

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15110

研究課題名(和文) NMR・MRIとタンパク質科学に基づくAオリゴマー生成過程の解析

研究課題名(英文) Analyses of the oligomers of amyloid beta by NMR/MRI and protein science

研究代表者

寺沢 宏明 (TERASAWA, HIROAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：10300956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病患者の脳内には、アミロイド(A β)の不溶性線維を主成分とする老人斑が見つかる。近年の研究より、A β が不溶性線維に変化する前段階の可溶性オリゴマーが、強い神経毒性をもたらすという説が広く受け入れられている。本研究は、A β オリゴマーの最小単位であるA β ダイマーの分子間相互作用様式を、NMR、光架橋反応、質量分析を駆使して明らかにすることを目的とした。質量分析における検出フラグメントの強度を比較した結果、平行型および逆平行型の量比は2：1と見積もられた。本解析より、A β ダイマーは平行型と逆平行型のいずれも含み、逆平行型より平行型の方が好んで形成されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Amyloid beta (A β) is often bound in the brain of patients with Alzheimer disease as insoluble aggregates. It is generally assumed that soluble oligomer that occur before the aggregates exerts strong neurotoxicity. In this study, we explored the interaction mode of two monomers comprising the A β dimer that is the minimal component of A β oligomers, using NMR, photo-induced cross coupling and mass analyses. The results showed that the two monomers align in both parallel and anti-parallel manner in a 2:1 ratio, indicating that both the two forms exist, but the parallel one is more preferred.

研究分野：構造生物学

キーワード：認知症 アミロイド 神経毒性オリゴマー

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化社会の到来とともに、認知症患者は増加の一途をたどっている。現在、主要な認知症の一つであるアルツハイマー病患者は、世界で1800万人に達しており、予防・診断・治療法の確立が急務である。しかし、未だにアルツハイマー病については、その進行を遅らせることは出来ても、根本的な治療薬は開発されていないのが現状である。

(2) アルツハイマー病患者の脳内には、アミロイド (A β) の不溶性線維を主成分とする老人斑が見つかる。近年の研究より、A β の不溶性線維は毒性を持たず、A β が不溶性線維に変化する前段階の可溶性オリゴマーが、強い神経毒性をもたらすというオリゴマー仮説が広く受け入れられている(参考文献1)。そのため、A β オリゴマーは、認知症治療における分子標的薬の重要なターゲット分子と考えられる

(3) A β オリゴマーは、溶液中において結合・解離平衡にあり存在寿命が短く、直接その立体構造を解析することは難しい。A β の不溶性線維について、固体NMRにより3次元立体構造が解明されている(参考文献2)。解明された一つのA β の不溶性線維は平行型シート構造を形成しているが、逆平行型シート構造の形成も報告されている。そのため、A β オリゴマーはシート構造を形成すると想定されているが、平行型か、あるいは逆平行型かは明らかでない。

(4) 研究代表者のグループは、A β オリゴマーの構造を明らかにするため、NMR、光架橋反応(参考文献3)、質量分析を組み合わせたタンパク質化学・構造生物学的手法に基づいたA β の解析法の開発を行ってきた。

2. 研究の目的

A β オリゴマーの最小単位であるA β ダイマーの分子間相互作用様式を、NMR、光架橋反応、質量分析を駆使して明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 解析に用いるA β (1-42)タンパク質を調製するため、N末端側にユビキチンを融合したA β (1-42)タンパク質を大腸菌により大量発現した。ユビキチンタグを利用して発現したA β (1-42)を夾雑物から分離した後、ユビキチンタグを切断した。また、 ^{15}N 塩化アンモニウムを唯一の窒素源として含むM9最少培地においてA β (1-42)を発現させることで、 ^{15}N 標識を施したA β (1-42)タンパクを調製した。

