

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570192

研究課題名(和文)カプセル化によるアミロイド 可溶性オリゴマーのNMR構造解析

研究課題名(英文)NMR analysis of amyloid beta-oligomer by using molecular chaperone encapsulation system.

研究代表者

星野 大(Masaru, Hoshino)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70304053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：核磁気共鳴分光法は、水溶液中でのタンパク質の構造を残基レベルの分解能で解析できる優れた手法です。その一方で、凝集性の高いタンパク質には適用する事ができません。本研究はこの欠点を克服するべく、分子シャペロンという巨大なカプセルの中に測定対象タンパク質を封じ込めて、核磁気共鳴法により解析する事を目指します。その第一歩として、緑色蛍光蛋白質をモデル基質としてカプセルの中に閉じ込め、カプセルが安定に存在する条件を調べました。

研究成果の概要(英文)：Nuclear magnetic resonance spectroscopy is a powerful tool for the analysis of protein structure and dynamics in solution. This technique is, however, not able to analyze aggregated proteins and proteins which is in equilibrium in association and dissociation. To circumvent this major disadvantage, it is effective to encapsulate the target protein into the 'cage' composed of molecular chaperone from *Escherichia coli*. As a first step of the development of molecular chaperone encapsulating system, the long term stability of the molecular chaperone capsule was analyzed by using a green fluorescence protein as a model substrate.

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 分子シャペロン シャペロニン 核磁気共鳴 アミロイド

1. 研究開始当初の背景

本来水溶性の蛋白質が、アミロイド線維と呼ばれる会合体を形成し、様々な疾患の原因となっていることが明らかになってきた。中でも、およそ 40 残基からなるアミロイド (A) ペプチドが患者脳内に蓄積するアルツハイマー病は、老人性認知症の約半数を占め、その原因解明と治療戦略の確立は社会的にも重要な課題である。

申請者はこれまでに、溶液高分解能 NMR を用いて様々な蛋白質の構造解析を行ってきた。特に、有機溶媒による可溶化と組み合わせた重水素交換法は、アミロイド線維内部での蛋白質分子の二次構造を残基分解能で解析する手法として 200 回近く引用され、国内外を通じて高い評価を受けている。本手法は A にも適用され、固体 NMR による解析結果とともに、C 末端部分で規則正しい水素結合を形成した平行型シート構造からなるアミロイド構造が提唱されている。その一方で、神経細胞死を引き起こす原因となっているのは、不溶性のアミロイド線維ではなく、A ペプチド数分子からなる「可溶性オリゴマー」であることが明らかとなりつつある。しかしながら、神経細胞毒性をもつ可溶性オリゴマーがどのような構造をもち、またどのような機構により形成されるのか、多くの点が未解明である。

可溶性オリゴマーの構造解析を阻む最大の障壁は、構造転移の高い協同性にある(重合核依存性重合モデル: 図 1)。複数の分子の衝突によりごく「まれ」に形成された「核」に対し、引き続く付加重合は、急速かつほぼ不可逆的に進行する。その結果、多数の単量体分子が共存するなかで、ごく稀に形成される線維凝集核を回収することや、重合度も含めて構造的に均一に揃った可溶性オリゴマーを調製する事は不可能である。

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞毒性をもち、アルツハイマー病の主要因であるとされながら、過渡的にしか存在しえない A ペプチドのアミロイド線維凝集核の構造ならびにその形成機構を解明する事を目的とする。線維凝集核の構造解析を行なう上での最大の障壁は、上述したとおり、凝集核形成反応の進行しづらさならびに線維伸長反応の高い協同性にある。この問題点を克服するために、本研究では、申請者により開発された「分子シャペロンカプセル化システム」をさらに発展させ、A ペプチドに適用する。それにより、

1. カプセル内に封入する A 分子の数を厳密に制御する事により、
2. 重合度の均一に揃った可溶性オリゴマーを作製し、
3. 高分解能溶液 NMR による構造解析を行ない、
4. 固体 NMR により既に報告されている不

