

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830025

研究課題名(和文) タンパク質の一分子力学計測によるプリオン伝播機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of prion propagation using optical tweezers

## 研究代表者

小見 悠介 (Komi, Yusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：20565999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光ピンセット法を用いて酵母プリオンタンパク質Sup35NMのコンフォメーションスペースを測定解析した。強いアミロイド性を示す野生型Sup35NMと弱いアミロイド性を示す17番目のセリンをアルギニンに変えたS17R変異体では一部共通の構造を持つが、異なるコンフォメーションスペースを持つことが解った。また、S17Rに加えアミノ酸配列139番目から142番目のセリンをグルタミン酸に変えた変異体S17R+EPEEはS17Rのみの変異体のコンフォメーションスペースとは異なり、野生型に近いことが解った。

研究成果の概要(英文)：I investigated the conformational space of a yeast prion protein Sup35NM using optical tweezers. Sup35NM S17R mutant had a part of common structure, but to different conformational space from Sup35NM wild type. Sup35NM S17R with EPEE mutant had similar conformational space to Sup35NM wild type.

研究分野：生物物理

キーワード：光ピンセット タンパク質一分子

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の異常凝集は、アルツハイマー病やハンチントン病など多くの神経変性疾患の要因となる重要な現象である。脳内に生じる原因蛋白質の線維状凝集体(アミロイド)には構造の多様性があり、それは細胞毒性や感染性と深い関係がある。また、高凝集性タンパク質には天然変性タンパク質が多く、その不均一性がアミロイドの形成やアミロイド構造の多様性にも関わると考えられているが、技術的な難しさから、その相関には不明な点が多い。当研究室で、酵母プリオン Sup35NM のオリゴマー構造がアミロイドの性質を決定することを解明していた。オリゴマーの構造はモノマーのコンフォメーションによって決定されると考えられているが、溶液中でのモノマーは、様々なコンフォメーションの平衡状態にあり、一種類のモノマーのみを解析することは難しく、アミロイド形成に与える影響を不明であった。

2. 研究の目的

天然変性タンパク質は多様な構造を取り得るため、そのコンフォメーション空間は機能と深くかかわると考えられるが、技術的な難しさから、天然変性などの柔らかいタンパク質の構造多様性には不明な点が多い。それらを克服するため、本研究では、Sup35NM に対して、光ピンセット法を用いた力学計測(図1)を新規に構築し、Sup35NM のモノマーのコンフォメーション空間を解明し、アミロイド遷移の形成・成長メカニズムを解明する。

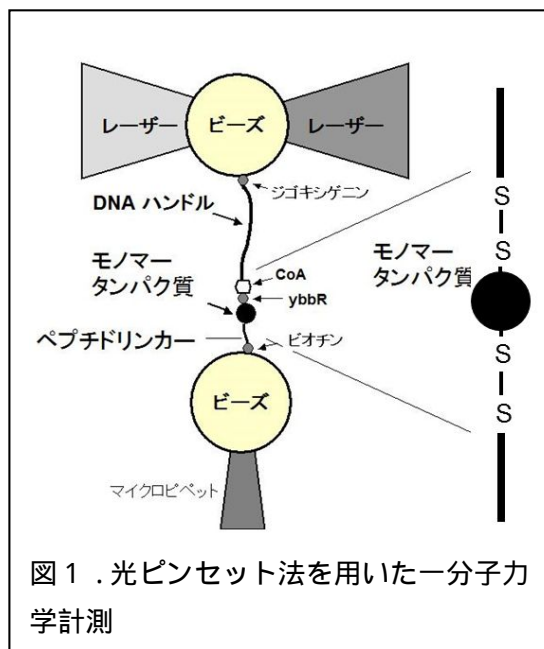


図1. 光ピンセット法を用いた一分子力学計測

そえにより、モノマーの不均一な集合の中で、どのような構造のモノマーがどのようなオリゴマーを形成し、アミロイドを生成させるか、また、それらがもたらす細胞表

現型を明らかにする事で、「モノマー - オリゴマー - アミロイド - 細胞表現型」の相関関係の全容解明を目指す。

3. 研究の方法

光ピンセット法を用いて、Sup35NM-DNA の片端から張力を加えて力学的応答を計測する。具体的には、100を超える異なる一分子を引っ張ることで得られたフォースカーブを解析し、Unfolding や Folding に対する自由エネルギーなどの熱力学パラメータを求め、モノマーのタンパク質のコンフォメーション空間を構築する。これまでの二次構造が基地のタンパク質のフォースカーブの知見を参考に、光ピンセット法で100以上の Sup35NM のフォースカーブを解析することで、Sup35NM モノマーがどのような構造の不均一な複合体であるのかを実測定する。さらに、システイン残基の導入個所を変えた Sup35NM を用いて、異なる二カ所からタンパク質を引っ張って Unfolding や Folding の一分子力学計測を行い、Sup35NM タンパク質内のドメイン間の、Unfolding や Folding における協調性を調べる。これらの実験を、異なるアミロイド構造を導くことがこれまで当研究室で明らかにしている S17R や S17E 変異体を用いて行い、野生型の Sup35NM モノマーとのコンフォメーション空間を比較、検討するとともに、点変異によってどのような特異な(新たな)モノマー構造が出現しているか、Sup35NM タンパク質内のドメイン間の相互作用がどのように変化しているか、検討を行う。

