

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月23日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770188

研究課題名（和文）線維前駆中間体の構造解析によるアミロイドーシス伝播機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of the self-propagation of amyloid fibrils explored by structural analysis of prefibrillar intermediates

研究代表者

茶谷 絵理（CHATANI ERI）

神戸大学大学院・理学研究科・准教授

研究者番号：00432493

研究成果の概要（和文）：

アミロイド線維は、タンパク質のミスフォールディングによって形成される超分子重合体であり、数多くの変性疾患に関わることから注目を集めている。中でも、アミロイド線維が自らの末端構造を鋳型としてモノマー体が結合し、線維構造を複製する「核依存性伸長反応」が疾病の感染や伝播の分子基盤として重要視されているが、詳細な機構は明らかにされていない。そこで、本研究では、インスリンを題材として、線維形成初期に形成する線維前駆中間体構造を捉え、詳細な構造特徴の解析を行い、伝播に関与するアミノ酸配列領域を推定した。

研究成果の概要（英文）：

Protein misfolding occasionally leads to the formation of supramolecular assemblies known as amyloid fibrils, the deposition of which is associated with numerous diseases. One of the most unique and essential properties of amyloid fibrils is their template-dependent growth, which underlies the propagation of pathology of amyloidoses. In this study, we trapped a prefibrillar intermediate of insulin formed transiently in the early stage of fibrillation reaction and from detailed structural properties analyzed by using AFM, FTIR, and proteolytic digestion, several regions have proved to be essential for the amyloid propagation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学、生物物理学

キーワード：タンパク質、フォールディング、ミスフォールディング、アミロイド線維、線維前駆中間体、NMR、インスリン

1. 研究開始当初の背景

(1) アミロイド線維について

アミロイド線維は、タンパク質の誤った折りたたみによって形成される超分子集合体である。これまでに、プリオン病やアルツハイマー病、透析アミロイドーシスなどに関わる30種類以上のアミロイド線維が報告されてい

る。さらに最近では、パーキンソン病やハンチントン病に代表される神経変性疾患に見られる沈着物もアミロイド線維に類似した特徴を示すことが明らかになり、アミロイド線維の構造形成原理は解明すべき重要な課題と考えられている。

アミロイド線維は、自らの末端構造を鋳型としてモノマー体が順次に結合し、成長して

いくことによって線維軸に沿って自己の構造を複製し、伝播させることができる。この反応様式を「核依存性伸長」というが、鋳型構造をどのように認識し再現してゆくのかの分子機構は明らかにされていない。そこで本研究では、アミロイド線維の末端で構造が複製し、構造伝播する分子機構をアミノ酸残基レベルで解明することを目的とした。

(2) これまでの経緯

アミロイド線維の伝播機構解明のための第一の研究として、研究代表者らは、透析アミロイドーシスの原因タンパク質である β_2 ミクログロブリンを用いて、アミロイド線維伸長反応にて経過することが予想される「伸長中間体」を捉え特性を明らかにする研究を進めてきた(図1)。

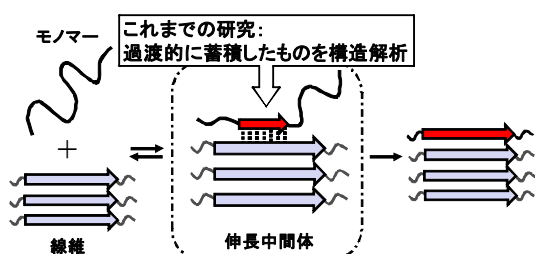


図1. アミロイド線維の核依存性伸長反応(アミロイド線維の構造伝播)とこれまでの研究内容の概略

β_2 ミクログロブリンは、酸性条件下でアミロイド線維の断片(シード)を核として添加すると、アミロイド線維の伸長が速やかに進行するが、アミロイド線維の伸長過程に対する中間体の構造観察例は、一例も存在していなかった。しかし、理論的には、シードの末端にモノマー分子が結合した伸長中間体を経過することが予想される。さらに、伸長反応を酵素反応に見立てると、過剰量の線維(酵素)に少量のモノマー(基質)を添加すれば、酵素反応の前定常状態のように伸長中間体(酵素・基質複合中間体)が過渡的に蓄積する可能性が考えられる。

