

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440071

研究課題名(和文) アミロイド線維の伝播性およびその発現メカニズムに関する構造的研究

研究課題名(英文) Structural basis of the self-propagation of amyloid fibrils and its manifestation

研究代表者

茶谷 絵理 (Chatani, Eri)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00432493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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り形成される凝集体の一種であり、数多くの疾患に関わる。アミロイド線維の持つ「伝播性」は、アミロイド線維の異常増殖、ひいては疾病の発症を担う重要な性質であるが、分子論的な実体は解明されていない。

そこで本研究では、インスリンとインスリン由来のペプチド断片について線維前駆中間体を捉え解析した。さらにインスリンについてはSAXSによる時分割測定を実施し、線維前駆中間体を経由したインスリン線維化プロセスを明らかにし、周囲の水分子にも着目するために、近赤外分光法を用いて核形成時の水の吸収スペクトルの変化観察も行った。

研究成果の概要(英文)：Amyloid fibrils are a form of protein aggregates associated with numerous diseases. One of the most unique and essential properties is their ability to self-propagate, which leads to the explosive amplification of amyloid fibrils and then the onset of the diseases; however, much remains to be elucidated regarding its molecular details how and when the propagating nuclei initially emerge.

In this study, we have trapped and characterized structural properties of prefibrillar intermediate species of insulin and an insulin-derived short peptide, and as for insulin, we have clarified time-dependent formation and evolution of the prefibrillar intermediates by time-resolved small angle X-ray scattering measurement. We also performed time-resolved NIR spectral measurement to clarify more details of the water molecular system dynamics during the nucleation.

研究分野：生物学

キーワード：蛋白質 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 中間体 インスリン 伝播性

1. 研究開始当初の背景

(1) アミロイド線維とは

アミロイド線維は、数多くの重篤な疾病に関与するタンパク質凝集体である。これまでにプリオン病やアルツハイマー病などに関わる 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であると認識されたことで、その構造形成原理には強い関心が寄せられている。

アミロイド線維の形成反応は、おもに核生成とそれに続く成長の 2 段階から構成されるが、核生成は、基本的に起こりにくくアミロイド線維形成反応全体の律速となっている。しかし、一旦核が生成すると、核の持つ伝播性により自己触媒的に成長・増殖し高確率で発病に至る。このように、アミロイド線維の伝播性は、アミロイド線維の異常増殖、ひいては疾病の発症を担う重要な性質であると考えられるが、その分子論的な実体は十分に理解されていない。

(2) これまでの経緯

研究代表者らは、これまでにアミロイド線維の伝播性を担う構造上の特性を明らかにし、さらに伝播性が発現するまでのタンパク質の構造変化について、アミノ酸残基レベルで解明することを目標とした研究を行ってきた。

まず、アミロイド線維の伸長過程に存在することが予想される線維・モノマー複合中間体を捉え、核依存性伸長に伴うタンパク質の構造変化を明らかにする研究に取り組んできた。β2 ミクログロブリンを解析した結果、シード末端と相互作用しているモノマーの構造形成レベルは非常に小さく、限られた領域のなかにアミロイド線維の構造伝播に重要な役割を果たすアミノ酸残基が含まれている可能性が示唆された。

さらに、伝播性が発現する以前のオリゴマー様線維前駆中間体を新たに捕捉する試みを行った。その結果、インスリンについて線維前駆中間体の安定捕捉に成功し、成熟アミロイド線維との構造比較により、伝播に深く関与するアミノ酸配列領域の存在を特定できる可能性を見出した。

2. 研究の目的

以上の研究成果を踏まえ、本研究では、アミロイド線維の伝播機構をタンパク質構造の見地から解明することを目指した。これを達

成するために、先ず、これまで安定捕捉に成功したインスリンの線維前駆中間体の解析を進め、アミロイド構造伝播に必要な領域の特定および線維前駆中間体を經由する線維化機構の解明を行った。

さらに、ほかのタンパク質分子においても線維前駆中間体の観察が実現可能であるの可否を検証するため、インスリン以外の分子について線維前駆中間体の捕捉を検討した。また、伝播性の発現段階として重要である核形成反応における水分子の動態は明らかにされていない。そこで、近赤外吸収スペクトルを用いた水構造変化の追跡も試みた。

3. 研究の方法

本研究では、インスリンを主要なモデルタンパク質として選択し、さらにインスリンを構成する二本鎖のうち、30 アミノ酸残基からなる B 鎖も新たな解析対象に加えた。インスリンの線維前駆中間体については、先述の通りこれまでに捕捉に成功しており、FTIR やプロテアーゼ消化をもちいた構造解析の結果、伝播に関与するアミノ酸配列領域の存在の提案に辿り着きつつあった。そこで、さらに解析を進めたうえで得られたデータを総合的に解釈することにより、線維前駆中間体の構造特徴および本中間体を經由した線維化プロセスを解明した。このほか、インスリン B 鎖の線維化反応をさまざまな条件で解析し、線維前駆中間体を安定に捕捉する試みを実施した。

