

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 25 年 4 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570164

研究課題名（和文）リゾチームアミロイド線維コアの分子解剖

研究課題名（英文）Molecular dissection of the core of lysozyme amyloid fibril

研究代表者

橋 秀樹（TACHIBANA HIDEKI）

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：70126118

研究成果の概要（和文）：リゾチームはアミロイド病の原因となる蛋白質のひとつである。この研究では、ニワトリリゾチームのSS結合欠損体ならびに分子内特定領域のペプチドを用いて、アミロイド線維コアの形成反応を調べた。その結果、正常なフォールディングでのコア形成に関与する領域が、異常なフォールディングによる線維化のコア形成にも関っており、高いベータ会合能を持つ領域の受け皿となる構造が分子内に形成されるかどうか、正常と異常の分かれ目となることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Lysozyme is one of the amyloidogenic proteins. Here, by using hen lysozyme disulfide-deficient variants and synthetic peptides covering specific residue positions, we investigated the mechanism of the core formation of lysozyme amyloid fibrils. Peptide regions involved in the core formation in normal monomolecular folding are also involved in misfolding and core formation of lysozyme amyloid fibrils. Specifically, absence of a structure which could interact and successfully accept a highly beta-aggregating structure in normal folding reaction leads to misfolding and fibrillogenesis through intermolecular beta-aggregation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：フォールディング、リゾチーム、アミロイド、線維形成、ジスルフィド結合

1. 研究開始当初の背景

【アミロイド線維形成機構の推察】アミロイド病の原因となるアミロイド線維の形成に関しては、アミロイド病原性の蛋白質モノマー分子の部分的あるいは完全変性状態中で一部ペプチド領域が分子間でβ構造をとりはじめ、それが伸張・拡大して沢山のモノマー分子が連なった線維が形成されると考えられていた。しかし、具体的に特定のアミロ

イド原性の蛋白質において、β構造をとりはじめめるペプチド領域が同定されたり、分子間β構造形成に対するその他のペプチド領域の寄与が明らかにされた例は少ない。肝臓・脾臓・腎臓に蛋白質線維が沈着するヒトリゾチームアミロイド病においては、Asp67His, Ile56Thr、あるいはTrp64Argの単一アミノ酸置換変異が知られていた。さらに、Trp112Argというアミノ酸置換による遺伝性

リゾチーム・アミロイド症も報告された。野生型リゾチームの立体構造では、前3者は分子内 β 構造、後者は α ヘリックス構造をとっているペプチド領域にあたるが、これらの領域が分子間 β 構造そしてアミロイド線維形成に関連していることが示唆された。

【リゾチームアミロイド線維コア形成領域の候補】我々は、アミノ酸置換によりジスルフィド(SS)結合を全て欠損させた変異ニワトリ・リゾチーム(OSS)が自発的にアミロイド線維を形成すること、そしてその線維状態で、 β 構造の形成などにより溶媒中の重水素原子と交換しないペプチドNH基水素原子を持つアミノ酸残基をNMR検出H/D交換測定により直接同定してきた。それらは4ヶ所のペプチド領域(A(W28-S36)、B(G54-S60)、C(N106-R112)、D(V120-R125))として現れ、その中でBおよびC領域は全段落で述べた二つの領域に近い。これらの領域がアミロイド線維コアの形成に関っていると考えられる。また、OSS変異リゾチームの形成するアミロイド線維は曲がりくねった形態を示すが、SS結合をすべて保持したリゾチームの形成するアミロイド線維は真っ直ぐな形態を示す。後者においてSS結合の架橋パターンも保持されているかどうかはわからないが、SS結合の有無がアミロイド線維形成の分子機構に大きく影響していることは、他のアミロイド原性蛋白質でも報告されている。

2. 研究の目的

(1) ニワトリ・リゾチームのアミロイド線維コアの形成に関与すると推定される4ヶ所のペプチド領域を選択的に欠損させた変異体、あるいは特定のSS結合を欠損させることにより特定の領域の蛋白質高次構造を欠損した変異体、を作製し、線維形成に対する蛋白質中の各領域の具体的な寄与を明らかにする。

