

## 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24年5月25日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380185

研究課題名（和文）人獣共通感染症関連する高分子タンパク質重合体の電子スピン二重共鳴法による構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of zoonosis-related high-molecular protein aggregation by double electron-electron resonance (DEER) technique

研究代表者

稲波 修 (INANAMI OSAMU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：10193559

研究成果の概要（和文）：部位特異的スピンラベル法による2点間距離計測技術をプリオン凝集体の構造解析を明らかにする目的で研究を行った。実験は家族性プリオン病の変異体D178NのC末端側のヘリックス構造を持つ領域にスピンプローブ（R1）を導入し、酸性下で1M塩酸グアニジン処理により凝集体構造を形成させ、CW-ESRならびに電子スピン二重共鳴法（DEER）によりスピン間距離を計測した。その結果、凝集に関与している構造体はC末端領域の構造が凝集体形成に重要であり、N末端領域は一定の構造を取っておらず、凝集体の形成にも関与していないことが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to obtain the structural information for this pathological fibrous form of PrP<sup>Sc</sup>, we measured the intermolecular distance in the pathological fibrous form with D178N mutation by the site-directed spin labeling (SDSL) with continuous wave (CW) ESR (X-band) and pulsed ESR (Q-band). After the formation of the fibrous structure by exposure to 1M of guanidine hydrochloride in pH4.0, the ESR spectra were measured by CW-ESR. The interspin-distances in pathological fibrous form were measured by continuous wave ESR (CW-ESR) and the four-pulse double electron-electron resonance (DEER) technique. The information of intermolecular distances will be useful to estimate the pathogenic fibrous structure of the familial prion disease, since it is difficult to analyze the macromolecules such as the fibrous protein by NMR or X-ray crystallography.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：(1) プリオン (2) 構造生物学 (3) ESR 分光法 (4) ニトロオキシドプローブ (5) 距離情報 (6) 部位特異的スピンラベル法 (7) 人獣共通感染症

## 1. 研究開始当初の背景

構造生物学の分野では古くは、X線解析法、X線や中性子を用いた小角散乱法 (SAX) や多波長異常分散 (MAD) X線解析などの方法が、金属イオン周辺の構造はX線吸収端微細構造解析法 (EXAFS)、二次構造では Far-UV、円二色性分光法などが用いられてきている。1990年代から核磁気共鳴分光法 (NMR) による構造解析法の発展が大きな力を発揮してきた。特に NMR ではそのパルス発生技術、積算技術やオーバーハウザー効果の利用は大きな力を発揮し、TROSY 法や NOESY 法によって 20 k から 30 k ダルトンのタンパク質の構造解析が可能となってきた。しかしながら、これらの方法にも 30 k ダルトンを超える高分子タンパク質や糖タンパク質、別のタンパク質のドメイン、脂質や核酸などと相互作用した際の、微細なタンパク質分子の構造、リン酸化に伴う微少な構造変化や数十ナノ秒程度の速い揺らぎ運動などの構造解析は不可能である。

また、結晶化が全く不可能なタンパク質も数が多い。そこで、目的とするタンパク質の調べたい任意のアミノ酸残基にシステイン残基を導入し、チオール特異的な安定ラジカルであるニトロオキシドプローブを導入し、電子スピン共鳴法 (ESR) により測定する方法が Hubbell らにより考案された。ESR スペクトルを解析する事により、その局所の構造を反映した情報を得ることが可能となる。初期の研究では既に他の NMR 等の方法で構造解析が明確にされている T4 リゾチームをモデルに精力的に行われ、プローブの運動性 (回転相関時間  $\tau$ ) と構造との相関性、8 Å ~ 25 Å までのプローブ間の距離の計測が CW-ESR 装置で可能となった (Mchaourab et al., Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. *Biochemistry*, 35:7692 (1996))。その後、ナノ秒レベルのパルス発生装置の開発、パルス波を用いた二重共鳴電子スピン ESR 装置が安価に用いる事が出来るようになり、25 Å ~ 80 Å (2.5 nm ~ 8 nm) までの距離まで測定することが可能となった (Jeschke G et al., Direct conversion of EPR dipolar time evolution data to distance distributions. *J Magn Reson*. 155:72 (2002))。ちなみに NMR での核オーバーハウザーを利用した距離は 5 Å 以内の距離しか測定出来ないことから比較するとドメイン間以上の長距離の測定に非常に有用であるといえる。特に、この方法では、次の優位点が挙げられる。