さらに、この線維前駆中間体を經由する反応経路を解析対象として、小角 X 線散乱 (SAXS) プロファイルの時分割測定を行い、線維形成反応初期におけるタンパク質の集合プロセスをリアルタイムで追跡した。SAXS は、合成高分子のゲルや結晶の解析などに適用され、それらの階層構造や構造形成過程の解明に多大な貢献をしてきており、線維化過程の追跡にも有用であることが期待される。高濃度の塩を含んだインスリン水溶液を石英セルに封入し、温度コントローラーで高温ジャンプさせた。これにより、線維形成反応をセル内で開始し、これに同期させて SAXS プロファイルを一定時間間隔で測定した。

また、タンパク質だけでなく、周囲の水分子にも着目するために、近赤外分光法を用いてインスリンアミロイド線維形成反応における水の吸収スペクトルの観察を行った。1300 nm - 1600 nm の水の第一倍音波長領域の吸収スペクトルを時分割で測定したのち主成分分

析を行ない、モニタリング時間の経過に伴うスコア値の推移を観察した。

4. 研究成果

(1) 線維前駆中間体を経由したアミロイド線維化経路の解析

はじめに、これまでに見出した線維前駆中間体を経由するインスリンアミロイド線維化経路の詳細な解明を進めた。過去に明らかにした点も含め、得られた成果の概要としては、まず、高濃度の塩を添加すると線維化経路が変わり、クロスβ構造が未熟でなおかつ会合数の比較的少ない線維前駆中間体が過渡的に大量蓄積することを確認した。伝播性は線維前駆中間体が成熟する段階で発現した。プロテアーゼ消化を用いて線維前駆中間体においてクロスβ構造が未完成のアミノ酸配列領域を調べたところ、数か所見つかリ、段階的な構造発達の様子が明らかとなった(図1)。

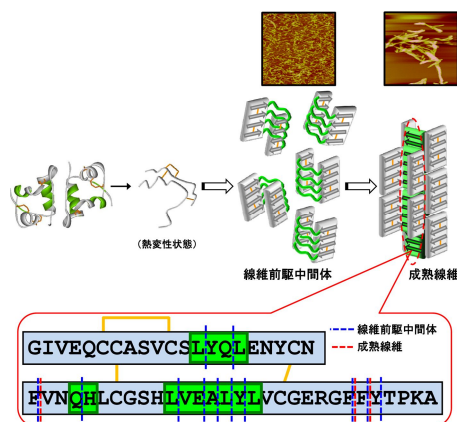


図1: 線維前駆中間体を経たインスリンの線維形成のスキームと、線維前駆中間体および成熟線維のプロテアーゼ消化による切断部位の概略。緑色に着色したアミノ酸配列領域が核構造の構築に深く関与すると考えられた。

上記の結果より、線維前駆中間体の観察は、アミロイド線維の伝播核が形成されるまでの途中段階を理解するために有用であると考えた。そこで、これまでのインスリンでの捕捉実績を踏まえ、インスリンB鎖を用いた中間体捕捉の可否を検討した。その結果、本ペプチドの場合は、pH条件を調節することにより線維構造が一部形成した中間体構造が長寿命で蓄積し、その後成熟化してアミロイド線維が出現することが明らかになった。今後、本プロセスの詳細な解析を行うとともに、さらに数種類のタンパク質を解析対象に追加し、線

維前駆中間体捕捉の可否を検証したいと考えている。

(2) 小角 X 線散乱測定による線維前駆中間体の形成過程の追跡

温度ジャンプにより、セル内でのインスリンアミロイド線維形成反応を開始させたところ、100-200 秒後には低い散乱ベクトル領域での急激な散乱強度の増大が見られ、線維前駆中間体の形成が確認された。このときの散乱プロファイルモデルフィッティングすると、線維前駆中間体は柱状の構造であることが判明した。続いて、アミロイド線維構造への成熟化を意味する散乱プロファイルの変化も見る事ができた。チオフラビン T 蛍光、FTIR、小角光散乱 (SALS) の解析結果と組み合わせることで、最終的に、部分的なクロスβ構造形成を伴った柱状の線維前駆中間体の形成→中間体のさらなる集合化→クロスβ構造の発達によるアミロイド線維の完成、というスキームが提案された(図2)。