(2) 4ヶ所のペプチド領域のそれぞれに対応する合成ペプチドを研究対象とし、それらによる線維形成の有無、形成有りの場合の線維の形態および2次構造を、分光学的手法、AFM観察、MD計算により解析する。

(3) 以上をあわせて、蛋白質中のどの領域がアミロイド線維コアにおける分子間 β 構造の形成の主要な役割を担っているのか、また逆に、正常な立体構造形成においてはどの領域がそのようなミスフォールディングを阻止しているのかを解明する。

3. 研究の方法

(1) 【蛋白質変異体】4ヶ所のペプチド領域を選択的に欠損させた変異体の作製は完成に至らなかったため、特定のSS結合を欠損させることにより特定の領域の蛋白質高次構

造を欠損した変異体を作製した：領域A(W28-S36)についてはC30-C115欠損体、領域B(G54-S60)についてはC64-C80欠損体、領域C(N106-R112)についてはC30-C115欠損体、領域D(V120-R125)についてはC6-C127欠損体が、それぞれ対応する。また、二つ以上の領域の欠損に対応するもの(例えばC6-C127とC30-C115の両方とも欠損体など)も作製した。これらの変異体は大腸菌内で封入体として生産され、それを可溶化後、イオン交換・ゲルろ過・大規模逆相クロマトグラフィによって精製した。

(2) 【アミロイド線維形成】作製した変異体の会合体・アミロイド線維形成能は、中圧力のsize-exclusion chromatographyやチオフラビン蛍光、CD測定によって調べた。アミロイド線維形成反応としては、自発的な線維形成反応と、既に形成されたWTリゾチームアミロイド線維を超音波処理によって線維化の「種」(シード)として用い、それに種々の蛋白変異体を加えて線維伸長反応を見る、いわゆる“seeded-growth”の系も用いた。線維の2次構造ならびに形態は赤外吸収測定および原子間力顕微鏡観察によって解析した。

(3) 【ペプチドのアミロイド線維形成】4ヶ所のペプチド領域のそれぞれに対応するペプチドはシグマ社において注文合成されたものを用いた。特に領域Bについては、N末端およびC末端が未修飾のものに加えて、それぞれアセチル化およびアミド化によって電荷をなくしたものも用いた。これらのペプチドの自発的なアミロイド線維形成能については項目(2)と同様の方法で解析した。

(4) 【ペプチド会合体のエネルギー計算】 β 構造へのペプチド会合の計算機科学的解析としては、まずMMFF94S力場を用いた配座解析によってペプチドの初期構造を決定し、次に例えばペプチドの2量体について溶媒環境中での分子動力学計算を行い、得られた構造について、MMPBSA法によってペプチドの結合自由エネルギーを算出した。

4. 研究成果

(1) 【B領域ペプチドが最も容易にアミロイド線維を形成する】NMR検出H/D交換測定により同定された、ニワトリリゾチームのアミロイド線維コア形成に関与すると推定される4ヶ所のペプチド領域A、B、C、Dのうち、領域B(Gly54-Ser60)と領域C(Asn106-Arg112)については自発的にアミロイド線維を形成することがチオフラビン蛍光測定および原子間力顕微鏡観察により確認された(図1)。領域Bペプチドの線維形成は容易に起こり、線維化臨界モノマー濃度は低く、塩濃度に依存せず、真っ直ぐでな線維が形成される。領域Cペプチドの線維形成はそれよ

りも遅く、線維化臨界モノマー濃度はBペプチドの場合よりも高く、塩濃度依存性があり、線維形態にはうねったものが含まれる。

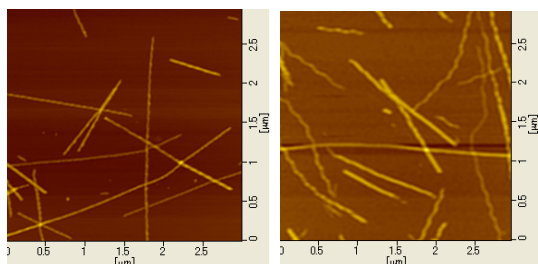


図1. 領域Bに対応するペプチド(DYGILQINSR、左、濃度1 mM、純水中、6-day incubation period)と領域Cに対応するペプチド(GMNAVVAWRN、右、20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0、30 mM NaCl 中、15-day incubation period)によるアミロイド線維形成。