そこで、トリプトファン蛍光をプローブに用いて、一定濃度の希薄モノマー溶液に様々な濃度でシードを加えて測定を行った結果、過渡的な中間体の蓄積を確認することに成功した(Chatani *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2010))。続いて、より詳細な伸長中間体の構造特徴を明らかにするため、タンパク質フォールディングにおける中間体の解析を飛躍的に進めた画期的手法である水素/重水素(H/D)標識-NMR

法を用いての構造解析を試みた。中間体を蓄積させた直後に試料のpHを瞬時に変化させて、ごく短いH/D交換パルスを与え、各アミノ酸残基の交換程度を ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルをもちいて調べた。その結果、中間体構造では、新たに付着したモノマー体はほぼほどこけた状態で弱く線維と結合していることが明らかとなった。さらに、酸変性構造に存在する疎水性クラスターまでがほどこけているという興味深い特徴もわかり、ほどこけて露出した疎水性クラスター領域が伸長時に線維との相互作用に貢献していることが示唆された(発表論文2,3)。

2. 研究の目的

以上の結果から、アミロイド線維の構造伝播には、限られた領域のみが線維末端の認識に関与している可能性が考えられた。そこで、伝播性に重要な役割を果たす配列領域を具体的に特定するために、本課題では、「アミロイド線維前駆中間体」を新たに捕捉し構造解析することを試みた。

自発的なアミロイド線維形成反応では、その初期過程に、オリゴマーやプロトフィブリルなどの線維前駆中間体を形成することがしばしば観察される(図2)。興味深いことに、これらの前駆中間体では、 β シート構造に富んだ立体構造(クロス β 構造)が完全には構築されておらず、伝播性も発現していないことが多い。そこで、この中間体を捕捉して成熟アミロイド線維と構造比較することで、伝播性が発現するために必要なクロス β 構造の領域を明らかにできるのではないかと考え、本中間体の捕捉を検討した。

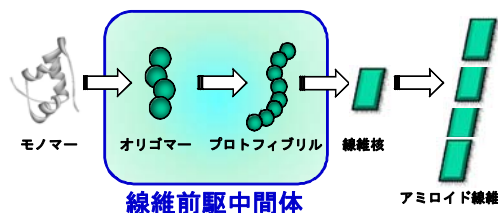


図2. 線維形成反応途中で形成される線維前駆中間体の概略図

3. 研究の方法

本研究では、ウシ由来インスリンをモデルタンパク質として選択した。まず、線維前駆中間体を過渡的に蓄積する経路の探索を行った。インスリンは、酸性条件下で加熱するだ

けで容易に核形成し、自発的な線維形成が進行する。これを基本条件としたうえで、アミロイド線維形成反応の溶媒条件や反応温度を変化させながら、線維前駆中間体が形成し、安定に捕捉が可能なる条件を調べた。

得られた線維前駆中間体については、原子間力顕微鏡による形状観察および、FTIR を用いたクロス β 構造の性質、含量の解析を行い、成熟型アミロイド線維との違いを解析した。さらに、捕捉した線維前駆中間体のクロス β 構造形成部位を明らかにするために、プロテアーゼ消化による構造解析を行った。線維前駆中間体と成熟線維にトリプシンを一定時間作用させて切断し、生成したペプチドフラグメントを MALDI-TOF 解析により同定した。前駆体と成熟型アミロイド線維の間で酵素消化の感受性の違いを評価し、中間体のみにおいて特に切断されやすい領域の有無を解析した。

4. 研究成果

(1) 凝集中間体を過渡的に蓄積する経路の探索

線維形成反応は、アミロイド線維の検出に頻用されているチオフラビン T 蛍光を用いて追跡した。様々な形成条件を検討した結果、高濃度の塩添加と高温条件の組み合わせで線維形成反応を進行させると、反応開始直後に著しいチオフラビン T 蛍光の上昇が確認され、その後低い値へと収束するという、通常の S 字状とは異なるパターンが確認された(図3)。原子間力顕微鏡観察と赤外吸収スペクトル解析を行ったところ、高いチオフラビン T 蛍光を示す時間領域では、クロス β 構造が未成熟で微細なアミロイド線維が形成しており、その後、これらが会合してさらにクロス β 構造

