

機関番号: 13901
 研究種目: 若手研究(B)
 研究期間: 2008~2010
 課題番号: 20750008
 研究課題名(和文) プリオン病発症メカニズムの解明:プリオン蛋白質・銅イオン複合体の構造と性質
 研究課題名(英文) Roles of Metallic Ions in Prion Diseases: Structure and Properties of Copper-binding Sites in Prion Protein
 研究代表者: 山本 典史(NORIFUMI YAMAMOTO)
 名古屋大学・情報科学研究科・特任助教
 研究者番号: 30452163

研究成果の概要(和文):

プリオンタンパク質(PrP)は窒素末端領域に複数の金属イオン結合部位を持つ。オクタペプチド領域 PrP(60-91)には最大四個の銅イオンが配位する。His96 と His111 残基近傍にも銅イオンが配位することがNMRやESR分光で観測されている。プリオンタンパク質に結合した銅イオンはプリオン病機序に関与すると考えられていたが、詳細は明らかではなかった。本研究では、プリオンタンパク質・銅イオン複合体を主な対象として、金属結合部位の構造と性質について、量子化学計算を用いた解析に取り組んだ。その結果、オクタペプチド領域に結合したCu(II)イオンは高いCu(II)/Cu(I)還元電位を持ち、His96 や His111 残基近傍に結合した銅イオンは、逆に、高いCu(II)/Cu(III)酸化電位を持つことが分かった。このように、プリオンタンパク質は金属イオンの配位構造によって著しく異なる酸化還元的特性を持つことが本研究の結果から明らかとなった。

研究成果の概要(英文):

Prion protein (PrP) is a metalloprotein having several copper-binding regions in the N-terminal half domain. One is a highly conserved octapeptide repeat portion in PrP(60-91). Additional copper-binding sites are located around His96 and His111. In this study, to clarify copper's role in the pathological mechanism underlying prion diseases, we had investigated redox chemical behaviors of these copper-binding sites in PrP using the density functional theory calculations. The results indicated that the octarepeat sites had a high Cu(II)/Cu(I) reduction potential, which can exhibit SOD-like activity. The copper ion bound to the His96 and His111 sites, however, had a high Cu(II)/Cu(III) oxidation potential, which can modify the redox property to react with hydrogen peroxide to generate hydroxyl radicals via a Fenton-type pro-oxidative reaction. These distinct redox activities of PrP, individually or collectively, could be involved in the neurotoxic mechanism underlying prion diseases.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野: 計算化学

科研費の分科・細目: 基礎化学・物理化学

キーワード: 生物物理化学, 量子化学, 金属複合体, プリオン病, 酸化還元電位

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は脳神経組織の海綿状変性の特徴とする致死性の疾患群であり、感染能を持つタンパク質性因子「プリオン」を介して伝染する。プリオン病における神経変性の機序は、本来は正常型であるプリオンタンパク質が異常型へと構造転移することに伴った機能喪失・毒性化が原因と考えられている。しかし、プリオン病発症機序には不明な点が数多く、診断法・治療法は未だ確立していない。プリオンタンパク質の機能を解明すること、正常型から異常型へ構造転移することで失われる(獲得する)機能を明らかにすることは、プリオン病研究の重要課題である。

プリオンタンパク質の機能を解明する手掛かりとして、近年、その金属イオン親和性が注目されている。プリオンタンパク質は、室素末端領域にアミノ酸配列が繰り返し現れる部位(ヒトの場合、アミノ酸残基番号 60-91 の配列領域に PHGGGWGQ の四回繰り返しモチーフ)を持つ。このオクタリピート部位に含まれる His-Gly-Gly 配列は、二価の銅イオンと選択的に配位し易いことが知られている。さらに His96 と His111 残基の近傍にも銅イオンが配位することが NMR や ESR 分光で観測されている。これらのことから、プリオンタンパク質の機能発現やプリオン病の発症機構には、銅イオンの生体作用が重要な役割を担うことが予想されていた。

