

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18518

研究課題名(和文) Study on cold and heat denaturation of amyloid fibrils of intrinsically disordered alpha-synuclein

研究課題名(英文) Study on cold and heat denaturation of amyloid fibrils of intrinsically disordered alpha-synuclein

研究代表者

李 映昊 (YOUNG-HO, LEE)

大阪大学・たんぱく質研究所・講師

研究者番号：70589431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：異なる温度(298、310、323、333、343K)でアルファシヌクレインのアミロイド線維を作製し、低温あるいは高温側への温度変化に対するアミロイド線維の構造安定性を調べた。異なる温度で形成された線維は、類似の二次構造およびコア領域を示す一方、線維の太さに違いが見られた。線維を含む溶液を383Kまで昇温させることで、線維は高温変性した。273Kまで温度を低下させることで、線維の低温変性が見られた。さらに、高温条件で形成した線維ほど、構造安定性が高く、変性速度も遅いことが分かった。以上から、アミロイド線維の構造安定性は、二次構造ではなく線維の太さなど高次構造によって調節されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：I examined cold and heat denaturation of amyloid fibrils of intrinsically disordered alpha-synuclein (aSN) prepared at various temperatures (298, 310, 323, 333, and 343 K). Despite differences in temperature for aSN amyloidogenesis, all fibrils showed similar core regions and secondary structures with the distinct width. As temperature increased from 298 to 383 K, all types of aSN fibrils heat-denatured to monomers from approximately 343 K. Decreasing temperature from 298 to 273 K caused cold denaturation of fibrils to monomers. Intriguingly, the stability of aSN fibrils depended on temperature for preparing fibrils. aSN fibrils generated at higher temperature showed higher stability at high and low temperature as well as slower denaturation kinetics than fibrils formed at lower temperature. Taken together, the stability of aSN amyloid fibrils depended on growing temperature of fibrils which produced differences in higher order structures of amyloid fibrils.

研究分野：蛋白質科学、生物物理、生化学

キーワード：Alpha-synuclein Amyloid fibril Cold denaturation Heat denaturation Kinetics Protein aggregation Protein misfolding Thermodynamics

### 1. 研究開始当初の背景

周囲の刺激により不安定になった可溶性蛋白質は不溶性の異常凝集体を形成する。特異的な構造や形態がない不定形凝集が形成される反面、ある条件下ではアミロイド線維のような線維状の規則正しい蛋白質の凝集体が形成される。蛋白質の凝集形成反応そして凝集体の沈着は、蛋白質の失活および40種類以上の深刻な病気を引き起こす。代表的な病気にアルツハイマー病やパーキンソン病のような神経疾患および透析アミロイドーシスのようなアミロイドーシスが挙げられる。

近年、アミロイド線維の形成機構および構造の特徴が、原子レベルから分子レベルまで明らかになりつつある。しかし、アミロイド線維の構造安定性に関する研究はほとんどない。我々は、10種類以上の様々なアミロイド線維の温度に対する構造安定性を網羅的に調べた (Ikenoue and Lee et al. (2014) PNAS)。アミロイド線維の種類によらずに55°C以上の高温で線維の構造安定性が低下し、モノマーに脱重合 (高温変性) することが見出された。20°Cより低い低温側では、アルファシヌクレインアミロイド線維のみが不安定になり、モノマーに脱重合 (低温変性) することが明らかになった。そこで、0°Cから110°Cまでの温度域におけるアルファシヌクレインアミロイド線維の安定性のカーブを作成することができた。

この安定性のカーブから、アルファシヌクレインアミロイド線維は0°C~20°Cの温度域で低温変性し、55°C以上では高温変性をすることが分かった。また、20°Cから55°Cまでの温度域では安定に存在することも分かった。しかし、20°C以下の低温そして55°C以上の高温でもアルファシヌクレインはアミロイド線維を形成する報告がある。そこで、アルファシヌクレインは異なる温度で異なる構造安定性をもつアミロイド線維を形成する可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

パーキンソン病の原因蛋白質であるアルファシヌクレインに着目し、異なる温度で形成されるアルファシヌクレインアミロイド線維の温度変化に対する構造安定性を調べ、アミロイド線維の構造と構造安定性間の関連性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

円二色性分光法  
 蛍光分光法  
 核磁気共鳴分光法  
 原子間力顕微鏡法  
 電子顕微鏡法  
 プロテオリスिस  
 質量分析法  
 フーリエ変換赤外分光法

