

令和元年9月13日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18524

研究課題名(和文) 高速AFMによるアミロイド脱凝集酵素Hsp104の分子動態の解明

研究課題名(英文) Video-imaging of amyloid disaggregase, Hsp104, on amyloid fibrils

研究代表者

中山 隆宏 (Nakayama, Takahiro)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授

研究者番号：00532821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：酵母Hsp104は唯一、不溶性のアミロイド線維を脱凝集が可能な酵素で、構造の異なるアミロイド線維に対して幅広く脱凝集活性を示すが、幅広い基質特異性を示す仕組みの詳細は不明であった。この解明のため、本研究は、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を用いて、脱凝集反応における線維及びHsp104の構造動態の撮影を試みた。結果、Hsp104の脱凝集活性を高速AFM観察で特定はできなかったが、基質として調製したアミロイドタンパクXの凝集過程における構造動態の観察に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドタンパクX凝集過程の構造動態に関する知見は、アミロイド病Xは勿論のこと、別のアミロイド病研究にもインパクトが大きい。異なるアミロイド病は、原因タンパクの一次構造も異なるが、アミロイド線維への凝集過程は共有するメカニズムが多いためである。本研究で確立したアミロイドタンパクXの構造動態観察方法は、凝集阻害作用のあるとされる薬剤が凝集のどの反応過程を阻害するか検証することに利用できる。

研究成果の概要(英文)：Yeast Hsp104 has been known to be the disaggregase which disaggregates various insoluble amyloid fibrils with different fibril structures. The mechanism of this diverse substrate specificity, however, has been unclarified. In this study, we tried to observe structural dynamics of individual Hsp104 and amyloid fibrils on amyloid disaggregase reaction, using high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). We observed structural dynamics of amyloidogenic protein X aggregation into fibrils while we have not been able to characterize the disaggregation events on HS-AFM movies.

研究分野：分子生物学

キーワード：アミロイドタンパク 原子間力顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミロイド病は、原因タンパクが会合、構造変化して、異常構造のアミロイド線維へと凝集する過程と密接に関連する。アミロイド線維の構造は、一次構造が同じタンパクでも異なる亜種(=株)が存在し、株によって疾患の症状が異なる。予防、治療策として、この凝集過程を幅広く阻害する手法の確立が望まれている。酵母 Hsp104 は唯一、アミロイド線維を脱凝集することができる脱凝集酵素として注目されてきた。Hsp104 は、最大でホモ 6 量体を形成し、多様なアミロイド線維に対して脱凝集活性を示す。脱凝集の際、アミロイド線維の構造によってサブユニット間の協同性が変化することが示唆されている〔1〕。

しかし、アミロイドタンパク単量体が連なった不溶性のアミロイド線維上で、Hsp104 がどのような構造で動き、脱凝集活性を発揮するのか、アミロイド凝集体の構造によって Hsp104 の構造動態がどのように変化するか、詳細な構造動態は不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、不溶性のアミロイド凝集体を脱凝集するときの Hsp104 及びアミロイド線維の構造動態を明らかにすることを目的として着手した。基質のアミロイド線維構造に応じて、Hsp104 の全体の運動、サブユニットの協同的運動、アミロイド線維の脱凝集の様式が異なるのではないかと仮説を立て、検証を試みた。

3. 研究の方法

【概要】

組換えタンパク発現でアミロイドタンパクと Hsp104 を用意し、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いて、アミロイド線維、Hsp104 の構造動態を同時に動画撮影することを試みた。アミロイド線維は不溶性、Hsp104 は可溶性なので、固液界面の構造動態を生理条件下で観察できる高速 AFM が本研究の手法として適していると考えた。

アミロイド線維の構造動態

本研究では、主にアミロイド病原因タンパク X を用いた。試験管内で攪拌し続けて調製したアミロイド線維を高速 AFM ステージ上に吸着させ、高速 AFM 試料チャンバー中にタンパク X 単量体を導入し、観察した。

Hsp104 の構造動態

Hsp104 の多量体形成: ATP 存在下、非存在下で Hsp104 を高速 AFM 観察した。

アミロイド線維脱凝集: アミロイド線維をステージ上に吸着させた状態で、試料チャンバー中に Hsp104 を導入して高速 AFM 観察した。

4. 研究成果

アミロイド線維の構造動態

物理化学条件によって、タンパク X の形成する線維の立体構造が異なり、それぞれの線維が伸長する様子を観察することに成功した。

Hsp104 の構造動態

Hsp104 の多量体形成

ATP 存在下では、非存在下に比べて、粒径の大きな分子が増加することを確認できた。この結果は、この粒状の分子が Hsp104 で、ATP 結合依存的に多量体を形成することに対応することを示唆する。一方で、本研究ではリング状のホモ 6 量体を観察できなかった。原因として、Hsp104 が単量体から 6 量体まで様々なサブユニット数の状態をとること〔1〕、高速 AFM ステージ(マイカ)上での分子配向を一定方向に制御できていないことが挙げられる。

