

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 5 月 31 日現在

機関番号： 82648

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2011 ~ 2012

課題番号： 23870043

研究課題名（和文）アミロイド線維末端の特異構造の解明に基づく線維伸長メカニズムの理解

研究課題名（英文）Characterization of conformational dynamics of the active end of amyloid fibril to elucidate mechanisms underlying the fibril elongation

研究代表者

矢木 真穂 (YAGI MAHO)

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任助教

研究者番号： 40608999

研究成果の概要（和文）：アミロイド線維の形成メカニズムを分子構造論的に理解するために、線維末端における特異構造の解明を試みた。まずはじめに、精密構造解析を行う上で必要なアミロイド線維断片のデザインおよび作製に取り組んだ。アミロイド線維断片の小型モデルとして4~5分子のアミロイド β ($A\beta$) を遺伝子工学的に連結したタンデム型 $A\beta$ を作製し、 $A\beta$ の線維末端に特異的に結合する抗体によって認識されること、および、モノマー $A\beta$ の線維形成を促進する核として機能することを明らかとした。さらに分子シャペロンや特定のガングリオシドを組み込んだ脂質2重膜上において、 $A\beta$ の線維伸長が抑制されることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：To characterize the conformational dynamics of the active end of amyloid fibril, we attempted to design small-sized amyloid fibril models. We successfully prepared tandem repeats of amyloid β ($A\beta$) molecules as minimal models of the amyloid fibrils by genetic manipulation. It was revealed that the tandem-repeat $A\beta$ was recognized by the specific antibody directed against the end point of $A\beta$ amyloid fibrils and served as nucleus which promoted the amyloid fibrillization. Furthermore, we found that bacterial molecular chaperones and ganglioside-embedding bicelles could suppress formation of $A\beta$ fibrils.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物物理学

キーワード：アミロイド、アルツハイマー病、抗体、NMR

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やプリオン病といった神経変性疾患の発症には、神経細胞膜上でク

ラスターを形成している糖脂質の存在が深く関わっていることが明らかにされつつある。特に最近、神経系に豊富に存在する GM1

ガングリオシドは、アルツハイマー病に関わるアミロイド β ($A\beta$) ペプチドの異常会合を引き起こすことが注目されている。 $A\beta$ は非共有結合を介して重合することで巨大な凝集体 (アミロイド線維) を形成することが知られており、この反応は神経細胞の豊富に存在するガングリオシド GM1 との相互作用を契機として促進されるという知見が蓄積されてきている。しかしながら、 $A\beta$ の重合開始および線維伸長の分子メカニズムは明らかとはなっていない。 $A\beta$ をはじめとするアミロイド線維の形成は多段階の過程からなっており、 $A\beta$ の線維伸長は、線維末端の特異構造が触媒的に作用し、モノマー $A\beta$ を順次線維に取り込むことによって進行すると考えられる。しかしながら、これまでに線維伸長を誘起する分子間相互作用の実体を分子構造論の観点から捉えた研究例はないが、それは、そのような線維末端の特異構造を安定に留めることが不可能であったためである。したがって、線維伸長の末端に現れる特異構造を保持しつつ線維伸長を抑える実験系をデザインすることができれば、その精密な構造情報を抽出できると考えた。

2. 研究の目的

$A\beta$ は、 β シート構造が規則正しく多数積み重なったアミロイド線維を形成して脳内に蓄積することにより、アルツハイマー病の発症を惹起すると考えられている。しかし、これまでに線維伸長を誘起する分子間相互作用の実体を分子構造論の観点から捉えた研究例はない。申請者は、アミロイド線維の“線維末端”に特異な柔構造が形成されているものと想定し、X 線結晶構造解析法や核磁気共鳴 (NMR) 法などの構造化学的手法を用いて、 $A\beta$ 線維の伸長末端における特異構造を原子レベルの分解能で解明する。さらに、アミロイド一般に通じる伸長メカニズムの構造基盤を明らかにし、それらが関与する疾患の発症機構を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