1) 測定原理が特異的に二カ所にラベルされたスピンプローブ間の双極子-双極子相互作用 (dipole-dipole interaction) を利用するために、ドメイン間、分子間の長距離の二点測定が可能であること

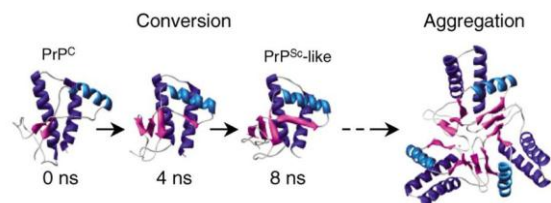
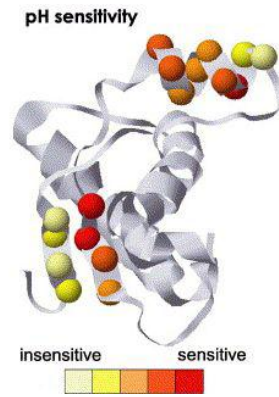
2) 均一なタンパク質溶液でなくとも、ラベルさえ出来れば異種タンパク質や異種分子 (例えばタンパク質と核酸) の距離計測が可能。また、溶液が濁っていても測定可能であること

3) 測定時のタンパク質の存在様式に拘らないこと。つまり、膜タンパク質でも凝集体になっても測定が可能である。

4) 金属タンパク質の金属イオン結合部位近傍にスピンプローブを導入できれば金属イオンが銅イオンやマンガンイオンなどの常磁性体金属イオンであれば、金属イオンとプローブとの距離計測が可能。

こうした優位点に着目して、申請者は BSE、CJD やスクレーピーなどのプリオン関連病はタンパク質の凝集体状態が病原体であることから、本法を適応することにより今までにはない構造情報が得られると考え、マウスプリオンタンパク質を用いて、定常状態での運動性が非常に NMR で得られた構造情報と一致すること、pH に構造変化を起こしやすい領域が  $\beta$  シート 2、 $\alpha$  ヘリックス 1 の埋没した部位、 $\alpha$  ヘリックスの末端の三カ所存在すること (右の図の赤い  $\alpha$  炭素の部位)。さらにはヒトの致死性家

族性不眠症 (fatal familial insomnia ; FFI) で見られるアスパラギン酸 178 のアスパラギンへの変異 (D178N) が、より pH による構造変化を引き起こし易くなることが明らかとなり、1 アミノ酸変異が病原性の構造変化の引き金となることを示唆した。また、H186 に銅イオンが結合する事も見だし、現在、国際誌に投稿中である。また、パルス ESR を用いた距離計測も低 pH により形成されたプリオン凝集体の分子間距離の計測を開始しており、凝集体は  $\beta$  シート 2 を中心として分子間相互作用に関与し凝集し、N 末端の非構造領域やヘリックス領域は分子間相互作用には関与する可能性が低いことを見いだした。これは下図に示す DeMarco らが提唱した分子シミュレーション (MD) で報告されている構造体 (DeMarco and Gallett, PNAS 101:



