

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82648

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21680

研究課題名(和文) ガングリオシド糖脂質クラスター上におけるアミロイド の構造転換の精密解析

研究課題名(英文) Structural characterization of conformational transition of amyloid beta peptide promoted on ganglioside clusters

研究代表者

矢木 真穂 (YAGI, Maho)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：40608999

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)：固体NMR法を用いて、リン脂質膜および糖脂質クラスターに結合したアミロイド(A β)の構造解析を行った。その結果、脂質膜上において、A β のN末端領域は特定の二次構造をとらないが、C末端領域は β -ストランドを形成していることが明らかとなった。この構造は、A β がヘリックス構造からクロスシート構造へと至る β -転移の過程で一過的に生じる中間体構造であると考えられる。また、家族性変異型A β について、NMR解析および速度論的解析を実施した。その結果、1アミノ酸残基の置換によって引き起こされるA β のガングリオシドクラスターへの結合特性の変化が、アミロイド凝集核の構造形成に影響を与えることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy has elucidated the membrane-induced conformation of amyloid (A β), in which the disordered N-terminal segment is followed by the stable C-terminal β -strand. The data obtained in this project provides insights into the molecular processes of the conformational transition of A β coupled with its assembly into parallel β -structures. Structural and kinetic analyses of the Flemish-type mutant (A21G) of A β (1-40) peptide were also performed in comparison with the wild type to examine the possible effects of the A21G mutation on the conformation of the A β (1-40) isoform. These findings suggest that the mutational perturbation to the membrane binding properties is coupled with the changes in nucleation behavior of A β during its fibril formation.

研究分野：生物物理学

キーワード：アミロイド ガングリオシド 固体NMR 糖脂質 アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患関連タンパク質の凝集体構造の形成には、神経細胞膜上の糖脂質の存在が深く関わっていることが明らかにされつつある。しかしながら、神経細胞膜とタンパク質の相互作用様式および神経細胞膜上で誘起されるタンパク質の構造変化の詳細は未解明であった。それは、このようなタンパク質と糖脂質膜からなる複雑かつ動的な超分子複合体の詳細な構造解析は通常の構造生物学的アプローチでは困難であったためである。

我々はこれまで、A β の異常会合は神経系に豊富に存在する GM1 ガングリオシドと A β の複合体形成を契機として促進されるという知見に基づき、GM1 クラスタと野生型 A β を対象に、構造生物学・生物物理学的研究を展開してきた。超高磁場 NMR 法と安定同位体標識技術を駆使することにより、通常の構造解析手法では困難であった A β -GM1 複合体の高分解能 NMR 計測に初めて成功した。さらに、GM1 クラスタ界面に結合した A β のトポロジーおよび空間配置を精密に決定した。これらの成果により、GM1 がクラスタ化した環境場こそが、A β の特異的な結合・構造変化・アミロイド線維形成を促す舞台となり、アルツハイマー病の発症に関与していることを明らかとしてきた。

一方、これまでの研究では、GM1 ミセル上に安定に結合した状態の A β を対象としてきたため、膜上で α ヘリックス構造を形成した A β 分子が協調して最終的に β シート構造と変化していく過程に関する構造情報は得られていなかった。我々のこれまでの研究より、A β のアミロイド線維の形成過程は多段階からなっており、ガングリオシドクラスタの組成・サイズ・曲率などが A β との相互作用を規定していることがわかってきている。しかし一方では、現在までの検討において、溶液 NMR 解析に適した小型のミセルやナノディスクでは A β の構造変化を十分誘起できないことが判明している。そこで、本研究では発想を転換し、より生体膜に近い膜モデルを利用した固体 NMR 解析を実施することができれば、A β の α ヘリックスから β シート構造形成へと至る構造変化の過程について精密な構造情報を抽出できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、NMR 法を用いて A β と環境場との相互作用の構造情報を蓄積することにより、構造変化から神経機能の破綻へと至る分子病態のメカニズムを理解することを目的とした。

(1) ガングリオシド膜上における A β の構造変換過程の解明：これまで培ってきた溶液 NMR 解析をベースに固体 NMR 手法へと拡張・応用することにより、膜上での α ヘリックス形成の先に繰り広げられるイベント、すな

わち、特徴的なトポロジーにより規定される A β -A β 分子間の過渡的な相互作用を詳細に捉えることを目指した。

(2) 家族性アルツハイマー病における変異型 A β の糖脂質認識の特異性の構造基盤の解明：一連の変異型 A β を対象に糖脂質膜環境との相互作用の分子構造基盤を解析することにより、変異型 A β によるガングリオシド認識の特異性を解明するとともに、糖脂質クラスタ環境に応じた A β の構造変化の過程を捉えることを目指した。

