

## 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 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22810014

研究課題名（和文） 生体高分子アミロイド線維形成反応機構の可視化による分子機構の解明

研究課題名（英文） Visualization of molecular mechanisms of amyloid fibril formation

研究代表者

八木 寿梓 (Hisashi Yagi)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：10432494

研究成果の概要（和文）：さまざまな疾病に関与するアミロイド線維の分子機構の解明は、疾患の治療や予防方法を開発する上で重要なことである。本研究は、アミロイド線維の分子機構を明らかにするために、全反射蛍光顕微鏡を用いてアミロイド線維形成反応を可視化した。この方法により、アミロイド線維とそれ以外の凝集物との区別することに成功した。次に、アミロイド線維の伸長に着目した。すでに形成したアミロイド線維に異なる蛍光色素で標識したペプチドを添加して、伸長する様子を観察した。その結果、アミロイド線維は線維末端だけでなく線維側面からも伸長することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Understanding the molecular mechanisms of amyloid formation is important to prevent various amyloidosis. In this study, to elucidate the molecular mechanisms of amyloid fibril formation, we visualized the reaction of amyloid fibril growth by total internal reflection fluorescence microscopy. Using this method, we succeeded in distinguishing between the amyloid fibrils and amorphous aggregates. Then, we focused on amyloid fibril growth. We added Alexa-532 labeled peptides to preformed fibrils and then observed the fibril growth. Our results suggested that the growth of fibrils occurred in not only the terminal of fibrils but also the side surface of fibrils.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：(1)全反射蛍光顕微鏡 (2)アミロイド線維 (3)アルコール (4)HFIP

(5)リアルタイム観察 (6)ヒト Islet amyloid polypeptide

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは $\beta$ シートに富んだ不溶性の凝集物（アミロイド線維）が細胞内外で蓄積し、さまざまな症状を引き起こす疾患で

ある。アルツハイマー病などを代表とする脳の神経変性疾患もアミロイドーシスに含まれる。それぞれの疾患には固有の原因タンパク質が存在しているにもかかわらず、すべて

の原因蛋白質がアミロイド線維を形成する共通の機構が知られている。さらにアミロイドーシスは現在も疾患の数が増加している (Westermarck, P. et al. Amyloid (2005))。

アミロイド研究は、蛋白質の構造的特徴を知る上で欠かせない X 線結晶構造解析や溶液 NMR 等の手法を用いることができない。アミロイド線維が結晶化しない不溶性の凝集体かつ高分子量であるためである。現在、凝集体でも測定が可能な固体 NMR を用いたアミロイド線維の構造解析が行われているが短いペプチドに限られている (Sawaya, MR. et al. Nature (2007))。また、一番の問題として、*in vitro* の研究で得られた知見から、生体内で生じるアミロイド線維形成の仕組みを理解することが重要であるが、実験条件の問題等から *in vitro* と *in vivo* の研究を結びつけるにはまだ深い溝が存在することである。

アミロイド線維はプロトフィラメントと呼ばれる細線維が数本束なることによって線維を形成するが、プロトフィラメントの数による形態の多様性が存在する。生体内においても、組織特異的にアミロイド線維同士による超分子複合体を形成し、脂質膜などの外的環境の影響が強く示唆されるが、その詳細な機構は明らかにされていない。細胞内外の環境の複雑さがその理解を妨げていると考えられる。よって、アミロイド線維の分子基盤を理解するためには *in vitro* と *in vivo* 研究のそれぞれの要素を取り入れた融合的な実験手法が必須である。その一つとしてアミロイド線維のさまざまな現象を可視化することである。申請者はこれまでにアミロイド線維の形成分子機構、物性に関する研究をタンパク質科学的、生物物理学的手法を用いて研究を行ってきた。アミロイドーシスの発症機構を解明するためには、アミロイド線維形成の分子基盤を理解することが重要である。そのためには、蛋白質科学的、生物物理学的手法を組み合わせ、原因ペプチド、蛋白質そのものの物性を理解することが近道である。

## 2. 研究の目的

多くの蛋白質は、機能的な天然構造を形成し生命活動を担っているが、さまざまな要因により、天然構造とは全く異なる「アミロイド線維」と呼ばれる異常凝集体を形成することが知られている。アルツハイマー病、透析アミロイドーシス、II 型糖尿病などを含むアミロイドーシスは、このアミロイド線維の形成・沈着が発症の原因と考えられているが、詳細な分子機構の全容は明らかになっていない。本研究は、全反射蛍光顕微鏡を用いて分光学的手法では明らかにすることができない線維と無定形な凝集の区別およびアミロイド線維形成途中の線維側面、線維末端で

