

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17783

研究課題名(和文) アミロイド線維形成に關与する水和水ダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Understanding hydration-water dynamics related to amyloid fibril formation

研究代表者

山本 直樹 (Yamamoto, Naoki)

神戸大学・理学研究科・特命助教

研究者番号：90580671

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)：アミロイド線維はタンパク質の異常凝集体であり、全身性アミロイドーシスなど難病疾患の原因と考えられている物質である。本研究ではアミロイド線維形成メカニズム解明のために、線維周辺に存在する水、すなわち水和水に焦点を当て、その動的挙動(ダイナミクス)をギガヘルツからテラヘルツ領域において評価した。温度依存性の複素誘電率スペクトルを用いて、特にギガヘルツ領域に存在する水和水の回転緩和成分に着目してスペクトルの解析をおこなったところ、モデルタンパク質インスリンにおいて、線維状態では正常状態よりも早い回転緩和を示す一方、線維形成中間体状態は線維と同等のダイナミクスであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Protein misfolding sometimes results in formation of abnormal aggregation, or amyloid fibril, which are thought to be causes of specified diseases such as generalized amyloidoses. In order to understand the underlying mechanism of the amyloid fibril formation, we scrutinized the dynamics of water around proteins or amyloid fibrils, i.e. hydration water, at gigahertz and terahertz regions. We performed temperature-dependent broadband dielectric spectroscopy in the frequency region by obtaining the complex dielectric spectra. We found that the rotational relaxational mode of hydration water became faster in the fibril state compared to the monomeric normal state while the relaxation time was similar between a prefibrillar intermediate state and the fibril state.

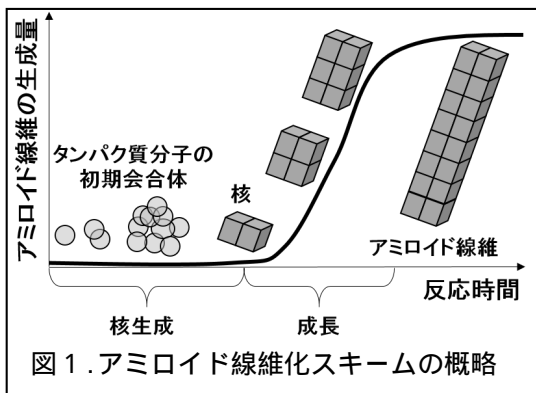
研究分野：生物物理化学

キーワード：広帯域誘電分光 タンパク質の水和水 アミロイド線維 線維前駆中間体 回転緩和

1. 研究開始当初の背景

(1) アミロイド線維とは

アミロイド線維はタンパク質やペプチドの異常蓄積により形成され、アルツハイマー病や関節リウマチなどの重い疾患、すなわちアミロイドーシスを引き起こす原因物質である。従ってアミロイド線維形成メカニズムの解明はそれら重篤疾患を根本的に治療する、あるいは予防する上で必要不可欠である。現在主に考えられている形成機構を図1に示す。まず単量体タンパク質が会合することにより初期会合体を形成し、その初期会合体がアミロイド線維伸長の元となる核を形成する。一旦この核が形成されると、その核にモノマーが構造を変化させながら次々と積層していき、速やかにアミロイド線維形成が引き起こされる。つまり、初期会合体は線維形成の引き金となる重要因子であり、初期会合体の性質の理解はアミロイド線維形成機構解明にとって重要な課題である。



(2) 線維前駆中間体の特徴

申請者が所属するグループでは近年、血糖値調節ホルモンタンパク質インスリンのB鎖において線維前駆中間体が安定に蓄積されることを発見した。様々な分光学的手法により、B鎖は定まった立体構造を持たないにも関わらず、100 nm程度の会合体を形成していることを明らかにした。アミロイド線維を形成する場合、シートを形成し、それらが隙間無く、硬く相互作用する。一方B鎖の線維前駆中間体は、溶媒である水分子と相互作用しつつゆるい相互作用で会合体を形成していると考えられ、この特異な性質は核形成機構の鍵を握っていることが予想される。

(3) 申請者のこれまでの研究と本研究課題の関連性

タンパク質表面と相互作用している水、すなわち水和水は、3次元的な水素結合ネットワークを形成し、時々刻々と揺らいでいる。このダイナミクスは、ギガヘルツ(10<sup>9</sup> Hz; GHz)からテラヘルツ(10<sup>12</sup> Hz; THz)において、ナノ秒からピコ秒の時間領域にわたる回転緩和や水分子間の低振動運動に反映される。申請者はこれまで世界に先駆けて、誘電分光(GHz帯)およびテラヘルツ分光(THz帯)を組み合わせた広帯域分光法をモデル球状タンパク質や脂質二重膜等の生体分子におい