例えば、オクタリピートの領域 PrP(60-91)が欠損するタンパク質を過剰発現するノックアウト・マウスには、行動異常や神経細胞の脱落などが認められている。このことからオクタリピート部位 PrP(60-91)は、何らかの細胞防御の役割を担うことが推測されている。これまでのところ、正常型プリオンタンパク質の機能としては SOD 活性や GSH 濃度維持に重要な役割を担うという報告、細胞内のシグナル伝達を修飾するという報告があるが、推測の域を出ていなかった。

また、プリオンタンパク質の室素末端領域 PrP(106-126)を断片化したペプチドフラグメントは、培養神経細胞に対して、毒性作用を示すことが報告されている。このことから PrP(106-126)は、プリオン病の病態機序を解明する手掛かりとして注目されている。PrP(106-126)の His111 残基は、銅イオンを結合することから、配位した金属イオンを介した分子間架橋形成によるアミロイド性凝集、触媒作用によるラジカル種産生などに

関与する可能性などが指摘されていたが、詳細は明らかではなかった。

プリオンタンパク質の機能やプリオン病発症のメカニズムと金属イオンの生体作用について、具体的な議論に移行するための詳細な手掛かりが必要とされており、分子論的立場からの基礎的研究が求められていた。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、プリオンタンパク質・銅イオン複合体を対象として、量子化学計算を用いた解析に取り組み、金属イオン結合部位の構造と化学反応性に関わる物理化学的な性質(酸化還元電位など)を明らかにすることを目的とした。更にプリオンタンパク質・銅イオン複合体の構造と性質の関係を明らかにした上で、得られた知見に基づき、正常型プリオンタンパク質の生体内における機能、プリオン病に伴う神経変性の機序について、分子論的な立場からの具体的な考察を目指した。

3. 研究の方法

(1) 金属イオン複合体

① クプリゾン・銅イオン複合体(CuCPZ)

銅キレート剤の一種であるクプリゾン(oxalic acid bis(cyclohexylidene hydrazide))は脳神経組織の海綿状変性をもたらす細胞毒性を持ち、プリオン病などの神経変性疾患群の病態機序に相似な生化学モデルの構築に利用されている。クプリゾンを経口投与したマウス群は、数週間の暴露後に急性脱髓が進行し、投与中止後には速やかにミエリンを再形成することが報告されている。このようなクプリゾン誘発脱髓の作用機序として、近年、金属イオンを配位したクプリゾンが活性酸素種産生の化学反応を触媒する可能性が示唆されていた。本研究では、まず始めに、金属イオンの生体作用と神経組織障害の関係を解明する基本的な手掛かりとして、クプリゾン・銅イオン複合体(CuCPZ)の構造と性質の量子化学計算を用いた解析に取り組んだ。

② プリオンタンパク質・銅イオン複合体(CuPrP)

プリオン病の発症機構と銅イオンの生体作用の関係を明らかにすることを目指して、プリオンタンパク質・銅イオン複合体(CuPrP)の構造と性質の量子化学計算を用いた解析に取り組んだ。

(2) 量子化学計算

銅イオン複合体の構造及び物理化学的性質の解析には、密度汎関数法を用いた。交換相関汎関数には、混合型の B3LYP を用いた。基底関数は、6-31G(d,p) と cc-pVDZ を基本として、配位原子である窒素原子と酸素原子には分散関数を加えた double-zeta 関数系 (6-31+G(d), aug-cc-pVDZ), 銅原子には triple-zeta 関数系 (6-311+G(d), aug-cc-pVTZ) を用いた。

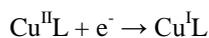
(3) 酸化還元電位

クプリゾンやプリオンタンパク質の毒性発現については、金属イオンが関与した活性酸素種の生成による細胞障害が原因の1つとして考えられている。活性酸素種の産生反応には幾つかの種類があるが、最も代表的な反応機構としてフェントン試薬による過酸化水素分解を介した反応が良く知られている:



