

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08204

研究課題名(和文)天然変性蛋白質に含まれる残存構造とその機能解析

研究課題名(英文)Residual structure in intrinsically disordered protein and its function

研究代表者

西村 千秋(Nishimura, Chiaki)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：70218197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シヌクレインは生理的条件下で構造形成せず、環境によりアミロイドを形成しパーキンソン病を誘発する。A30PとA53T変異は家族性パーキンソン病の患者に見られ、線維形成速度に影響を与える。

アミドプロトン交換速度とシグナル強度を観測し、温度も25と15で測定した。A30P変異ではC端領域の揺らぎ構造の増加が見られた。変異部位を含む両変異体のN端領域で構造化が上昇した。この部分の構造化で線維の核形成速度が上昇すると考えた。野生株と溶液中で構造の差が見られた。N端領域の変異の影響がC端領域に観測されたので、天然変性度の高いシヌクレインであっても構造または複合体形成が部分的に起こると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シヌクレインは天然変性蛋白質に分類され、その研究は医学生化学分野において重要な意義を持つ。30%の蛋白質はこの種の天然変性蛋白質に属し生命現象に関わる。通常は変性状態で、他の蛋白質との結合とともに構造形成するというユニークな特性を持つことより、物理化学的にも研究は意義を持つ。本研究により、構造形成前と結合前の変性状態の構造にも重要な意義があることが示され、天然変性蛋白質の残存構造に立脚したパーキンソン病の治療に繋がる研究である。

アルツハイマー病やパーキンソン病は、高齢化社会において極めて重要であり、本研究の残存構造の実験結果も、これからのパーキンソン病治療に社会的に大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Alpha-synuclein in solution is not folded even under the physiological condition. It becomes the fibril, which causes the Parkinson's disease. The A30P or A53T mutation is frequently found in the genetically familial patients with the change of the kinetics of the fibril formation.

Amide-proton exchange and signal intensity were employed for the detection of the residual structures. Temperature effects were also obtained for the data. The more flexible structure was observed at the C-terminal region of A30P than WT. By contrast, more rigid structures were observed in mutants at 30-60 region, indicating that the core for the fibril formation was formed. The residual structure even for the intrinsically disordered protein was observed by NMR. The interaction between the N-terminal and C-terminal regions might occur in solution.

研究分野：構造生物学

キーワード：天然変性蛋白質 NMR 残存構造 アミドプロトン交換 シグナル強度 温度変化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病の原因となる $\alpha$ シヌクレインは、天然変性蛋白質に分類される。この種の蛋白質は、生理的条件下においても完全には折りたたまれておらず、他の蛋白質との相互作用を介した場合などにおいて、初めて折りたたまれる。それゆえ、核内に存在する転写因子は、複数の違った蛋白質と、異なる構造のモチーフで相互作用できる独特の性質を持つ。さらに、 $\alpha$ シヌクレインは天然変性の状態より自ら重合してベータ構造形成し、アミロイド線維を形成する性質を持つ。 $\alpha$ シヌクレインの研究では、その蛋白質の溶液中での構造を残存構造として捉えていくこと、さらに固体 NMR などを用いて、形成された線維を直接構造解析する方法がなされている。その $\beta$ 構造はクロス $\beta$ 構造と呼ばれ、S 字文字のように示されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1)ほとんどが変性状態である天然変性蛋白質を解析するための新しいアプローチ法を核磁気共鳴を用いて構築すること、(2)天然変性蛋白質の持つ構造多形性とアミロイド形成の関わりを調べ、アミロイド形成時における揺らぎ構造の寄与を明らかにすることを目的とする。

実際には $\alpha$ シヌクレインの、(1)アミロイド形成の際に必要な条件となる揺らぎ構造を明らかにすること、(2)モノマー、毒性を持つとされるオリゴマー、蛋白質凝集物、アミロイド線維など、みかけの異なる種類のものが、同じ蛋白質からどのようにして生成され、病原性を獲得するかを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1)  $\alpha$ シヌクレインの線維形成時の動的時分割解析を行うために、クエンチフローを用いた速度論的実験系の確立を計画した。アポミオグロビンの折り畳み解析方法を当てはめる。

(2) 平衡条件下での NMR 緩和実験によって、線維形成に関連する揺らぎ運動を明らかにした。その解析の応用実験として、NMR チューブ内での線維形成反応の解析を計画した。

(3) 天然変性蛋白質の持つ揺らぎ構造を調べるため、 $\alpha$ シヌクレインと薬剤の相互作用における NMR 解析と、変異体の NMR 解析により、アミロイド形成能と揺らぎ構造の関連を調べた。NMR 解析として速い時間領域を調べる緩和実験(ナノとピコ秒領域)とアミドプロトン交換である CLEANEX-PM (ミリ秒領域)を用いることを計画した。

### 4. 研究成果

#### 研究の主な成果

$\alpha$ シヌクレインは生理的条件下でも構造を形成せず、環境によりアミロイドを形成しパーキンソン病を誘発する。A30P と A53T 変異体は家族性パーキンソン病の患者に見られる変異体であり、前者は線維形成を遅くし、後者は線維形成を速くにする。また両変異が同時に起こる場合には、線維の形成量が多くなる。本研究では溶液 NMR を使って解析し、アミロイドを形成する前段階において野生株と変異体で構造に違いがないかを、アミドプロトン交換とシグナル強度を主に用いて調べた。

CLEANEX-PM 法を用いると、天然変性蛋白質の速い数ミリ秒のプロトン交換でも追跡できる。CLEANEX-PM により得られた交換速度定数を異なる温度の 25°C と 15°C で求め、その比の値により蛋白質構造の揺らぎの増加や構造形成の増加を評価した。比の値の測定より温度に

関わる因子を求めた。A30Pの変異によって、C端領域の一部の揺らぎ構造の増加が導かれた。また一方、変異の部位を含むN端領域の一部では両変異体において構造化の上昇が観測された。この部分の初期段階の構造化によって、線維の核形成速度が上昇すると考えられた。

さらに、シグナル強度が上昇する場合、その部位の揺らぎが上昇したと考え解析した。A30PにおいてC端領域の揺らぎ構造が上昇した。シグナル強度を測定し、温度を変えた時のシグナル強度の比を求めた。シグナル強度の比からも、両変異体においてC端領域の広い領域で揺らぎの増加が観測された。さらにA30Pにおいては、N端領域の一部の安定化と揺らぎ構造の上昇が見られた。しかしながら、シグナル強度は複雑であり揺らぎ構造と関係するが、揺らぎ構造が増えて水との交換が速くなった場合には、逆に減少する。他のデータでは $T_2$ の結果は野生株の場合、N端領域とC端領域の化学交換を示唆する結果であり、xNOEの結果も、野生株においてN端領域とC端領域において構造ができることを示唆した。さらに $^{13}\text{C}\alpha$ の化学シフトの結果より、N端領域はヘリックス構造、C端領域は $\beta$ 構造であることが示唆された。N122番近傍のV118A変異体を作成し、V118の側鎖が、想定しているN端領域とC端領域の相互作用に貢献しているかを調べたが、若干のV118Aにおける残存構造の減少が見られた。

このようにアミロイドを形成する前段階の溶液構造中でも、野生株と変異体間で構造の差が見られた。N端領域の変異の影響がC端領域に観測されたので、 $\alpha$ シヌクレインであっても構造化形成または複合体形成のあることが示された(図1)。なお、N端領域にはプラス、C端領域にはマイナス荷電の残基が数多くあり、相互作用する可能性が考えられた。温度変化したアミドプロトン交換とシグナル強度の結果が有意義であることがわかった。

## 国内外における位置づけとインパクト

天然変性蛋白質は通常変性している蛋白質であり、そのためアプローチが難しく、そんな中で本研究では面白いことが明らかにできたと思う。世の中での当該研究は20年前位から始まり、ここ10年では進展が少ないように思われたが、本研究がブレイクスルーになるような方法も含んでいると思われる。温度変化の手法は今後の発展を期待したい。国内外からの多くの天然変性蛋白質や $\alpha$ シヌクレインの研究報告が、これまでなされてきた。

## 今後の展望

研究の方法の3- (3)における $\alpha$ シヌクレイン変異体の揺らぎ構造解析が順調にいった。実際にCLEANEX-PM法と緩和実験により、変異体の揺らぎ運動解析を行うことができた。固体NMR法を使用しないと、固体状態でのアミロイド構造を直接的には明らかにできないが、アミロイドを形成する前の残存構造は、形成されるアミロイド構造に対してのヒントを与えていると考えている。さらにアミロイド形成の変化したA30PとA53Tの変異体の解析を行い、構造活性相関を論じることができた。本研究のアミドプロトン交換とシグナル強度の温度変化による測定は、今までの他の実験結果とよく一致しており、感度の観点からも利用することがとても有用だと思われる。今後はさらに

- (1) アミロイド形成に関連する構造を明らかにしていく。V118Aにおける残存構造を詳しく調べる。
- (2) 多くのラベル化蛋白質を作成していく。そのために作成法を改良していく。現在の収量では、クエンチフローなどの速度論的実験を行うには足りない。

(3)  $\alpha$ シヌクレインと薬剤の相互作用を、NMR で観測する。

(4) リアルタイムで NMR チューブ内でアミロイド伸長反応を起こさせ、その反応をモニターする。

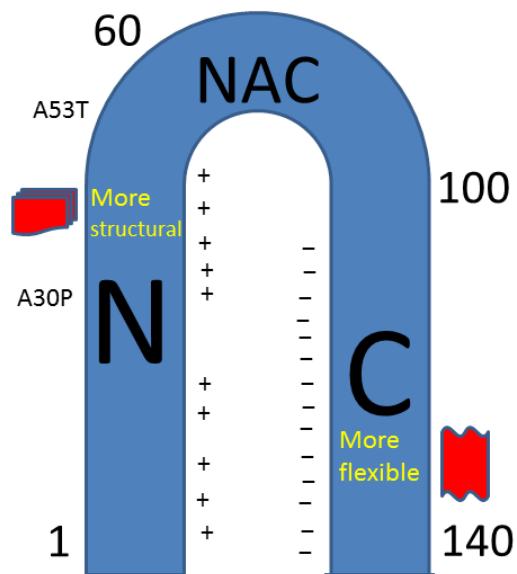


図1： $\alpha$ シヌクレインの模式図、  
変異体において野生株より揺ら  
ぎの多い C 端領域、同様に揺ら  
ぎの少ない N 端領域

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakurai, K., Yagi, M., Konuma, T., Takahashi, S., Nishimura, C., Goto, Y.	4. 巻 56
2. 論文標題 Non-native alpha-helices in the initial folding intermediate facilitate the ordered assembly of the beta-barrel in beta-lactoglobulin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4799-4807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.7b00458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Konagaya, Y., Miyakawa, R., Sato, M., Matsugami, A., Watanabe, S., Hayashi, F., Kigawa, T., and Nishimura, C.	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of Glu12-His89 interaction on dynamic structures in HIV-1 p17 matrix protein elucidated by NMR	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0167176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0167176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura, C.	4. 巻 93
2. 論文標題 Folding of apomyoglobin: Analysis of transient intermediate structure during refolding using quick hydrogen deuterium exchange and NMR	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. Japan Acad. ser B	6. 最初と最後の頁 10-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2183/pjab.93.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 長島敏雄、植田啓介、西村千秋、山崎俊夫	4. 巻 65
2. 論文標題 アゾベンゼンの双方向光異性化反応を用いた高分子の構造相関NMR法	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 分光研究	6. 最初と最後の頁 258-260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuwaki, R., Shinmura, I., Morita, S., Matsugami, A., Hayashi, F., Goto, Y., Nishimura, C.	4. 巻 1868
2. 論文標題 Distinct residual and disordered structures of alpha-synuclein analyzed by amide-proton exchange and signal intensity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1016/j.bbapap.2020.140464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 西村千秋
2. 発表標題 NMRによる天然変性アルファシヌクレイン蛋白質の残存構造解析
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村千秋
2. 発表標題 構造蛋白質であるHIV-1p17とp24の動的と静的構造のNMR解析
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村千秋
2. 発表標題 アポミオグロビンの折り畳み中間体の解析
3. 学会等名 第56回NMR討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村千秋
2. 発表標題 構造蛋白質であるp17とp24の動的と静的構造の関わり
3. 学会等名 第7回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishimura, C.
2. 発表標題 The residual and marginally stabilized structures in intrinsically disordered proteins
3. 学会等名 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nagashima, T., Ueda, K., Nishimura, C., and Yamazaki, T.
2. 発表標題 Protein structure manipulated by photoswitching of azobenzene
3. 学会等名 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西村 千秋
2. 発表標題 アポミオグロビン折りたたみ中間体に含まれる非天然構造
3. 学会等名 第17回若手NMR研究会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nishimura, C.
2. 発表標題 Approach for the intrinsic disorder in the protein structure
3. 学会等名 The 42nd Naito Conference "In the vanguard of structural biology: Revolutionizing life sciences" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nishimura, C.
2. 発表標題 Fluctuation observed at native and folding-intermediate states of proteins monitored by NMR
3. 学会等名 9th Korea-Japan Joint Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 長島敏雄、植田啓介、西村千秋、山崎俊夫
2. 発表標題 アゾベンゼン架橋剤の光異性化反応によるタンパク質変性のNMR同期測定
3. 学会等名 第55回NMR討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西村 千秋
2. 発表標題 天然状態と似たそして異なるアポミオグロビン折り畳み中間体の構造
3. 学会等名 第54回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 Nagashima, T., Ueda, K., Nishimura, C., and Yamazaki, T.
2. 発表標題 NMR-synchronized folding manipulation of protein GB1 by photoisomerization of an azobenzene cross-linker
3. 学会等名 58th ENC (Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京平成大学薬学部生体防御教育研究部門タンパク質科学研究ユニット <a href="http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/tanpakushi-tsukagaku.html">http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/tanpakushi-tsukagaku.html</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考