

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07363

研究課題名(和文) アモルファス凝集からアミロイド線維への構造転移に伴う熱揺らぎの解明

研究課題名(英文) Elucidation of thermal fluctuation associated with structural transition from amorphous aggregation to amyloid fibrillation

研究代表者

笹原 健二 (SASAHARA, KENJI)

大阪大学・蛋白質研究所・特任講師(常勤)

研究者番号：20432495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：3つの蛋白質(鶏リゾチーム、 α 2ミクログロブリン、 α -シヌクレイン)を用い、蛋白質の構造揺らぎとアミロイド線維形成との関係を調べた。実験系において、蛋白質の構造揺らぎは、加熱とポリリン酸の添加によって制御した。ポリリン酸の蛋白質分子への結合によって、蛋白質の溶解度は著しく減少し、溶解限界領域で蛋白質分子は構造揺らぎの大きな状態となった。攪拌などの摂動によって揺らぎの状態からアミロイド線維形成が効率よく誘導されることを明らかにした。蛋白質の構造揺らぎに基づいたアミロイド線維形成モデルを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質は、大きく二つの凝集体を形成する。規則構造を持たないアモルファス凝集と規則的なクロスシート構造を持つアミロイド線維である。生体内でのアミロイド線維の沈着は、アルツハイマー病、パーキンソン病、型糖尿病、プリオン病など数々の深刻な病気に関わることで注目されている。本研究では、蛋白質の構造揺らぎに着目して、天然状態にある蛋白質がアミロイド線維を形成する機構、及びアモルファス凝集を回避してアミロイド線維が形成される機構を明らかにした。蛋白質の構造揺らぎの概念を導入した新たなアミロイド形成モデルを示した。結果は、アミロイド病の治療や予防に結び付き、また早期診断にも応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Using three types of proteins (hen lysozyme, α 2-microglobulin, α -synuclein), the relation between structural fluctuation and amyloid fibril formation was examined. In the experimental system, the structural fluctuation of the proteins was regulated by the heating and the addition of polyphosphate. Upon binding of polyphosphate to the protein molecules, the protein solubility largely decreased, resulted in the structurally-fluctuated state of the protein molecules in the vicinity of solubility limit. It was found that amyloid fibril formation is efficiently induced from the fluctuated state through the perturbation such as agitation. The model of amyloid fibril formation based on the structural fluctuation of protein was presented.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：アミロイド線維 アミロイドーシス 蛋白質凝集

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の規則構造を持たないアモルファス凝集に対して、規則的なクロスシート構造を持つ線維状凝集物であるアミロイド線維は、数々の深刻な病気に関わることで注目されている。アミロイド線維の沈着する疾患をアミロイドーシスと総称し、アルツハイマー病、パーキンソン病、2型糖尿病、プリオン病などが知られている。天然状態にある蛋白質のアミロイド線維への構造転移、アモルファス凝集からアミロイド線維への構造転移の解明は、アミロイドーシスの治療や予防に結び付く重要な研究テーマである。蛋白質のアモルファス凝集とアミロイド線維形成は、溶液中の塩（NaClなどの低分子塩やヘパリン、核酸、ポリリン酸などのポリアニオンなど）の影響を受けることが知られているが、塩存在下、特にポリアニオン存在下で生じる蛋白質の構造揺らぎが、アモルファス凝集、アミロイド線維形成、及びこれら二つの競合反応にどのような影響を及ぼすかはほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

生体内に存在するヘパリンやポリリン酸といったポリアニオンは、その濃度、鎖長に依存して、蛋白質のアモルファス凝集やアミロイド線維形成を促進することが知られている。同様に、加熱によって蛋白質はアモルファス凝集やアミロイド線維を形成する。本研究では、蛋白質溶液中の塩濃度（NaCl、ヘパリン、ポリリン酸）を変えることで蛋白質のアモルファス凝集とアミロイド線維形成の競合反応を定量化する実験系を構築する。次に、蛋白質分子がポリアニオンの濃度と鎖長に依存して、また加熱によって揺らぎの大きな状態をとる現象に着目し、蛋白質の構造揺らぎがアミロイド線維形成に及ぼす影響を明らかにする。これまでのアミロイド線維形成機構の研究を発展させるため、新たに構造揺らぎの概念を導入したアミロイド線維形成モデルを示す。

3. 研究の方法

アモルファス凝集を光散乱測定で検出し、アミロイド線維を蛍光色素チオフラビン T による蛍光測定で検出した。光散乱とチオフラビン T 蛍光を同時に測定する手法を用いることで、アモルファス凝集とアミロイド線維形成の競合反応を時間軸に対して定量化した。更に、最終生成物に対して円二色性測定でアミロイド線維のシート含有量を定量化した。ポリアニオンと蛋白質の相互作用（結合、会合）を等温滴定型熱量測定により熱力学的に解析した。熱力学的、分光学的データを組み合わせることで、蛋白質構造揺らぎとアミロイド線維形成との相関性を考察した。アミロイド形成蛋白質として、鶏リゾチーム（モデル蛋白質）、透析アミロイドーシス関連の2ミクログロブリン、パーキンソン病関連のシヌクレインを用いた。

4. 研究成果

(1) 鶏リゾチームのアミロイド線維形成に及ぼすヘパリン効果

負の電荷を持つヘパリンは、様々な蛋白質のアミロイド線維形成を促進させることが知られているが、詳細な機構はよくわかっていない。本研究では、鶏リゾチームのアミロイド線維形成に及ぼすヘパリンの効果を広い濃度範囲にわたって詳細に評価した。低濃度のヘパリン存在下では、ヘパリンの電荷の効果によりアミロイド線維形成が促進され、中程度の濃度では塩溶効果によってアミロイド線維形成が抑制、高濃度では塩析効果によって再びアミロイド線維形成が促進されることを明らかにした。更にヘパリンとリゾチームとの会合の親和性を等温滴定型熱量計で定量化し、アミロイド線維形成のヘパリン濃度依存性を考察した。ヘパリンのアミロイド線維形成能を広い濃度範囲にわたって相図としてまとめた (J. Biol. Chem. 2017)。

(2) 2 ミクログロブリンのアモルファス凝集とアミロイド線維形成

透析アミロイドーシス関連の 99 残基からなる蛋白質 2 ミクログロブリンのアモルファス凝集とアミロイド線維形成の競合反応を加熱条件下で調べた。酸変性状態にある 2 ミクログロブリンは、加熱によりアモルファス凝集とアミロイド線維を形成する。アモルファス凝集とアミロイド線維形成の競合反応は、溶液中に存在する塩濃度(NaCl 濃度)に依存し、高塩濃度ではアモルファス凝集が促進され、中程度の塩濃度ではアミロイド線維形成が促進された。温度軸と塩濃度軸に対して、2 ミクログロブリンのアモルファス凝集とアミロイド線維を形成する領域を相図にまとめ、二つの競合反応に基づいたアミロイド線維形成機構を示した (J. Biol. Chem. 2018)。

(3) 加熱による 2 ミクログロブリンのアミロイド形成機構

透析アミロイドーシス関連の蛋白質 2 ミクログロブリンを用い、NaCl 存在下での蛋白質の加熱による unfolding と misfolding の関係を詳細に調べた。蛋白質は、Unfolding によって変性状態となり、misfolding によってアミロイド線維を形成する。アミロイド線維が形成される効率は、塩濃度(NaCl 濃度)と unfolding 状態に及ぼす外部からの摂動(攪拌)によって決まることを明らかにした。温度軸と塩濃度軸に対して、蛋白質の folding/unfolding 領域と摂動を加えたときに観察される misfolding 領域を相図としてまとめ、加熱による unfolding と misfolding の関係を明らかにした (Noji et al., J. Biol. Chem. 2019)。

(4) 脂質膜上での膵島アミロイドポリペプチドのアミロイド線維形成

ヒトの膵島アミロイドポリペプチド (hIAPP) は、健常者では膵臓内において 細胞からインスリンとともに分泌される。hIAPP は、2 型糖尿病患者の膵臓においてアミロイド線維を形成し、特に脂質膜上で形成すると脂質膜破壊効果(細胞毒性)を示す。モデル脂質膜上での hIAPP アミロイド線維形成を詳細に観察した結果、ラフト成分を含む脂質表面は、hIAPP アミロイド線維形成のテンプレートとしての機能を担うこと、更にインスリンが共存すると hIAPP アミロイド核形成が著しく抑制されることを明らかにした (Biophys. Rev. 2018)。

(5) 2ミログロブリンのアミロイド線維形成に及ぼすポリリン酸の効果

生体内に存在するポリリン酸は、蛋白質のアミロイド線維形成を著しく促進する機能を持つと報告されているが、詳細な機構は明らかにされていない。2ミログロブリンのアミロイド線維形成に及ぼすポリリン酸の濃度・鎖長依存性を調べ、次に蛋白質とポリリン酸との親和性を等温滴定型熱量計により熱力学的に解析した。その結果、ポリリン酸には、蛋白質分子に対して脱水和作用があることを明らかにし、選択的水和効果を導入した新規なアミロイド線維形成モデルを示した (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2019)。

(6) シヌクレインの等電点沈殿効果とアミロイド形成

シヌクレインは、パーキンソン病(PD)患者脳内にアミロイド線維として蓄積する140残基からなる蛋白質である。蛋白質の等電点沈殿効果とアミロイド線維形成との関係を明らかにするため、シヌクレインのアミロイド線維形成に及ぼすリン酸塩の効果を検討した。アミロイド線維形成は、リン酸塩濃度に大きく依存し、低濃度(1mM以下)と高濃度領域(150mM以上)でアミロイド線維形成が促進され、中濃度領域(1~150mM)では、アミロイド線維形成が抑制されることがわかった。解析の結果、低濃度領域では、蛋白質の等電点沈殿効果により、高濃度領域ではリン酸塩の塩析効果によりアミロイド線維形成が促進され、中濃度領域では、リン酸塩の塩溶効果によって阻害されることが明らかになった (Curr. Res. Struct. Biol. 2020)。2016年10月より、AMEDプロジェクト(超音波を応用した神経変性疾患の低侵襲診断機器開発)に参画し、上記結果をPD患者脳髄液に含まれるアミロイド核を検出するアッセイ条件に応用した。

(7) 鶏リゾチームアミロイド線維形成に及ぼすポリリン酸の効果

蛋白質の構造揺らぎとアミロイド線維形成との関係を明らかにするために、モデル蛋白質である鶏リゾチームのアミロイド線維形成に及ぼすポリリン酸の効果の詳細に検討した。ポリリン酸の蛋白質分子への結合後、蛋白質分子は、脱水和された構造的に揺らぎの大きい状態をとることが分光学的、熱力学的解析から明らかになった。更に、この構造的揺らぎは、蛋白質の溶解限界領域で最も大きくなり、この状態に攪拌などの摂動を加えると、規則構造をもたないアモルファス凝集を回避して、効率よくアミロイド線維が形成されることを明らかにした。得られた結果に基づき、蛋白質の構造揺らぎを導入した新たなアミロイド線維形成モデルを示した。(Sasahara et al., J. Biol. Chem. 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furukawa K, Aguirre C, So M, Sasahara K, Miyanoiri Y, Sakurai K, Yamaguchi K, Ikenaka K, Mochizuki H, Kardos J, Kawata Y, Goto Y	4. 巻 2
2. 論文標題 Isoelectric point-amyloid formation of synuclein extends the generality of the solubility and supersaturation-limited mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Research in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 35-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1016/j.crstbi.2020.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sasahara K, Yamaguchi K, So M, Goto Y	4. 巻 294
2. 論文標題 Polyphosphates diminish solubility of a globular protein and promote amyloid aggregation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15318-15329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noji M, Sasahara K, Yamaguchi K, So M, Sakurai K, Kardos J, Naiki H, Goto Y	4. 巻 294
2. 論文標題 Heating during agitation of α 2-microglobulin reveals that supersaturation breakdown is required for amyloid fibril formation at neutral pH	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15826-15835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhang CM, Yamaguchi K, So M, Sasahara K, Ito T, Yamamoto S, Narita I, Kardos J, Naiki H, Goto Y	4. 巻 116
2. 論文標題 Possible mechanisms of polyphosphate-induced amyloid fibril formation of α 2-microglobulin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	6. 最初と最後の頁 12833-12838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1819813116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Masayuki Adachi, Masahiro Noji, Masatomo So, Kenji Sasahara, Jozsef Kardos, Hironobu Naiki, Yuji Goto	4. 巻 293
2. 論文標題 Aggregation-phase diagrams of 2-microglobulin reveal temperature and salt effects on competitive formation of amyloids versus amorphous aggregates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14775-14785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.004683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nitani Ayame, Muta Hiroya, Adachi Masayuki, So Masatomo, Sasahara Kenji, Sakurai Kazumasa, Chatani Eri, Naoe Kazumitsu, Ogi Hirotsugu, Hall Damien, Goto Yuji	4. 巻 292
2. 論文標題 Heparin-dependent aggregation of hen egg white lysozyme reveals two distinct mechanisms of amyloid fibrillation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 21219 ~ 21230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.813097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasahara Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Membrane-mediated amyloid deposition of human islet amyloid polypeptide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 453 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-017-0351-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 笹原健二、山口圭一、宗正智、後藤祐児
2. 発表標題 Polyphosphate-induced aggregation of hen lysozyme
3. 学会等名 第57回日本生物物理学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹原健二、山口圭一、宗正智、後藤祐児
2. 発表標題 Mechanism of polyphosphate-induced aggregation of a globular protein
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹原健二、山口圭一、宗正智、河田康志、後藤祐児
2. 発表標題 Amyloid aggregation of α -synuclein near solubility limit modulated by polyphosphate
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹原健二、山口圭一、宗正智、河田康志、後藤祐児
2. 発表標題 Competition between amyloid fibrillation and amorphous aggregation of α -synuclein
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹原健二、山口圭一、宗正智、後藤祐児
2. 発表標題 シヌクレインアミロイド線維形成を促進及び抑制する溶液条件
3. 学会等名 第6回日本アミロイドーシス研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasahara Kenji, Yamaguchi Keiichi, So Masatomo, Goto Yuji
2. 発表標題 Amyloid aggregation of synuclein in the vicinity of solubility limit modulated by polyphosphate
3. 学会等名 2019 Ulm Meeting - Biophysics of Amyloid Formation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹原健二、山口圭一、宗正智、後藤祐児
2. 発表標題 超音波照射による シヌクレインアミロイド核の伸長を促進する溶液条件
3. 学会等名 第26回ソノケミストリー討論会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考