このフェントン反応は、遷移金属を触媒として、過酸化水素を一電子還元することで反応性の高いヒドロキシラジカル(OH[·])を生成する典型的な酸化還元反応である。したがって、酸化還元電位は、クプリゾンやプリオンタンパク質の金属イオン複合体の毒性発現などを議論する上では最も重要な因子と考えられる。そこで本研究では、量子化学計算で得られた熱力学量を用いて、酸化還元反応の反応性の指標となる標準電極電位 (E°) の算出に取り組んだ。

標準水素電極を基準にした場合、銅イオン複合体の還元反応



に関する標準電極電位は、半電池反応に対する平衡関係から

$$E^\circ = (G^\circ[\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}] - G^\circ[\text{Cu}^{\text{I}}\text{L}] - G^\circ[\text{H}^+] + 1/2 G^\circ[\text{H}_2]) / F$$

として見積もることができる。ここで F はファラデー定数、 G° は標準状態(27°C, 1気圧)におけるギブス自由エネルギーを示す。本研究では、標準水素電極の絶対還元電位 $E_{\text{abs}}[\text{H}^+/\text{H}_2]$ を 4.28 V と仮定して、これに対応する還元電位 $E_{\text{abs}}[\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}/\text{Cu}^{\text{I}}\text{L}]$ と酸化電位 $E_{\text{abs}}[\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}/\text{Cu}^{\text{III}}\text{L}]$ から標準電極電位を計算した。

4. 研究成果

(1) クプリゾン・銅イオン複合体

① 配位構造

図1に示す四つの配位モードで構造最適化を行い、それぞれに対する安定構造を求めた。

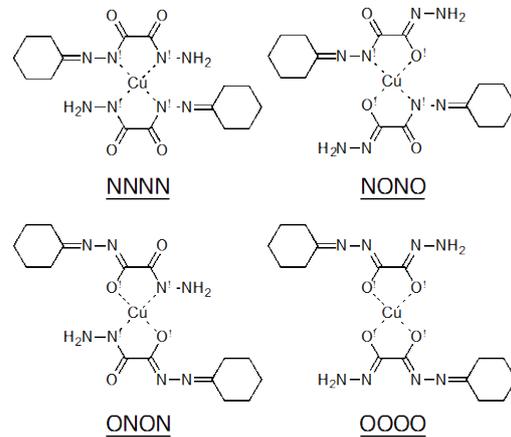


図1. CuCPZ の配位構造

② 酸化還元電位

各安定構造で基準振動解析を行い、調和近似を用いて振動分配関数を計算した。算出したギブス自由エネルギーから各配位構造に対応する酸化還元電位を求めた(図2)。

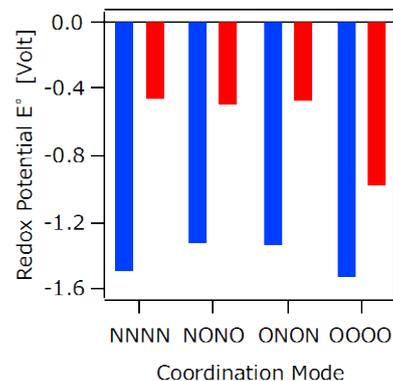


図2. CuCPZ の還元電位 ($E^\circ[\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}]$, ■) と酸化電位 ($E^\circ[\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{III}}]$, ■)

図2から明らかなように、CuCPZ は配位構造の違いによって酸化還元電位が大きく異なっていた。配位部位に窒素原子を含む配位構造は高い Cu(II/III) 酸化電位を持ち、Cu(III) 状態を安定化する傾向が明らかとなった。CuCPZ は ESR 分光によって Cu(III) 状態であることが推測されており、実験的に観測される酸化還元特性と配位構造を裏付ける結果となった。

(2) プリオンタンパク質・銅イオン複合体

① 配位構造

オクタリピード領域と His96 近傍の配位モード(図3), 及び His111 近傍の配位モード(図5)で構造最適化を行い, それぞれに対応する安定構造を求めた(図4, 図6).

