

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580119
 研究課題名（和文） アミロイド形成抑制の分子論的基盤：オボアルブミン重合体における分子間構造の役割
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms for prevention of amyloidogenesis: Role of intermolecular β structure in ovalbumin polymer
 研究代表者
 高橋 延行 (TAKAHASHI NOBUYUKI)
 京都大学・農学研究科・助教
 研究者番号：20252520

研究成果の概要：アミロイド（ベータ）タンパク質の重合沈着によるアルツハイマー病発症を抑制する方法を探索するために、卵白タンパク質、オボアルブミンの重合機構の解明を試みた。オボアルブミンがアミロイド線維を形成することを確認し、分子内に重合核となり得る内在配列を見出した。更に、オボアルブミンと類縁のセリンプロテアーゼインヒビターとの連関から、上記重合核以外の内在配列ペプチドによる重合体形成抑制の可能性を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

研究分野：応用構造生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：蛋白質、痴呆、脳・神経、食品、生体分子、オボアルブミン、アミロイド、コンフォメーション変化

1. 研究開始当初の背景

プリオン病（狂牛病、クロイツフェルト・ヤコブ病）や、アルツハイマー病は、生体の持つ正常タンパク質がコンフォメーション変化を起こして病態を呈することから、コンフォメーション病と呼ばれている。これらに共通する特徴としては、特定のタンパク質が

コンフォメーション変化を起こし、別の分子とシート構造を形成して重合することにより凝集体を形成して組織への沈着を起こすことがあげられる。これらの病態を治療、予防するには、このコンフォメーション変化の原因を明らかにすることが重要であるが、実際の病理変化は長期間にわたるものであ

り観察が難しいため、タンパク質科学的なアプローチが必要とされている。

血液中で、血栓溶解や、血液凝固の調節を担っているセリンプロテアーゼインヒビター類がそのインヒビター活性を発現するとき、プロテアーゼにより切断部位が切断されると、その近傍のループが分子中央のシートAの中央(ストランド5Aとストランド3Aの間)に割り込む”ループ挿入”というコンフォメーション変化が起こることが知られている。分子異常をきたしたセリンプロテアーゼインヒビターでは、切断部位近傍のループが、他の分子のシートAに挿入し、新たなストランドとして、安定な二量体を形成し、これが重合体形成の引き金となり、組織沈着などを経て、重篤な病態に至るとされている。家族性若年型痴呆症(FENIB)の原因タンパク質ニューロセルピンもこのインヒビターの一群に属しており、同様の機構による重合体の沈着が、神経細胞の損傷に関わることが示唆されている。

2. 研究の目的

この分子間構造形成(ループ挿入)の制御を目指し、セリンプロテアーゼインヒビターとアミノ酸配列の類似性が高く、同一スーパーファミリーに分類される卵白タンパク質、オボアルブミンをモデルとして、分子重合の機構に迫ることができると考えた。オボアルブミンについては、熱変性過程で、アミロイド様の線状凝集体を生じることが報告されており、この凝集体の形成過程におけるコンフォメーション変化を調べることで、アミロイド形成抑制の分子論的基盤を確立できるものと考えた。

一般的に、通常可溶性の球状タンパク質が重合凝集する過程では、タンパク質分子の立体構造が部分的に壊れた状態で、分子内部に

埋もれていた疎水性領域が分子表面に現れ、この部分を他の分子と共有することにより安定化する機構が考えられる。アルツハイマー病で見られるアミロイド線維など、神経組織を損傷する分子重合体は、ほとんどが規則的な構造体を形成しており、重合に関わるアミノ酸配列は、特定の部分に限定されている可能性が高い。

