

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月4日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15441

研究課題名(和文) アミロイド線維の伸長末端の3次元構造情報に基づく重合機構の理解および創薬展開

研究課題名(英文) Understanding of polymerization mechanism based on three-dimensional structural information of extension end of amyloid fibril toward to drug discovery

研究代表者

矢木 真穂 (Yagi, Maho)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・助教)

研究者番号：40608999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NMR、クライオ電子顕微鏡および計算化学的アプローチを組み合わせることにより、A_βのアミロイド線維末端における特異構造の動的3次元構造解析に取り組んだ。線維の均一性を高めるため、微小重力環境下におけるアミロイド線維形成反応を実施した。解析の結果、微小重力環境下においては、A_βの線維化の速度は地上に比べて遅く、形成したアミロイド線維は地上で形成したものと構造が異なることが判った。さらに、分子動力学シミュレーションとNMRから、細胞膜表面にはA_β分子が集まりやすいだけでなく、A_β分子が互いに結合しやすい構造を取っていることが、膜表面におけるA_βの凝集促進の理由であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、微小重力環境および膜環境におけるA_βのアミロイド線維形成メカニズムの一端を明らかにするものである。今後、得られた構造情報に基づいてアミロイド線維の伸長を特異的に阻害する化合物を設計する糸口を与え、アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとするアミロイド線維関連疾患の予防や治療に向けた創薬研究への可能性を切り拓くものと予想される。またアミロイド線維伸長に限らず、オリゴマー形成メカニズムに関しても理解を促すものとなる。こうしたストラテジーを構築することができれば、神経変性疾患の発症機構全般に通じるような普遍的な分子病態を解明することにつながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to obtain three-dimensional structural information of extension end of amyloid fibril toward to drug discovery, we attempted to characterize the amyloids formed under microgravity environment. Thioflavin T assay suggested amyloid fibrils formed more slowly in space than on the ground. Solid-state NMR and cryo-EM data showed the fibril structure formed under microgravity environment was different from that formed on the ground. Additionally, to understand the effects of the interface on oligomerization of A_β, we performed MD simulations and NMR experiment for an A_β 40 monomer in the presence and absence of the hydrophilic/hydrophobic interface such as ganglioside membrane. We found that the hydrophobic residues of A_β 40 bound to the interface stably and A_β 40 formed a hairpin structure at the interface more readily than in bulk water. From these results, we discussed the acceleration mechanism of the oligomer formation at the interface.

研究分野：生物物理学

キーワード：アミロイド線維 アミロイド 核磁気共鳴 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

アルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患の発症には、それぞれアミロイド (A) や シヌクレインといったタンパク質の神経組織における異常な凝集・蓄積が関与している。このようなタンパク質の凝集の本質は、本来明確な立体構造をもたないタンパク質が、アミロイド線維やオリゴマーなどの毒性を発揮する巨大構造体へと変換される過程である。したがって、こうした構造変化を通じて神経機能の破綻へと至る分子病態のメカニズムを理解するためには、疾患関連タンパク質の分子間相互作用の実体を解明する必要がある。

これまでに固体 NMR 解析から、A のアミロイド線維はクロス シート構造を形成することが明らかとなっている。また、近年、膜環境や初期の凝集核構造の違いによって、アミロイド線維構造が様々に異なることが報告されている。しかしながら、最終生成物であるアミロイド線維は創薬ターゲットにはならないため、アミロイド線維の全体構造を決定するだけでは、A の線維形成を阻害するような創薬研究へと展開することはできない。

したがって、アミロイド線維形成機構の本質を理解し創薬研究へと展開するためには、構造変化を伴う A 分子間の相互作用がまさにおこっている現場、すなわち“アミロイド線維末端”という特異点に着目し、その特異構造の動的 3次元構造を同定することにより、線維伸長を誘起する分子間相互作用の実体を明らかにすることが必要不可欠である、との着想に至った。

線維末端に見られる特異構造に選択的に結合し、シート構造への転換を阻害するような低分子化合物をデザインすることができれば、アミロイド線維の形成を特異的に抑制することが可能であると期待され、アルツハイマー病に対する創薬研究の基礎を与えることが可能となる。

2. 研究の目的

アミロイド タンパク質 (A) は、シート構造が規則正しく多数積み重なったアミロイド線維を形成して脳内に蓄積することにより、アルツハイマー病の発症を惹起すると考えられている。しかし、これまでに線維伸長を誘起するタンパク質間相互作用の実体を分子構造論の観点から捉えた研究例はない。これまでに申請者は、主に溶液 NMR 法を用いて、膜上における A の動的構造解析を実施して成果を上げている。本研究では、これまで培ってきた NMR 手法をベースに、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析および計算化学的アプローチを組み合わせることで、A のアミロイド線維末端における特異構造の動的 3次元構造解析に体系的に取り組み、アミロイド線維の伸長メカニズムを分子構造論的な観点から解明することを目的とした。さらに得られた精密構造情報に基づき、線維の伸長末端を標的とした創薬基盤の構築へと展開することを目指した。