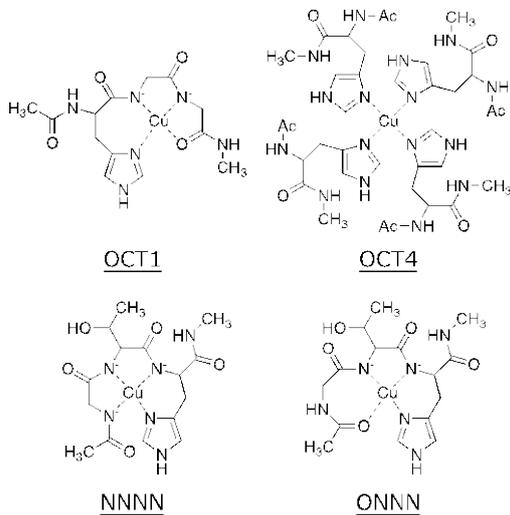


図3. CuPrP の配位モード. オクタリピード領域 (OCT1, OCT4), His96 近傍 (NNNN, ONNN)

図3に示す CuPrP オクタリピード領域の二種類の配位モード OCT1とOCT4は, それぞれ, 銅:オクタペプチドが 1:1 と 1:4 で配位する結合構造に対応する. 実験から, オクタリピード領域近傍の金属配位構造はプロトン濃度 (pH) に依存することが知られており, 低 pH の場合には OCT4, 高 pH の場合は OCT1 を形成する傾向がある.

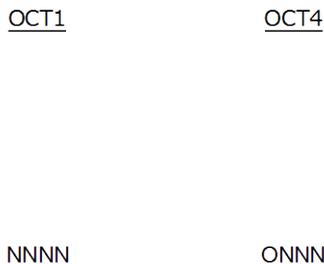


図4. CuPrP の安定構造. オクタリピード領域 (OCT1, OCT4), His96 近傍 (NNNN, ONNN)

図4が示すように, His96 に金属イオンが配位する場合, His 近傍のアミド窒素は脱プロトン化している. NNNN は ONNN に比べて配位原子に脱プロトンした窒素原子を多く含む. 従って His96 近傍も, オクタリピード領域と同様に, pH や銅イオン濃度に依存して, 配位構造が大きく異なることが予想される.

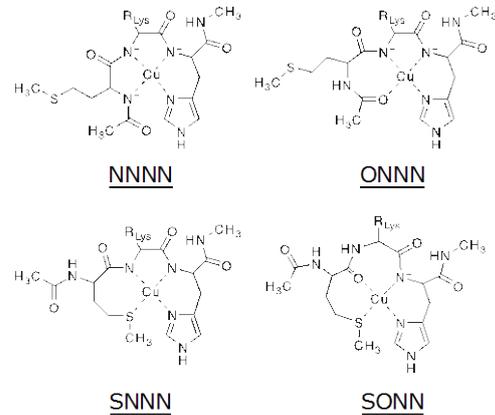


図5. CuPrP His111 近傍の配位モード

図5に示す His111 近傍は, Met 残基が隣接しているため, オクタリピード領域や His96 近傍とは異なり, Met 残基の S 原子を介した相互作用が銅イオン複合体の酸化還元的性質に重要な影響を及ぼす.

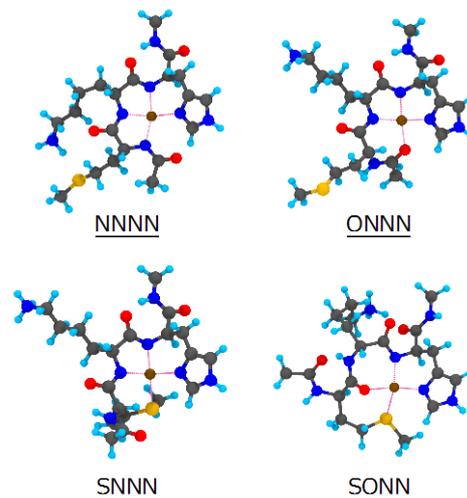


図6. CuPrP His111 近傍の安定構造

図6が示すように, His111 に隣接する Lys110 の側鎖はアミド C=O 結合と水素結合を形成する場合がある. Lys の塩基性側鎖が分子内で相互作用する場合, 金属複合体の酸化還元的性質は著しく変化する. His111 近傍では, Met や Lys などのフレキシブルな側鎖を持つ残基が複合体の化学反応性を大きく左右すると考えられる.