(2) 光架橋反応による解析に用いるA β (1-42)変異体を構築した。野生型A β (1-42)においてはトリプシンによる切断箇所が3つ含まれており、トリプシンによる切断を受けると[1 5]、[6 16]、[17 28]、[29 - 42]の4つの断片が生じる。また、光架橋を形成するチロシン残基は10番目に一つ含まれるのみである。A β ダイマー中の2つのモノマーの相対配向が平行型か逆平行型か、またその相対位置の情報を得るため、10番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換し、新たに4番目と21番目に含まれる2つのフェニルアラニン残基をチロシン残基に置換した変異体を遺伝子操作により構築した。

(3) 光架橋反応および架橋産物の限定分解・質量分析を組み合わせて、A β (1-42)ダイマーの構造を解析した。ルテニウム試薬とタンパク質溶液の混合溶液に452 nmの光を当てると、空間的に近接した2つのチロシン残基間に瞬時に架橋が生じる。A β は溶液中において、モノマーとダイマーとの間の平衡状態にあるが、A β ダイマーにおいて2つのモノマーに含まれるチロシン残基どうしが近接すれば、光架橋反応により分子間に架橋を形成できると考えられる。本研究では、野生型にかわり上述した2残基のチロシン残基を含む変異体を用いて、光架橋反応を行った。反応産物のSDS電気泳動を行い、架橋により生じたダイマーおよび高次のオリゴマーの生成を調べた。また、生じたダイマーについてそのバンドのゲルを切りだし、ゲル状態のままトリプシンによる消化を行った。生じた消化断片をイオンスプレー型液体クロマトグラフィー質量分析法により解析することで架橋位置を同定した。また、分子内、分子間の光架橋産物を区別するため、非標識A β と ^{15}N 標識したA β を混合した試料を用いた解析も行った。非標識体断片と ^{15}N 標識体断片との架橋産物は、分子内のチロシン間相互作用では生じず、異なる分子のチロシンどうしが結合した場合のみ生じることを利用している。

(4) A β (1-42)溶液の濃度を変化させて、NMR緩和解析を行うことで、ダイマー化に関与する残基の同定を試みた。極低温プローブを備えた600 MHzのNMRマシンを用いて ^{15}N 標識A β (1-42)の測定を行った。A β (1-42)の濃度を増加させると、モノマーとダイマーとの平衡がダイマー側に偏る。その際、モノマーとダイマーとの間で化学環境が異なる残基においては、化学シフトやスピン緩和速度等が変化する。また、モノマーとダイ

マーとの間の交換が化学シフト差に近い場合は、化学交換による T_2 緩和も促進される。そこで、 ^{15}N 標識 A (1-42) の濃度を変えながら、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定しその線幅を調べた。また ^{15}N の T_1 , T_2 緩和測定も行うことで、濃度変化によるそれらの値の変化を残基ごとに調べた。

4. 研究成果

(1) N 末端にコピキチンを融合した A (1-42) タンパク質を大腸菌により大量発現させて、コピキチンタグの切断および精製を行った。 ^{15}N 塩化アンモニウムを唯一の窒素源とする M9 最小培地において A (1-42) タンパク質をエンコードするプラスミドを形質転換した大腸菌を培養することで、 ^{15}N 標識コピキチンを発現し精製した。

(2) 野生型 A (1-42) に含まれる 10 番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換して、4 番目、21 番目のフェニルアラニン残基をチロシン残基に置換した A (1-42) の変異体を構築した。

(3) A 変異体のモノマー溶液を調製し光架橋反応を行った。まず、非標識 A を用いて本解析を行った。生じた架橋産物を SDS ゲル電気泳動に流すことで、架橋ダイマーおよびトライマー以上の架橋産物が生じていることを確認した。流したゲルからダイマーのバンドを切り出して、ゲル状態のままトリプシンによる消化を行った。架橋断片をイオンスプレー型クロマトグラフィー質量分析により調べた。その結果、4 番目のチロシン残基を介した 2 つの [1 5] 断片の架橋産物および 21 番目のチロシン残基を介した 2 つの [17 28] 断片の架橋産物が検出された。この結果は、A ダイマーに平行型が含まれることを示す。さらに、4 番目と 21 番目のチロシンが架橋した [1 5] 断片と [17 28] 断片の架橋産物も検出された。この架橋産物は、モノマー分子内で架橋されて生じる場合と、異なるモノマー間で架橋されて生じる場合が考えられた。分子内と分子間架橋とを区別するため、非標識体と ^{15}N 標識体を混合した A (1-42) を用いて、光架橋反応を再度行い、限定分解、質量分析を行った。その結果、[1 5] 断片と [17 28] 断片の架橋産物には、分子間で架橋されたものが含まれることが明らかとなった。この結果は、A ダイマーに逆平行型ダイマーも含まれることを示す。また、質量分析における検出フラグメントの強度を比較した結果、平行型および逆平行型の量比は 2 : 1 と見積もられた。本解析より、A ダイマーは平行型と逆平行型のいずれも含み、逆平行型より平行型の方