て測定してきた。その結果、水和水はバルク水と比較して遅いダイナミクスを示すことを明らかにし、広帯域分光の有用性を実証した。そこでこの広帯域分光を用いて、B鎖の線維前駆中間体形成のメカニズムを、水和水ダイナミクスの違いを通して明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、アミロイド線維形成過程の各段階における水和水ダイナミクスを明らかにし、特に線維前駆中間体における水和水ダイナミクスの特異的性質を探ることを目標とする。手法としてGHz-THz帯における広帯域分光法を用いる。以下に達成すべき点を述べる。

(1) 試料としてインスリンから分離されるペプチド鎖のB鎖を用いる。申請者が所属する研究室において、インスリンB鎖は線維前駆中間体が安定に蓄積することを見出している。誘電分光およびテラヘルツ時間領域分光を用いて、初期段階、核形成期、および線維伸長期における水和状態の複素誘電率スペクトルを得る。測定は液体窒素温度(-195℃)から室温にかけての温度変化測定を行い、温度依存性スペクトルを得る。

(2) 温度依存性複素誘電率スペクトルをモデル関数でカーブフィッティングすることにより、水和水の回転緩和成分および振動成分を抽出し、その温度依存性を明らかにする。特に回転緩和時定数の温度依存性より、水和水ダイナミクスに関する詳細な情報を取得できる。

(3) カーブフィッティングにより抽出した成分の強度や時定数といった物理量、およびその温度変化特性に基づき、アミロイド線維形成の各段階での水和水ダイナミクスの特徴づけを行う。特に、線維前駆中間体とその他の状態(単量体、アミロイド線維)とで決定的に異なる物理量の抽出を行いつつ、その違いに基づいて水和水が線維前駆中間体形成に果たす役割について論ずる。その結果を踏まえ、単量体-線維前駆中間体-線維核-アミロイド線維という一連の線維形成過程において水和水のダイナミクスがどのように変遷していくか、その分子論的描像を明らかにし、アミロイド線維形成メカニズムを水との相互作用の観点から再構築する。

3. 研究の方法

(1) まず、ネットワークアナライザを用いて、0.5~20GHz領域における複素誘電率スペクトルの温度変化測定を行った。まず水分蒸発防止目的の試料ホルダを設計および作製する。次にこの試料ホルダを用いて、233Kから室温までの温度変化測定を行った。なお、温度変化測定については、モデル球状タンパク質であるリゾチームや、モデル膜タンパク質であるバクテリオロドプシンを用いた測定を行い、温度変化測定が正常におこなえて

いるかどうかを評価した。

(2) 次に、テラヘルツ時間領域分光計を用いて、THz 領域の複素誘電率スペクトルを、温度および水和依存的に行った。得られたスペクトルを GHz 領域スペクトルとつなぎ合わせて解析することにより、水と水のダイナミクスに関する情報を抽出した。解析結果を元に、アミロイド線維形成過程における水と水ダイナミクスの性質を、特に線維前駆中間体に注目しつつ議論した。

#### 4. 研究成果

(1) ネットワークアナライザの温度変化測定用セルの作製

溶液実験等に用いるプラスチック製のチューブを加工し、Oリングと組み合わせる事で、図2に示すような測定セルを、予想よりも安価に製作することが出来た。モデル球状タンパク質リゾチームを用いて測定をおこなったところ、233K から 293K において、問題なく温度変化測定をおこなえることを確認した。

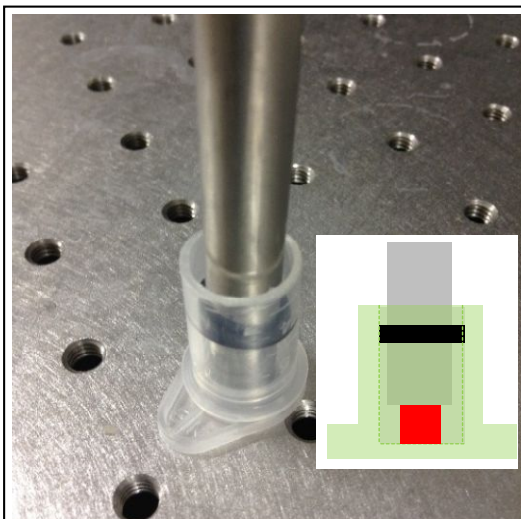


図2. ネットワークアナライザ温度依存性測定のために作製した試料セル。プローブ（金属の棒部分）の先端に効率よく試料を押しあてられるように設計されている。右側の模式図が、試料（赤色で示す）にプローブが押し当てられている様子を示している。