溶性アミロイド線維構造と比較することにより

5. アミロイド線維形成反応の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

大腸菌の分子シャペロン GroE は、GroEL/GroES の 2 種類のサブユニットが共同して巨大な中空の「カプセル」を形成する。これまでに、GroES と不可逆的に結合する SR398 変異型 GroEL を用いる事により、モデル基質蛋白質であるユビキチンをカプセル内部に隔離し、その二次元 NMR スペクトルを得る事に成功した。本研究では、これを応用・発展させ、7 分子の A ペプチドをカプセル内に封じ込め、会合数の揃った均質なオリゴマーを作製し、溶液多次元 NMR による構造解析を行なう。

SR398 変異型 GroEL は、7 量体で一つの機能的カプセルを形成する。単量体あたりシステイン残基を 1 つずつ導入した SR398-S43C と A2C-AB との間に選択的ジスルフィド架橋を形成させる。それにより、7 分子の A ペプチドを保持したカプセルを作製する。

前述の方法で得られた、7 分子の A ペプチドを保持した SR398 に、ATP 類似化合物ならびに GroES を添加し、カプセルを完成させる。その後、還元剤を添加し、SR398-A のジスルフィド結合を切断してカプセル内部に A 7 分子を遊離させる。それにより、外部から隔離した状態で重合反応を進行させる。カプセル内での A ペプチドの構造転移は、アミロイド線維に特異的な蛍光色素チオフラビン T により検出する。

上記の NMR 測定は、数時間から数日におよぶため、その間カプセルが安定に維持されている必要がある。そこで本研究では、以上の研究を遂行するにあたり鍵となる分子シャペロンカプセルの安定性を、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をモデル基質として用いて評価した。

4. 研究成果

(1) SR398/GFP/GroES 三重複合体の形成

SR398 に対して二倍量の酸変性した GFP を添加して両者の複合体を形成した後に、SR398 の 10 倍量の GroES と 2 mM の ATP γ S を添加した。これを Sephacryl S-300 ゲルろ過クロマトグラフィーにアプライしてその溶出曲線を、489 nm の GFP の吸光度をもとに検出した(図 1)。その結果、GFP 単独をアプライしたときに見られる 40 分の位置の溶出ピークの他に、SR398 と同一の 24 分の位置にもピークが観測された。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーにアプライする前に、分画分子量 100 kDa の限外ろ過膜で濃縮・希釈を繰り返したものをアプライした場合には、24 分の位置にのみピークが観測された。このことから、酸変性した GFP が SR398/GroES に取り込まれ、シャペロン内部に効率よく隔離され

る事、少なくともゲルろ過クロマトグラフィーが完了する1時間程度の間はSR398/GFP/GroES 三重複合体が安定に存在する事が明らかとなった。

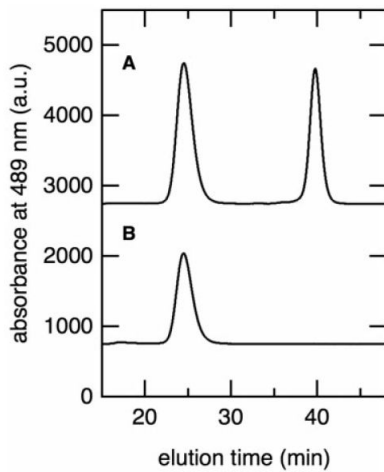


図1 SR398/GFP/GroES 三重複合体のゲルろ過 HPLC 溶出曲線。複合体形成直後(A)、ならびに分画分子量 100 kDa の限外ろ過膜にて過剰量の GFP, GroES を取り除いたもの(B)。

(2) SR398/GFP/GroES 三重複合体の安定性

次に、SR398/GFP/GroES 三重複合体のより長時間における安定性を評価した。(1)と同様に複合体を作製して限外ろ過膜で単離したものを 37 °C で 32 時間インキュベートした後に、ゲルろ過クロマトグラフィーにアプライした。