生じる局所的な反応を一線維レベルで視覚的にとらえ、また外部環境 (特に脂質膜) との相互作用をリアルタイムで解析する。そして線維形成の分子基盤を生物物理学的視点から理解することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、1) 線維形成機構と無定形な凝集の形成機構の区別、2) 線維伸長末端で生じる反応の可視化、の二つに重点をおき、その機構を全反射蛍光顕微鏡にて明らかにする。具体的に、数種類のアミロイド形成タンパク質・ペプチドを用いて、さまざまな線維形成条件で線維を形成させ、分子間相互作用と溶媒との相互作用のバランスを探る。二種類の蛍光色素、チオフラビン T とナイルレッドを組み合わせることより、今まで困難であった溶液中に共存する線維と無定形な凝集を区別し、その機構を解析する。また、線維の分子機構の解明において、一番重要である、線維末端におけるモノマー分子との相互作用について、異なる蛍光色素で修飾したペプチドを用い、高感度カメラを組み合わせることにより、一線維末端レベルかつリアルタイムで解析する。全体的な反応と、一線維レベルでの反応を組み合わせることにより、線維形成機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 「アミロイド線維形成機構と無定形な凝集の形成機構の区別」

アルコール存在下におけるアミロイド線維形成の挙動について詳細に調べた。当研究室で独自に組み立てた全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) と、モデルペプチドとして、II 型糖尿病の発症に関係するとされている Islet amyloid polypeptide (IAPP) を用いた。TIRFM によるアミロイド線維伸長リアルタイム観察は、アミロイド線維形成機構およびアミロイド線維の特性を可視化することが可能である。アミロイド線維形成反応を直接観察することは、まだ明らかされていない線維形成分子機構の手掛かりや、現在提唱されている分子機構の直接的な証明となる。また、II 型糖尿病の発症機構に関する知見を得て、将来的に新たな治療方法の開発に貢献することも期待できる。

IAPP は疎水性に富んだアミノ酸からなり、非常に凝集性が高い。IAPP の粉末を水系の溶液で溶解させるとすぐに白濁した。これに対し、様々な濃度のヘキサフロイソプロパノール (HFIP) を添加した溶液では、白濁することなくアミロイド線維を形成した。アミロイド線維と不定形な凝集を区別するための蛍光色素 (NileRed) を用いて観察すると、水系の溶液では線維と不定形な凝集の両方が形成されたが、HFIP 存在下ではアミロ

イド線維のみを形成したことが明らかになった。図1はアミロイド線維と不定形な凝集体を区別するために NileRed を加え、アミロイド線維に特異的に結合する蛍光色素、チオフラビンTとの二重染色を行った結果である。HFIP 存在下では、酸性でも中性条件でもチオフラビンTと NileRed は共局在し重ね合わせると一致した (図1 AとC)。他方、水系の溶液中ではチオフラビンTと NileRed の一部は共局在せず、重ね合わせても一致しなかった (図1 B)。このことから水系の溶液ではアミロイド線維と不定形な凝集の両方が存在することがわかった。さらに蛋白質・ペプチドの二次構造を調べる円二色性分散測定を行ったところ、線維を形成する初期の段階で IAPP の二次構造が HFIP の有無で異なっていることがわかった。HFIP は水系の溶液に添加するとクラスターを形成する。このクラスターは細胞表面の環境と似ており、今後より詳細な線維形成の分子機構に関する知見を得ることもできる。

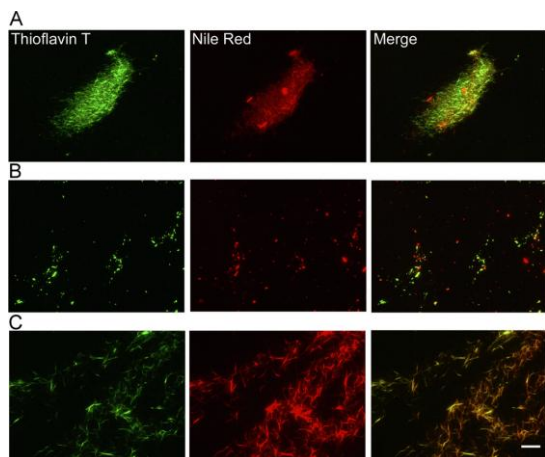


図1. TIRFM 二重染色観察から得られたさまざまな条件下で形成した IAPP のアミロイド線維と不定形な凝集体。A、酸性条件、HFIP 存在下でのアミロイド線維。B、中性条件、HFIP 非存在下でのアミロイド線維と不定形な凝集体。C、中性条件、HFIP 存在下でのアミロイド線維。