野生型 Sup35NM と変異体のモノマーのコンフォメーションの違いがアミロイド構造に与える影響を、当研究室で開発したタンパク質凝集体感染法により細胞表現系にて解析する。光ピンセット法による解析結果およびアミロイド構造の解析結果をもとに、特異的なモノマー条件下で作製したアミロイドを酵母へ感染させることで、プリオン感染力の強さや細胞表現型を細胞のコロニーの色から短期間で判別できる。これにより、どのようなコンフォメーションをした Sup35NM モノマーが感染性の高いアミロイド構造を導くかを明らかにする。さらに、アミロイドをプロテアーゼ K で切断し、質量分析装置にてアミロイドのコアを解析することで、様々な条件下で作製したアミロイドのコア領域の違いから、アミロイド性と構造の関係を明らかにする。

4. 研究成果

光ピンセット法を用いて、野生型 Sup35NM 一分子を N 末および C 末の両端から引っ張った結果、Sup35NM は天然変性タンパク質ではあるが、4つのコンパクト構造があることが分かった(図2)。

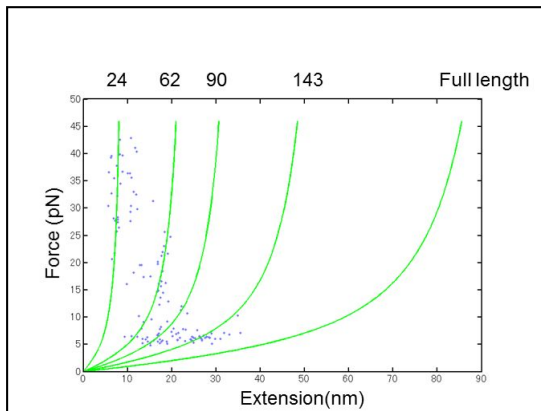


図2 野生型 Sup35NM の unfolding ポジションの分布

さらに、N 末から 150 番目のアミノ酸までを引っ張った結果、トランケートでは小さく（45 アミノ酸以下）強いフォースを与えた時に（15 pN 以上）見られる構造のみが見られたが、全長を含んだものでは、小さく強いフォースで得られた構造に加え、70 - 100 アミノ酸の大きさで弱いフォース（15 pN 以下）で見られる構造が見られた。さらに、150 番目のアミノ酸から C 末を引っ張った結果、驚いたことに N 末端を引っ張った時と同様に、小さく強いフォースの構造がみられ、全長を含んだ分子のみで 70 - 100 アミノ酸の弱いフォースで見られる構造が見られた。このことから、70 - 100 アミノ酸の構造は、Sup35NM の N 末と C 末の領域の間での相互作用があることが示唆された。

次に、アミロイド性が異なることが解っている変異体 S17R と S17E を引っ張ったところ、野生型 Sup35NM のコンフォメーションスペースとは異なり、S17R 変異体のほとんどが 70 - 100 アミノ酸の弱いフォースの構造であった。一方、S17E 変異体は小さくフォースの強い構造の他に 70 - 100 アミノ酸の大きさの構造が見られたが、弱いフォースではなく、強いフォースの構造であった。この 70 - 100 アミノ酸の強いフォースの構造は、1 M NaCl の存在下で弱いフォースへと変化した。このことは、70 - 100 アミノ酸の構造は静電的な結合による構造であることが示唆された。次にこの静電的な結合がどのあたりのアミノ酸と結合しているかを検討した。Sup35NM は 130 アミノ酸以降にリジンの多い領域があり、このリジンをグルタミン酸に変えた変異体を作製してそのコンフォメーションスペースを解析した。S17R 変異体に 139 番目から 142 番目のリジンをグルタミン酸にかえた EPEE 変異体は S17R 変異体のみとはことなり、野生型と似たコンフォメーションスペースを示した。

細胞表現系を用いた解析の結果、S17R + EPEE 変異体は野生型に近いアミロイド性を

示した。さらに、そのアミロイドコアは野生型 Sup35NM と同じであった。これらの結果は、17 番目のアミノ酸と 139 番目のアミノ酸との間での相互作用があることが解った。

## 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 1 件)

1. Layers of structure and function in protein aggregation. Motomasa Tanaka, Yusuke Komi. 査読あり *Nat. Chem. Biol.*, 11(6), 373-377, 2015.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Single-molecule analysis of conformational space of a yeast prion protein Sup35NM using optical tweezers. Yusuke Komi, Rodrigo Maillard, Pierre Rodriguez, Carlos Bustamante, Motomasa Tanaka. 第 53 回日本生物物理学会年会 2015 年 9 月 14 日 金沢大学・金沢市

2. 一分子力学計測による Sup35NM の不均一構造の解明 Yusuke Komi, Rodrigo Maillard, Carlos Bustamante, Motomasa Tanaka. 第 51 回日本生物物理学会年会 2013 年 10 月 28 日 国立京都国際会館 京都市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小見 悠介 (KOMI YUSUKE)  
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員  
研究者番号：20565999

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：