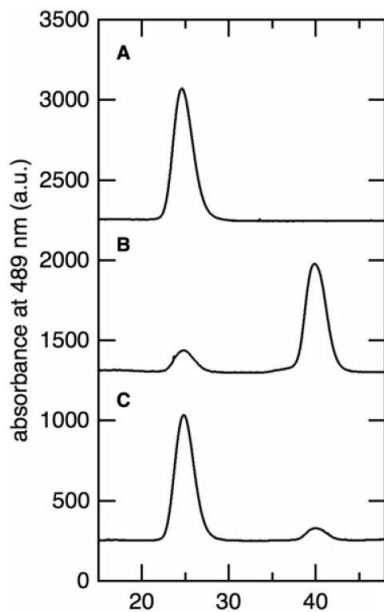


図2 SR398/GFP/GroES 三重複合体のゲルろ過 HPLC 溶出曲線。単離直後の複合体(A)、過剰量の ATP γ S 非存在下(B)、存在下(C)で 32 時間インキュベートしたもの。

その結果、32 時間のインキュベートの後にはほぼ全ての GFP は SR398/GroES から解離し、40 分の位置に溶出した(図 2 B)。それに対し、2 mM の ATP γ S を共存させておく事により漏出が大部分抑制される事が明らかとなった(図 2 C)。

(3) SR398/GroES 二重複合体の安定性

次に、SR398 と GroES により形成される二重複合体の安定性が ATP γ S 存在下・非存在下でどのように変化するかをゲルろ過 HPLC ならびに SDS-PAGE によって調べた(図 3)。複合体を形成・単離したものを 37 °C で 32 時間インキュベートしたのちにゲルろ過 HPLC で溶出曲線を解析した。その結果、予想に反して ATP γ S 存在下だけでなく、非存在下においても SR398 と GroES はほとんど解離する事なく 25 分の位置に溶出する事が明らかとなった。

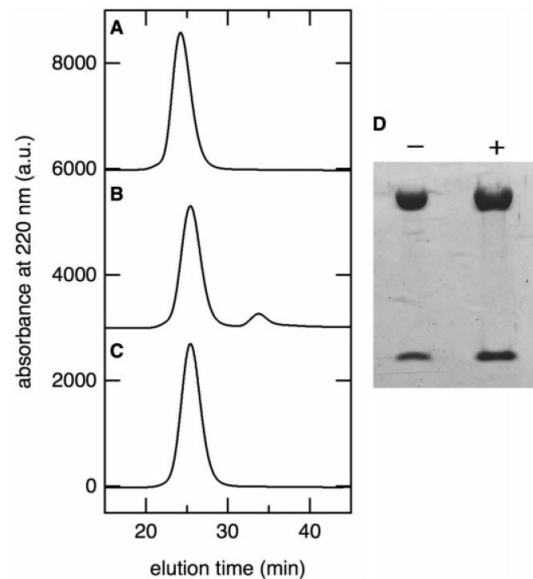


図3 SR398/GroES 二重複合体のゲルろ過 HPLC 溶出曲線。単離直後の複合体(A)、過剰量の ATP γ S 非存在下(B)、存在下(C)で 32 時間インキュベートしたもの。(B)および(C)において 24 分に溶出したピークを分取したものを SDS-PAGE にて解析した。どちらのピークも SR398 と GroES の両方を含んでいる。

(4) SR398 と GroES の結合・解離

(2)(3)の結果から、ATP γ S 非存在下において、GFP は三重複合体から解離する一方で、GroES は大部分 SR398 と結合していることが明らかとなった。この理由として、GroES は一旦解離するものの、すぐにまた SR398 に再結合するのではないかと考えた。この事を確認するために、GroES に Y71C の変異を入れて蛍光色素 Cy3 で標識したものを作製した。得られた Cy3-GroES を用いて SR398 と複合体を

形成させ、10 倍量の非標識の野生型 GroES を共存させた状態で、ATP γ S 非存在下・存在下において 32 時間インキュベートした後にゲルろ過 HPLC を用いて解析した。Cy3 の 552 nm における吸光度を指標として検出した(図 4)。その結果、ATP γ S 非存在下ではほぼ全ての Cy3-GroES は SR398 から解離して 33 分の位置に溶出した。一方、2 mM ATP γ S 存在下では約 70%の Cy3-GroES が SR398 と結合していた。このことから、ATP γ S 非存在下では GroES は SR398 と結合・解離を繰り返しており、ATP γ S が存在する場合にはその結合・解離の平衡が結合状態へと大きくシフトする事が明らかとなった。

