

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07041

研究課題名(和文) タンパク質分子を取り巻く環境を考慮した構造解析によるアミロイド形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of amyloid formation by structural analyses considering the environments surrounding protein molecules

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：微小重力環境下で形成したアミロイド線維の精密構造解析を行い、アミロイド線維形成に対する溶液内マイクロ環境の揺らぎの影響を明らかにすることができた。一方、アミロイドの分子会合に対する溶液-膜界面での空間限定の効果をもたらすため、固体NMR解析および分子動力学計算を実施し、ガングリオシドを含む脂質膜界面に補足されたアミロイドの分子集合体の構造を決定するとともに、分子集合の鍵となるアミノ酸残基を特定することに成功した。さらに、高速原子間力顕微鏡を用いて、アミロイド線維の伸長の様子や、抗アミロイド抗体がアミロイド線維の伸長末端に特異的に結合して線維伸長を阻害する様子を可視化することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質のアミロイド形成は神経変性疾患等の発症と関わっており、その分子機構を明らかにすることは薬学領域において重要な課題である。タンパク質の分子間相互作用から線維形成に至るプロセスには、タンパク質を取り巻く様々な環境因子が複雑に関わっている。したがって、対流等による溶液内マイクロ環境の揺らぎ、溶液-膜界面での空間限定の効果等の寄与を考慮した構造解析を実施することではじめて、アミロイド形成機構の真の理解が可能となる。さらに、得られた研究成果に基づき、環境因子の影響を考慮したアミロイド標的創薬への新たな展開などが期待される。

研究成果の概要(英文)：The effects of fluctuations in the solution microenvironment on the amyloid fibril formation were elucidated by detailed structural analysis of amyloid fibrils formed under microgravity conditions. On the other hand, to clarify the effect of spatial limitation at the solution-membrane interface on the molecular assembly of amyloid, solid-state NMR analysis and molecular dynamics simulation were performed to determine the structure of the molecular assembly of amyloid promoted on the ganglioside-containing membrane interface, and to identify the key amino acid residues that induce the molecular assembly. Furthermore, using high-speed atomic force microscopy, I was able to visualize the elongation of amyloid fibrils and how anti-amyloid antibodies specifically bind to the elongation ends of amyloid fibrils and inhibit their elongation.

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 微小重力環境 低温大気圧プラズマ ガングリオシド 核磁気共鳴 クライオ電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のアミロイド形成は神経変性疾患をはじめとする疾患の発症と密接に関わっている。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β(Aβ)やαシヌクレイン(αSN)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機構を明らかにすることは薬学領域においても重要な課題である。すでにアミロイド形成を対象とする構造研究は数多く報告されているが、これまでの実験・理論研究の多くは均一水溶液系における理想的な環境において行われたものである。しかしながら、実際にアミロイドが生じる場合は、細胞の表層などの不均一な夾雑環境である。近年、溶液環境の違いによって形成されるアミロイド線維の構造が様々に異なることが報告されつつあるが、こうした外部環境の多様性がアミロイド線維形成に至るプロセスに及ぼす影響に関しては明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、タンパク質分子を取り巻く環境を考慮した構造解析を通じてアミロイド形成のプロセスを解明することを目的とするものである。実験と理論のアプローチを駆使して、タンパク質を取り巻く環境因子がアミロイド形成プロセスに与える影響を詳細に検討して分子会合機構の実態解明に迫り、「タンパク質のアミロイド形成機構の真の理解」をもたらすことを目指した。具体的には、アルツハイマー病の発症に関わるAβをモデル分子として、対流等による溶液内ミクロ環境の揺らぎ、溶液-膜界面での空間限定の効果、生体内における共存分子や膜成分との特異的・非特異的相互作用を考慮した構造解析を行い、これらの環境因子がアミロイド形成に与える影響を詳細に検討して分子会合機構の実態解明に迫るものである。