### 4. 研究成果

異なる温度 (25°C、37°C、50°C、60°C、70°C) でアルファシヌクレインのアミロイド線維を作製し、0°Cの低温から110°Cの高温までの温度変化に対するアルファシヌクレインアミロイド線維の構造安定性を調べた。

異なる温度で形成された線維は、類似の二次構造およびコア領域を示す一方、線維の太さに違いが見られた。線維を含む溶液を110°Cまで昇温させることで、線維は高温変性した。0°Cまで温度を低下させることで、線維の低温変性が見られた。さらに、高温条件下で形成した線維ほど、構造安定性が高く、変性速度も遅いことが分かった (図1)。以上から、アミロイド線維の構造安定性は、二次構造ではなく線維の太さなど高次構造によって調節されることが分かった。

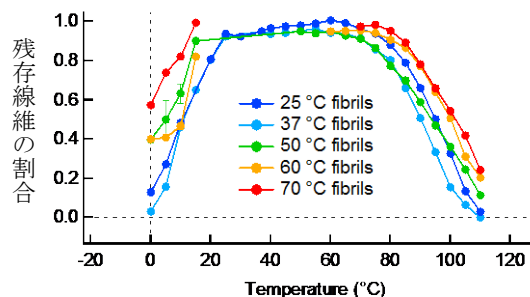


図1. 異なる温度で形成された線維の安定性カーブ

### 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18件)

① Kinoshita M., Kakimoto E., Terakawa M. S., Lin Y., Ikenoue T., So M., Sugiki T., Ramamoorthy A., Goto Y., Lee Y. -H., Model Membrane Size-dependent Amyloidogenesis of Alzheimer's Amyloid- $\beta$  peptides Phys. Chem. Chem. Phys., 査読有, In press  
 DOI: No DOI (In pressのため)

② Kinoshita M., Lin Y., Nakatsuji M., Inui T., Lee Y. -H., Kinetics and polymorphs of yeast prion Sup35NM amyloidogenesis, Int. J. Biol. Macromol., 査読有, In press  
 DOI: No DOI (In pressのため)

③ Sahoo B. \*, Maruyama K. \*, Edula J. \*, Tougan T. \*, Lin Y. \*, Lee Y. -H. \*, Horii T., Fujiwara T., Mechanistic and structural basis of bioengineered bovine Cathelicidin-5 with optimized therapeutic activity, Sci. Rep., 査読有, 2017, 7, 44781-44796 (\*equal contribution)  
 DOI: 10.1038/srep44781