3. 研究の方法

微小重力環境下で調製したアミロイド線維に関して、固体 NMR 法および電子顕微鏡を用いて構造解析を行った。また、分子動力学シミュレーションと NMR 実験を用いて、細胞膜表面で A ペプチドが凝集しやすいメカニズムについての解明を試みた。

4. 研究成果

NMR 解析および電子顕微鏡解析を行う上で必要となる構造的均一性の高いアミロイド線維断片を調製した。チオフラビン T 蛍光を指標としたアミロイド線維形成に関する速度論解析に基づき、構造的に均一なアミロイド線維を調製するための条件検討を行った。また、線維の均一性を高めるため、地上で調製したアミロイド 試料を実際に宇宙に打ち上げ、国際宇宙ステーション「きぼう」にて、微小重力環境下におけるアミロイド線維形成反応を実施した。得られたアミロイド線維の速度論解析を行った結果、微小重力環境下においては、A の線維化の速度は地上に比べて遅いことが判った。また、固体 NMR 解析およびクライオ電子顕微鏡解析の結果、微小重力環境下において形成したアミロイド線維は、地上で形成したものと構造が異なることが判った。

一方、A の凝集は膜表面の親水性・疎水性界面で誘起されることを実験的に明らかにしてきたが、なぜ細胞膜表面で A ペプチドが凝集しやすいのか、その理由は未解明のままであった。そこで、分子動力学シミュレーションと NMR 実験を用いてこの問題に取り組んだ。その結果、A は親水性アミノ酸残基と疎水性アミノ酸残基の両方を持っているため、細胞膜表面のような親水性・疎水性界面に存在する方が安定であることが判明した。さらに A は親水性・疎水性界面においては、主に疎水性アミノ酸残基から構成される 1 領域と 2 領域の間で ヘアピン構造を多くとっていることが明らかとなった。このようなヘアピン構造は A の分子内水素結合により形成されるが、A 分子間においても水素結合を形成しやすく、A 分子同士の分子間相互作用を誘起すると考えられる。以上より、細胞膜表面には A ペプチドが集まりやすいだけでなく、A 分子が互いに結合しやすい構造を

取っていることが、細胞膜表面における A β ペプチドの凝集促進の理由であることが解明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Maho Yagi-Utsumi, NMR characterization of conformational dynamics and molecular assemblies of proteins, *Biol. Pharm. Bull.* 2019, 42, 867-872, 査読有
<https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00115>

Satoru G. Itoh, Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Hisashi Okumura, Effects of a Hydrophilic/Hydrophobic Interface on Amyloid- β Peptides Studied by Molecular Dynamics Simulations and NMR Experiments, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2018, 123, 160-169. 査読有,
DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b11609.

Maho Yagi-Utsumi, Takumi Yamaguchi, Yoshinori Uekusa, Koichi Kato, NMR characterization of the conformations, dynamics, and interactions of glycosphingolipids, *NMR in Glycoscience and Glycotechnology*, 2017, pp.161-178, 査読有,
<https://doi.org/10.1039/9781782623946-00161>

〔学会発表〕(計8件)

矢木真穂, 西村勝之, 加藤晃一, 固体 NMR 法による GM1 ガングリオシド膜上におけるアミロイド β の構造解析, 日本薬学会第 139 年会, 2019

矢木真穂, 神経変性疾患の解明を目指した構造生物学研究, サントリー生命科学財団セミナー, 2019

M. Yagi-Utsumi, NMR structural analyses of molecular assembly of amyloid- β , The 2nd IMS-NANOTEC Joint Research Meeting, 2018

矢木真穂, 加藤晃一, 西村勝之, 固体 NMR 法を用いたガングリオシド膜上におけるアミロイド β の構造解析, 第 57 回 NMR 討論会, 2018.

M. Yagi-Utsumi, K. Kato, NMR analyses of conformational dynamics and molecular assemblies of amyloid- β , 2018 Japan&Korea Joint Seminars on Biomolecular Sciences, 2018

M. Yagi-Utsumi, K. Kato, NMR characterization of conformational dynamics and molecular assemblies of proteins, ExCELLS Young Scientists Forum 2018, 2018

矢木真穂, NMR 分光法を基軸としたタンパク質の構造ダイナミクスと分子集合, 日本薬学会第 138 年会, 2018

矢木真穂, 糖脂質膜上におけるタンパク質のアミロイド線維形成, 第 2 回 秩序化分子ワークショップ, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

https://groups.ims.ac.jp/organization/kkato_g/rombun/index.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：西村 勝之
ローマ字氏名：(NISHIMURA, katsuyuki)

研究協力者氏名：村田 和義
ローマ字氏名：(MURATA, kazuyoshi)

研究協力者氏名：奥村 久士
ローマ字氏名：(OKUMURA, hisashi)

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。