アミロイド線維末端は、動的でかつ不安定な過渡的中間体としての性質を有しており、その構造を安定にとどめることはこれまで不可能であった。逆に言えば、線維伸長の末端に現れる特異構造を保持しつつ線維伸長を抑止する実験系をデザインすることができれば、その精密な構造情報を得ることができると考えた。そこで $A\beta$ を連結した小型かつ均一な $A\beta$ 線維断片を作製し、線維形成を制御することを試みた。さらに、アミロイド線維末端を特異的に認識する抗体を利用して、線維伸長を誘起する活性構造を安定に捕

捉することにより、その構造解析を実施することを試みた。

4. 研究成果

アミロイド線維の形成メカニズムを分子構造論的に理解するために、線維末端における特異構造の解明を試みた。まずはじめに、精密構造解析を行う上で必要なアミロイド線維断片のデザインおよび作製に取り組んだ。アミロイド線維断片の小型モデルとして 4~5 分子の $A\beta$ を遺伝子工学的に連結したタンDEM型 $A\beta$ を作製し、 $A\beta$ の線維末端に特異的に結合する抗体によって認識されること、および、モノマー $A\beta$ の線維形成を促進する核として機能することを明らかとした。さらに分子シャペロンや特定のガングリオシドを組み込んだ脂質 2 重膜上において、 $A\beta$ の線維伸長が抑制されることを明らかとした。

さらにそのような特異な末端構造を安定化する方法として、分子シャペロンやモデル糖脂質膜を用い、チオフラビン T アッセイおよび NMR 計測をはじめとする分光学的計測を実施した。その結果、分子シャペロン GroEL や特定のガングリオシドを組み込んだ脂質 2 重膜上において、 $A\beta$ の線維伸長が抑制されることが判明した。さらに、一定の計測時間中、その結合状態を安定にとどめることが可能となり、両者の相互作用様式を NMR 法を用いて捉えることができた。また、 $A\beta$ を連結した小型かつ均一なタンDEM $A\beta$ 線維断片を作製し、NMR 解析を行った結果、タンDEM $A\beta$ は溶液中で 2 量体を形成していることが判明した。

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 15 件)

- ① Maho Yagi-Utsumi, Tomoko Kunihara, Takashi Nakamura, Yoshinori Uekusa, Koki Makabe, Kunihiko Kuwajima, Koichi Kato. NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid β as a model ligand. FEBS Lett., 587, 1605-1609 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.04.007.
- ② Noritaka Nishida, Maho Yagi-Utsumi, Fumihiro Motojima, Masasuke Yoshida, Ichio Shimada, Koichi Kato. Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing interactions between the bacterial chaperonin GroEL and

