

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770159

研究課題名（和文） トランスサイレチン中性子結晶構造解析によるアミロイド繊維化の解明

研究課題名（英文） Neutron crystallographic analysis of human transthyretin

研究代表者

横山 武司 (YOKOYAMA TAKESHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・助教

研究者番号：50524162

研究成果の概要（和文）：トランスサイレチンの中性子結晶構造解析に向けてトランスサイレチンの大型結晶化、中性子回折データ収集を行い、中性子結晶構造解析に成功した。それによって結晶中におけるトランスサイレチンのプロトン化状態と水和構造を明らかにした。それらの情報からトランスサイレチンのアミロイド繊維化に関わる構造安定性と pH 感受性の分子メカニズムを解明することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Towards to the neutron crystallographic analysis, crystallization of large crystals and neutron diffraction data collection were carried out, and we succeeded to determine the neutron crystal structure of transthyretin. Neutron structure revealed the structural stability and molecular pH sensitivity, related to the amyloid fibril formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：構造生物学

キーワード：中性子結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、アミロイドと呼ばれる繊維状の異常タンパク質が沈着して臓器の機能障害を起こす病気の総称であり、難治性特定疾患として厚生労働省に指定されている。血液中でサイロキシンを運搬する役割を持つトランスサイレチン(TTR)は、アミロイドーシス原因タンパク質として知られている。特に TTR 遺伝子変異による家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)は自律神経障害や腎・心不全等の症状を引き起こす。

TTR は β -シートを多く含む 127 アミノ酸残

基からなるサブユニットが 4 分子会合し、ホモ 4 量体を形成している。単量体の分子量は約 14kDa で、A-H と名付けられた 8 つの β ストランドと 1 つの短い α -ヘリックスからなる。それぞれの 2 量体では二つの単量体間の相互作用は水素結合と疎水結合からなる。この 2 つの単量体はそれぞれの H-ストランド同士で多くの水素結合を形成し、いわゆる単量体-単量体界面を形成している。この 2 量体が会合することによって 4 量体が形成される。2 量体-2 量体相互作用に特に重要とされているのは AB-ループ、GH-ループであり、2 量

体-2 量体相互作用はこれらのループ間で形成される水素結合と疎水結合からなる。

TTR がアミロイド繊維を形成する過程で最も重要であると考えられているのが4量体の解離であり、イン・ビトロ実験によって証明されている。また、TTR は pH に対して感受性を持つ。pH が低下すると4量体が解離し、アミロイド繊維形成が促進される事が知られている。

2. 研究の目的

近年、低 pH で作成した TTR 結晶の構造解析がなされ、pH 低下が及ぼす立体構造変化等の知見が得られてきた。しかし、これらの研究は全て X 線を利用して構造解析されたものであり、本来 pH の主役である水素原子についての議論は困難であった。したがって根本的にその構造変化がどのようにして TTR4 量体を不安定化し、アミロイド繊維化を促進するのかが解明できていない。タンパク質における pH に依存した振る舞いは、主に酸性・塩基性アミノ酸残基のプロトン化状態の変化に起因する。TTR の pH 感受性を構造生物学的に追及するには、水素原子やプロトン化状態等の情報が必要不可欠である。水素原子の X 線原子構造因子は他の原子に比べて非常に小さく、X 線を用いてプロトン化状態を観測することは困難である。一方で中性子結晶構造解析において、水素原子の中性子散乱長 (X 線の原子散乱因子に相当) は他の原子と大きな差は無く、生体高分子の水素結合、プロトン化状態、水和状態等を決定する手法として用いられている。

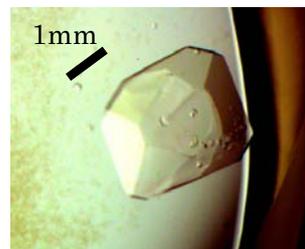
本研究では TTR の中性子結晶構造解析を目指し、大型結晶作成、中性子回折データ収集、構造解析を行うことによって、TTR における水素結合やプロトン化状態を決定する。これらの情報を元に TTR の pH 感受性と4量体安定性、そしてアミロイド繊維化の関係を構造生物学的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