(2) モデル膜タンパク質バクテリオロドプシンを含む紫膜の温度依存性複素誘電率スペクトル測定

ネットワークアナライザにより、233-293K の温度範囲において、乾燥試料および水和試料の複素誘電率スペクトル測定をおこなった。その結果、水と水に由来する回転緩和成分の温度依存性を明瞭に観測することが出来た。また、テラヘルツ時間領域分光計を用いて、同様の試料について 83-293K の温度範囲で複素誘電率スペクトル測定を行い、ネットワークアナライザの結果と合わせて、以下の式を用いてスペクトルのカーブフィッティング

をおこなった。

$$\begin{aligned} \varepsilon^*(\nu) = & \frac{\sigma_0}{i2\pi\nu\varepsilon_0} \\ & + \frac{\Delta\varepsilon}{1+(i2\pi\nu\tau)^\beta} \\ & + \sum_{k=1}^2 \frac{A_k}{\nu_k^2 - \nu^2 + i\nu\gamma_k} \\ & + \varepsilon_{\text{inf}} \end{aligned}$$

ここで、 $\nu$  は周波数をあらわす。右辺第1項はイオン伝導に由来する項で、283K 以上で虚部スペクトルにのみ寄与する。第2項目が GHz 領域に存在する水と水の回転緩和に寄与する項であり、 $\Delta$ 、 $\tau$ 、 $\beta$  がそれぞれ緩和強度、緩和時間、およびスペクトル成分の拡がりパラメータである。第3項目は THz 領域の低振動成分であり、2個のローレンツ型関数で記述している。第4項は実部のみに寄与する定数項である。結果を図3に示す。フィッティングの結果、水と水に由来する回転緩和の大きな成分（図3、青色の成分）が GHz 領域に存在し、かつ 233K より THz 領域にブルーシフトにより侵入してくることがわかった。興味深いことに、バクテリオロドプシンのプロトンポンプ機能は、水和した状態で 230K 以上でないと発現しないことがわっている。従って、本研究により得られた結果は、水と水に由来する回転緩和成分が THz 領域に存在すると考えられる、機能に関連する振動モードを熱的に誘起し、その結果機能が発現されるということを示唆している。この研究結果は、アメリカ化学会が発行する物理化学系雑誌である、Journal of Physical Chemistry B にて報告した。

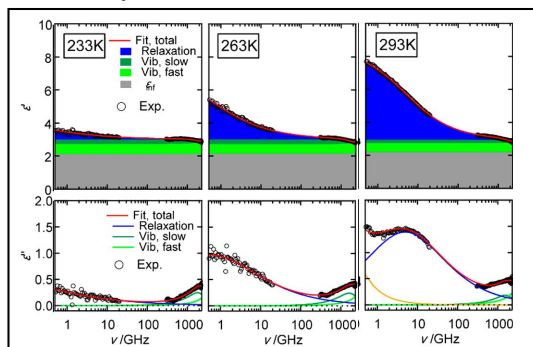


図3. 水と紫膜の GHz-THz 領域における温度依存性広帯域複素誘電率スペクトル

(3) アミロイド線維前駆中間体およびアミロイド線維の水と水ダイナミクス測定

インスリンの正常状態、およびアミロイド線維を用意し、GHz-THz 領域において広帯域誘電分光測定をおこなった。ネットワークアナライザと THz 時間領域分光計それぞれに用いたサンプルで水和量が異なり、それぞれ独

立して温度依存性を評価した。その結果、GHz領域に存在する水和水の回転緩和時定数が、アミロイド線維形成時に1.5倍程度速くなる事象を見出した。一方、インスリンを還元剤処理して得られるインスリン Bchain を用いて作製した、アミロイド線維前駆中間体は、アミロイド線維形成状態と比較して水和水の回転緩和はほとんど変化しなかった。これらの結果は、正常状態のタンパク質がアミロイド線維前駆中間体を形成すると、疎水性度合いの増大などによって水和水の水素結合ダイナミクスが速くなる一方、線維前駆中間体は成熟アミロイド線維と同様の表面性質を持っていることを示唆している。これらの実験は再現性を確認する必要があり、一通り実験が終了次第、学術論文としてまとめる予定である。

#### 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 4件)

1. Yamamoto N, Tshuhara S, Tamura A, Chatani E. A specific form of prefibrillar aggregates that functions as a precursor of amyloid nucleation. *Scientific Reports* 2018; 8:62.
2. Yamamoto N, Ito S, Nakanishi M, Chatani E, Inoue K, Kandori H, Tominaga K. Effect of temperature and hydration level on purple membrane dynamics studied using broadband dielectric spectroscopy from sub-GHz to THz regions. *Journal of Physical Chemistry B* 2018;122(4):1267-77.
3. Chatani E, Yamamoto N. Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation. Accepted and published in Dec 2017
4. Yamamoto N, Ohta K, Tamura A, Tominaga K. Broadband Dielectric Spectroscopy on Lysozyme in the Sub-Gigahertz to Terahertz Frequency Regions: Effects of Hydration and Thermal Excitation. *Journal of Physical Chemistry B* 2016;120(21):4743-55.