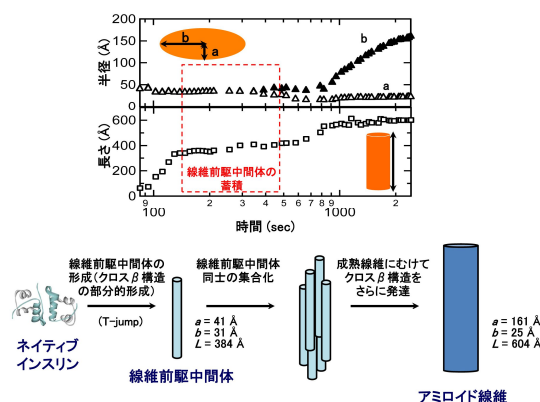


図2: (a) SAXS による集合体のサイズ発達の追跡によるインスリンの線維前駆中間体蓄積の確認。(b) 一連の解析結果より提案されたタンパク質の初期集合および構造発達のスキーム。

(3) アミロイド核形成相に見られる水の構造変化

さらに、タンパク質を取り巻く水分子にも着目し、近赤外分光法を用いてインスリンアミロイド線維形成反応における水の吸収スペクトルの観察を行った。主成分分析をもちいた解析を実施した結果、1417 nm (水素結合の少ない水: ここでは自由水と呼称した) および 1458 nm (水素結合した水) のピークが核形成相の最中に変動することが確認され、核形成相の最中に水分子間の水素結合が過渡的に形成することが示唆された(図3)。

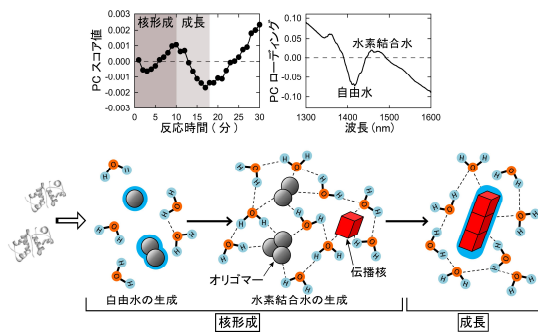


図3：NIR分光による水構造変化の観察。多変量解析によるスペクトル解析を行った結果、核生成反応の前半に自由水が生成し、その後水素結合ネットワークが発達するというような水構造の動きが見出された。

以上の結果から、線維前駆中間体の捕捉観察は、アミロイド線維形成初期のタンパク質の構造形成について具体的なイメージを与えることがわかった。さらにSAXS解析を実施することにより、線維前駆中間体の形状や、アミロイド線維への構造発達のし方についても明らかとなった。さらに、B鎖でも線維前駆中間体を経由した線維化の様子が確認されたことより、他のタンパク質においても、線維前駆中間体の解析は伝播性の獲得過程を知るための有用な手段として活用できることが期待される。また、アミロイド線維の伝播性を担う核が形成する際には水分子が関与するという新たな面も判明した。

上記で得られた成果をもとに、今後は、線維前駆中間体の生成やその後の成熟化による伝播性の発現に関わるアミノ酸配列領域に着目し、これらの領域の任意の箇所にアミノ酸変異を導入したタンパク質を系統的に作製することを考え、インスリンの発現系の構築を進めている。同時に、アルツハイマー病に關与するアミロイドβペプチドについても伝播性に重要な配列領域を特定したいと考え、当ペプチドの発現および精製系を準備した。そのほかにも、ヨウ素の吸着様式によりアミロイド線維構造の形成過程を追跡できる可能性を見出しつつあるので、今後も複数の解析手法を検討しながら多面的に伝播性の分子機構を明らかにしたいと考えている。

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6件)

1. Eri Chatani, Rintaro Inoue, Hiroshi Imamura, Masaaki Sugiyama, Minoru Kato, Masahide Yamamoto, Koji Nishida, and Toshiji Kanaya "Early aggregation preceding the nucleation of insulin amyloid fibrils as monitored by small angle X-ray scattering" *Sci. Rep.* **5**, 15485 (2015), 査読有, doi: 10.1038/srep15485
2. 茶谷 絵理「プログラムされていないフォルディング - アミロイド線維の形成 - 」*生化学* **87**, 292-297 (2015), 査読有
3. 井上 倫太郎, 茶谷 絵理, 金谷 利治「小角 X 線散乱によるアミロイド線維形成機構に関する研究」*SPring-8/SACLA 利用研究成果集* **3**, 2011B1996/BL40B2 (2015), 査読有
4. Eri Chatani, Yutaro Tsuchisaka, Yuki Masuda, and Roumiana Tsenkova "Water molecular system dynamics associated with amyloidogenic nucleation as revealed by real time near infrared spectroscopy and aquaphotomics" *PLOS One* **9**, e101997 (2014), 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0101997
5. Eri Chatani, Hiroshi Imamura, Naoki Yamamoto, and Minoru Kato "Stepwise organization of the β-structure identifies key regions essential for the propagation and cytotoxicity of insulin amyloid fibrils" *J. Biol. Chem.* **289**, 10399-10410 (2014), 査読有, doi: 10.1074/jbc.M113.520874
6. 茶谷 絵理, 井上 倫太郎, 竹中 幹人, 西田 幸次, 金谷 利治「超小角X線散乱によるインスリンアミロイド線維の構造解析」*SPring-8利用研究成果集* **1**, 2011B1951 (2013), 査読有