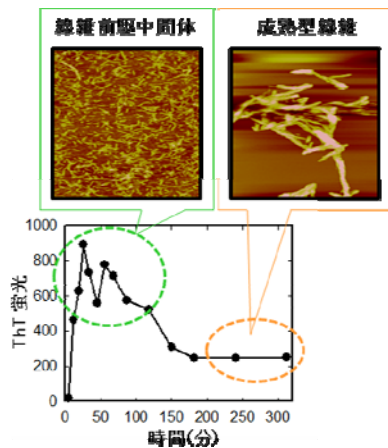


図3. インスリンの線維前駆体の過渡的な蓄積

を発達させ、太く成熟したアミロイド線維になることが分かった(図3)。さらに、得られた中間体および成熟線維を超音波破砕により断片化し、新たなインスリン水溶液に添加してシーディング反応を行った結果、後半のクロス β 構造の形成が形成するまでアミロイド線維の伝播性も発揮されておらず、反応開始直後に形成される微細なアミロイド線維は、オリゴマーやプロトフィブリルに相当するアミロイド線維前駆中間体に相当することが考えられた。

(2) 中間体および成熟アミロイド線維の構造解析

線維前駆中間体の構造特徴を明らかにするために、FTIR スペクトル測定を行った。その結果、線維前駆中間体ではクロス β 構造が未成熟であり、一部のクロス β 構造のみが形成されていた。さらに、成熟化が進むにつれて、クロス β 構造がさらに発達する様子が確認された(図4)。このことより、段階的にクロス β 構造が発達することが実証され、アミロイ

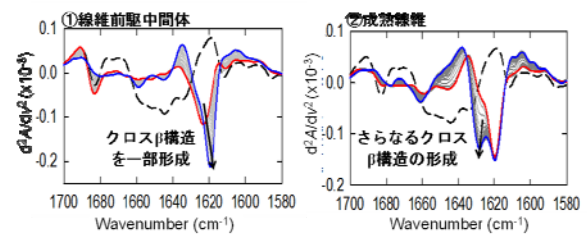


図4. 線維前駆中間体と成熟型線維の FTIR 二次微分スペクトル

ド線維の自己触媒的複製には特定のクロス β 構造領域が関与する可能性が考えられた。

そこで、得られた前駆中間体についてプロテアーゼ消化による構造解析を行い、クロス β 構造形成部位を明らかにしようとした。線維前駆中間体および成熟したアミロイド線維をそれぞれトリプシン処理し、切断されたアミノ酸配列領域を決定した。その結果、前駆体のみで酵素消化されやすい領域が存在することが確認された(図5、緑色部分)。

線維前駆中間体で構造化していない領域は、中間体からアミロイド線維へと成熟化する際にクロス β 構造を形成する領域であることに留意すると、前駆体のみで酵素消化されやすい領域は、アミロイド線維の伝播に貢献する部位に相当すると考えられる。このように、アミロイド線維の伝播性に関わる可能性の高い配列領域が初めて実験的に提案された。本研究成果については、学会発表をおこなった。論文投稿については近日