3. 研究の方法

固体 NMR 法を用いて、リン脂質膜および GM1 クラスタに結合した A β の構造解析を行った。安定同位体標識を施した A β ペプチドを調製し、脂質膜に対する A β の配向情報を抽出するとともに、A β の分子内相互および分子間相互作用に関わる残基を同定した。その際、糖脂質とリン脂質を組み込んだリポソームを調製し、糖脂質の含量や膜構成要素との割合を系統的に変化させることにより生じる A β 側の構造変化を NMR 解析により捉えた。また、家族性変異型 A β のうち Flemish 変異型 A β (A21G) に関して、溶液 NMR 解析および速度論解析を実施し、ガングリオシドとの相互作用に関する構造情報を得た。

4. 研究成果

(1) ガングリオシド膜上における A β の構造変換過程の解明：脂質膜に結合した A β の固体 NMR 解析を実施した。その結果、平面性の高いリン脂質膜上において、A β の N 末端領域は特定の二次構造をとらないが、C 末端領域は安定な β ストランドを形成していることが明らかとなった。また、C 末端領域の β ストランドは分子間で相互作用しており、平行 β シート構造を形成していることが示された。さらに、ガングリオシドの濃度を変化させたリポソームを作製し、固体 NMR 法を用いてガングリオシド含有膜上に結合した A β の構造解析を行い、ガングリオシドの含有量に依存して A β の二次構造が変化することが明らかとなった。これらの構造は、A β が α ヘリックス構造からクロス β シート構造へと至る α - β 転移の過程で一過的に生じる中間体構造であると考えられる。

(2) 家族性アルツハイマー病における変異型 A β の糖脂質認識の特異性の構造基盤の解明：Flemish 変異型 A β (A21G) および野生型 A β について、NMR 解析および速度論的解析を実施した。チオフラビン T 蛍光を用いた速度論的解析の結果、A21G 変異はアミロイド線維の伸長過程よりも核形成過程に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。また、NMR 解析の結果、GM1 ガングリオシドミセルに結合した Flemish 型 A β は、C 末端側の α ヘリックスは野生型と同様に保持されているが、N 末端側の α ヘリックスが野生型に比べて非常に緩まっていることが明らかとな

った。これらの結果から、1 アミノ酸残基の置換によって引き起こされる A の GM1 ガングリオシドクラスター上での構造変化が、アミロイド凝集核の構造形成に影響を与えることが示された。

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 13 件)

Kurimoto E, Satoh T, Ito Y, Ishihara E, Okamoto K, Yagi-Utsumi M, Tanaka K, Kato K.

Crystal structure of human proteasome assembly chaperone PAC4 involved in proteasome formation.

Protein Sci. (2017) 26, 1080-1085.

doi: 10.1002/pro.3153. 査読有

加藤晃一、谷中冴子、矢木-内海真穂

NMR 構造生物学がもたらす新たな創薬研究のツール

MEDCHEM NEWS (2016) 26, 195-200.

URL: http://medchem.pod.ne.jp/index.php?option=com_content&view=article&id=146%3Amedchem-news-&catid=36%3Acategory3&Itemid=56&lang=en. 査読有

Thammaporn R, Ishii K, Yagi-Utsumi M, Uchiyama S, Hannongbua S, Kato K.

Mass Spectrometric Characterization of HIV-1 Reverse Transcriptase Interactions with Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors.

Biol Pharm Bull. (2016) 39, 450-454.

doi: 10.1248/bpb.b15-00880. 査読有

Habchi J, Arosio P, Perni M, Costa AR, Yagi-Utsumi M, Joshi P, Chia S, Cohen SI, Müller MB, Linse S, Nollen EA, Dobson CM, Knowles TP, Vendruscolo M.

An anticancer drug suppresses the primary nucleation reaction that initiates the production of the toxic A_β42 aggregates linked with Alzheimer's disease.

Sci Adv. (2016) 2, e1501244. doi:

10.1126/sciadv.1501244. 査読有

Seetaha S, Yagi-Utsumi M, Yamaguchi T, Ishii K, Hannongbua S, Choowongkamon K, Kato K.

Application of Site-Specific Spin Labeling for NMR Detecting Inhibitor-Induced Conformational Change of HIV-1 Reverse Transcriptase.

ChemMedChem. (2016) 11, 363-366. doi:

10.1002/cmdc.201500554. 査読有

Yagi-Utsumi M, Kato K, Nishimura K.

Membrane-Induced Dichotomous Conformation of Amyloid with the Disordered N-Terminal Segment

Followed by the Stable C-Terminal Structure.

PLoS One. (2016) 11, e0146405. doi: 10.1371/journal.pone.0146405. 査読有

Thammaporn R, Yagi-Utsumi M, Yamaguchi T, Boonsri P, Saparpakorn P, Choowongkamon K, Techasakul S, Kato K, Hannongbua S.

NMR characterization of HIV-1 reverse transcriptase binding to various non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors with different activities. Sci Rep. (2015) 5, 15806. doi: 10.1038/srep15806. 査読有

Newby FN, De Simone A, Yagi-Utsumi M, Salvatella X, Dobson CM, Vendruscolo M.

