

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04345

研究課題名(和文) アミロイドの生成・脱凝集機構の新たなパラダイム創成

研究課題名(英文) New Paradigm for molecular mechanism of amyloid formation and disaggregation

研究代表者

田中 元雅 (Tanaka, Motomasa)

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・チームリーダー

研究者番号：40321781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドの伝播機構を解明する目的で、酵母プリオンタンパク質Sup35のモノマーの構造を調べたところ、局所的にコンパクトな構造をもつことをNMRから明らかにし、その局所構造や揺らぎがアミロイドの構造に大きな影響を与えることを明らかにした。さらには、Sup35アミロイドの構造や物理的性質に依存して、分子シャペロン群のリモデリング活性が異なることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Self-propagating β -sheet-rich fibrillar protein aggregates, amyloid fibers, are often associated with cellular dysfunction and disease. Distinct amyloid conformations dictate different physiological consequences, such as cellular toxicity. However, the origin of the diversity of amyloid conformation remains unknown. Here, we suggest that altered conformational equilibrium in natively disordered monomeric proteins leads to the adaptation of alternate amyloid conformations that have different phenotypic effects. We performed a comprehensive high-resolution structural analysis of Sup35NM, an N-terminal fragment of the Sup35 yeast prion protein, and found that monomeric Sup35NM harbored latent local compact structures despite its overall disordered conformation. In addition, we found that the chaperone machinery has distinct remodeling activity to different prion strain conformations of Sup35.

研究分野：構造神経科学

キーワード：アミロイド 神経変性疾患 精神疾患 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

シート構造に富んだ線維状のタンパク質凝集体であるアミロイドは様々なヒト疾患の関与しているため重要な研究対象である。特に、モノマー(単量体)のタンパク質からアミロイドが生成する時のタンパク質の動的構造変化を原子レベルで解明することは、アミロイドによる細胞障害機構を理解する上で必須である。

しかし、アミロイド性のタンパク質は凝集性が極めて高く、取扱いが容易ではないため、そのタンパク質構造の解析は難しく、例えば、そのためのNMRの帰属情報の獲得は極めて難しい。また、たとえ構造情報が得られても、そのアミロイドが細胞内でどのような毒性や細胞機能障害をもたらすかをより直接的に調べる実験系がなければ、その構造解析したアミロイドの生理的意義を理解することはできない。実際に、これまでその相関には多くの疑問が残されている。

一方で、アミロイドの生成・脱凝集機構を理解する上で、3つのシャペロン Hsp104/Hsp70/Hsp40システムの機能の理解は欠かせない。なぜなら、これらのシャペロンは、モノマーからアミロイドを生成していく凝集反応を加速させ、一方では、出来上がったアミロイドを細かく断片化し、モノマーにまで脱凝集させるという、一見相反する二つのステップの両方に中心的な役割を果たすからである。しかし、アミロイドの生成だけでなく、この脱凝集の分子機構にも不明な点が多い。

2. 研究の目的

多くのヒト神経変性疾患では、その原因タンパク質が細胞内のストレスなどでミスフォールドし、線維状タンパク質凝集体であるアミロイドが脳内に生成する。また、酵母や哺乳動物細胞において、一定の条件下で、アミロイドはモノマーにまで脱凝集できることが示唆されている。アミロイドの生成および脱凝集のどちらの過程にも、Hsp104/Hsp70/Hsp40が関与すると考えられているが、その詳細には不明な点が多い。

本研究では、申請者がこれまでに構築してきた独自の酵母プリオンSup35NM (Sup35タン

パク質におけるアミロイドの伝播に必須なドメイン)およびHsp104/Hsp70/Hsp40の分子シャペロン実験系を用いる。それによって、アミロイドの生成、脱凝集分子機構を調べるための新規な実験系を構築するとともに、NMR(核磁気共鳴)などの構造生物学的手法を用いて、異なる構造をもつSup35NMアミロイドの生成機構および脱凝集の分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

Sup35NMの異なるアミロイド構造の生成機構を明らかにするため、Sup35NMモノマーの構造をアミノ酸、原子レベルで知る必要がある。そこでNMRによるSup35NMの解析を行うため、NMR測定条件の最適化を行った。さらに、Sup35NMの主鎖アミドプロトンの帰属を行い、その情報をもとに、各アミノ酸について、常磁性緩和促進効果や溶媒の水との交換速度を調べるための実験などを行った。また、アミロイドのコア領域を同定するために、各種アミロイドのコア領域由来のペプチドを調製し、それに対する質量解析を行った。

さらに、これらの構造情報をもとにして、アミロイド生成時におけるSup35NMとシャペロンの関係を調べるため、アミロイドに特異的な蛍光色素であるチオフラビンTを用いた蛍光測定や、アミロイド線維およびその生成途中に生じるオリゴマーの形態を調べることのできる原子間力顕微鏡を用いて、シャペロン存在下でのSup35NMのアミロイド生成機構の解析を行った。

一方、Sup35NMのアミロイドの脱凝集過程をアミノ酸レベルで調べるために、NMRによる構造解析を行うための測定条件および、本実験に用いるための各種タンパク質の最適化を行った。さらに、チオフラビンTを用いた蛍光測定やイムノプロットング、各種遠心実験などの生化学的、分子生物学的手法から、異なる構造をもつSup35NMアミロイドとHsp104/Hsp70/Hsp40シャペロンを用いて脱凝集実験を行い、その脱凝集過程を追跡した。

4. 研究成果

酵母プリオンタンパク質Sup35のモノマーが局所的にコンパクトな構造をもつことをNMRから明らかにした。さらに、Sup35のモノマーにおいて露出しているアミノ酸を同定した。これらの解析から、モノマーにおけるその局所構造や揺らぎが最終的に生じるアミロイドの構造に大きな影響を与えることを明らかにした。

さらに、特徴的なセクタリングを示し、ピンク色を呈する弱いプリオン株を引き出すS17R変異体の解析を行ったところ、S17R変異体はプリオンドメインのカルボキシル末端にコア領域をもつアミロイドを生成すること、つまり野生型とは大きく異なる構造をもつアミロイドを生成することを見出した。さらに、NMRの詳細な構造解析から、野生型とS17R変異体のアミロイド構造の差異が、モノマー状態における局所構造や揺らぎの違いに起因することを明らかにした(図1)。

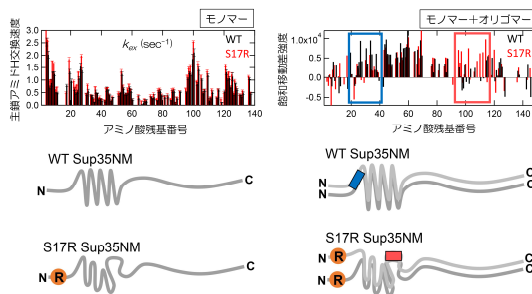


図1 Sup35NMのWTとS17R 変異体のモノマー、オリゴマー構造の相違点

一方で、Ser17のアミノ酸をトリプトファンやチロシンなどの体積が大きなアミノ酸に置換した変異体を作成し、そのアミロイドを作成した。その結果、これらの変異体のアミロイドは、野生型のアミロイド構造と同様に、プリオンドメインのアミノ末端領域にコアにもつアミロイド構造を生成することが明らかになった。

したがって、Ser17の位置のアミノ酸の立体障害によって、アミロイド線維内のパッキングに問題が生じたためにS17R変異体のアミロイドのコア領域がプリオンドメインのカルボキシル末端へと変化したわけではなく、むしろSup35NMモノマーの構造の揺らぎの違いによってアミロイドのコア構造が大きく変化したことが示唆された(図2)。