中に行う予定である。

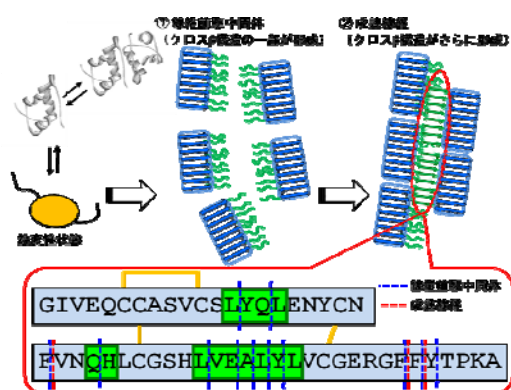


図5. 本研究から提案された前駆中間体を経た線維形成のスキームと、トリプシン消化による切断部位のまとめ

以上の結果から、アミロイド線維末端でモノマー分子が結合し構造変化する際に関わるのは、全アミノ酸配列のうち限られた領域に限定されていることが考えられた。これは、構造複製の基本原理をアミノ酸残基レベルで理解するために重要な知見であると考えている。今後、当該領域について、アミノ酸置換効果の解析を行いアミロイドーシスの感染や伝播の根底にある分子機構を解明し、最終的に高効率な線維化の阻害手法の確立を目指したいと考えている。さらに、アルコール共存下で β_2 ミクログロブリン線維の構造多形が濃度依存的に生成することを見つけ、 β_2 ミクログロブリン線維の多形線維では伸長速度が異なることが示された(発表論文1)。今後、アミロイド線維の多形構造についても上記の解析を行うことにより、構造伝播反応に関わる相互作用がより具体的に明らかになると期待される。

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. Eri Chatani, Hisashi Yagi, Hironobu Naiki, and Yuji Goto "Polymorphism of β_2 -microglobulin amyloid fibrils manifested by ultrasonication-enhanced fibril formation in trifluoroethanol" *J. Biol. Chem.* **287**, 22827-22837 (2012), 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M111.333310
2. 茶谷 絵理, 小沼 剛, 後藤 祐児 "アミロイド線維伸長における中間体構造の捕

捉と構造解析" *生物物理* **52**, 148-149 (2012), 査読有

3. Tsuyoshi Konuma[†], Eri Chatani[†], Masanori Yagi, Kazumasa Sakurai, Takahisa Ikegami, Hironobu Naiki, and Yuji Goto ([†]equally contributed) "Kinetic intermediates of β_2 -microglobulin fibril elongation probed by pulse-labeling H/D exchange combined with NMR analysis" *J. Mol. Biol.* **405**, 851-862 (2011), 査読有
DOI: 10.1016/j.jmb.2010.11.029

[学会発表] (計22件)

1. 土坂 祐太郎, 増田 裕輝, 茶谷 絵理, ツェンコヴァ ルミヤナ「近赤外分光法を用いたインスリンアミロイド形成過程の非破壊モニタリング」, 第28回近赤外フォーラム, 那覇, 2013年3月8日
2. 増田 裕輝, 茶谷 絵理「アミロイド線維形成に及ぼすイオンの作用機構」神戸大学研究基盤センター「若手フロンティア研究会2012」, 神戸, 2012年12月25日
3. 増田 裕輝, 茶谷 絵理「アミロイド線維形成に及ぼすイオンの作用機構」第85回日本生化学会年会, 博多, 2012年12月15日
4. 茶谷 絵理「アミロイド線維形成機構と制御の解析」横浜国立大学大学院研究セミナー: 機能性生体分子の構造生物学的研究, 横浜, 2012年12月12日
5. 茶谷 絵理, 井上 倫太郎, 西田 幸次, 金谷 利治, 山本 雅英「小角X線散乱によるアミロイド線維形成の初期会合プロセスの解析」第50回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2012年9月22日
6. 増田 裕輝, 茶谷 絵理「インスリンアミロイド線維形成に対するイオンの作用機構」第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 2012年6月21日
7. 茶谷 絵理, 今村 比呂志, 山本 直樹, 加藤 稔「インスリンアミロイド線維前駆中間体の捕捉と構造解析」第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 2012年6月20日
8. 井上 倫太郎, 茶谷 絵理, 西田 幸次, 金谷 利治, 山本 雅英「小角X線散乱によるアミロイド線維の構造解析」第61回高分子学会年次大会, 横浜, 2012年5月31日
9. 茶谷 絵理「アミロイド線維の形成機構」奈良女子大学酵素クラブ第3回セミナー, 奈良, 2012年5月11日
10. 茶谷 絵理「アミロイド線維伸長反応の分子機構」