(2) 「線維伸長末端で生じる反応の可視化」  
(1)と同様にアルコール存在下におけるアミロイド線維形成について詳細に調べた。

IAPP は疎水性に富んだアミノ酸からなり、非常に凝集性が高いために、初年度に行った「線維形成機構と無定形な凝集の形成機構の区別」で得られた IAPP がアミロイド線維を形成する最適な条件を用いて研究を行った。具体的には、すでに形成した未修飾のアミロイド線維に対して、蛍光色素 Alexa532 で修飾した IAPP (Alexa532-IAPP) のモノマーを添加した。加えた Alexa532-IAPP モノマーがすでに形成したアミロイド線維に対して、どのような相互作用をするかをリアルタ

イムで観察した。その結果、Alexa532-IAPP モノマーはアミロイド線維末端のみだけでなく、線維側面にも結合して新たな線維を形成している模様が観察された (図2)。この結果は、これまで線維の末端にモノマー分子が反応することより線維伸長が生じると考えられてきたことが、線維の側面にも着目して線維の形成機構を考えなければならないという新たな知見を得ることに成功した。現在さらに詳細な知見を得るために、対物型の TIRFM の観察システムを構築中であり、その観察から得られた結果をふまえて投稿論文としてまとめる予定である。

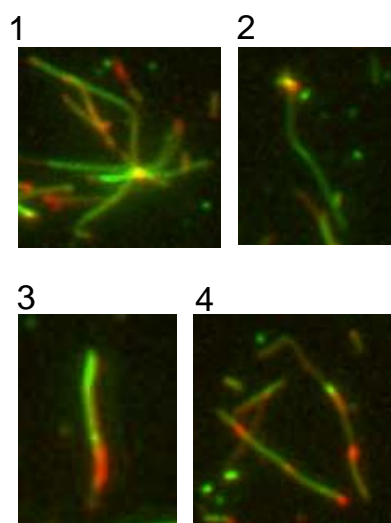


図2. すでに形成した IAPP 線維に対して Alexa-532 で標識した IAPP モノマーを添加した IAPP のアミロイド線維伸長観察。赤色は新たに結合または伸長した Alexa-532 IAPP の線維を示す。

## 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 2 件)

① Eri Chatani, Hisashi Yagi, Hironobu Naiki and Yuji Goto, Polymorphism of  $\beta$ 2-Microglobulin amyloid fibrils manifested by ultrasonication-enhanced fibril formation in trifluoroethanol, Journal of Biological Chemistry, (in press (2012)), (査読有)、<http://www.jbc.org/content/early/2012/05/07/jbc.M111.333310.long>

② 八木 寿梓, 後藤 祐児, 蛍光顕微鏡観察によるアミロイド線維形成の分子機構、タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会報告(III)、2011、1-5、

(査読無)

[学会発表] (計9件)

- ① 八木 寿梓、全反射蛍光顕微鏡を用いたアミロイド線維形成反応の可視化、先端融合科学シンポジウム タンパク質アセンブリー会合、超分子化、凝集ー (招待講演)、2012. 1. 31-2. 1、神戸大学
- ② 長谷川 恭平、超音波による amyloid  $\beta$  (1-40)の線維形成機構、第 83 回生化学会大会、2011. 12. 7-10、神戸国際会議場 (兵庫)
- ③ 八木 寿梓、ケラトエピセリンペプチドのアミロイド線維形成に対する超音波と界面活性剤の効果、第4回 タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会 (招待講演)、2011. 11. 11、京都大学原子炉研究所
- ④ 八木 寿梓、天然変性蛋白質  $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維伸長直接観察、第 11 回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)、2011. 6. 8、ホテル阪急エキスポパーク (大阪)
- ⑤ Yuji Goto 、 Hexafluoroisopropanol induces amyloid fibrils of islet amyloid polypeptide by enhancing both hydrophobic and electrostatic interactions 、 The 3<sup>rd</sup> Asia Pacific Protein Association Conference in conjunction with the 3<sup>rd</sup> Symposium of the Chinese Protein Society、2011. 5. 7-9、Shanghai, China
- ⑥ Hisashi Yagi、 The amyloid fibril growth of human islet amyloid polypeptide revealed by total internal reflection fluorescence microscopy、 The 3<sup>rd</sup> Asia Pacific Protein Association Conference in conjunction with the 3<sup>rd</sup> Symposium of the Chinese Protein Society、2011. 5. 7-9、Shanghai, China
- ⑦ 八木 寿梓、超音波によるアミロイド線維形成、大阪大学蛋白質研究所セミナー (招待講演)、2011. 4. 27-28、大阪大学蛋白質研究所
- ⑧ 高柳 直人、全反射蛍光顕微鏡による human Islet Amyloid Polypeptide のアミロイド線維伸長、BMB2010 、2010. 12. 7-10、神戸国際会議場
- ⑨ 八木 寿梓、蛍光顕微鏡観察によるアミロイド線維形成の分子機構、第 3 回 タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会、2010. 11. 11、京都大学原子炉研究所

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八木 寿梓 (Hisashi Yagi)

大阪大学・蛋白質研究所・助教  
研究者番号：10432494