より詳しく見ると、Bペプチドでは、線維形成反応初期には高さが0.5 nm程度で長さが60–140 nm程度の会合体を形成すること、反応の進行とともに、恐らくそれらがお互いに巻きあって、高さが3 nm以上で長い線維が形成されることがわかった。また、領域AおよびDペプチドは、これまで試した条件では自発的にはアミロイド線維を形成しない。Bペプチド部はWTリゾチーム中では分子内 β 構造部分に、また、AおよびDペプチドはヘリックス構造部分に相当していることと符合する結果であり、Bペプチド部がアミロイド線維コアの形成に最も大きな役割を果たすことを示す。ただし、CペプチドはWTリゾチーム中ではヘリックス構造部分に相当しており、 β 構造もヘリックス構造もとり得るものと思われる。

なお、Bペプチドの線維形成には酸性あるいは弱酸性条件が適していることがわかった。その条件下ではBペプチドの総電荷はプラスである。中性pHではBペプチドの総電荷がゼロになるが、線維形成は抑制された。Cペプチドの場合も総電荷はプラスである。ペプチド間に斥力もあることが、却って長距離にわたる秩序構造を産み出しているようにも考えられる。

(2) 【領域AおよびDの構造の欠損がアミロイド線維形成を促進する】特定のSS結合を欠損させることにより特定の領域の蛋白質高次構造を欠損した変異体の多くは、全てのSS結合を欠損させた変異体の場合と異なり、自発的には容易にアミロイド線維を形成しなかった。そこで、既に形成されたWTリゾチームアミロイド線維を断片化してシードとし、それにこれらの特定SS結合欠損体を加えて線維伸長反応の有無を解析した。その

結果、seeded-growthはAおよびD領域の構造の欠損、すなわちC6–C127 (SS結合1)およびC30–C115 (SS結合2)の欠損、で促進されることがわかった。逆から言うと、seeded-growthはC64–C80 (SS結合3)およびC76–C94 (SS結合4)の存在で促進され、C6–C127 (SS結合1)およびC30–C115 (SS結合2)の存在で抑制される、という結果である(図2)。

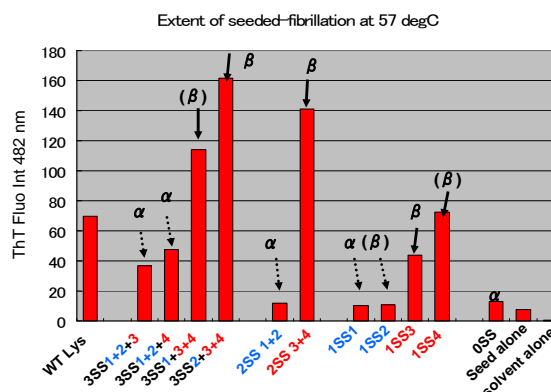


図2. リゾチームの色々なSS結合欠損体を用いた場合の「線維種依存性」アミロイド線維形成。蛋白濃度 4 mg mL^{-1} のSS結合欠損体と同濃度のWTリゾチームアミロイド線維断片化物を、20 mM Glycine · HCl, pH 2.6、50 mM NaCl 中、体積比で19:1に混合し、57°Cで24時間反応させ、482 nmでのチオフラビン蛍光強度を測定した。それぞれの変異体が保有するSS結合を、番号1~4で横軸に示してある。また、CDスペクトルがベータ型かアルファ型かを、各縦棒の上部に示した。

(3) 【ベータ会合性領域を受容する分子内構造の欠損がアミロイド線維化につながる】リゾチームのアミロイド線維コアの形成の主要因となることがわかったBペプチド(Gly54–Ser60)は、高い β 鎖形成-aggregation能を持つ。一方、この領域中のIle 55ならびにLeu 56は、リゾチーム単分子での正常なfoldingの場合に、 α ドメインの疎水コアと相互作用して、いわゆる β ドメインを含めた分子全体のfoldingを実現する役割を持つことがわかっている。つまり、正常なfoldingでのコア形成に関与するペプチド領域が、異常な線維化のコア形成にも関わっている。そして、上述の「線維種依存性」アミロイド線維形成実験における「領域AおよびDの構造の欠損がアミロイド線維形成を促進する」という結果は、 α ドメインの疎水コアが形成されていない変異体ではBペプチドの相互作用の相手となる構造が分子内に存在しないために、分子間でBペプチド領域自体が相互作用して線維を形成する、と解釈される。すなわち、高い β -aggregation能を持つ領域の受