アミロイド線維脱凝集

アミロイド線維を高速 AFM ステージ上に吸着させた状態で Hsp104 を試料チャンバーに投入して観察を続けたが、再現性良く脱凝集を観察することはできなかった。

原因として、ステージ上に線維を吸着させていること、高速 AFM 探針の先端曲率が挙げられる。酵素反応の高速 AFM 観察では、基質、酵素の一方がステージ上に固定されていることが必要で、本研究では基質である線維の形状を観察する必要がある都合上、線維の方をステージ上に固定した。アミロイド線維は、その断面が回転対称であることが多く、Hsp104 が線維上を動く特性をもつ場合、断面から見ると回転する可能性がある。線維がステージ上に横たわる状態では、この回転運動が妨げられる可能性が高い。また、Hsp104 が線維上を動かずに線維中途を脱凝集して線維から離れる場合(線維を切断する場合)でも、切断箇所を特定することはできない。それは、線維を構成する単量体が脱凝集して隙間ができて、その隙間の大きさは高速 AFM 探針の先端曲率~5 nm よりも遥かに小さいので、脱凝集してできた隙間を検出することができないためである。

〔引用文献〕

1. DeSantis M et al. Operational plasticity enables hsp104 to disaggregate diverse amyloid and nonamyloid clients. *Cell*. 151(4). 778-93. 2012 年

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Sahoo BR, Genjo T, Watanabe-Nakayama T, Stoddard AK, Ando T, Yasuhara K, Fierke CA, Ramamoorthy A. A cationic polymethacrylate-copolymer acts as an agonist for α -amyloid and an antagonist for amylin fibrillation. *Chemical Science* 10(14) 3976-3986. 2019年 [査読有り]
2. Uno M, Watanabe-Nakayama T, Konno H, Akagi KI, Tsutsumi N, Fukao T, Shirakawa M, Ohnishi H, Tochio H. Intramolecular interaction suggests an autosuppression mechanism for the innate immune adaptor protein MyD88. *Chemical communications* (Cambridge, England) 54(87) 12318-12321. 2018年10月 [査読有り]
3. 中山 隆宏, 紺野 宏記, 山田 正仁, 小野 賢二郎. 高速 AFM によるタンパク質集合体のダイナミクスの観察. *生物物理* 58(2) 86-88. 2018年4月 [表紙採択][査読有り][招待あり]
4. Mohamed MS, Kobayashi A, Taoka A, Watanabe-Nakayama T, Kikuchi Y, Hazawa M, Minamoto T, Fukumori Y, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, Wong RW. High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Loss of Nuclear Pore Resilience as a Dying Code in Colorectal Cancer Cells. *ACS nano* 11(6) 5567-5578. 2017年6月 [査読有り]
5. Watanabe-Nakayama T, Itami M, Kodera N, Ando T, Konno H. High-speed atomic force microscopy reveals strongly polarized movement of clostridial collagenase along collagen fibrils *Scientific Reports* 6(28975). 2016年7月 [査読有り]
6. Watanabe-Nakayama T, Ono K, Itami M, Takahashi R, Teplow DB, Yamada M. High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of amyloid β 1-42 aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(21) 5835-40. 2016年5月 [査読有り]

〔学会発表〕(計7件)

1. Takahiro Watanabe-Nakayama. Nano-space video imaging of amyloidogenic protein aggregation. International Symposium on Pathomechanisms of Amyloid Diseases. 2018年12月20日. (Invited)
2. 中山 隆宏, 小野 賢二郎, 山田 正仁. ナノスペースビデオイメージングによる食品関連因子アミロイド凝集抑制作用機序の解明. 日本生物物理学会第56回年会. 2018年9月16日. (一般口頭発表)
3. Takahiro Watanabe-Nakayama. Nanometer resolution video imaging reveals structural dynamics of single amyloidogenic protein assemblies. 5th Asia Pacific Protein Association Conference and 12th Protein Society of Thailand Symposium. 2017年7月13日. (Oral presentation)
4. Takahiro Watanabe-Nakayama. NANO-SPACE VIDEO IMAGING REVEALS STRUCTURAL DYNAMICS OF FIBROUS PROTEIN ASSEMBLY AND RELEVANT ENZYMES. the 61st annual meeting of Biophysical Society. 2017年2月15日. (Oral presentation)
5. 中山 隆宏. 高速原子間力顕微鏡を用いたアミロイドタンパク構造動態のナノスペースビデオイメージング. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30日. (シンポジウム講演)
6. 中山 隆宏. アミロイド線維の多型形成における構造動態のナノスペースビデオイメージング. 日本顕微鏡学会第72回学術講演会. 2016年6月14日. (シンポジウム講演)
7. 中山 隆宏. コラーゲン線維分解におけるコラゲナーゼの動態のナノスペースビデオイメージング. 日本顕微鏡学会第72回学術講演会. 2016年6月14日. (シンポジウム講演)

〔図書〕(計1件)

1. Watanabe-Nakayama T, Ono K. High-Speed Atomic Force Microscopy of Individual Amyloidogenic Protein Assemblies. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1814. 201-212. 2018年7月 [査読有り][招待あり]

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。