まず、中性子回折測定に用いる結晶を作成した。一般的に中性子は X 線と比べて強度が弱く、X 線結晶構造解析に用いられる 1000 倍程度の結晶体積が必要である (1mm^3 以上)。そこで、立体構造を保持していない N 末端 (1-10 残基) を削除した、結晶化しやすい変異体を用いて結晶化を行った。結晶化条件は結晶化スクリーニングによって探索し、見つかった結晶化条件を最適化することによって大型結晶作成に成功した。結晶化条件を最適化した結果、最も大きな結晶が析出した条件は、タンパク質溶液：[9.5mg/ml TTR, 1.0M クエン酸三アンモニウム pD 7.4, 0.2M 塩化マグネシウム]と沈殿剤溶液：[1.85M クエン酸三アンモニウム pD 7.4]であり、シッティング

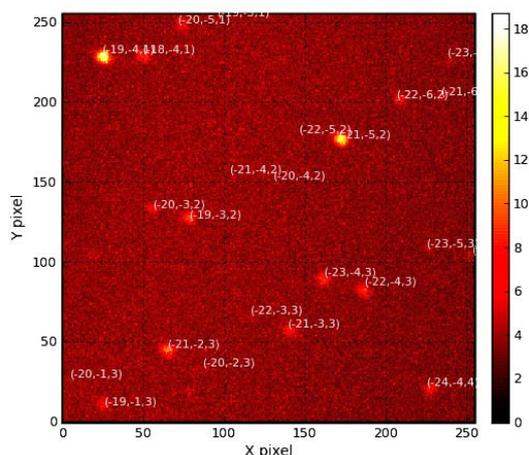
ドロップ蒸気拡散法を用いたものであった。結晶は約三週間後に析出し、その後 3~4 ヶ月間成長し続け、約 2.5mm^3 ($2.6 \times 1.2 \times 0.8\text{mm}$) 程度まで成長した (図 1)。

図 1.
中性子回折測定に用いた
TTR 大型結晶



中性子回折測定は大強度陽子加速器施設 (J-PARC) の物質・生命科学実験施設 (MLF) に建設された BL-03 茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) を用いて行った。J-PARC では飛行時間型 (TOF 型) パルス中性子を供給しており、従来の原子炉線源よりも効率良く回折データを収集できる。データ収集時の波長範囲は $2.7\text{-}6.7\text{\AA}$ であり、41 セット (結晶方位数) を 13 台の検出器を用いてデータ収集した。1 セット当たりの照射時間は J-PARC 加速器の出力が 120kW 時に 20 時間、220kW 時には 12 時間とし、2010 年 10 月~2011 年 1 月のマシンタイム約 30 日間を利用した。図 2 は 2θ 角が約 50° 付近 (分解能領域： $3.16\text{-}5.03\text{\AA}$ を表示) に配置された検出器の回折像を示している。回折点は比較的弱いながらも鋭く観測出来ており、質の良い結晶であると共に、十分に構造解析が可能であることが伺える。

図 2. $3.16\text{-}5.03\text{\AA}$ 分解能領域の中性子回折像。3 組の数字はミラー指数を表している。



回折データ処理は主に iBIX 用に開発された STARGazer を使い、適宜イン・ハウス・スクリプトを作成して計算を行った。高分解能領域でも比較的明瞭に回折点が観測でき (図 3)、結晶データも良好であったので (表 1)、 2.0\AA 分解能までの回折点を用いて解析を行

った。構造精密化は常温で測定した X 線結晶構造 (PDB ID:3U2I) を初期モデルとして、PHENIX.REFINE を用いて行った。分子表示ソフトウェア COOT で手動での構造修正を行い、PHENIX.REFINE による構造精密化を繰り返すことによって、最終的な R 因子が 23.4%、freeR 因子が 27.2% になった。精密化された構造データと構造因子データは Protein Data Bank に登録した (PDB ID:3U2J)。回折データと構造精密化データを表 1 にまとめる。