2293 (2004)) を実験的に示したものであり、より詳細な検討が今後の研究に求められている。

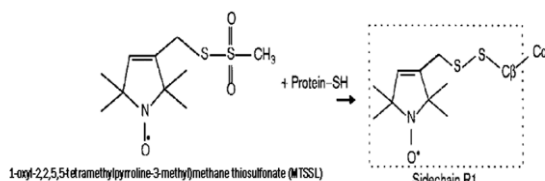
申請者らは平成 19 年—平成 20 年の期間、科学研究費基盤研究 (B) として採択された「プリオン蛋白質構造の原子間力顕微鏡と磁気共鳴法を用いた新たな分子イメージング」において、プリオンタンパク質は高分子重合体を形成し、銅イオンとの結合構造を形成する複雑なタンパク質であることから、その高次構造解析において、NMR や X 線解析よりも、電子スピン共鳴法が有用であることを示し、プリオンの銅イオンとの結合部位構造や pH に感受性のドメインの同定、遺伝性 CJD の変異体プリオンタンパク質の安定性などを明らかにしてきた (J Clin Biochem Nutr. 2008Sep;43(2):51-7. Biochem Biophys Res Commun. 366:244 (2008), Biochem Biophys Res Commun. 350:549 (2006), Biochem Biophys Res Commun. 335:785 (2005))。この方法は、目的のタンパク質の構造変化を検出したい任意の場所、あるいは分子間距離を測定したいアミノ酸残基の二カ所にニトロオキサイドプローブを特異的に導入し、その運動性を持続波—電子スピン共鳴法 (CW-ESR) やパルス条のマイクロ波を用いた電子スピン二重共鳴法 (pulse-ESR) を用いて、その近傍の構造情報を得るという方法であり、NMR のような分子の大きさに制限されず、X 線解析では不可能な結晶化出来ないタンパク質でも構造情報を得ることが出来るという利点を持っている (Hubbell et al., Nat Struct Biol. 7:735 (2000))。申請者らは、この方法をプリオンのみならず、人獣共通感染症に関連するタンパク質に適用し、人獣共通感染症関連タンパク質の会合状態、RNA との相互作用や脂質膜への融合などの複雑な、構造情報を得ることにより、感染のメカニズム、創薬の分子機構の基礎的知見を得ることができると予想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はこの ESR 技術を用いた新たな距離測定法を用いることにより、プリオンを始め、人獣共通感染症に関連するタンパク質の構造解析に適用できる技術確立し、人獣共通感染症関連タンパク質の会合状態、RNA との相互作用や脂質膜への融合などの複雑な、構造情報を得ることにより、感染のメカニズム、創薬の分子機構の基礎的知見を得る技術確立することを目的とする。具体的には引き続きプリオン重合機構の解明を中心に進め、病原性プリオンの凝集体の構造を明らかにする事を目的とする。

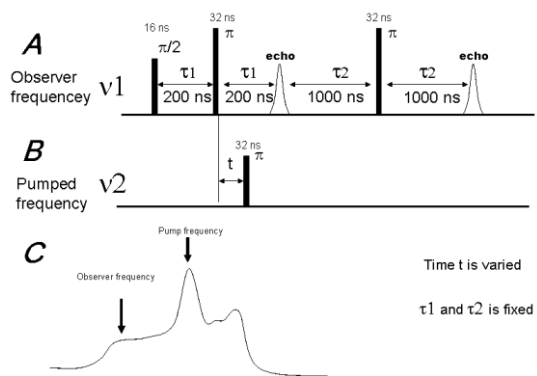
## 3. 研究の方法

第一にプローブの導入のための目的の場所にシステイン残基を導入したタンパク質あるいはペプチドを作製、第二に次の図のようにチオール特異的に反応する thio-sulfonate spin label 剤 (MTSSL) と反応