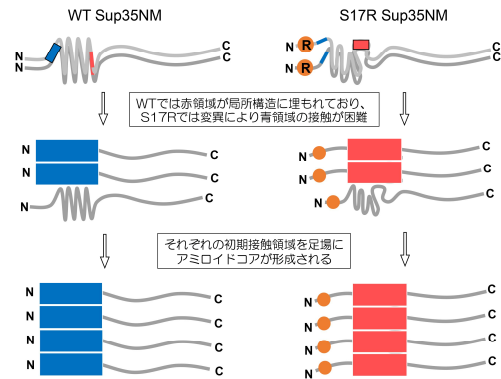


図2 Sup35NMのWTとS17R 変異体のアミロイド形成過程のモデル

Sup35とHsp104/Hsp70/Hsp40シャペロンの相互作用に関して、NMRなどによってアミノ酸レベルで構造解析を行うための実験系を確立した。これら両者の相互作用をNMRおよび蛍光などの生物物理的手法で明らかにした。さらに、その相互作用に関して、解離定数などのパラメーターを得ることができた。また、各種シャペロンの存在下でSup35の凝集過程を詳しく追跡したところ、Sup35の凝集速度に著しい変化を与えることを見出した。さらに、各種シャペロンの組み合わせの違いによる、凝集加速効果の差異を明らかにした。また、シャペロンが存在することによって、最終的に生じるSup35アミロイドの構造に変化が生じることが明らかになった。

さらには、シャペロンによるSup35アミロイドの脱凝集過程を調べるための実験系を確立するとともに、その反応条件の最適化を行った。その反応条件下で、Sc4, Sc37などの異なる温度下で生成させ、異なる構造をしたSup35アミロイドを基質に用いて、シャペロンによる脱凝集実験を行った。その結果、アミロイドの構造に依存して脱凝集効率が異なることが明らかになった。以上から、Sup35アミロイドの構造や物理的性質に依存して、各シャペロンのリモデリング活性が異なることが明らかになった。

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)

Yumiko Ohhashi, Yoshiki Yamaguchi, Hiroshi

Kurahashi, Yuji O. Kamatari, Shinju Sugiyama,

Boran Uluca, Timo Piechatzek, Yusuke Komi,
Toshinobu Shida, Henrik Muller, Shinya
Hanashima, Henrike Heise, Kazuko Kuwata,
Motomasa Tanaka, Molecular basis for
diversification of yeast prion strain conformation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, 2389-2394
(2018). 査読有り
[10.1073/pnas.1715483115](https://doi.org/10.1073/pnas.1715483115).

〔学会発表〕(計 3件)

1) Yoshiko Nakagawa, Hideki Taguchi,
Motomasa Tanaka, Molecular basis for
Hsp104-mediated prion propagation in yeast, 第
54回日本生物物理学会大会, 2016年11月25日
~ 2016年11月27日, つくば国際会議場、つく
ば市

2) 田中元雅、大橋祐美子、志田俊信プリオン
様タンパク質の感染性の本体とその生成分子
機構の解明, 第21回日本神経感染症学会(招
待講演), 2016年10月21日~2016年10月22日,
金沢東急ホテル、金沢

3) Motomasa Tanaka, Yumiko Ohhashi, Yoshiki
Yamaguchi, Yuji O. Kamatari, Kazuo Kuwata,
Latent structural variation in a yeast prion
monomer determines strain phenotypes,
PRION2016(国際学会), 2016年05月10日~
2016年05月13日, Hitotsubashi Hall, National
Center of Sciences Building, Tokyo (Japan).

〔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〕

1) 所属研究機関ホームページ

アミロイド構造の多様性の原因解明：
http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180322_1/

2) 所属研究機関一般公開での研究紹介：
2017年4月22日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 元雅 (TANAKA, Motomasa)
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・チームリーダー
研究者番号：40321781

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

桑田 一夫 (KUWATA, Kazuo)
岐阜大学・連合創薬医療情報研究科・教授
研究者番号：00170142

紺野 宏記 (KONNO, Hiroki)
金沢大学・バイオ AFM 先端研究センタ
ー・准教授
研究者番号：80419267

(4) 研究協力者

中川幸姫 (NAKAGAWA Yoshiko)
Shen Chih-hao