図 3. $2\theta = 118^\circ$ 、 $2.44 \sim 2.74 \text{ \AA}$ 分解能領域の中性子回折像。3 組の数字はミラー指数を表している。

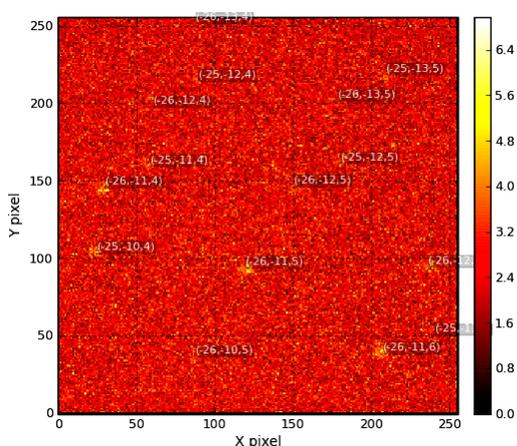


表 1. 回折データと構造精密化データ

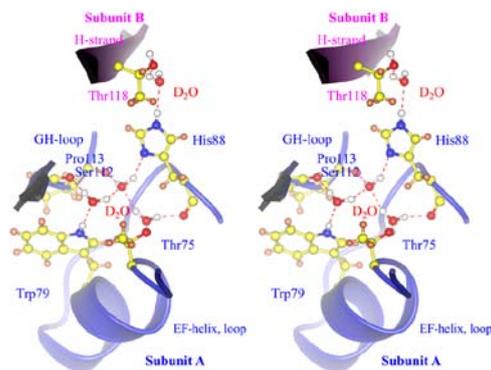
結晶データ	
空間群	$P2_12_12$
格子定数 (\AA)	$a=44.3, b=86.4, c=66.7$
分解能 (\AA)	12.1-2.00 (2.07-2.00)
観測反射点	39,815 (2,080)
独立反射点	15,307 (1,443)
完全性 (%)	86.4 (72.5)
R_{sym} (%)	19.1 (30.6)
$I/\sigma(I)$	4.3 (1.5)
精密化データ	
非対称単位	2 量体
分解能 (\AA)	12.1 - 2.00
R_{factor} (%)	23.4
R_{free} (%)	27.2
水分子の数	55
理想結合との誤差	
距離 (\AA)	0.010
角度 ($^\circ$)	1.207

4. 研究成果

まず、プロトン化状態の決定を試みた。ヒスチジン側鎖を除外した差フーリエ図を計算し、(重)水素原子位置のピークの高さから、His31 はダブルプロトン化、His56、His88、

His90 は $N^{\delta 2}$ のみがプロトン化されていることがわかった。また、同様の方法を水分子にも適用し、観測された水 55 分子の内、14 分子を D-O-D として同定することができた。これらの中でとりわけ興味深いのが His88 とその近傍の水分子で水素結合ネットワークを形成していたことである (図 4)。この水素結合ネットワークは Thr75、Trp79、His88、Ser112、Pro113、Thr118(B) と 4 つの水分子による計 10 個の水素結合から形成されており、TTR の構造安定性に寄与していることがわかる。また、His88 の $N^{\delta 1}$ はプロトン化されておらず、水分子と形成している水素結合においてアクセプターとして機能していることから、酸性 pH 下では His88 の $N^{\delta 1}$ はプロトン化され、この水素結合ネットワークを維持できず構造が不安定化することが示唆される。

図 4. His88 近傍の水素結合ネットワークの立体図 (並行法)。サブユニット A と B のリボンモデルはそれぞれ青・マゼンタで表示している。また、炭素、酸素、窒素、水素、重水素原子はそれぞれ黄、赤、青、茶、白色で表示し、水素結合は赤点線で表している。