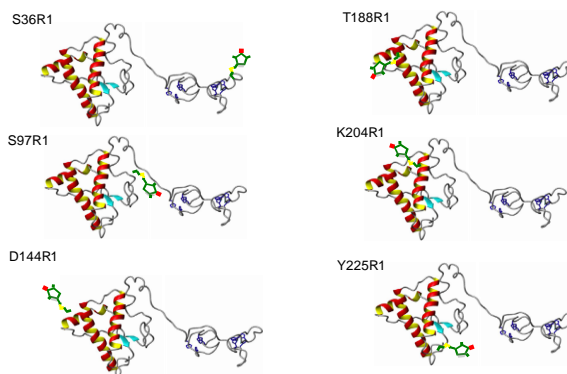
させ、透析あるいは HPLC によって未反応なラベル剤を取り除き、生成する、第三に下図のパルスシーケンスを用いパルス ESR 測定を行い、スピネコーを積算する。最終的に得られたシグナルをガウス関数にフィッティングし、得られた関数をフーリエ変換する事により距離情報に依存する Pake function curve に変換し、dipolar evolution frequency ( $\omega_{dd}$ ) からスピン間距離を計算

### Four pulse sequence for determination of biradical distance



する。

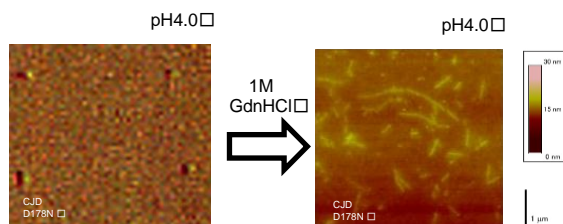
具体的には下の図に示した D178N の家族性プリオン変異体の組み替えタンパク質上の 6 個のアミノ酸残基をシステイン残基に変異を入れ、MTSSL スピンラベル剤を導入した。



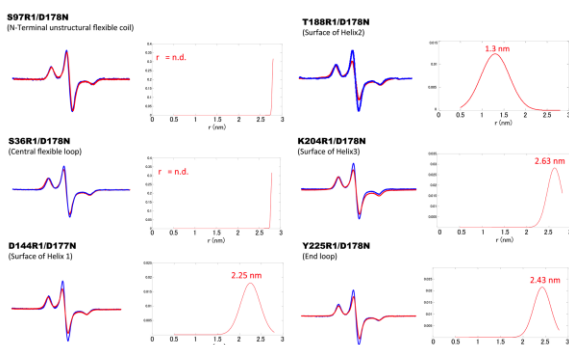
スピンプローブ (R1) を導入後、pH 4.0 の低 pH 条件で、1 M 塩酸グアニジン処理することで凝集体を形成させ、ESR 法により距離計測を行った。

#### 4. 研究成果

部位特異的スピラベル法による2点間距離計測技術をプリオン凝集体の構造解析を明らかにする目的で研究を推進した。実験は家族性プリオン病の変異体 D178N の C 末端側のヘリックス構造を持つ領域にスピンプローブ (R1) を導入し、酸性下で 1 M 塩酸グアニジン処理すると凝集体構造を形成させた。凝集体が形成されたか否かは下図の AFM 像より明らかにされた。

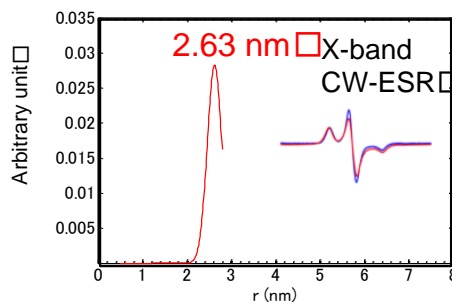
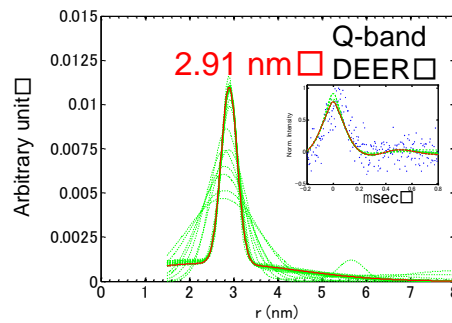


次に CW-ESR ならびに電子スピン二重共鳴法 (DEER) によりスピン間距離を計測した。その結果、どの場所でも凝集体のスピン間の距離は 2.0 nm 以上の値が持続波 ESR 法で検出された。パルス ESR 法でも計測範囲の短距離限界を示し、周期的で規則正しい構造ではなく、凝集体中の同じアミノ酸残基の分子間の距離は 2.0 nm 程度の間隔を持つ凝集体を形成している可能性を示していると類推された。