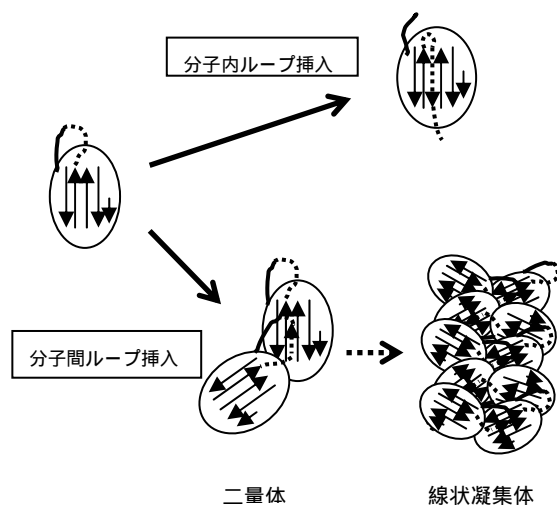
この性質を利用して、Serrano L.ら(欧州分子生物学研究所・EMBL)は、タンパク質の一次構造から、各アミノ酸残基の重合体形成確率を予測するプログラム(TANGO)を開発し、インターネット上で公開した。本研究では、このプログラムにより、オボアルブミンの重合核形成部分を予測し、これに対応するペプチド断片の挙動を調べることで、オボアルブミンの重合体形成機構に迫ることを目的とした。

さらに、先に述べたタンパク質分子の立体構造が部分的に壊れた状態が、重合体形成の中間状態として重要であるという考えについて、オボアルブミンの各種分子種について、変性状態から構造を回復させる実験を行い、オボアルブミンの構造形成経路の詳細を解明し、重合体形成の中間状態を捉え、これを阻止する方策に関する知見を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

セリンプロテアーゼインヒビターがそのインヒビター活性を発現するとき、プロテアーゼにより切断部位が切断されると、その近傍のループが分子中央のシートAの中央(ストランド5Aとストランド3Aの間)に割り込む”ループ挿入”というコンフォメーション変化が起こることが知られている(分子内ループ挿入)。分子異常をきたしたセリンプロテアーゼインヒビターでは、切断

部位近傍のループが、他の分子のシート A に挿入し、新たな ストランドとして、安定な二量体を形成し、これが重合体形成の引き金となり、組織沈着などを経て、重篤な病態に至るとされている。本研究では、この分子間 構造形成 (分子間ループ挿入) の制御を目指し、セリンプロテアーゼインヒビターのスーパーファミリーに属する卵白タンパク質、オボアルブミンをモデルとして、分子重合の機構を明らかにしたいと考えた。オボア



ルブミンについては、熱変性過程で、アミロイド様の線状凝集体を生じることが報告されており、この凝集体の形成過程におけるコンフォメーション変化を調べることにより、アミロイド形成抑制を実現することを目的とした。以上の目的のために、(1)定速昇温過程におけるコンフォメーション変化の解析、(2)加熱に伴うオボアルブミン重合体形成における内在性ペプチドの添加効果の検討、(3)オボアルブミン変性状態からの構造回復実験による、重合体形成中間状態の解析を行った。

4. 研究成果

(1)定速昇温過程におけるコンフォメーション変化の解析 オボアルブミン及び組換え体、変異体オボアルブミンについて、一定速

度で、昇温させ、この過程での CD スペクトルの変化を解析したところ、分子種によって変曲点が異なり、各分子種の熱変性温度に対応することが示唆されたが、温度に対してヘリックス含量を反映する 222nm でのシグナルをプロットすると、変曲点の前後で、挙動が異なることが明らかとなり、変曲点より高い温度では、重合体の形成による分子間相互作用等の増加により、変曲点より低い温度でのコンフォメーション変化と同一に比較できないことがわかった。DSC による分析では、定速昇温過程における吸熱ピークの前後で、著しい挙動の違いは見られず、単量体分子のコンフォメーション変化に応じて熱吸収挙動を反映していると考えられた。変異体を含む各オボアルブミン分子種の CD スペクトルと DSC 解析の結果を比較検討したところ、各変異体の単量体分子の熱変性挙動と、重合による CD シグナルの変化は、ほぼ同期しており、各分子種の重合は、概ね同一の機構によることが示唆された。