- 神戸大学先端融合科学シンポジウム：蛋白質アセンブリ - 会合・超分子化・凝集 -, 神戸, 2012年2月1日
11. 山置 佑大, 茶谷 絵理, 今村比呂志, 高尾 英佑, 加藤 稔「アミロイド β 19-34断片と変異体モノマーのターン構造形成能とアミロイド線維形成能」
神戸大学先端融合科学シンポジウム：蛋白質アセンブリ - 会合・超分子化・凝集 -, 神戸, 2012年1月31日
 12. 増田 裕輝, 茶谷 絵理「インスリンアミロイド線維形成に及ぼすカチオンとアニオンの影響」
神戸大学先端融合科学シンポジウム：蛋白質アセンブリ - 会合・超分子化・凝集 -, 神戸, 2012年1月31日
 13. 秦 和澄, 秋田 まゆみ, 位田 雅俊, 茶谷 絵理, 加藤 稔「FT-IRと蛍光による α シヌクレインのアミロイド線維形成の解析と圧力解離」
神戸大学先端融合科学シンポジウム：蛋白質アセンブリ - 会合・超分子化・凝集 -, 神戸, 2012年1月31日
 14. Yudai Yamaoki, Eri Chatani, Hiroshi Imamura, Eisuke Takao, and Minoru Kato "The relationship between the abilities of amyloid fibril formation and turn structure formation: study of amyloid- β peptide fragment A β 19-34 and its mutants with high turn propensity"
6th International Meeting on Biomolecules under Pressure, 大津, 2011年12月13日
 15. Takahiro Shibata, Eri Chatani, Hiroshi Imamura, Eisuke Takao, and Minoru Kato "The polymorphic structures of insulin amyloid fibrils formed at natural pH"
第49回日本生物物理学会年会, 姫路, 2011年9月16日
 16. Eisuke Takao, Eri Chatani, Hiroshi Imamura, and Minoru Kato "Atomic force microscopy study of the stepwise organization of insulin amyloid fibrils"
第49回日本生物物理学会年会, 姫路, 2011年9月16日
 17. Rintaro Inoue, Eri Chatani, Hiroshi Imamura, Toshiji Kanaya, Koji Nishida, Minoru Kato, Sono Sasaki, Hiroki Ogawa, Hiroyasu Masunaga, and Masahide Yamamoto "Mechanism of amyloid fibril formation as revealed by small angle X-ray scattering"
第49回日本生物物理学会年会, 姫路, 2011年9月16日
 18. 茶谷 絵理「タンパク質凝集と食品：アミロイド線維の形成機構」
シンポジウム：新たな機能性食品開発へ向けた取り組み - 異分野融合による機能性食品のイノベーション -, 神戸, 2011年9月10日
 19. Eri Chatani, Tsuyoshi Konuma, Reina Ohnishi, Masanori Yagi, Kazumasa Sakurai, Takahisa Ikegami, Hironobu Naiki, and Yuji Goto "Kinetic intermediate of β_2 -microglobulin fibril elongation probed by tryptophan fluorescence spectroscopy and H/D exchange-NMR"
Conference "Amyloid Fibrils, Prions and Precursors: Molecules for Targeted Intervention", ドイツ, 2011年8月26日
 20. 茶谷 絵理「超音波を用いたアミロイド線維の微細化・均一化の試み」
第12回若手NMR研究会, 滋賀, 2011年6月24日
 21. 茶谷 絵理, 小沼剛, 大西玲奈, 八木正典, 櫻井一正, 池上貴久, 内木宏延, 後藤祐児「伸長反応中間体の観察によるアミロイド構造伝播機構の解明」
第11回日本蛋白質科学会年会, 大阪, 2011年6月9日
 22. 茶谷 絵理「異常凝集の構造生物学 - β_2 ミクログロブリンアミロイド伸長中間体の構造解析 -」
大阪大学蛋白質研究所セミナー：蛋白質異常凝集の原理と制御, 大阪, 2011年4月27日
6. 研究組織
(1) 研究代表者
茶谷 絵理 (CHATANI ERI)
神戸大学大学院・理学研究科
研究者番号：00432493