- unstructured proteins. *J. Biosci. Bioeng.*, in press (2013) 査読有
DOI: pii: S1389-1723(13)00054-6.
10.1016/j.jbiosc.2013.02.012.
- ③ Eiji Kurimoto, Kimiko Kuroki, Yoshiki Yamaguchi, Maho Yagi-Utsumi, Takahiro Igaki, Takeshi Iguchi, Katsumi Maenaka, Koichi Kato. Structural and functional mosaic nature of MHC class I molecules in their peptide-free form. *Molecular Immunology*, 55, 393-399 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.molimm.2013.03.014.
- ④ Mahesh S. Chandak, Takashi Nakamura, Toshio Takenaka, Tapan K. Chaudhuri, Maho Yagi-Utsumi, Jin Chen, Koichi Kato, Kunihiro Kuwajima. The use of spin desalting columns in DMSO-quenched H/D-exchange NMR experiments. *Protein Science*, 22, 486-491 (2013) 査読有
DOI: 10.1002/pro.2221.
- ⑤ Soichiro Kitazawa, Tomoshi Kameda, Maho Yagi-Utsumi, Kenji Sugase, Nicola J. Baxter, Koichi Kato, Michael P. Williamson, Ryo Kitahara. Solution structure of the Q41N variant of ubiquitin as a model for the alternatively folded N2 state of ubiquitin. *Biochemistry*. 52, 1874-1885 (2013) 査読有
DOI: 10.1021/bi301420m.
- ⑥ Maho Yagi-Utsumi, Yoshiki Yamaguchi, Pornthip Boonsri, Takeshi Iguchi, Kazuo Okemoto, Shunji Natori, Koichi Kato. Stable isotope-assisted NMR characterization of interaction between lipid A and sarcotoxin IA, a cecropin-type antibacterial peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 431, 136-140 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.009.
- ⑦ Takumi Yamaguchi, Tsuyoshi Uno, Yoshinori Uekusa, Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato. Ganglioside-embedding small bicelles for probing membrane-landing processes of intrinsically disordered proteins. *Chem. Commun.*, 49, 1235-1237 (2013) 査読有
DOI: 10.1039/c2cc38016a.
- ⑧ Daishi Fujita, Kosuke Suzuki, Sato Sota, Maho Yagi-Utsumi, Yoshiki Yamaguchi, Nobuhiro Mizuno, Takashi kumasaka, Masaki Takata, Nasanori Noda, Susumu Uchiyama, Koichi Kato, Makoto Fujita. Protein encapsulation within synthetic molecular hosts. *Nature Communications*, 3, 1093 (2012) 査読有
DOI: 10.1038/ncomms2093
- ⑨ Maho Yagi-Utsumi, Sumi Yoshikawa, Yoshiki Yamaguchi, Yohei Nishi, Eiji Kurimoto, Yoshihito Ishida, Takayuki Homma, Jun Hoseki, Yoshimi Nishikawa, Takaki Koide, Kazuhiro Nagata, Koichi Kato. NMR and mutational identification of the collagen-binding site of the chaperone Hsp47. *PLoS One*, 7, e45930 (2012) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0045930.
- ⑩ Hirokazu Yagi, Kazuhiro Ishimoto, Takeshi Hiromoto, Hiroaki Fujita, Tsunehiro Mizushima, Yoshinori Uekusa, Maho Yagi-Utsumi, Eiji Kurimoto, Masanori Noda, Susumu Uchiyama, Fuminori Tokunaga, Kazuhiro Iwai and Koichi Kato. A non-canonical UBA-UBL interaction forms the linear-ubiquitin-chain assembly complex. *EMBO reports*, 13, 462-468 (2012) 査読有
DOI: 10.1038/embor.2012.24.
- ⑪ Maho Yagi-Utsumi, Expression and purification of isotopically labeled amyloid β as ubiquitin-fused protein in *E. coli*. *Protein Science Society of Japan Archives*, 5, e065 (2012) 査読有
http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Expression/amy_02/amy_02_01.html
- ⑫ Yukiko Kamiya, Maho Yagi-Utsumi, Hirokazu Yagi, and Koichi Kato. Structural and molecular basis of carbohydrate-protein interaction systems as potential therapeutic targets. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 1672-1684 (2011) 査読有
DOI: 10.2174/138161211796355074

[学会発表] (計 15 件)

- ① Maho Yagi-Utsumi, Takumi Yamaguchi,

Yoshinori Uekusa Koichi Kato. NMR approaches for characterizing molecular recognition process of intrinsically disordered proteins, Fifth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, 2013年2月25日, High1 Resort (Korea)

- ② Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato. NMR spectroscopic characterization of the pathogenic interaction of amyloid β peptide with GM1 clusters, Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013), 2013年1月24日, Bangsaen Beach(Thailand)
- ③ 矢木真穂、山口拓実、植草義徳、加藤晃一、NMR法による神経変性疾患関連タンパク質とガングリオシドクラスターとの相互作用解析、第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012年11月16日、京都大学薬学部（京都）
- ④ 矢木真穂、加藤晃一、ガングリオシドクラスターを舞台とするアミロイド β の構造転移と分子間相互作用、第11回日本蛋白質科学会、2011年6月8日、ホテル阪急エキスポパーク（大阪）
- ⑤ 矢木真穂、加藤晃一、ガングリオシドクラスターが誘起するアミロイド β 重合の開始機構の解明、第30回日本糖質学会年会、2011年7月12日、ハイブ長岡（新潟）
- ⑥ Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, NMR characterization of interaction modes of amyloid β with ganglioside clusters, 3rd Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology, 2011年10月27日, Shanghai Institute of Organic Chemistry (China)
- ⑦ Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Conformational transition and intermolecular interaction of amyloid β molecules promoted on ganglioside clusters, The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, 2011年11月16日, 大さん橋ホール（神奈川）

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.ac.jp/topics/2010/110217>

.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢木 真穂 (YAGI MAHO)

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任助教

研究者番号：40608999

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者