[学会発表](計 10件)

1. Naoki Yamamoto, Shoko Tshuhara, Atsuo Tamura, Eri Chatani, "Characterization of prefibrillar aggregates that function as a precursor of amyloid nucleation", The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Kumamoto University, 19th-21st, September 2017
2. Naoki Yamamoto, Shota Ito, Eri Chatani, Hideki Kandori, Keisuke Tominaga, "Protein Hydration and its Thermal

Excitation Studied by Broadband Dielectric Spectroscopy", 1st Philippine-Japan Terahertz Research Workshop, De La Salle University, the Philippines, February 20-24, 2017

3. Naoki Yamamoto, Shota Ito, Kaoru Ohta, Atsuo Tamura, Eri Chatani, Hideki Kandori, Keisuke Tominaga, "Protein Hydration Dynamics Studied by Broadband Dielectric Spectroscopy", 14th Annual Meeting of the Japan Association of Medical Spectroscopy Awaji Yumebutai International Conference Center, 4th-7th, December 2016

4. Naoki Yamamoto, Shota Ito, Eri Chatani, Hideki Kandori, Keisuke Tominaga, "Effects of Hydration on Protein Dynamics and Its Thermal Excitation Studied by Broadband Dielectric Spectroscopy", 2nd International Aquaphotomics Symposium, Kobe University, Kobe, Japan, November 26-28, 2016

5. Naoki Yamamoto, Shota Ito, Eri Chatani, Hideki Kandori, Keisuke Tominaga, "Hydration and Thermal-Excitation Effects of Purple Membrane Dynamics Probed by Broadband Dielectric Spectroscopy", *Frontiers in Molecular Spectroscopy*, Indian Institute of Technology, Kanpur, India, November 13-16, 2016

6. 山本直樹, "広帯域誘電分光で観るタンパク質ダイナミクスの水とおよび熱励起効果", テラヘルツテクノロジーフォーラム平成28年度 第1回技術セミナー, 2016年10月26日、ホテル北野プラザ六甲荘

7. Naoki Yamamoto, Shota Ito, Eri Chatani, Hideki Kandori, Keisuke Tominaga, "Effects of Hydration and Thermal Excitation of Globular and Membrane Proteins Studied by Broadband Dielectric Spectroscopy", The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Tsukuba International Congress Center, 25th-27th, November 2016

8. 山本直樹, 伊藤奨太, 茶谷絵理, 神取秀樹, 富永圭介, 「広帯域誘電分光を用いた紫膜ダイナミクスの観測; サブ GHz-THz 領域における水とおよび温度依存性の評価」, 第10回分子科学討論会, 2016年9月13-15日、

神戸ファッションマート

9. 山本直樹, “ THz 分光および広帯域誘電分光による水和タンパク質ダイナミクスの観測”, Spring-8 シンポジウム 放射光赤外研究会サテライトミーティング 「振動分光でわかること:赤外分光の今後と方向性」, 2016 年 8 月 30 日 関西学院大学神戸三田キャンパス VII 号館

10. 山本直樹、伊藤奨太、茶谷絵理、神取秀樹、富永圭介, 「広帯域誘電分光法を用いた紫膜のダイナミクスにおける温度および水和依存性の観測」, 第 4 3 回生体分子科学討論会, 2016 年 6 月 24-25 日、名古屋大学 野依記念学術交流館

〔図書〕(計 1 件)

山本直樹、太田薫、田村厚夫、富永圭介  
「タンパク質の動的挙動に及ぼす水和および熱活性の影響 広帯域誘電分光による観測」応用物理, vol. 85, No. 8 689-692 (2016).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~echatani/members.html>

<http://www.jichi.ac.jp/divbio/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)  
神戸大学・大学院理学研究科・特命助教  
研究者番号: 90580671

### (2)研究協力者

富永 圭介 (TOMINAGA, Keisuke)  
神戸大学・分子フォトサイエンス研究センター・教授  
研究者番号: 30202203

茶谷 絵理 (CHATANI, Eri)  
神戸大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 00432493

中西 真大 (NAKANISHI, Masahiko)  
福岡工業大学・電気工学科・助教  
研究者番号: 00707763