(2)加熱に伴うオボアルブミン重合体形成における内在性ペプチドの添加効果 EMBL で開発された、重合体形成能予測プログラム、TANGO を用いて、オボアルブミンの内在配列中、アミロイド形成の核となり得る領域を推定したところ、3 種のペプチド断片(I-, L-, M-ペプチド: アミノ酸残基番号 32-37、38-43、172-181 に相当)が候補に上がった。これらを化学合成し、単独、もしくはオボアルブミンと混在させて加熱し、重合体の形成と、構造の形成を調べたところ、これら単独では、重合体形成能を見出せなかったが、オボアルブミンの 構造形成、および、線状重合体形成に及ぼす影響は、それぞれ異なっていることがわかった。 I-, L-ペプチドは、オボアルブミンの分子内部に位置するヘリックス B に対応しており、化学合成したペプチドの溶

解性が低く、I-ペプチドについては、実際上水溶液中での操作が行えなかった。L-、M-ペプチド、および、いくつかのコントロールペ

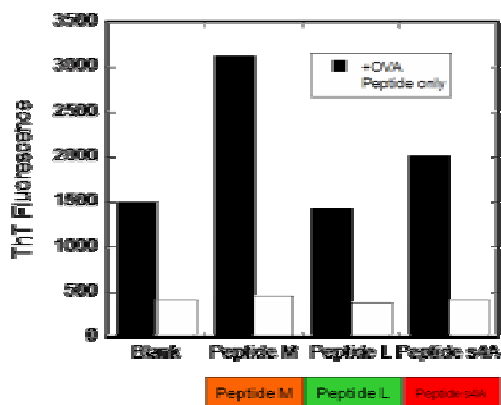


図2 内在性ペプチドのオボアルブミン重合体形成に対する添加効果

プチド(いずれも、オボアルブミン内在配列

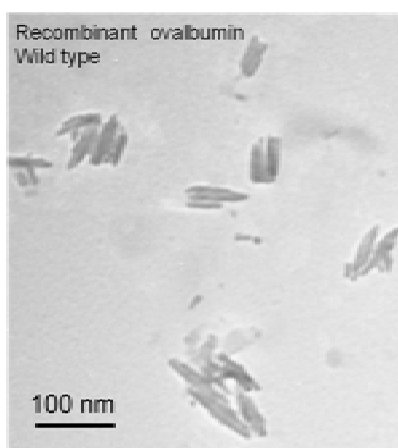
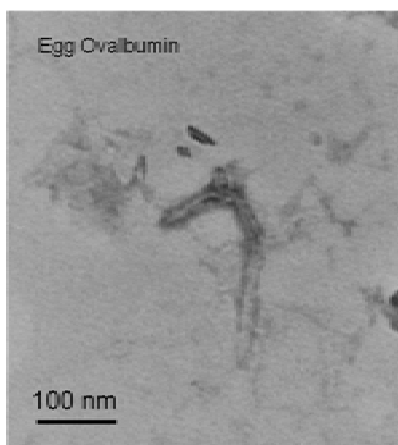


図3. オボアルブミンの加熱による線状凝集体形成(上: 卵白オボアルブミン、下: 組み換え型オボアルブミン野生型)

に対応)について、加熱実験をおこなったが、これらのペプチドについては、加熱による重合体形成は観察されなかった。そこで、オボアルブミンの加熱重合体形成過程にこれらのペプチドを混在させ、添加効果を調べたところ、コントロールペプチドとL-ペプチドは、オボアルブミンの重合体形成に影響を与えなかったが、M-ペプチドは、オボアルブミンの重合体形成をさらに促進する傾向が観察された。TANGO プログラムにより、重合体形成能が高いと推測された配列について、相当するペプチドは、オボアルブミンの重合核に結合することにより、さらなる重合体形成を抑制する効果があるのではないかと予想していたが、M-ペプチドについては、むしろ、重合体形成を促進する結果が得られた。このことから、M-ペプチドの配列は、重合核となる性質が強く、構造が壊れた状態では、2分子以上の分子間で、結合を促進している可能性が考えられた。この分子について、規則的な構造を取り得るか、現在のところ、明らかではないので、今後の検討課題としたい。また、本実験でコントロールとして用いたペプチド s4A 上のバリン残基をアラニンに置換した変異体を作成したところ、予想外に重合体形成が促進され、この領域も重合核としての可能性を秘めていることが明らかとなった。

(3) オボアルブミン変性状態からの構造回復実験による、重合体形成中間状態の解析

オボアルブミンも他のセリンプロテアーゼインヒビター同様に、エラスターゼ等のプロテアーゼにより、偽基質部位が切断されるが、それらインヒビター類のような構造変化、ループ挿入を起こさないため、セリンプロテアーゼインヒビターとしての活性を示さないと考えられている。我々は、すでにこのルー

ブ挿入のヒンジとなる領域に部位特異的アミノ酸置換を導入した変異体が、セリンプロテアーゼインヒビター類と同様、ループ挿入

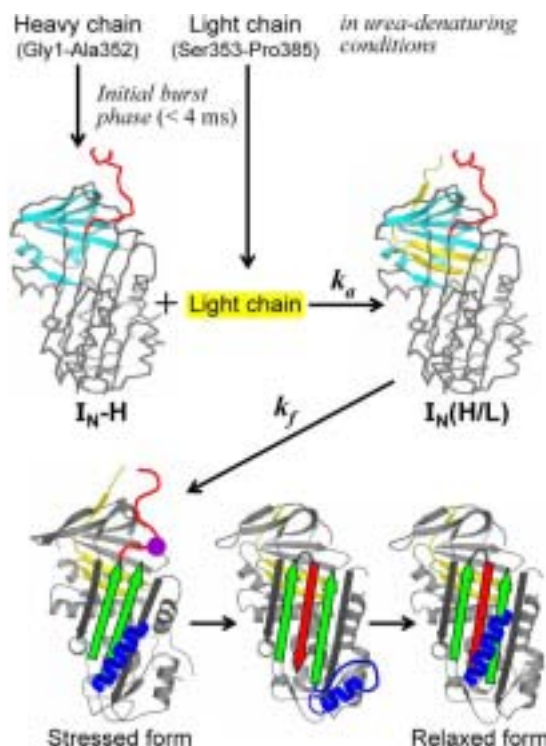


図4. オボアルブミン変性状態からの構造回復実験

を示すことを発見した。この分子について、変性剤尿素により、立体構造を壊し、尿素を希釈することにより、構造の回復を促したところ、2本のポリペプチドが分子として別々になっているにも拘らず、相互作用を回復し、元のオボアルブミン同様の高次構造を有するようになった。このことから、オボアルブミンの部分的変性状態は、未変性状態に非常に近いもので、内在性ペプチドの実験で見出されたM-ペプチドのような領域が、わずかに露出することが、重合の引き金となっていることが示唆された。なお、本研究について、平成20年7月にベルギーで開催された第5回国際セルピンシンポジウムにおいて発表を行ったが、発表内容について基調講演に取り上げられ、オボアルブミンの重合とセリンプロテアーゼインヒビターの重合機構を関連付けた成果について、高く評価された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

恩田真紀・中谷和代・竹原清日・西山美香・高橋延行・廣瀬正明、Cleaved serpin refolds into the relaxed state via a stressed conformer、*Journal of Biological Chemistry*、283巻、17568-17578頁、2008年、査読有

[学会発表](計 3件)

高橋延行、オボアルブミンのアミロイド繊維形成：内在性ペプチドの添加効果、日本農芸化学会2009年度大会、平成21年3月29日、マリンメッセ福岡(福岡)
高橋延行、Amyloidogenicity of ovalbumin and its conceivable core region of aggregation、The 5th International Symposium on Serpin Biology, Structure and Function、平成20年7月13日、Faculty Club(ルーベン・ベルギー)

高橋延行、セルピンのコンフォメーション変化と阻害機構、日本農芸化学会菰田セミナー酵素化学ミニシンポジウム、平成19年9月10日、京大会館(京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 延行 (TAKAHASHI NOBUYUKI)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：20252520

(2)研究分担者

(3)連携研究者