け皿となる構造が分子内に形成されることが正常な folding と異常な β -aggregation・線維化の分かれ目となっている、という描像が得られた (図3)。領域Cペプチドについても、その受け皿となる構造が α ドメイン疎水コアにできていれば、そこに付着して α ヘリックス構造をとるのであろう。付着できなければ β 構造をとり、アミロイド線維化することになる。

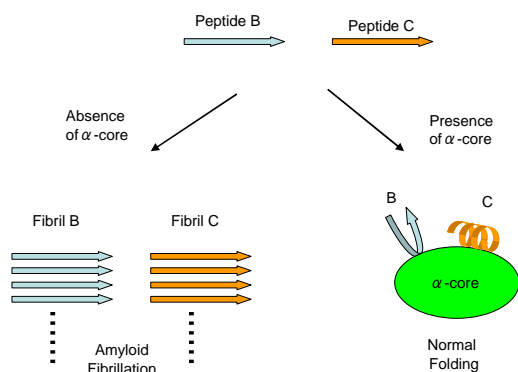


図3. リゾチーム分子中の α ドメインの疎水コア構造が存在すれば、ベータ会合性領域BおよびCがそれぞれ分子内の β 構造および α ヘリックスとなって (右の経路) 正常なフォールディングとなる。一方、疎水コア構造がなければ、領域BおよびCともに分子間で β 構造をとって自己集合してアミロイド線維を形成する (左の経路)。

リゾチームの場合、残基レベルでのフォールディング研究の蓄積があるので、このように大変具体的な描像を得ることができた。そして、このメカニズムは、今後、 α コアと問題のペプチド間の特定の残基の側鎖の相互作用のレベルでの検証実験が可能であり、アミロイド性蛋白の研究において大きな進展をもたらすと期待できる。

(4) 【アミロイド線維中での β 鎖の配置】

ペプチドBのアミロイド線維形成を計算機科学的に解析するために、MMFF94S 力場を用いた配座解析を行い、初期構造としての低エネルギーコンフォーマーを求め、次に、このペプチドの2量体の、平行あるいは反平行 β 構造を作成し、それらについて水溶媒環境中での分子動力学計算を行い、それぞれの安定構造を求めた。その構造について、Molecular Mechanics / Poisson-Boltzmann Surface Area 法によって結合自由エネルギーを計算したところ、平行ベータ構造では $-235.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、逆平行ベータ構造では $-274.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ と、線維は逆平行ベータ構造をとることが予想された (図4)。また、アセチル化およびアミド化によりペプチド両末端の電荷を取り

去った場合の計算結果も逆平行 β 構造の方が安定であった。この結果は、自発的にアミロイド線維を形成する OSS 変異体蛋白質での線維の赤外吸収スペクトル解析結果からの、逆平行 β 構造という結論と一致するものである。

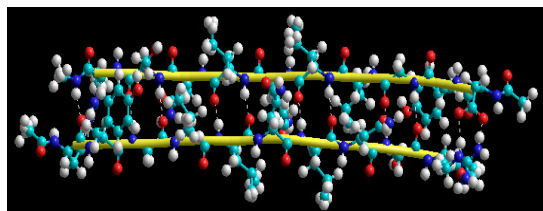


図4. 逆平行 β 構造のBペプチド2量体の計算された平均構造。

しかしながら、実際に測定されたBペプチド線維の赤外吸収スペクトルは平行 β 構造を示した (図5)。従って、今後、水溶媒環境中での分子動力学計算におけるイオン種の扱いの検討や、ペプチド多量体を対象とした分子動力学計算などを行う必要がある。また、蛋白質アミロイド線維とペプチドアミロイド線維では、同一のアミノ酸配列領域でも、その立体構造上の平行か逆平行かの β 鎖の配置が異なる可能性を検討する必要がある。