- ④Kinoshita M., Kim J. Y., Lin Y., Markova N., Lee Y.-H., Practical Tips of Calorimetric Experiments using PEAQ-ITC, Malvern Instruments Ltd., 査読有, 2017  
<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN161202MicroCalPEAQITCPracticalTips.aspx>
- ⑤Ikenoue T., Kinoshita M., Lin Y., Lee Y.-H., Biophysical Applications of Calorimetric Methods to Examination of Protein Misfolding and Aggregation, Malvern Instruments Ltd., 査読有, 2017  
<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/Whitepapers/WP170307MicrocalorimetryProteinMisfoldingAggregation.aspx>
- ⑥Korshavn K. J., Satriano C., Lin Y., Zhang R., Dulchavsky M., Bhunia A., Ivanova M. I., Lee Y.-H., La Rosa C., Lim M. H., Ramamoorthy A. Reduced Lipid Bilayer Thickness Regulates the Aggregation and Cytotoxicity of Amyloid- $\beta$ , *J. Biol. Chem.*, 査読有, 2017, 29, 4638-4650  
 DOI : 10.1074/jbc.M116.764092
- ⑦Kinoshita M., Kim J. Y., Kume S., Lin Y., Mok K. H., Kataoka Y., Ishimori K., Markova N., Kurisu G., Hase T., Lee Y.-H., Energetic basis on interactions between ferredoxin and ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase at varying physiological conditions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 2017, 482, 909-915  
 DOI : 10.1016/j.bbrc.2016.11.132
- ⑧Kim J. Y., Kinoshita M., Satoshi K., Hanke G. T., Sugiki T., Ladbury J. E., Kojima C., Ikegami T., Genji K., Goto Y., Hase T. and Lee Y.-H., Noncovalent Forces Tune the Electron Transfer Complex between Ferredoxin and Sulfite Reductase to Optimize Enzymatic Activity, *Biochem. J.*, 査読有, 2016, 473, 3837-3854  
 DOI : 10.1042/BCJ20160658
- ⑨Alsanousi N., Sugiki T., Furuita K., So M., Lee Y.-H., Fujiwara T., Kojima C., Solution NMR Structure and Inhibitory Effect against Amyloid- $\beta$  Fibrillation of Humanin Containing a d-Isomerized Serine Residue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 2016, 477, 647-653  
 DOI : 10.1016/j.bbrc.2016.06.114
- ⑩Negoro S., Kawashima Y., Shibata N., Kobayashi T., Baba T., Lee Y.-H., Kamiya K., Shigeta Y., Nagai K., Takehara I., Kato D. I., Takeo M., Higuchi Y., Mutations Affecting the Internal Equilibrium of the 6-aminohexano-atedimer Hydrolase Reaction, *FEBS Lett.*, 査読有, 2016, 590, 3133-3143  
 DOI : 10.1002/1873-3468
- ⑪Kawakami T., Mishima Y., Kinoshita M., Lee Y.-H., Suetake I., A thiirane linker for isopeptide mimetics by peptide ligation, *Tetrahedron Lett.*, 査読有, 2016, 57, 2112-2115  
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.04.006>
- ⑫Lin Y., Kardos J., Imai M., Ikenoue T., Kinoshita M., Sugiki T., Ishimori K., Goto Y., Lee Y.-H., Amorphous Aggregation of Cytochrome c with Inherently Low Amyloidogenicity Is Characterized by the Metastability of Supersaturation and the Phase Diagram, *Langmuir*, 査読有, 2016, 32, 2010-2022  
 DOI : 10.1021/acs.langmuir.5b03810
- ⑬Mutoh R., Muraki N., Shinmura K., Kubota-Kawai H., Lee Y.-H., Nowaczyk M. M., Rögner M., Hase T., Ikegami T., Kurisu G., X-ray Structure and Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Interaction Sites of the Ga-Substituted Cyanobacterial Ferredoxin, *Biochemistry*, 査読有, 2015, 54, 6052-6061  
 DOI : 10.1021/acs.biochem.5b00601
- ⑭Sakurai K., Nakahata R., Lee Y.-H., Kardos J., Ikegami T. and Goto Y., Effects of a Reduced Disulfide Bond on Aggregation Properties of the Human IgG1 CH3 Domain, *Biochim. Biophys. Acta-Proteins and Proteomics*, 査読有, 2015, 1854, 1526-1535  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.02.020>
- ⑮Kinoshita M., Kim J. Y., Kume S., Sakakibara Y., Sugiki T., Kojima C., Kurisu G., Ikegami T., Hase T., Kimata-Aruga Y., Lee Y.-H., Physicochemical Nature of Interfaces Controlling Ferredoxin NADP<sup>+</sup> Reductase Activity through Its Interprotein Interactions with Ferredoxin, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics*, 査読有, 2015, 1847, 1200-1211  
 DOI : 10.1016/j.bbabi.2015.05.023
- ⑯Micsonai A., Wien F., Kernya L., Lee Y.-H., Goto Y., Réfrégiers M., Kardos J., Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA., 査読有, 2015, 112, E3095-103  
DOI : 10.1073/pnas.1500851112

⑰Oktaviani N.A., Risør M.W., Lee Y.-H., Megens R.P., de Jong D.H., Otten R., Scheek R.M., Enghild J.J., Nielsen N.C., Ikegami T., Mulder F.A.A., Optimized Co-Solute Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Rapid NMR Analysis of a Highly Fibrillogenic Peptide, *J. Biomol. NMR*, 査読有, 2015, 62, 129-142  
DOI : 10.1007/s10858-015-9925-8

⑱Yagi H., Mizuno A., So M., Hirano M., Adachi M., Akazawa-Ogawa Y., Hagihara Y., Ikenoue T., Lee Y.-H., Kawata Y., Goto Y., Ultrasonication-Dependent Formation and Degradation of  $\alpha$ -Synuclein Amyloid Fibrils, *Biochim. Biophys. Acta.-Proteins and Proteomics*, 査読有, 2015, 1854, 209-217  
DOI : 10.1016/j.bbapap.2014.12.014

[学会発表] (計7件)

①李映昊、等温滴定熱量測定を用いた分子間相互作用の熱力学、Malvern ウェブナー (神戸、日本)、2016年6月23日

② Lee Y.-H., Principle of Protein Misfolding and Aggregation - New Findings of Amyloid Formation from Thermo-dynamics, RIKEN CLST セミナー (神戸、日本)、2016年3月18日

③Lee Y.-H., The Interaction of Sulfite Reductase with Ferredoxin and Its Relation to Enzyme Activity (北海道大学、札幌、日本)、2016年2月26日

④ Lee Y.-H., Thermodynamic Study on Interprotein Interaction between Oppositely-charged Electron Transfer Proteins, Institute for Protein Research seminar on "Bridging the Gap: from Structure to Functional Dynamics of Photosynthesis Related Protein Complexes" (Osaka, Japan), 2016年2月2日

⑤ 李映昊、The Study on Thermodynamic Property of Protein Misfolding and Aggregation、日本分子生物学会・日本生化学会大会 (神戸、日本)、2015年12月3日

⑥ Lee Y.-H., Toward Understanding of Thermodynamic Property of Protein Misfolding and Aggregation, The 5th Korean Society for Protein Science (KSPS) Annual symposium and the 5th Asia-Pacific symposium on Intrinsically Disordered Proteins (Daejeon, Korea), 2015年10月9

日

⑦ 李映昊、Toward the Establishment of Thermodynamics on Protein Misfolding and Aggregation、大阪府立大学オープンセミナー (大阪、日本)、2015年4月22日

[図書] (計6件)

① Sugiki T., Lee Y.-H., Advanced Techniques to Detect Protein-Protein Interactions using Solution Nuclear Magnetic Resonance (Part II: Cross-saturation, Paramagnetic Effects, and In-cell NMR), Protein-Protein Interactions (PPIs): Types, Methods for Detection and Analysis (Nova Science Publishers, Inc. (NOVA)) 査読有, 2017  
[https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=59611&osCid=b17406f46d25c202a8c2998398043182](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=59611&osCid=b17406f46d25c202a8c2998398043182)

② Lee Y.-H., Sugiki T., Advanced Techniques to Detect Protein-Protein Interactions using Solution Nuclear Magnetic Resonance (Part I: Chemical Shift Perturbation and Residual Dipolar Coupling), Protein-Protein Interactions (PPIs): Types, Methods for Detection and Analysis (Nova Science Publishers, Inc. (NOVA)) 査読有, 2017  
[https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=59611&osCid=b17406f46d25c202a8c2998398043182](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=59611&osCid=b17406f46d25c202a8c2998398043182)

③ Ikenoue T., Lin Y., Kinoshita M., Sakurai K., Goto Y., Lee Y.-H., Molecular Structure of Amyloid Fibrils Revealed by Thermodynamics, Protein-Protein Interactions (PPIs): Types, Methods for Detection and Analysis (Nova Science Publishers, Inc. (NOVA)) 査読有, 2017  
[https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=59611&osCid=b17406f46d25c202a8c2998398043182](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=59611&osCid=b17406f46d25c202a8c2998398043182)

④ Kim J.Y., Kinoshita M., Inui T., Kurisu G., Goto Y., Hase T., Ishimori K., Lee Y.-H., Thermodynamics of Protein-Protein Interactions Examined by Isothermal Titration Calorimetry, Protein-Protein Interactions (PPIs): Types, Methods for Detection and Analysis (Nova Science Publishers, Inc. (NOVA)) 査読有, 2017  
[https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=59611&osCid=b17406f46d25c202a8c2998398043182](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=59611&osCid=b17406f46d25c202a8c2998398043182)

⑤ Kinoshita M., Kim J.Y., Lin Y., Markova N., Hase T., Lee Y.-H., Biochemical and Biophysical Methods to Examine Effects of

Site-directed Mutagenesis on Enzymatic Activities and Interprotein Interactions. Methods in Molecular Biology (In Vitro Mutagenesis: Methods and Protocol) (Springer) Methods Mol. Biol., 査読有, 2017, 1498, 439-460  
DOI : 10.1007/978-1-4939-6472-7\_30

©Kim J. Y., Ikegami T., Goto Y., Hase T., Lee Y.-H., Investigation of Protein-Protein Interactions of Ferredoxin and Sulfite Reductase under Different Sodium Chloride Concentrations by NMR spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry, Molecular Physiology and Ecophysiology of Sulfur (Springer), 査読有, 2015, 169-177  
DOI : 10.1007/978-3-319-20137-5\_17

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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

李 映昊 (Lee, Young-Ho)  
大阪大学タンパク質研究所 講師  
研究者番号 : 70589431

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

### (4) 研究協力者

( )