が好んで形成されることが明らかとなった。固体 NMR により解明された A (1-42) の不溶性線維が平行型シート構造をとるので、平行型ダイマーが不溶性線維へと変化する可能性が考えられる。

(3) ^{15}N 標識 A (1-42) タンパク質の濃度を変化させて ^1H - ^{15}N HSQC 測定、および主鎖 ^{15}N 緩和測定を行った。A (1-42) の濃度変化により、 ^{15}N T_2 値が変化する残基を調べることによって、A のダイマー形成に参与する残基を同定した。

(4) 本研究により得られる A ダイマーの構造情報は、A オリゴマーの実像解明に貢献するとともに、A オリゴマーを標的とした創薬基盤技術の開発にも利用できると考えられる。

<引用文献>

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297 巻, 2002, 353-6

Xiao Y, Ma B, McElheny D, Parthasarathy S, Long F, Hoshi M, Nussinov R, Ishii Y. A (1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nat Struct Mol Biol*. 22 巻, 2015, 499-505

Fancy DA, Kodadek T. Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96 巻, 1999, 6020-4

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)

[学会発表](計 3 件)

Shintaro Yoshida, Sosuke Yoshinaga, Mitsuhiro Takeda, Ayumi Tanaka, Takashi Hamaguchi, Hitomi Yamaguchi, Shigeto Iwamoto, Takashi Saito, Yoshihiko Takinami, Toshiyuki Kohno, Takaomi C. Saïdo, Hiroaki Terasawa “ESI-QTOF MS 法を用いたアミロイドペプチドのオリゴマー形成機構の解析” 第 54 回日本生物物理学会 (2016 年 11 月 25 日) つくば国際会議場、茨城県

Mai Kawashita, Shintaro Yoshida, Sosuke Yoshinaga, Mitsuhiro Takeda, Ayumi

Tanaka, Takashi Hamaguchi, Hitomi Yamaguchi1, Shigeto Iwamoto, Takashi Saito, Yoshihiko Takinami, Toshiyuki Kohno, Takaomi C. Saido, Hiroaki Terasawa
“ Photo cross-linking and MS analyses of the amyloid -peptide oligomers ” 第 55 回日本生物物理学会 (2017 年 9 月 19 - 21 日)熊本大学黒髪キャンパス、熊本県

川下真依, 吉田晋太郎, 吉永壮佐, 武田光広, 田中愛弓, 濱口貴史, 山口瞳, 岩本成人, 斉藤貴志, 瀧浪欣彦, 瀬田丈士, 河野俊之, 西道隆臣, 寺沢宏明 “ 光架橋法と質量分析法を用いたアミロイドペータペプチド (A β) のオリゴマー形成メカニズムの解析 ” 第 36 回日本認知症学会 (2017 年 1 月 24 - 26 日、石川県立音楽堂、石川県

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺沢 宏明 (TERASAWA, Hiroaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬)・
教授
研究者番号 : 10300956

(3)連携研究者

吉永 壮佐 (YOSHINAGA, Sosuke)
熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬)・
講師
研究者番号 : 00448515

武田 光広 (TAKEDA, Mitsuhiro)
熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬)・
助教
研究者番号 : 90508558

西道 隆臣 (SAIDO, Takaomi)
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・教授
研究者番号 : 80205690