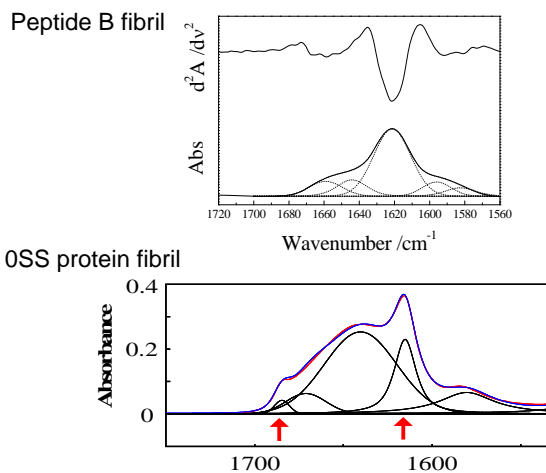


図5. Bペプチド線維ならびに OSS 変異体蛋白質線維 (下) の赤外吸収スペクトル. 溶媒はいずれも 20 mM 重水素化酢酸ナトリウム、30 mM NaCl、pD* 4.0 in D₂O. ペプチド濃度は 2 mM、蛋白濃度は約 1.5 mM. OSS 蛋白質線維においては 1685 cm^{-1} の吸収ピークが逆平行 β 鎖の存在を示すが、Bペプチド線維では高波数側のピークが見られない。

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 3 件)

- ① Y. Noda, K. Narama, K. Kasai, H. Tachibana, S. Segawa, Glycerol-enhanced detection of a preferential structure latent in unstructured ISS-variants of lysozyme, Biopolymers, 査読有、97、2012、539-549
- ② R. Silvers, F. Sziegat, H. Tachibana, S. Segawa, S. Whittaker, U. L. Gunther, F. Gabel, J. Huang, M. Blckledge, J. Wirmer-Bartoschek, H. Schwalbe, Modulation of Structure and Dynamics by Disulfide Bond Formation in Unfolded States, Journal of the American Chemical Society, 査読有、134、2012、6846-6854
- ③ B. R. Shah, A. Maeno, H. Matsuo, H. Tachibana, K. Akasaka, Pressure-Accelerated Dissociation of Amyloid Fibrils in Wild-Type Hen Lysozyme, Biophysical Journal, 査読有、102、2012、121-126

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① 橘 秀樹、藤澤雅夫、河野良平、加藤稔、Amyloidogenic Peptides from Hen Lysozyme、第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 23 日、名古屋大学 (名古屋市)
- ② 河野良平、篠原 薫、藤田悠太郎、橘 秀樹、Amyloid-Fibrillation of Lysozyme Is Enhanced by C64-C80 and C76-C94 Disulfide Bonds、第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 22 日、名古屋大学 (名古屋市)
- ③ 橘 秀樹、Basic Equations in Statics and Kinetics of Protein Polymerization、Sixth International Meeting of Biomolecules under Pressure、2011 年 12 月 14 日、大津旧公会堂 (大津市)
- ④ 河野良平、川平侑希、小林祐大、橘 秀樹、Effect of Salt-Concentration on Pressure-Dissociation of Lysozyme Amyloid-Like Fibrils、第 49 回日本生物物理学会年会、2011 年 9 月 16 日、兵庫県立大学 (姫路市)
- ⑤ 橘 秀樹、久保村俊太、篠原 薫、河野良平、Seeded-Fibrillation of Lysozyme Disulfide-Variant Proteins、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 22 日、東北大学 (仙台)
- ⑥ 河野良平、黒木晃仁、小林祐大、橘 秀樹、Effect of Temperature on Pressure-Dissociation of Lysozyme Amyloid-Like Fibrils、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 22 日、東北大学 (仙台)
- ⑦ 橘 秀樹、河野良平、赤坂一之、Volumetric Properties of Amyloid Fibrillation Starting from Unfolded High-Energy

Protein Structures、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 21 日、東北大学 (仙台)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橘 秀樹 (TACHIBANA HIDEKI)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：70126118

(2) 研究分担者

加藤 稔 (KATO MINORU)
立命館大学・薬学部・教授
研究者番号：00241258
藤澤 雅夫 (FUJISAWA MASAO)
近畿大学・生物理工学部・准教授
研究者番号：20258065
河野 良平 (KONO RYOHEI)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70569110