酸性 pH では、TTR は構造不安定化し、単量体化とアミロイド繊維形成が促進されることがわかっている。本研究で発見した水素結合ネットワークは 2 量体間相互作用、つまり 4 量体形成においても重要な役割を果たしていると考えられる。TTR4 量体はサブユニット A の Ser112 と Tyr114 がそれぞれサブユニット D の Ser112 と Ala19 と水素結合を形成して 4 量体を維持しているが、その領域の Ser112 と Pro113 は His88 を中心とした水素結合ネットワークの一角を担っている (図 5)。つまり、酸性条件下で His88 がダブルプロトン化されると水素結合ネットワークを維持できなくなり、Ser112、Tyr114 を含む領域の構造が不安定化、サブユニット D との水素結合が形成できず、4 量体構造が不安定化することがわかった。このように pH 低下と 4 量体解離の関係が明らかになった。

図 5. 水素結合ネットワークと二量体相互作用領域の立体図（並行法）。サブユニット A、B、D のリボンモデルはそれぞれ水色・緑、マゼンタで表示している。また、炭素はリボンモデルと同じ色で、酸素、窒素、水素、重水素原子はそれぞれ黄、赤、青、茶、白色で表示し、水素結合は黄色の点線で表している。

次に、pH が低下すると、どの部位にプロトンが結合するのかを検証するため、pH4.0 の X 線結晶構造 (PDB ID: 3D7P) と中性子モデルを比較した。本研究で用いた結晶はほぼ中性の pH7.4 で作成しており、この結晶におけるプロトン化状態と酸性 pH における構造変化を吟味することで、プロトン結合部位を特定することができる。中性子モデルにおけるプロトン化状態と相互作用、そして pH4.0 における相互作用を検証した結果、中性子構造では、Asp74 は Ser77 と水素結合を、His88 は巨大な水素結合ネットワークを、Glu89 は Lys76 と塩橋を形成しているが、pH4.0 の結晶構造ではこれらの結合が消失していることがわかった。このことから、中性から pH4.0 に低下すると、Asp74、His88、Glu89 にプロトンが結合し、相互作用を消失、構造が不安定化することが強く示唆される。特に His88 のプロトン化状態は計 10 個の水素結合からなる水素結合ネットワークの形成に関わるため、TTR の pH 依存性に最も重要であることがわかる。また、これらのアミノ酸残基は同じ領域 (EF-ヘリックス) のアミノ酸残基と相互作用している。この EF-ヘリックスは低 pH 下で構造変化が顕著に現れることが知られており、中性子解析の結果から pH の低下と構造変化の関係を説明することができた。最後に、水素原子を含めた立体構造を注意深く観測して得ることができた。CH \cdots O 水素結合に関する重要な知見について報告する。CH \cdots O 水素結合はタンパク質立体構造においてしばしば見られ、生体高分子の立体構造安定化やその機能に重要な役割を果たしており、近年では水素結合の一種として認識されている。過去の研究によるモデル計算によると、一般的な水素結合の結合エネルギーは -5.5 kJ/mol で C \cdots O 距離が 2.8 Å である一方、

CH \cdots O 水素結合では -1.9 kJ/mol で C \cdots O 距離が 3.3 Å であった。この計算結果を参考に、二量体間相互作用領域 (サブユニット A-D 間) について調べた。表 2 は二量体間相互作用領域で形成されていた水素結合と CH \cdots O 水素結合をまとめたものである。

表 2. 二量体間相互作用領域で形成されている水素結合と CH \cdots O 水素結合のリスト。

アクセプター	ドナー	距離 (Å)
水素結合		
A19(A) - O	Y114(D) - D	3.0 (2.2)
S112(A) - O ^γ	S112(D) - D ^γ	2.5 (1.9)
A19(D) - O	Y114(A) - D	3.0 (2.2)
CH \cdots O 水素結合		
A19(A) - O	Y114(D) - H ^{β2}	3.4 (2.6)
V20(A) - O	P113(D) - H ^{β2}	3.6 (2.8)
V20(A) - O	Y114(D) - H ^{δ1}	3.4 (2.8)
A19(A) - O	S112(D) - H ^{β3}	3.6 (2.9)
A19(D) - O	S112(A) - H ^{β3}	3.6 (2.9)
V20(D) - O	P113(A) - H ^{β2}	3.6 (2.7)
A19(D) - O	Y114(A) - H ^{β2}	3.4 (2.6)
V20(D) - O	Y114(A) - H ^{δ1}	3.4 (2.8)