Structure-Free Validation of Residual Dipolar Coupling and Paramagnetic Relaxation Enhancement Measurements of Disordered Proteins.

Biochemistry. (2015) 54, 6876-6886.

doi: 10.1021/acs.biochem.5b00670. 査読有

Yagi-Utsumi M, Dobson CM.

Conformational Effects of the A21G Flemish Mutation on the Aggregation of Amyloid Peptide.

Biol Pharm Bull. (2015) 38, 1668-1672.

doi: 10.1248/bpb.b15-00466. 査読有

Yagi-Utsumi M, Satoh T, Kato K.

Structural basis of redox-dependent substrate binding of protein disulfide isomerase.

Sci Rep. (2015) 5, 13909. doi:

10.1038/srep13909. 査読有

Inagaki K, Satoh T, Yagi-Utsumi M, Le Gulluche AC, Anzai T, Uekusa Y, Kamiya Y, Kato K.

Redox-coupled structural changes of the catalytic a' domain of protein disulfide isomerase.

FEBS Lett. (2015) 589, 2690-2694. doi:

10.1016/j.febslet.2015.07.041. 査読有

Sato S, Yoshimasa Y, Fujita D, Yagi-Utsumi M, Yamaguchi T, Kato K, Fujita M.

A Self-Assembled Spherical Complex Displaying a Gangliosidic Glycan Cluster Capable of Interacting with Amyloidogenic Proteins.

Angew Chem Int Ed Engl. (2015) 54,

8435-8439. doi:

10.1002/anie.201501981. 査読有

Yagi-Utsumi M, Kato K.

Structural and dynamic views of GM1 ganglioside.

Glycoconj J. (2015) 32, 105-112. doi:

10.1007/s10719-015-9587-5. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

Maho Yagi-Utsumi

Structural views of dynamical ordering of biomolecule

Okazaki Institute for Integrative Bioscience Retreat 2016, 2016 年 11 月 22 日, 三河湾リゾートリンクス(愛知県西尾市), 招待講演

Maho Yagi-Utsumi, Tadashi Satoh, and Koichi Kato

Structural basis for interactions of molecular chaperones with intrinsically disordered proteins

The 9th Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, 2016 年 11 月 14 日, Gyeongju (Korea), 招待講演

Maho Yagi-Utsumi, Tadashi Satoh, and Koichi Kato

Structural basis for interactions of molecular chaperones with natively unstructured proteins involved in neurodegenerative diseases

The 42nd Naito Conference, 2016 年 10 月 6 日, シャトレゼ・ガトーキングダムサッポロ(北海道札幌市)

Maho Yagi-Utsumi and Koichi Kato

Interactions of amyloidogenic proteins with membranes and molecular chaperones

the 17th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016 年 8 月 26 日, 京都国際会議場(京都府京都市), 招待講演

Maho Yagi-Utsumi, Katsuyuki Nishimura, and Koichi Kato

NMR Characterization of Conformational Transition of Amyloid-Promoted in Membrane Environments

the 17th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016 年 8 月 25 日, 京都国際会議場(京都府京都市)

矢木真穂

タンパク質の構造ダイナミクスと分子集合メカニズムの理解を目指して

分子研若手の会, 2016 年 7 月 22 日, 分子科学研究所(愛知県岡崎市), 招待講演

Maho Yagi-Utsumi, Katsuyuki Nishimura, and Koichi Kato

NMR characterization of conformational transition of amyloid beta peptide promoted on ganglioside clusters

The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies,

2015 年 12 月 15 日, Honolulu (Hawaii, USA)

矢木真穂, 佐藤匡史, 山口拓実, 加藤晃一

神経変性疾患関連タンパク質と分子シャペロンとの相互作用の構造基盤

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015), 2015 年 12 月 1 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 招待講演

矢木真穂, 加藤晃一

ガングリオシドクラスターを舞台とする神経変性疾患関連タンパク質の構造転移

第 15 回 日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 26 日, あわぎんホール(徳島県徳島市), 招待講演

矢木真穂, 佐藤匡史, 加藤晃一

プロテインジスルフィドイソメラーゼの基質認識の構造基盤の解明

第 79 回日本生化学会中部支部例会, 2015 年 5 月 23 日, 信州大学(長野県松本市)

〔図書〕(計 2 件)

M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, Y. Uekusa and K. Kato

NMR in Glycoscience and Glycotechnology (2017) RSC Publishing, 396 (161-176)

M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, R. Kitahara, and K. Kato

Molecular Science of Fluctuations Toward Biological Functions (2016) Springer, 276 (87-104)

〔その他〕

ホームページ

岡崎統合バイオサイエンスセンター生命分子研究部門

https://groups.ims.ac.jp/organization/kato_g/

アウトリーチ活動

女子中高生のためのサイエンスカフェ実行委員(新学術「動的秩序と機能」主催)

出前授業「身近な化学反応で学ぶ! タンパク質のかたちとはたらき」, 矢作北中学校, 2016 年 12 月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢木 真穂 (YAGI, Maho)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号: 40608999