〔学会発表〕(計77件)

1. 茶谷 絵理「アミロイド線維形成にみられるタンパク質初期会合メカニズムの解明」, 日本化学会第96春季年会, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市), 2016年3月24日
2. 茶谷 絵理, 平松 貴人, 板倉 由佳利, 増田 裕輝, Roumiana Tsenkova「アミロイド線維の伝播核形成過程における水の関与性」, BMB2015, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市), 2015年12月1日
3. 茶谷 絵理, Roumiana Tsenkova「アミロイド線維の核形成に伴う水の動態解明」, 第31回近赤外フォーラム, 筑波大学国際会議室および総合交流会館(茨城県・つくば市), 2015年11月27日
4. 茶谷 絵理「アミロイド線維形成初期に見られる水構造の変化」, 京都大学原子炉実験所「第8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」, 京都大学原子炉実験所(大阪府・泉南郡), 2015年11月19日
5. Eri Chatani "Exploring the early stages of protein association in the formation of amyloid fibrils", IPR and ANU joint symposium "Protein structure and function", Canberra, Australia, 2015年11月16日
 6. 茶谷 絵理「アミロイド形成におけるタンパク質集積メカニズムへの実験的アプローチ」, 第2回新学術領域研究「動的秩序と機能」若手研究会, 西浦温泉ホテルたつき(愛知県・蒲都市), 2015年10月6日
 7. Eri Chatani, Yuki Masuda, Yutaro Tsuchisaka, Takato Hiramatsu, Yukari Itakura, and Roumiana Tsenkova "Exploring the early stages of generation of amyloid fibrils from the viewpoint of water molecular system dynamics" The 15th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul, Korea, 2015年9月18日
 8. Eri Chatani "Recent progress in understanding the early stages of generation of amyloid fibrils" Kwansai Gakuin-Kobe University Joint Symposium: International Symposium on Recent Advanced in Near Infrared Spectroscopy, 関西学院大学神戸新三田キャンパス(兵庫県・三田市), 2015年9月5日
 9. 茶谷 絵理「アミロイド線維構造の面白さ」, 第55回日本生物物理若手の会夏の学校, 琵琶湖畔・近江白浜・白浜荘(滋賀県・高島市), 2015年8月23日
 10. Eri Chatani "Investigation of molecular mechanism for the generation of amyloidogenic nuclei", 第15回日本蛋白質科学会年会(神奈川県・横浜市), 2015年6月25日
 11. 茶谷 絵理「アミロイド線維形成における蛋白質初期集合メカニズムの解明」, 日本薬学会第135回年会, 神戸学院大学(兵庫県・神戸市), 2015年3月26日
 12. 茶谷 絵理「アミロイド伝播核の形成メカニズムの解明」, 京都大学原子炉実験所・専門研究会 第7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, 京都大学原子炉実験所(大阪府・熊取市), 2014年12月11日
 13. Eri Chatani "Association mechanism of protein molecules in the formation of amyloid fibrils", Indo-Japan Joint Workshop on "Frontiers in Molecular Spectroscopy: Fundamentals and Applications to Material and Biology", 東大寺総合文化センター(奈良県・奈良市), 2014年11月26日
 14. Eri Chatani "Understanding early events in protein assembly for the amyloidogenic nucleation", Japan-Hungary Seminar "Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation", 大阪大学蛋白質研究所(大阪府・吹田市), 2014年11月20日
 15. Eri Chatani, "Investigation of early association of protein molecules during the amyloidogenic nucleation", 2nd Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications", 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市), 2014年6月16日
 16. Eri Chatani "Exploring early association of protein molecules in the amyloid formation", 台湾国立交通大学セミナー, Shinchu, Taiwan, 2014年1月21日
 17. Eri Chatani "Stepwise organization of insulin amyloid structure via a prefibrillar intermediate" 大阪大学蛋白質研究所セミナー: Exploring the New Horizons of Protein Folding and Misfolding Studies, 大阪大学蛋白質研究所(大阪府吹田市), 2013年6月20日
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.kobe-u.ac.jp/~echatani>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
茶谷 絵理 (CHATANI, ERI)
神戸大学・理学研究科・准教授
研究者番号: 00432493