サブユニット A-D 間で形成されている水素結合は 3 つであった。一方で同領域で形成されている CH \cdots O 水素結合は 8 つであった。これを先のシミュレーション計算結果と照らし合わせると、CH \cdots O 水素結合の総結合エネルギーは水素結合のものとは比べて無視できないことがわかる。この結果は 2 量体—2 量体相互作用において CH \cdots O 水素結合も重要な役割を果たしていることを示している。また、Tyr114 の側鎖は CH \cdots O 水素結合の半数 (4 本) に関わっている。このアミノ酸残基が His に変異した変異体 TTR はアミロイド性変異体として知られており、この変異によって TTR の四次構造の安定性が損なわれることから、この領域における CH \cdots O 水素結合の重要性が伺える。

本研究課題を遂行することによって TTR アミロイド繊維化に関わる pH 感受性、プロトン化状態、構造安定性など多くの知見を得ることができた。他の手法では観測が難しい水素原子の貴重な情報を入手できる中性子結晶構造解析の有用性を改めて示すことができた。これらの情報は、今後のアミロイド性変異体の研究や、アミロイドーシス抑制薬の開発に活用されるだろう。

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 4 件)

① Hydrogen-bond network and pH sensitivity in transthyretin: Neutron crystal structure of human transthyretin. Yokoyama T., Mizuguchi M., Nabeshima Y., Kusaka K., Yamada T., Hosoya T., Ohhara T., Kurihara K., Tomoyori K., Tanaka I., Niimura N. *J. Struct. Biol.*, 2012 Feb; 177(2): 283-290 査読有

② Neutron structure analysis using the IBARAKI biological crystal diffractometer (iBIX) at J-PARC. Tanaka I., Kusaka K., Hosoya T., Niimura N., Ohhara T., Kurihara K., Yamada T., Ohnishi Y., Tomoyori K., Yokoyama T., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010 Nov;66(Pt11): 1194-1197. 査読有

③ Structure and function of a Campylobacter jejuni thioesterase Cj0915, a hexameric hot dog fold enzyme. Yokoyama T., Choi KJ., Bosch AM., Yeo HJ., *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jul;1974(7):1073-1081. 査読有

④ Structure of a sigma28-regulated nonflagellar virulence protein from Campylobacter jejuni. Kirkpatrick AS., Yokoyama T., Choi KJ., Yeo HJ. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 <ar 6;380(2):407-412. 査読有

[学会発表] (計7件)

① 横山 武司: トランスサイレチンの結晶構造解析, 第3回 MLF シンポジウム, 口頭発表, 2012, 1, 19-20, 東海

② 横山 武司: トランスサイレチンの結晶構造解析, 平成22年度茨城県中性子ビームライン成果報告会, 口頭発表, 2011, 9, 26, 東京

③ Yokoyama T., Nabeshima Y., Hosoya T., Ohhara T., Kurihara K., Kusaka K., Mizuguchi M., Tanaka I., Niimura N., XXII Congress and General Assembly International Union of Crystallography (IUCr2011), ポスター発表, 2011, 8, 22-29, マドリッド

④ 横山 武司: トランスサイレチンの中性子結晶構造解析, 第12回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 口頭発表, 2011, 6, 18, 富山

⑤ Yokoyama T., Nabeshima Y., Hosoya T., Ohhara T., Kurihara K., Kusaka K., Mizuguchi M., Tanaka I., Niimura N., 変異体トランスサイレチンの中性子回折測定及びX線結晶構造解析, 第48回日本生物物理学会年会, ポスター発表, 2010, 9, 20, 仙台

⑥ 横山 武司: 変異体トランスサイレチンの中性子回折実験, 水とナノ構造研究会, 口頭発表, 2010. 9. 6, 伊豆

⑦ Yokoyama T., Nabeshima Y., Mizuguchi M., Tanaka I., Niimura N., Towards the neutron

crystallographic analysis of amyloid protein, TTR., 第47回日本生物物理学会年会, ポスター発表, 2009, 10, 30, 徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 武司 (YOKOYAMA TAKESHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・
助教

研究者番号: 50524162

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: