

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14458

研究課題名(和文)蛋白質に隠されたアミロイド原性の実験的探索

研究課題名(英文) Experimental verification of hidden amyloidogenicity of proteins

研究代表者

後藤 祐児 (Goto, Yuji)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：40153770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ある種の蛋白質は、アミロイド線維を形成してアミロイドーシスの発症に関わる。他方、多くの蛋白質はアミロイド線維を形成しない。そこで通常アミロイド線維を形成しないと考えられている蛋白質にアミロイド線維を形成させることができれば、アミロイド線維形成の理解の進展につながる。代表的な食品蛋白質である卵白アルブミンは、385アミノ酸残基から構成され、アミロイド線維を容易には形成しない。卵白アルブミンをトリプシン分解して得られる混合物に、アミロイド原性の高いペプチドが含まれることがわかった。このペプチドを単離精製すると共に、化学合成して、その特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Various proteins form amyloid fibrils and are responsible for amyloidosis. On the other hand, other proteins do not form amyloid fibrils. If we could form amyloid fibrils with those non-amyloid proteins, we can advance our understanding of the mechanism of amyloid formation.

Ovalbumin consisting of 385 amino acid residues is one of the most popular food proteins and does not form amyloid fibrils. We found that a peptide mixture of ovalbumin produced by tryptic digestion contains an amyloidogenic peptide. We purified and determine the amino acid sequence of the amyloidogenic peptide. We also chemically synthesized the peptide and characterized its amyloidogenic properties. The results showed that even ovalbumin contains highly amyloidogenic sequence, although its amyloidogenicity is hidden by the suppressing effects of surrounding sequences.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：蛋白質 脳神経変性疾患 生体分子 凝集 変性 アミロイド線維 溶解度 過飽和

1. 研究開始当初の背景

アミロイド線維は変性蛋白質が重合して形成する細線維であり、アルツハイマー病や透析アミロイドーシスをはじめとするさまざまな疾患に関わる。他方、病気とは関係ないさまざまな蛋白質も、溶媒条件に依存してアミロイド線維を形成することが示された。従来、変性蛋白質の凝集は蛋白質の構造と機能研究の障害と考えられてきたが、1990年代以降、アミロイド線維を中心に、蛋白質凝集は蛋白質研究の重要な課題となっていた。

病気との関係に関わらずさまざまな蛋白質がアミロイド線維を形成するが、全てがアミロイドを形成するわけではない。他方、変性蛋白質の代表的な凝集はアモルファス凝集であるが、アミロイド線維とアモルファス凝集の区別や、形成機構の違いはいまだに曖昧である。

代表者は、アミロイドとアモルファス凝集の関係が、一般の物質の結晶化における結晶とガラス状態の関係にあることを提唱してきた[後藤祐児、領域融合レビュー, 2, e002 (2013)]。これに基づくと、アモルファス凝集 (= ガラス状態) を形成して、アミロイドを形成しない蛋白質も、酵素消化などによって小さくなるとアミロイドを形成する可能性がある。

実際、アミロイドをはじめ、大きな前駆体から生じた比較的小さなペプチドがアミロイドを形成し、病気に関わっていることが知られているが、詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では蛋白質の大きさとアミロイド性の関係を、日常的な蛋白質を対象として研究する。これまでアミロイド線維とは全く関係ないと考えられてきた蛋白質が、特定の条件下においてアミロイド線維を形成することを示す。これにより、アミロイド線維の普遍性や形成機構の原理を更に深めると共に、身近な蛋白質の危険性の有無についても蛋白質科学的な見地から、検証する。アミロイド線維の構造物性研究を、より一般的なものとすると共に、蛋白質科学の関連分野に大きなインパクトを与えることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 一般にアミロイドを形成しないと見なされている蛋白質について、酵素限定分解を行い、アミロイド原性の変化を調べる。アミロイド原性の検出には、代表者が展開してきた超音波による促進効果を利用する。具体的には日常的な食品蛋白質である卵白アルブミン (385 アミノ酸残基) を対象として、トリプシンで分解した断片ペプチドのアミロイド形成反応を検証する。また、精製したペプチドと、元の混合系における反応を比較して、夾雑系の効果を調べる。

(2) 複雑系におけるアミロイド原性の発現機構については、卵白アルブミンとともに、透析アミロイドーシスの原因蛋白質である、

2 ミクログロブリンを用いる。2 ミクログロブリンとその断片ペプチドについては、研究代表者らによって多次元 NMR による帰属と解析が進んでいる。2 ミクログロブリンはリシン特異的なプロテアーゼによって9つの断片に分解されるが、このうち K3 と呼ばれるペプチドは単独でもアミロイド線維を形成することが知られている。分解直後の混合物や全長の 2 ミクログロブリンが K3 ペプチドのアミロイド線維形成に及ぼす効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 卵白アルブミンフラグメントのアミロイド線維形成反応

・卵白アルブミンをトリプシン分解し、ペプチド断片のアミロイド線維形成反応を調べた。まず、トリプシン分解混合物を用いて、さまざまな温度でアミロイド線維形成反応を調べたところ、40℃付近で極めて強くアミロイド線維が形成された (図1)。アミロイド線維形成は、アミロイドに特異的なチオフラビン T (ThT) による蛍光アッセイ、電顕や原子間力顕微鏡による形態観察で行った。

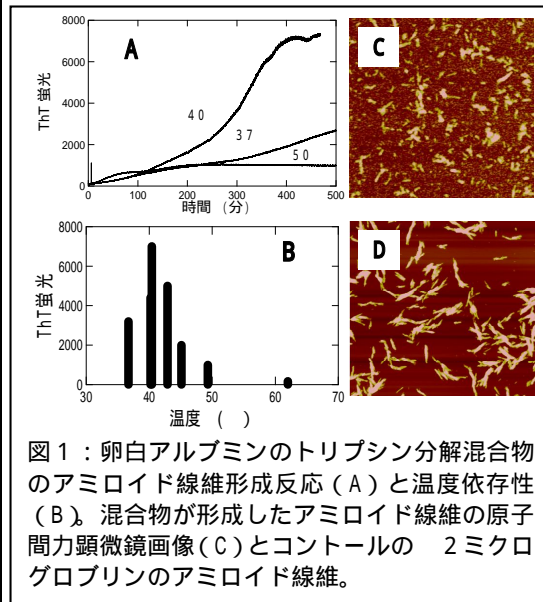


図1：卵白アルブミンのトリプシン分解混合物のアミロイド線維形成反応 (A) と温度依存性 (B)。混合物が形成したアミロイド線維の原子間力顕微鏡画像 (C) とコントロールの 2 ミクログロブリンのアミロイド線維。

・次に、アミロイドを形成するペプチドを HPLC、マスペクトルなどによって同定し、単離・精製した。ペプチドは 23 アミノ酸残基からなり、その配列は、159NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK181 であった。つまり卵白アルブミンの 159-181 残基の領域に相当し、OVA ペプチドと呼んだ。

・23 残基からなる OVA ペプチドを化学合成した。合成したペプチドのアミロイド線維形成反応を、ThT 蛍光アッセイ、形態観察によって行い、OVA ペプチドがアミロイド線維を形成することを検証した。

・以上より、全長の卵白アルブミンはアミロ

イド線維を形成しないか、あるいは、極めて形成しにくい、断片ペプチドはアミロイドを容易に形成することが明らかになった。つまり、全長卵白アルブミンは、断片ペプチドの強いアミロイド性を隠しているとみなすことができる。