② 酸化還元電位

CuPrP の各安定構造に対応する酸化電位, 還元電位を計算した(図7, 図8).

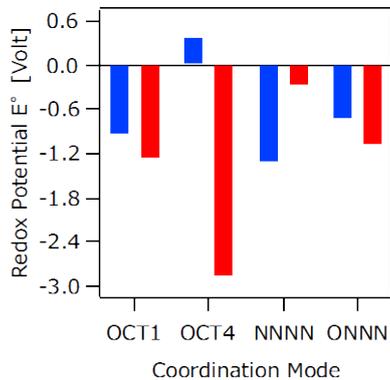


図7. 還元電位 ($E^\circ[\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}]$, ■) と酸化電位 ($E^\circ[\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{III}}]$, ■). オクタリピート領域 (OCT1, OCT4), His96 近傍 (NNNN, ONNN)

図7の OCT4 が示すように, オクタリピート領域では, 4つのオクタリピート部位が協力して1つの銅イオンを配位した場合, 高い Cu(II)/Cu(I) 還元電位を持つ. Cu/Zn SOD の還元電位は 0.32-0.40 V 程度であり, OCT4 は SOD と同程度の還元電位を持つ. このことから, 正常型構造のプリオンタンパク質の機能として, SOD と同様の抗酸化作用を持つ可能性は挙げられる. しかし, オクタリピート領域は pH に依存して配位モードが大きく変化することが予想され, 単純な SOD 類似の作用を担うことは考え難い. そこで例えば, 配位構造変化 (OCT1→OCT4) に伴い 1 Volt も酸化還元電位が顕著に変化することから, PrP は, このような電気化学的性質の変化を上手く利用して, プロトン・金属イオン濃度のセンサーとして働くなど, シグナル伝達の仲介者としての役割を担う可能性の方が高いと考えられる.

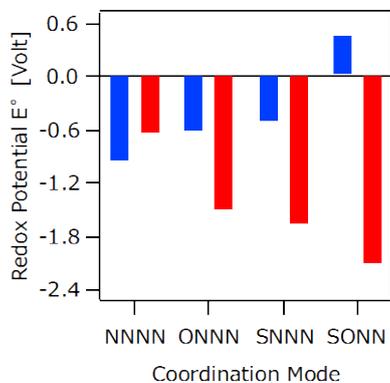


図8. CuPrP His111 の還元電位 ($E^\circ[\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}]$, ■) と酸化電位 ($E^\circ[\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{III}}]$, ■)

図7と図8が示すように, His96 部位や His111 部位など, オクタリピート領域外の結合部位でも, 配位構造の違いによって酸化還元電位が大きく異なることが分かる. 特に, 配位部位に N 原子を多く含む NNNN 配位構造は高い Cu(II)/Cu(III) 酸化電位を持ち, Cu(III) 状態を安定化する傾向にある. 通常, 典型的な銅イオン錯体の Cu(II)/Cu(III) 酸化電位は低いため, このような酸化過程を介した触媒作用は低いことが知られている. しかしながら, His96 部位や His111 近傍に結合した銅イオンの場合, 高い Cu(II)/Cu(III) 酸化活性により, フェントン機構類似の触媒反応を介して, 過酸化水素からヒドロキシル・ラジカルを発生させる可能性が考えられる. 例えば, CuCPZ の酸化電位は -0.4 V 程度であり, His96 や His111 の NNNN 配位構造は同程度の高い酸化電位を持つことから, これらの部位に銅イオンが結合した場合, クプリゾンと同機序の細胞毒性を持つことも考えられる.