3. 研究の方法

(1) 対流等による溶液内ミクロ環境の揺らぎ

地上においては、重力の影響による対流や沈降等の溶液内のミクロ環境が常に揺らいでいるのに対し、宇宙の微小重力空間ではそれらの影響を受けない、いわば限りなく理想系に近い均一溶液環境での実験が可能である。私たちはすでに、宇宙航空研究開発機構との共同研究により、国際宇宙ステーション「きぼう」の微小重力環境下において形成したAβ線維を手に入れている。本研究では、このような理想環境下において形成したアミロイド線維の精密な構造解析に取り組む。アミロイド線維の精密構造解析には、固体NMRとクライオ電子顕微鏡を利用する。

(2) 溶液-膜界面での空間限定の効果

私たちはこれまでに、Aβは膜が存在すると膜の親水性-疎水性界面に局在することを示してきた。Aβ分子は水溶液中においては3次元に自由に運動するが、膜界面における分子運動は2次元空間に限定される。同時に、Aβが膜表面に結合して濃縮された状態になるため、Aβ同士の分子間相互作用が促されると考えられる。このような分子運動と分子間相互作用の連関の仕組みを精密に探査するために、溶液および固体NMR法を用いて、膜界面に捕捉されたAβの動的コンフォメーション変化を捉えるとともに、分子動力学シミュレーションを用いて動的な立体構造変化におけるエナジेटクスを定量化する。さらに、高速原子間力顕微鏡を用いて、膜界面上におけるAβのアミロイド線維形成の様子をリアルタイムで捉えるとともに、空間限定の効果はAβの分子重合に与える影響を速度論的および構造論的な観点から明らかにする。

4. 研究成果

(1) 対流等による溶液内ミクロ環境の揺らぎ

宇宙空間では重力の影響による対流や沈降の影響を排除できることに着目し、国際宇宙ステーション「きぼう」を利用した微小重力下におけるアミロイド線維形成と、地上におけるアミロイド線維形成の比較を行った。その結果、アミロイドβの線維形成速度は、地上に比べて微小重力環境の方が有意に遅いことが判明した。また、微小重力下で形成した線維の構造多型の分布は、地上で形成されたものとは異なっており、地上ではみとめられなかった特徴を有するプロトフィブリル間相互作用が生じていることも明らかとなった。クライオ電子顕微鏡法を用いてアミロイド線維の形態を詳しく調べた結果、微小重力下で形成したアミロイド線維は大きく分けて2つの構造をとっていることが判明した。そのうち1つは地上で形成したアミロイド線維に形態が類似していたが、もう1つは地上ではみとめられない特徴的な構造であることが明らかとなった。これらの結果から、微小重力環境においては、アミロイド線維は対流や沈殿の影響を受けずにゆっくりと伸長して地上とは異なる構造になることが示唆された。さらに、微小重力環境を利用することで、Tottori変異型アミロイドβ(D7N)の線維に関して、特徴的な線維構造を示唆する高分解能な電顕像を取得し、構造の精密化を進めることができた。

一方、環境摂動要因の1つとして低温大気圧プラズマを照射した際のアミロイドβの構造変化およびアミロイド線維形成への影響を調べたところ、35位のメチオニン残基が特異的に酸化され、アミロイドβのアミロイド線維形成の阻害を引き起こすことが明らかとなった。プラズマ照射によって生成した過酸化水素が線維形成阻害を担っていることが示唆された。

(2) 溶液-膜界面での空間限定の効果

アミロイドβの分子会合に対する溶液-膜界面での空間限定の効果を明らかにするため、固体NMR解析および分子動力学計算を実施し、ガングリオシド膜界面に補足されたアミロイドβの分子集合体の構造を決定するとともに、分子集合の鍵となるアミノ酸残基を特定することにも成功した。さらに、高速原子間力顕微鏡を用いて、アミロイド線維の伸長の様子や、抗アミロイドβ抗体がアミロイド線維の伸長末端に特異的に結合して線維伸長を阻害する様子を可視化することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kato Koichi, Yamaguchi Takumi, Yagi-Utsumi Maho	4. 巻 39
2. 論文標題 Experimental and computational characterization of dynamic biomolecular interaction systems involving glycolipid glycans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 219 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-022-10056-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yagi-Utsumi Maho, Aoki Kazuhiro, Watanabe Hiroki, Song Chihong, Nishimura Seiji, Satoh Tadashi, Yanaka Saeko, Ganser Christian, Tanaka Sae, Schnapka Vincent, Goh Ean Wai, Furutani Yuji, Murata Kazuyoshi, Uchihashi Takayuki, Arakawa Kazuharu, Kato Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Desiccation-induced fibrous condensation of CAHS protein from an anhydrobiotic tardigrade	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00724-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yagi-Utsumi Maho, Tanaka Tomohiro, Otsubo Yoko, Yamashita Akira, Yoshimura Shinji, Nishida Motohiro, Kato Koichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Cold Atmospheric Plasma Modification of Amyloid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22063116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yagi-Utsumi Maho, Yanaka Saeko, Song Chihong, Satoh Tadashi, Yamazaki Chiaki, Kasahara Haruo, Shimazu Toru, Murata Kazuyoshi, Kato Koichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Characterization of amyloid fibril formation under microgravity conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41526-020-0107-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 矢木真穂、加藤晃一	4. 巻 46
2. 論文標題 膜環境におけるアミロイド の分子集合に関する構造的知見	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 2-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yagi-Utsumi Maho, Yanaka Saeko, Song Chihong, Satoh Tadashi, Yamazaki Chiaki, Kasahara Haruo, Shimazu Toru, Murata Kazuyoshi, Kato Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of amyloid fibril formation under microgravity conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.03.23.004341	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yagi-Utsumi Maho	4. 巻 42
2. 論文標題 NMR Characterization of Conformational Dynamics and Molecular Assemblies of Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 867 ~ 872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 矢木真穂、加藤晃一
2. 発表標題 溶液内マイクロ環境の揺らぎを考慮したアミロイド の構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢木-内海 真穂、青木 一洋、渡辺 大輝、Chihong Song、西村 誠司、佐藤 匡史、谷中 冴子、Christian Ganser、田中 冴、Vincent Schnapka、Ean Wai Goh、古谷 祐詞、村田 和義、内橋 貴之、荒川 和晴、加藤 晃一
2. 発表標題 ヨコツナクマムシ由来CAHS1タンパク質の乾燥ストレスに伴う自己集合
3. 学会等名 第6回クマムシ学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maho Yagi-Utsumi
2. 発表標題 Molecular assembly of amyloid- in membrane environments
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maho Yagi-Utsumi
2. 発表標題 Cold atmospheric plasma modification of amyloid
3. 学会等名 The 30th International Toki Conference on Plasma and Fusion Research（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢木真穂
2. 発表標題 ガングリオシド膜上におけるアミロイド の構造転移
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢木真穂
2. 発表標題 宇宙実験からアルツハイマー病の解明を目指す!
3. 学会等名 第30回自然科学研究機構シンポジウム「宇宙科学と生命科学の深～いつながり」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Maho Yagi-Utsumi
2. 発表標題 Biophysical characterization of environment-dependent biomolecular assemblies
3. 学会等名 ExCELLS visit talks (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maho Yagi-Utsumi, Satoru G. Itoh, Hisashi Okumura, Katsuyuki Nishimura and Koichi Kato
2. 発表標題 NMR characterization of conformational transition of amyloid- on ganglioside membrane
3. 学会等名 Frontier Bioorganization Forum 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maho Yagi-Utsumi and Koichi Kato
2. 発表標題 NMR Study of Conformational Transition of Amyloid- on Ganglioside Membrane
3. 学会等名 The 10th Toyota RIKEN International Worksyp on Science of Life Phenomena Woven by Water and Biomolecules (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maho Yagi-Utsumi and Koichi Kato
2. 発表標題 Biophysical characterization of environment-dependent protein assemblies of physiological and pathological interest
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢木真穂
2. 発表標題 アルツハイマー病の解明を目指したNMR構造研究
3. 学会等名 東京大学社会連携講座 革新分子構造解析講座：公開シンポジウム -低分子からタンパク質まで，統合分子構造解析- (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maho Yagi-Utsumi
2. 発表標題 NMR characterization of the conformations and interactions of amyloid- on glycolipid membrane
3. 学会等名 7th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences (iPOPS 2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------