

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570149

研究課題名（和文） 被修飾タウ分子の病理的視点からの分子構造論：繊維性凝集と環境相互作用を中心に

研究課題名（英文） Molecular analysis of chemically modified tau from pathological view points: fibrous aggregation and environmental interactions

研究代表者

今野 卓 (KONNO TAKASHI)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：50225637

研究成果の概要（和文）：タウ分子のアミロイド型凝集におけるリン酸化効果を分子レベルで明らかにするため、タウ由来部分ペプチドとリン酸化を含む種々の修飾体の凝集特性と凝集体構造を詳細に研究した。そのために用いる様々な手法（正確な凝集臨界濃度決定法や、X線回折法と計算機シミュレーションの併用）を確立した。その結果として、リン酸基上の電荷やペプチド上での位置、凝集体内での特定の分子内・分子間の相互作用の重要性が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate molecular mechanisms of phosphorylation effects on tau amyloidogenesis, their aggregation properties and amyloid structures were analyzed in detail. A variety of methods used for the analysis such as a precise determination method of critical concentration of amyloidogenesis and a combination of X-ray fiber diffraction and computer simulation methods were established here. The analysis found critical roles of charges on phosphate residues, position of phosphate on the peptides, and specific intra- and inter-molecular interaction within the aggregate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質・核酸の構造・動態・機能

1. 研究開始当初の背景

(1) タウ蛋白分子は、分子量約5万、高等動物の神経軸索内にある微小管結合タンパク質である。細胞骨格形成や細胞内輸送に関与し、とりわけ、アルツハイマー病との関連で注目されている。アルツハイマー病患者の脳細胞内では、微小管から解離したタウ蛋白が会合してPaired helical filament (PHF) と呼ばれる繊維性凝集体を形成し、その沈着が脳細胞死の原因の1つとなる。この PHF は、

近年研究の進むアミロイド凝集に分類されるものである。アルツハイマー病の診断・治療のため、PHF 形成の分子メカニズムの早急かつ詳細な解明が望まれている。

この問題について過去の研究が明らかにした重要なポイントは、本来凝集性に乏しいタウ蛋白分子が生体内でPHFを形成する際には、①生体環境にある分子群（有機イオン・脂質など）との相互作用（Goedertら、Nature、1996 など）、②リン酸化などのタウ蛋白の生

化学修飾 (Lee ら、Science、1991 など)、の両者が重大な関与をする点である。

2. 研究の目的

(1) 材料分子の人工合成、原子構造レベルでの分子科学実験、理論解釈のための分子シミュレーションの3分野の協力によって、具体的には、次の4項目を明らかにすることを目指した。原子・分子のレベルで、物理化学の言葉で、満足行く説明を与えることに力を置いた。(a) 全長タウ分子の各部位が、PHF凝集において、それぞれどのような役割を果たすか、(b) タウ分子の各部位の様々な生化学修飾が、どのようにPHF凝集に影響を与えるか、(c) PHF凝集を制御する環境分子が、タウ分子のどの部位と相互作用するのか、(d) タウ分子上の各部位の生化学修飾が、環境分子との相互作用をどう変化させるか

(2) しかし、本研究は、単にアミロイド型凝集のメカニズムを探る分子科学研究ではない。我々が注目するのは、生体内での分子修飾や環境分子との相互作用が、どのように干渉しあい協調しあって凝集を制御するかであり、この立場に立って、生理・病理的な視点と分子・物理化学的な視点を密接に絡ませつつ研究を導いてゆくことにあった。

(3) また、目標達成により、アルツハイマー病の病態の主要部分が、詳しい原子・分子レベルで明らかになるので、実際の診断・治療にも役立つことも期待した。(例えば、タウ凝集体を検出する分子プローブや特異的な凝集阻害剤の開発につながるなど)。さらに、アミロイド様の凝集に関わる他のケース、例えばパーキンソン病における α シヌクレイン凝集などでも、本件と酷似した生化学修飾や環境相互作用の関与が知られており、本研究の成果は、これらの類縁疾患の解明にも寄与できると考えた。

3. 研究の方法

(1) 被修飾タウ分子のデザイン・作成：タウ分子の中間に位置する「4リピートドメイン」がPHF凝集が起こるための必須部分なので、まず、ここに由来の幾つかの部分配列を利用して、野生株・リン酸化体などを *in vitro* 合成した。これらの配列を持つペプチドの幾つかは、単独でもPHFに似た凝集体を形成し、さらに複数の生化学修飾部位も含むため、様々な組み合わせの修飾分子も作成できる。他方、凝集力を持たない配列は、凝集の制御機能を有する可能性があるため、凝集性ペプチドと混ぜたり繋いだりして効果を検討した。

(2) 構造・物性の解析：凝集過程・凝集体の解析は、(a) 各分子種単独、(b) 複数のペプチド種の混合、(c) ペプチド種と全長タウ分子種の混合の3つの場合について、次の2群bの解析を個別に行った。

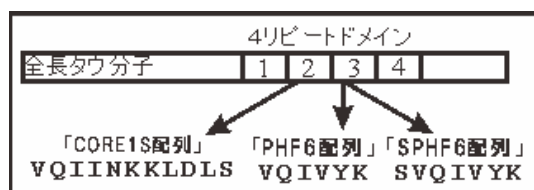
①凝集特性の解析：凝集の平衡、速度過程の双方を、定量的に解析する。よく確立されている多くの手法(蛍光・赤外分光法、光・X線散乱法、クロマト法、etc)を利用し、さらにそれらの洗練化をも試みた。

②凝集体構造の解析：ナノレベルの構造：電子顕微鏡・原子間力顕微鏡により、凝集体の形状と集合状態を観察した。分子レベルでの情報を得るためには、凝集体のX線回折を行い、さらに後述の計算機シミュレーションで構築した予測分子構造から計算された回折像とを詳細に比較検討した。

(3) 計算機シミュレーション：少なくともPHF6ペプチド(研究成果の項を参照)については、凝集体の原子座標が解かれている。本研究で行う他のペプチド種の場合のX線構造解析が成功すれば、さらに多くの原子座標が利用できる。それらの構造情報に基づき、分子動力学法などの分子シミュレーションを行い、まず、凝集構造の安定化因子をアミノ酸残基レベル、原子レベルで抽出した。その上で、リン酸化等の修飾を加えた場合のアミロイド構造の変異と安定性の変化を、理論的に予測した。これらの計算結果を実験データと比較して、実験結果の背景にある物理的因子を決定した。

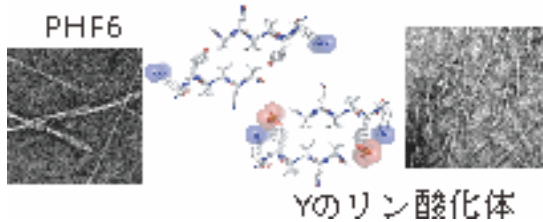
4. 研究成果

(1) 部分ペプチドを用いた研究では、タウ分子由来のPHF6、SPHF6、CORE1S(下図)などと呼ばれる配列と、それに含まれるSやY残基のリン酸化体や他の修飾体を合成した。



まず、PHF6とそのY修飾体について、その凝集特性を詳細に比較検討した。凝集体の安定性、凝集速度、凝集構造などを、臨界濃度測定、蛍光法による凝集過程解析、電子顕微鏡法によって検討した。次に、その変化の分子メカニズムがペプチド上の電荷配置に依存することを証明する為に、リン酸化以外の変異体ペプチドを作成し同様の実験を行った。また、凝集体内部でのペプチド分子間の相互作用を検討するために、異種類のペプチ

ドの混合溶液を用いて、その凝集特性を検討した。また溶液のイオン強度を変えた検討も行った。その結果、リン酸化 PHF6 の凝集は少なくとも2段階で進み、各段階での速度は周囲環境に敏感に影響されることが明らかになった。特に、凝集速度及び凝集体の安定性は、中性 pH よりも酸性 pH でより大きく、この傾向は非リン酸化 PHF6 の場合と全く逆転していた。これらの結果に、他の修飾ペプチド群の解析結果を組み合わせることで、ペプチド鎖上におけるリン酸基の荷電状態が、リン酸化効果の決定因子であることがわかった。さらに、ごく微量のリン酸化分子が非リン酸化分子と共存した場合、PHF6 の凝集が強く促進されることも明らかとなった。その成果は、論文として公表した (下図)。



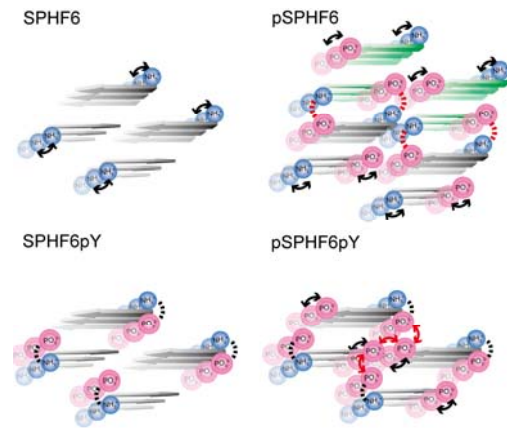
(2) 次に、リン酸化の効果、ペプチド上の位置によってどのように影響されるかを検討するため、PHF6 より拡張された配列 SPHF6 について、(1)と同様の解析を進めた (下表)。

Ac-X ₁ VQIVX ₂ K-NH ₂		
Peptide	X ₁	X ₂
PHF6	-	Y
PHF6pY	-	pY
SPHF6	S	Y
SPHF6pY	S	pY
pSPHF6	pS	Y
pSPHF6pY	pS	pY
KPHF6	K	Y
KPHF6pY	K	pY

その際、特に、凝集体の安定性評価を改善するために、新しい臨界濃度の測定手法を確立し、半定量的な蛍光法と詳細に比較した。

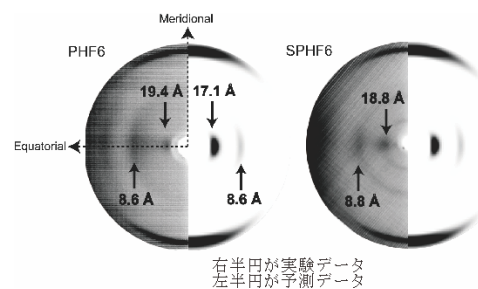
さらに以下の(3)-(4)の構造解析の成果をも合わせて総合的な解釈を進め、その結果、凝集を左右する因子として個別の分子間力がどのように寄与するかを提案することができ (下図)、それら個々の分子内・分子間相互作用のリン酸化による変化が、アミロイド構造の安定性と単位繊維の集合形態に大きな影響を与えることが明らかになった。これらの成果の詳細は論文に公表した。CORE1S 部分のペプチドとそのリン酸化体の凝集特性についても、PH

F6、SPHF6 と同様な解析を進めているところである。



(3) (1)や(2)の研究を構造面で詳細に明らかにするため、リン酸化体を含む様々な変異体ペプチドの形成する凝集体の構造を、まずナノスケールでの形態を電子顕微鏡と原子間力顕微鏡で詳細に記述した。また、凝集体上でのリン酸化部位を同定するために、リン酸プローブと電子顕微鏡観察を併用する手法も試み、部分的に実現した。

続いてより微細な規則構造をX線繊維性回折で解析した。ここでは、凝集体繊維を一定方向に配向させる様々な試みを行うことで、繊維軸方向の規則性とそれに垂直な方向のものとの分離して解析をおこなった。そのデータの解釈のためは、後述(4)の計算機シミュレーションと、分子構造からX線回折像を予測する計算手法を併用し、両者の結果を比較検討することで (下図)、アミロイドの分子構造レベルでの知見を与えることに成功した。

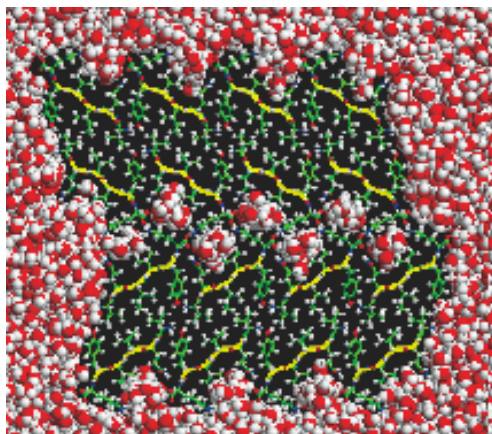


また、我々の用いたペプチド種の形成する凝集体の原子レベルでの構造を直接解明する目的でX線結晶構造解析を計画し、その第一段階として、ある典型的なペプチド種について微結晶作成を進め、部分的に成功した。

(4) 過去に報告されたアミロイドの原子レベルでの構造を骨格として、計算機シミュレーションの手法を用いて、上記(1)、(2)の場

合に用いたペプチド種の場合に予想される凝集構造を理論的に構築した(下図)。(2)における実験結果を解釈するために、コンピュータ上で作成した様々な分子モデル構造をもとにして、理論的に予測されるX線回折パターンをも計算し、それを実験結果と比較した。これによって、被修飾タウのアミロイド凝集体内部で、様々な残基やリン酸基がどのような原子間の相互作用をなし、それが凝集体の安定化や凝集過程にどのような影響を与えるかを詳しく議論することが可能となった。例えば、リン酸化が影響を与えるのは、基本繊維内部での原子間の相互作用だけでなく、基本繊維同士の界面でのそれにも寄与することが明らかとなった。この繊維間相互作用は、電子顕微鏡などで観察されたナノスケールでの形態変化を生み出していることも浮き彫りにされた。

(5) 全長タウ分子の細胞環境下での凝集特性を解析するため、蛍光タンパク質 YFP と融合



したタウの酵母発現系を構築した。これは、(1), (2)で行った部分ペプチド群での凝集解析を全長かつ細胞内環境下での解析に拡張するための準備段階の一つと位置づけられる。

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6件)

- ① Masafumi Inoue, Takashi Konno, Kazuki Tainaka, Eiji Nakata, Hiro-o Yoshida, Takashi Morii, Positional effects of phosphorylation on the stability and the morphology of tau-related amyloid fibrils, *Biochemistry*, 査読有, 51 巻, 2012, pp. 1396-1406, DOI: 10.1021/bi201451z
- ② Naoki Tanaka, Yumi Morimoto, Yurika Noguchi, Tomoko Tada, Tomonori Waku,

Shigeru Kunugi, Takashi Morii, Yin-Fai Lee, Takashi Konno, Nobuyuki Takahashi, The mechanism of fibril formation of a non-inhibitory serpin ovalbumin revealed by the identification of amyloidgenic core regions, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 286 巻, 2011, pp. 5884-5894, DOI: 10.1074/jbc.M110.1

- ③ Shigetoshi Oiki, Hirofumi Shimizu, Mayuki Iwamoto, Takashi Konno, Single Molecular Gating Dynamics for KcsA Potassium Channel, *Adv. Chem. Phys.*, 査読無, 146 巻, 2011, pp. 147-193, DOI: 10.1002/9781118131374
- ④ Masafumi Inoue, Kazuki Tainaka, Akiyoshi Hirata, Takashi Konno, Takashi Morii, The amyloid fibrillation of phosphorylated human tau core peptide, *Transaction of Mut. Res. Soc. Jpn.*, 査読有, 34 巻, 2009, pp. 517-520
- ⑤ Masafumi Inoue, Akiyoshi Hirata, Takashi Morii, Takashi Konno, A charge-pairing mechanisms of phosphorylation effect upon amyloid fibrillation of human tau core peptide, *Biochemistry*, 査読有, 47 巻, 2008, pp. 11847-11857, DOI: 10.1021/bi8010994
- ⑥ Tetsunari Kimura, Akio Maeda, Shingo Nishiguchi, Koichiro Ishimori, Isao Morishima, Takashi Konno, Yuji Goto, Satoshi Takahashi, Dehydration of mainchain amides in the final folding step of single chain monellin revealed by time-resolved infrared spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 105 巻, 2008, 13391-13396, DOI: 10.1073/pnas.0801316105

[学会発表] (計11件)

- ① 中田栄司、タウタンパク質由来の凝集性ペプチドによるアミロイド線維形成能の評価、日本化学会第92春季年会、2012年3月27日、横浜市
- ② 中川勝統、タウタンパク質凝集コアペプチドのアミロイド線維形成能の評価、日本化学会第91春季年会、2011年3月27日、横浜市
- ③ 井上雅文、タウタンパク質凝集コアペプチドのアミロイド線維形成におけるリン酸化の効果(1)、日本化学会第90春季年会、2010年3月27日、東大阪市
- ④ 開田真次、タウタンパク質凝集コア

ペプチドのアミロイド繊維形成におけるリン酸化の効果(2)、日本化学会第90春季年会、2010年3月27日、東大阪市

⑤今野 卓、アルツハイマー病関連ペプチド凝集の解析と制御、第12回生命化学研究会、2010年1月8日、芦原市

⑥今野 卓、タウ由来ペプチドの繊維性凝集におけるリン酸化の部位的効果、第47回日本生物物理学会年会、2009年10月30日、徳島市

⑦井上雅文、リン酸化位置によるタウタンパク質凝集コアペプチドのアミロイド繊維形成特性の変化、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009年9月14日、福岡市

⑧井上雅文、タウタンパク質凝集コアのリン酸化によるアミロイド繊維形成制御、日本化学会第89春季年会、2009年3月28日、舟橋市

⑨ Masafumi Inoue、The amyloid fibrillization of phosphorylated human tau core peptides、The IUMRS International Conference in Asia 2008、2008年12月10日、名古屋市

⑩今野 卓、リン酸化タウ由来ペプチドの繊維性凝集における電荷対形成効果、第46回日本生物物理学会年会、2008年12月3日、福岡市

⑪井上雅文、タウタンパク質凝集性コアペプチドのアミロイド繊維形成におけるリン酸化の効果、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008年9月19日、横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今野 卓 (KONNO TAKASHI)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：50225637

(2) 研究分担者

玉井 良則 (TAMAI YOSHINORI)
福井大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：50324140
森井 孝 (MORII TAKASHI)
京都大学・エネルギー理工学研究所・教授
研究者番号：90222348

(H20-H21)

(3) 連携研究者

該当なし