(3) まとめ

プリオンタンパク質の金属結合部位について明らかになった配位構造と酸化還元的性質の相互関係は, プリオンタンパク質の機能発現やプリオン病における神経毒性機序で重要な役割を果たすと考えられる. 例えば, 正常型構造を持つプリオンタンパク質の場合, 主要な銅イオン結合部位はオクタリピート領域内にある. しかし, プリオンタンパク質が異常型に転移する場合, オクタリピート部位は切断されて, それ以降の 140 残基程度のペプチド残余物が凝集化することで, 毒性の高いアミロイドを形成すると予想される. この場合, オクタリピート領域外の His96 や His111 部位はアミロイド凝集体に含まれると考えられる. 従って, アミロイド凝集体内で His96 や His111 と銅イオンが相互作用する場合, 正常型の場合とは異なる状況で, Cu(II)/Cu(III) 反応性などが異常な化学反応を触媒する可能性も考えられる. しかし, これらの可能性を支持する明確な実験事実はまだ報告されておらず, 今後も引き続き十分な検証が必要である.

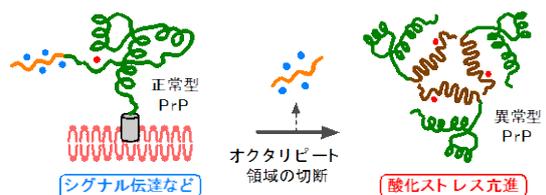


図9. プリオンタンパク質と銅イオンの生体作用

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① 石川岳志, 山本典史, 桑田一夫, Partial energy gradient based on the fragment molecular orbital method: Application to geometry optimization, *Chemical Physics Letters*, 査読有, 500 巻, pp. 149–154 (2010 年)

② 山本典史, 桑田一夫, Redox behaviors of the neurotoxic portion in human prion protein, HuPrP(106–126), *Chemical Physics Letters*, 査読有, 498 巻, 184–187 (2010 年)

③ 山本典史, 桑田一夫, Difference in redox behaviors between copper binding octarepeat and nonoctarepeat sites in prion protein, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 査読有, 14 巻, 1209–1218 (2009 年)

④ 山本典史, 桑田一夫, Regulating the conformation of prion protein through ligand binding, *Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, 113 巻, 12853–12856 (2009 年)

⑤ 山本典史, 桑田一夫, DFT studies on redox properties of copper chelating cuprizone: Unusually high valent copper(III) state, *Journal Molecular Structure Theochem*, 査読有, 895 巻, 52–56 (2009 年)

[学会発表] (計 6 件)

① 山本典史, 桑田一夫, プリオンタンパク質変性状態の構造類比, 第4回分子科学討論会, 2010 年 9 月 14 日, 大阪

② 山本典史, 桑田一夫, A pharmacological chaperone preventing the partial unfolding of prion protein, The 54th Annual Meeting of The Biophysical Society, 2010 年 2 月 20 日, San Francisco

③ 山本典史, 桑田一夫, Anti prion compound GN8 acts as a chemical chaperon for prion protein, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, 徳島

④ 山本典史, 桑田一夫, 抗プリオン化合物の作用機序:ケミカルシャペロンによるプリオンタンパクの構造制御, 第3回分子科学討論会, 2009 年 9 月 21 日, 名古屋

⑤ 山本典史, 桑田一夫, Regulating the conformation of prion protein through ligand binding, The 23rd Annual Symposium of The Protein Society, 2009 年 7 月 25 日, Boston

⑥ 山本典史, 桑田一夫, DFT studies on physiochemical properties of prion derived copper binding peptides: Pivotal roles of metallic ions in prion diseases, 第 46 回日本生物物理学会年会, 2008 年 12 月 3 日, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 典史 (NORIFUMI YAMAMOTO)
名古屋大学・情報科学研究科・特任助教
研究者番号:30452163

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし