離情報は、クライオ電子顕微鏡の電子密度マップを用いることで両者の利点を活かした構造計算をおこない、線維構造モデルを構築した(図3)。さらなる構造精密化と生体試料の解析を進めることにより、もおこない、NMRと電子顕微鏡双方の利点を活用し構造モデルの構築をおこなった。さらに生体試料を用いた線維を作製し、より生体内に近いアミロイド線維構造の理解に近づきつつある。

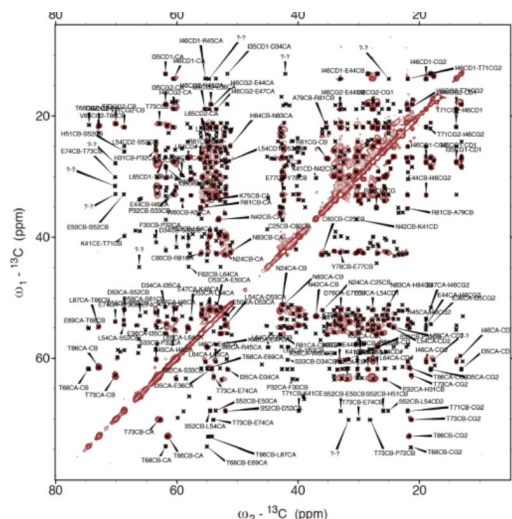


図2. NMRスペクトルの信号帰属状況。コア領域の8割以上を帰属した。

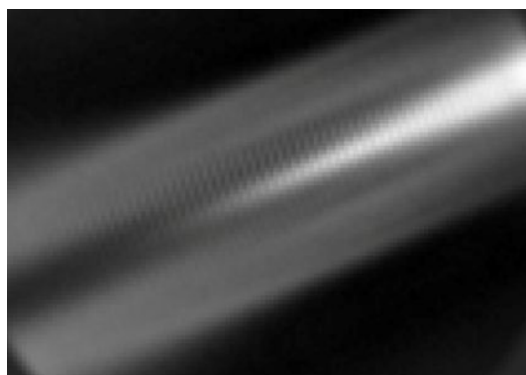


図3. アミロイド線維のクライオ電子顕微鏡像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masayuki Adachi, Masahiro Noji, Masatomo So, Kenji Sasahara, József Kardos, Hironobu Naiki, and Yuji Goto, Aggregation-phase diagrams of $\beta 2$ -microglobulin reveal temperature and salt effects on competitive formation of amyloids versus amorphous aggregates. 査読有, J. Biol. Chem., 293, 2018, 14775-14785
DOI: 10.1074/jbc.RA118.004683

〔学会発表〕(計 1 件)

(口頭発表)

Masatomo So, Amyloid fibrillation of the fragments of $\beta 2$ -microglobulin under crowding conditions.

3rd Ulm Meeting-Biophysics of Amyloid Formation, Ulm, Germany, 19-21 February, 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：松木陽
ローマ字氏名：Matsuki Yoh

研究協力者氏名：田巻初
ローマ字氏名：Tamaki Hajime

研究協力者氏名：岩崎憲治
ローマ字氏名：Iwasaki Kenji

研究協力者氏名：川本晃大
ローマ字氏名：Kawamoto Akihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。