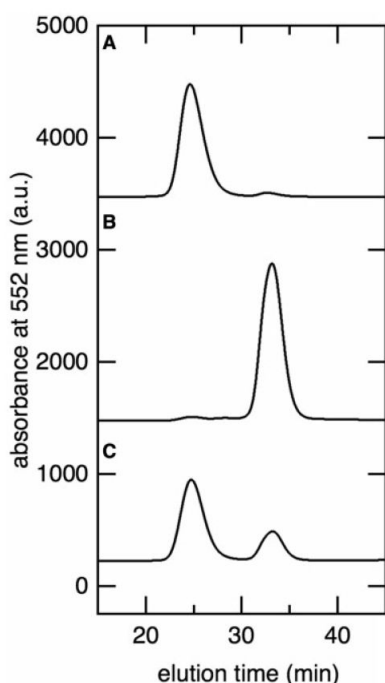


図 4 SR398/Cy3-GroES 二重複合体のゲルろ過 HPLC 溶出曲線。単離直後の複合体(A)、10 倍量の非標識野生型 GroES 共存下において、過剰量の ATP γ S 非存在下(B)、存在下(C)で 32 時間インキュベートしたもの。

(4) ヌクレオチドの結合・解離

これまでの結果から、SR398 では ATPase 活性が抑制されているものの、非常にゆっくりと ATP γ S が解離し、その結果として GroES もまた解離してしまうのだと考えた。一方、過剰量の ATP γ S 存在下においては、ATP γ S が解離すると同時に他の ATP γ S 分子が再結合することにより、見かけ上 GroES の解離が大幅に抑制されているのだと考えられる。実際に ATP γ S が結合・解離を繰り返しているのかを明らかにするために、SR398/GroES/ATP γ S 複合体に別の ATP 類似化合物である AMPPNP を共存させてインキュベートし、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて結合しているヌクレオチドを同定した(図 5)。その結果、

実際にヌクレオチドの交換反応が起きている事が明らかとなった。

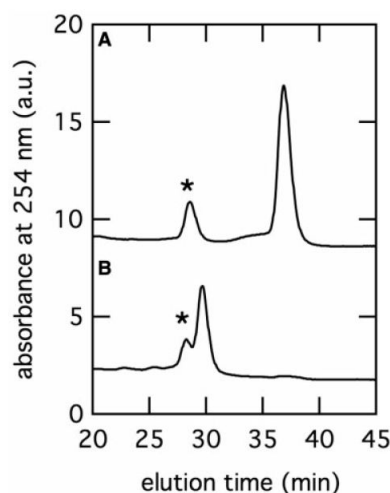


図 5 陰イオン交換クロマトグラフィーによる結合ヌクレオチドの同定。ATP γ S 存在下で形成した SR398/GroES 複合体に過剰量の AMPPNP を添加し直後に(A)あるいは 37 で 32 時間インキュベートしたものを、過塩素酸処理してタンパク質を沈殿させた。上清を Qセファロース陰イオン交換カラムにアプライした。ATP γ S は 37 分に、AMPPNP は 30 分に溶出する。28 分に溶出するピーク(アスタリスク)は過塩素酸処理の時に生じる副産物の ADP。

(6) 結論

SR398/GroES による分子シャペロンカプセル化システムを NMR 測定に応用するために、32 時間にわたる長時間のカプセルの安定性を、GFP をモデル基質として解析した。その結果、見かけ上のカプセルの安定性はヌクレオチドの有無により大きく異なり、ヌクレオチド非存在下では GFP はカプセルから容易に漏出した。一方、過剰量のヌクレオチドの存在により SR398 と GroES の結合・解離の平衡が結合状態に大きく傾く事により GFP のカプセルからの漏出は大部分抑制される事が明らかとなった。加水分解活性の低下した SR398 変異体においても、また加水分解されない ATP 類似化合物でも、ヌクレオチドのなればにそれに伴う GroES の結合・解離の平衡が存在する事が明らかとなった。

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 5 件)