(2) トリプシン分解物による OVA ペプチドのアミロイド線維形成の抑制

・卵白アルブミンのトリプシン分解混合物におけるアミロイド線維形成反応は比較的ゆっくりと進行した。また、アミロイド線維形成を促進する界面活性剤 SDS を添加することが必要であった。他方、単離した OVA ペプチドや、合成した OVA ペプチドのアミロイド線維形成は、迅速に進んだ。以上より、トリプシン分解混合物の系では、他のペプチドが OVA ペプチドのアミロイド線維形成を阻害していることが明らかとなった。

(3) 2 ミクログロブリン断片のアミロイド線維形成と夾雑系の効果

・リシン特異的なプロテアーゼによって 2 ミクログロブリンを分解して生じる 9 つのペプチドの混合物を作成し、アミロイド線維形成反応を、ThT 蛍光アッセイ、二次元 NMR などによって調べた。その結果、混合物の中では、K3 ペプチドが特異的にアミロイド形成をすることが明らかとなった。ただし、凝集性の極めて高い K6 ペプチドの挙動については不明な点が残された。

・単離した K3 ペプチドは、混合物に比べると迅速にアミロイド線維を形成した。単離した K3 ペプチドと混合物の量比を変えて、高貝の効果を詳細に調べた。その結果、酵素分解ペプチド混合物は K3 ペプチドのアミロイド線維形成を、濃度依存的に抑制していることが示された。

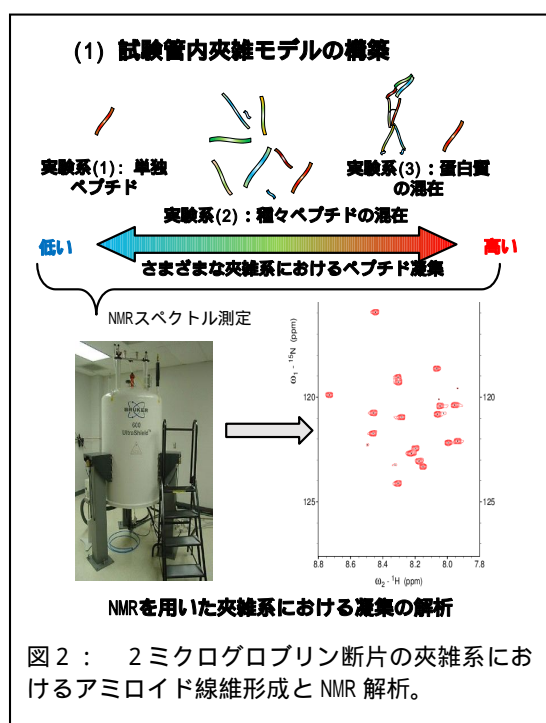


図 2 : 2 ミクログロブリン断片の夾雑系におけるアミロイド線維形成と NMR 解析。

・同様の阻害実験を、K3 ペプチドと全長の 2 ミクログロブリンを用いて調べた。全長の 2 ミクログロブリン自身もアミロイド線維を形成するが、反応は遅い。両者の量比を変化させた実験から、全長 2 ミクログロブリンは、濃度依存的に、K3 ペプチドのアミロイド線維形成を阻害することが明らかとなった。

・K3 ペプチドにはシステイン残基が 1 つ存在する。このシステイン残基を電子あきスピン共鳴 (ESR) 試薬によって標識し、全長 2 ミクログロブリンの二次元 NMR スペクトルを測定して、相互作用位置を残基レベルで明らかにすることを試みた。現在のところ、特異的な部位は明らかとなっていない。

以上に加え、以下の実験を行った。

(4) ヘパリンのアミロイド線維形成に及ぼす効果

代表的なグリコサミノグリカンであるヘパリンはアミロイド線維形成を促進することが知られている。ヘパリンのアミロイド線維形成に対する効果を、2 ミクログロブリン、ニワトリ卵白リゾチームなどを用いて調べた。ヘパリンは濃度に依存して、アミロイド線維の促進とともに、抑制を引き起こすことを明らかにした。さらに、強い負電荷をもたらす静電的な反発力の抑制によってアミロイド線維形成を促進する効果とともに、ヘパリンの高濃度においては、ヘパリンの硫酸基をもたらす塩析効果が重要であることを明らかにした。

(5) ポリリン酸のアミロイド線維形成に及ぼす効果

一般的な蛋白質凝集の例として、インターネットなどでよく知られている「コーラに少量の牛乳を添加すると、牛乳が凝集する現象」に注目した。これを蛋白質の構造物性の視点から調べ、コーラに含まれるポリリン酸が、牛乳を強く凝集させる原因物質であることを明らかにした。さらにポリリン酸は、一般的にアミロイド線維形成反応を促進することを明らかにした。以上の結果は、一般的な蛋白質の凝集反応と、アミロイド線維形成反応の関係を考える上でも重要な成果である。

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 3 件)

So, M., Hata, Y., Naiki, H. and Goto, Y. Heparin-induced amyloid fibrillation of β_2 -microglobulin explained by solubility and a supersaturation-dependent conformational phase diagram. *Protein Sci.* 26(5), 1024-1036 (2017). doi:

10.1002/pro.3149 査読有

So, M., Hall, D. and Goto, Y. Revisiting

supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 36, 32-39 (2016). doi: 10.1016/j.sbi.2015.11.009. 査読有
Adachi, M. So, M., Sakurai, K., Kardos, J. and Goto, Y. Supersaturation-limited and unlimited phase transitions compete to produce the pathway complexity in amyloid fibrillation. *J. Biol. Chem.* 290(29), 18134-18145 (2015).doi:10.1074/jbc.M115.648139. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

後藤 祐児、超音波に依存した蛋白質過飽和溶液の相転移現象、日本物理学会第 72 回年次大会シンポジウム、2017 年 3 月 18 日、大阪大学(大阪府、豊中市)。
後藤 祐児、アモルファス凝集とアミロイド線維の区別および疾患関連性、企業原パと先端蛋白質科学との接点を探るシンポジウム、2017 年 11 月 16 日、東京大学(東京都、文京区)。

Goto, Yuji, Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. Third International Symposium on Protein Folding and Dynamics, 2016 年 11 月 8 - 11 日、NCBS (Bangalore, India).

後藤 祐児、蛋白質の凝集と病気、大阪大学リサーチクラウドカフェ、2016 年 10 月 12 日、京阪電車なにわ橋駅(大阪府、大阪市)。

Goto, Yuji, Toward understanding the unified mechanism of protein aggregation. 農芸化学会中部関西合同大会・シンポジウム：酵素活性分子研究の新展開—タンパク質のフィールドインク研究と酵素機能の利用、2015 年 9 月 19 日、富山県立大学(富山県、射水市)。

Goto, Yuji, Supersaturation-limited protein misfolding revealed by ultrasonication. IUBMB-SBBq Satellite Symposium: Frontiers in Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases and Cancer, August 30-31, 2015, Rio de Janeiro, Brazil.

Goto, Yuji, Supersaturation-limited protein misfolding revealed by ultrasonication. The 23rd International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Congress. August 24-28, 2015, Foz do Iguaçu, Brazil.

Goto, Yuji, Supersaturation-limited and unlimited phase transitions compete to produce the pathway complexity in amyloid fibrillation. SFB1035 Conference on Conformational Transitions in Proteins. May 3-6, 2015, Venice International University, Venice, Italy.

後藤 祐児、アミロイド線維形成における過飽和の果たす役割、第 3 回日本アミロイドーシス研究会学術集会：シンポジ

ウム「アミロイド形成機構の解明と新たな治療戦略への展開」、2015 年 8 月 21 日、KKR 東京。

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/physical/yoeki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 祐児 (GOTO, Yuji)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：40153770

(2) 連携研究者

荻 博次 (OGI, Hirotugu)
大阪大学・基礎工学研究科・准教授
研究者番号：90252626

櫻井 一正 (SAKURAI, Kazumasa)
近畿大学・先端技術総合研究所・准教授
研究者番号：10403015