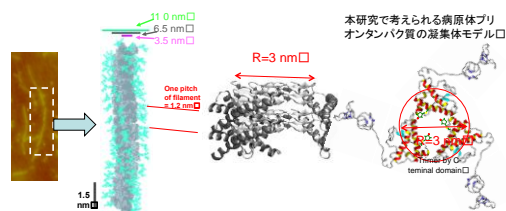
さらに N 末端の D178N/S36R1 と D178N/S97R1 の 2 点の点数を増やし正確な測定を行ったが、この 2 点からは持続波 ESR では測定が困難であった。Q バンドパルス ESR 装置を用い、より長距離の 2 点間距離計測を行ったところ、持続波 ESR で計測困難であった凝集体 D178N/K204R1 で 2.7 nm、D178N/Y225R1 で 3.0 nm を示した。次のページの上の図に D178N/K204R1 の測定の一例を示した。

## K207R1



また、D178N/S36R1 と D178N/S97R1 では Q バンドパルス ESR でも緩和時間が早いことが原因と考えられるが、計測できなかった。以上のことから凝集に関与している構造体は C 末端領域の構造が凝集体形成に重要であり、N 末端領域は一定の構造を取っておらず、凝集体の形成にも関与していないことが示された。

以上の結果から、以前の DeMarco らのシミュレーションの結果を合わせて考えると下図に示した様なプリオンタンパク質がディスク上に重層した凝集体モデルがモデルとして考えられた。



#### 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: Meike S., Yamamori T., Yasui H., Eitaki

- M., Matsuda A., Morimatsu M., Fukushima M., Yamasaki Y., and Inanami O. (2011) A nucleoside anticancer drug, 1-(3-C-ethynyl- $\beta$ -D-ribo-pentofuranosyl) cytosine (TAS106), sensitizes cells to radiation by suppressing BRCA2 expression. *Molecular Cancer*. 10:92. (査読有) (doi: 10.1186/1476-4598-10-92)
- 2: Meike S., Yamamori T., Yasui H., Eitaki M., Matsuda A., and Inanami O. (2011) 8-Aminoadenosine enhances radiation-induced cell death in human lung carcinoma A549 cells. *Journal of Radiation Research*. 52(4):456-463. (査読有) (doi 10.1269/jrr.10188)
- 3: Kobayashi S, Abe Y, Inanami O, Oda S, Yamauchi K, Hankanga C, Yasuda J, Sato R. (2011) Oral administration of bovine lactoferrin upregulates neutrophil functions in a dog with familial  $\beta$ 2-integrin-related neutrophil dysfunction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 143:155-161. (査読有) (doi:10.1016/j.vetimm.2011.05.027)
- 4: Yamamori, T., Mizobata, A., Saito, Y., Urano, Y., Inanami, O., Irani, K. and Noguchi, N. 2011. Phosphorylation of p66shc mediates 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *Free Radical Research*, 2011;45:342-350. (査読有) (doi:10.3109/10715762.2010.532496)
- 5: Yamanaka, K., Saito, Y., Yamamori, T., Urano, Y., Noguchi, N., 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2011;286:24666-24673. (査読有) (doi:10.1074/jbc.M111.236273)
- 6: Yamamori, T. and Irani, K. 2011. Regulation of DNA repair enzyme AP endonuclease 1 by lifespan regulation-related protein Sirt1. *The Journal of the Hokkaido Veterinary Medical Association*, 2011; 55:45-49. (in Japanese)
- 7: Yamamori, T. and Irani, K. 2011. Regulation of DNA repair enzyme AP endonuclease 1 by lifespan regulation-related protein Sirt1. *The Journal of the Hokkaido Veterinary Medical Association*, 2011; 55:45-49. (in Japanese)
- 8: Yamamori, T., DeRicco, J., Naqvi A, Hoffman TA., Mattagajasingh, I., Kasuno, K., Jung SB, Kim CS., and Irani, K. 2010 SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic Acids Research*, 38:832-845. (査読有)
- 9: Asanuma, T., Ono, M., Kubota, K., Hirose, A., Hayashi, Y., Saibara, T., Inanami, O., Enzan, H., Onishi, S., Kuwabara, M., and Oben, JA. 2010 Super paramagnetic iron oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 59:258-266. (査読有)
- 10: Yasui, H., Ito, N., Yamamori, T., Nakamura, H., Okano, J., Asanuma, T., Nakajima, T., Kuwabara, M., and Inanami, O. 2010 Induction of neurite outgrowth by alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrene through nitric oxide release and Ras-ERK pathway in PC12 cells. *Free Radical Research*, 44:645-654 (査読有)
- 11: Watanabe, Y., Hiraoka, W., Igarashi, M., Ito, K., Shimoyama, Y., Horiuchi, M., Yamamori, T., Yasui, H., Kuwabara, M., Inagaki, F., and Inanami, O. 2010 A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394:522-528 (査読有)
- 12: Yasui, H., Yamamori, T., Meike, S., Eitaki, M., Iizuka, D., Kuwabara, M., and Inanami, O. 2010. New insight into hypoxia-targeting cancer therapy. *Radiation Biology Research Communications*, 45: 45-57. (in Japanese)
- 13: Kobayashi S., Sato R., Abe Y., Inanami O., Yasui H., Omoe K., Yasuda J., Hankanga C., Oda S., and Sasaki J. (2009) Canine neutrophil dysfunction caused by downregulation of beta2-integrin expression without mutation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 130:187-196. (査読有)
- 14: Ogura A., Oowada S., Kon Y., Hirayama A., Yasui H., Meike S., Kobayashi S., Kuwabara M., and Inanami O. (2009) Redox

regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Letter* 277(1):64-71. (査読有)

15: Kobayashi S, Sato R, Abe Y, Inanami O, Yasui H, Omoe K, Yasuda J, Hankanga C, Oda S, Sasaki J.

Canine neutrophil dysfunction caused by downregulation of beta2-integrin expression without mutation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.

2009 Aug 15;130(3-4):187-96. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1: 20<sup>th</sup> JSPS Coe-to-core Seminar Internatiional Redox Core Symposium on In Vivo Magnetic Resonance Imaging (2012年2月5日-2月6日、福岡、西鉄グランドホテル)

稲波 修『Distance measurements of fibrous prion proteins by site-directed spin labeling(SDSL) and ESR spectrouscopy 』

2: Advanced ESR Studies for New Frontiers in Biofunctional Spin Science and Technology (2012年11月14日、神戸、神戸大瀧川メモリアルホール)

稲波 修『Structual characterization in the mouse prion protein by site-directed spin-labeling and ESR technique』

3: 14th International Congress of Radiation Research(2011年8月28日-、Warsaw, Memorial to Maria Sklodowska-Curie)

稲波 修、安井 博宣『Novel EPR imaging to visualize cycling hypoxia associated with a defect of vascular integrity integrity in transplanted tumors.』

4: Asia-Pacific EPR/ESR Symposium (2010年10月10-14日、Jeju)

稲波 修『Idenfication of a novel Cu (II) binding site in full-length murine prionprotein by using ESR/SDSL technique』

5: 第148回日本獣医学会(2009年9月25-27日、鳥取)

稲波 修『マウスプリオンタンパク質ヒスチジン186周辺の銅イオン結合部位に関する構造解析』

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/radbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲波 修 (INANAMI OSAMU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：10193559

(2) 研究分担者

稲葉 睦 (INABA MUSTUMI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：00183179

堀内 基広 (HORIUCHI MOTOHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：30219216

桑原 幹典 (KUWABARA MIKINORI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・名誉教授

研究者番号：10002081

山盛 徹 (YAMAMORI TOHRU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：00512675