1. S. Ishino, Y. Kawata, T. Ikegami, K. Matsuzaki & M. Hoshino (2014) Evaluation of the stability of an

- SR398/GroES chaperonin complex. *J. Biochemistry* 155 (5) 295-300. FEBS Lett. 587 (6) 620-624. 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvu009
2. T. Yamaguchi, K. Matsuzaki & M. Hoshino (2013) Interaction between soluble A β -(1-40) monomer and A β -(1-42) fibrils probed by paramagnetic relaxation enhancement. *FEBS Lett.* 587 (6) 620-624. 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.02.008
 3. S. Fukunaga, H. Ueno, T. Yamaguchi, Y. Yano, M. Hoshino & K. Matsuzaki (2012) GM1 cluster mediates formation of toxic A β fibrils by providing hydrophobic environments. *Biochemistry* 51 (41) 8125-8131. 査読有
DOI: 10.1021/bi300839u
 4. N. Hiramatsu, E. Hibino, K. Matsuzaki, J. Kuwahara & M. Hoshino (2012) Interaction between isolated transcriptional activation domains of Sp1 revealed by heteronuclear magnetic resonance. *Protein Sci.* 21 (10) 1481-1488. 査読有
DOI: 10.1002/pro.2137
 5. K. Kobayashi, S. Oishi, R. Hayashi, K. Tomita, T. Kubo, N. Tanahara, H. Ohno, Y. Yoshikawa, T. Furuya, M. Hoshino & N. Fujii (2012) Structure-Activity Relationship Study of a CXC Chemokine Receptor Type 4 Antagonist, FC131, Using a Series of Alkene Dipeptide Isosteres. *J. Med. Chem.* 55 (6) 2746-2757. 査読有
DOI: 10.1021/jm2016914

〔学会発表〕(計10件)

1. 星野 大、溶液NMRによるアミロイドペプチドの相互作用解析、日本薬学会北陸支部特別講演会、2013年12月13日、富山大学杉谷キャンパス
2. 星野 大、転写因子 Sp1 と TAF4 の天然変性領域を介した相互作用の解析、新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」領域会議、2013年9月3日～5日、ひだホテルプラザ
3. S. Ishino, K. Matsuzaki & M. Hoshino, Revisiting the stability of an SR398/GroES chaperonin complex. 第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日～14日、とりぎん文化会館
4. 日比野 絵美, 桑原 淳, 松崎 勝巳, 星野 大、転写因子 Sp1 と TAF4 の天然変性領域を介した相互作用の解析、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日～14日、とりぎん文化会館
5. 星野 大、アミロイド ペプチドの線維

- 形成機構の解析、R-GIRO プロジェクトセミナー「蛋白質のフォールディングおよびフォールディング病発症機構の解明のための統合研究」、2013年3月16日、立命館大学 生命科学部・薬学部
6. E. Hibino, J. Kuwahara, K. Matsuzaki & M. Hoshino, Interaction between transcriptional activation domains of Sp1 and TAF4 examined by heteronuclear magnetic resonance. 新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第2回国際シンポジウム、2013年1月23日～24日、理化学研究所 横浜研究所交流棟ホール
 7. 星野 大、分子シャペロンカプセル化システムの構築、大阪大学蛋白質研究所セミナー「分子シャペロンの機能発現の展開と細胞制御」、2012年11月15日～16日、大阪大学蛋白質研究所
 8. 星野 大、グルタミンリッチ型転写活性化ドメインの相互作用解析、新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」領域会議、2012年5月30日～6月1日、北広島クラッセホテル
 9. 平松 直子, 日比野 絵美, 松崎 勝巳, 桑原 淳, 星野 大、転写因子 Sp1 の転写活性化ドメイン間相互作用の解明、第9回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2011年9月12日～13日、ホテル箱根アカデミー
 10. 平松 直子, 日比野 絵美, 松崎 勝巳, 桑原 淳, 星野 大、転写因子 Sp1 の転写活性化ドメイン間相互作用の解明、第11回日本蛋白質科学会年会、2011年6月7日～9日、ホテル阪急エキスポパーク

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 大 (HOSHINO Masaru)

京都大学大学院・薬学研究科・准教授

研究者番号：70304053

(3) 連携研究者

池上 貴久 (IKEGAMI Takahisa)

大阪大学たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：20283939