

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06151

研究課題名（和文）逆ミセル封入法によるアミロイド 可溶性オリゴマーのNMR解析

研究課題名（英文）NMR analysis of amyloid-beta soluble oligomer encapsulated in reverse micelle

研究代表者

星野 大（Hoshino, Masaru）

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：70304053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病は、脳内にアミロイド と呼ばれる物質が蓄積することにより進行すると考えられている。アミロイド を単離して、試験管内でその反応を追跡する方法が試みられてきたが、速やかに進行するため詳細な解析は困難であった。本研究では、セッケン分子が油分子を取り囲む性質を利用して、アミロイド を一分子ずつバラバラにして詳細に解析する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病以外にも、「アミロイド線維」という物質が蓄積することにより進行する病気は数多く存在する。どのようにして「アミロイド線維」が形成されるのかを明らかにすることは、これらの病気に共通した治療法の確立に欠かせない。本研究により「アミロイド線維」の形成反応が、分子同士の結合・解離を繰り返しつつ進行しているという様子が明らかになってきた。アルツハイマー病だけでなく、他の多くのアミロイド線維の形成機構に共通の反応だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is difficult to analyze the process of oligomerization and fibril formation by amyloid-beta peptides, as it proceeds rapid and irreversibly. We developed the method to isolate each amyloid-beta molecule into reverse-micelle formed by AerosolAT (AOT) / n-hexane. We found that covalently-linked dimeric Abeta molecule adopted almost the same structure as that of wild-type Abeta.

研究分野：生物物理学

キーワード：アミロイド 逆ミセル 分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

生体内で正常な機能を発揮している水溶性蛋白質が、なんらかの原因によりアミロイド線維と呼ばれる不溶性の集合体を形成し、様々な疾患の原因となっている例が多数報告されている。中でも、およそ 40 残基からなるアミロイドβ (Aβ) ペプチドが患者脳内に蓄積するアルツハイマー病は、老人性認知症の約半数を占め、その原因解明と治療戦略の確立は社会的にも重要な課題である。

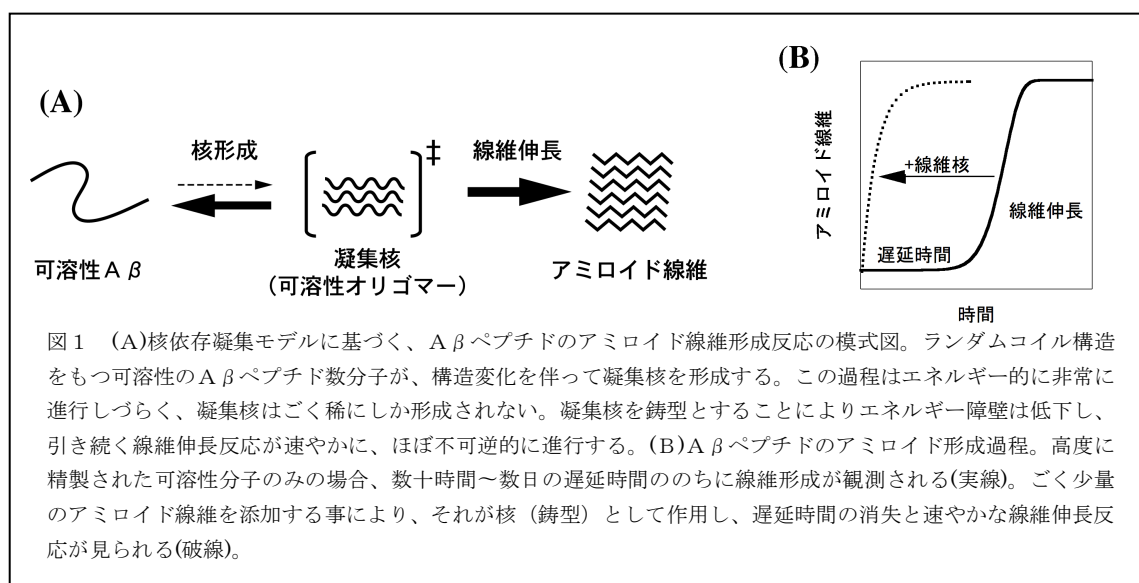
申請者はこれまでに、溶液高分解能NMRを用いて様々な蛋白質の構造解析を行ってきた。特に、有機溶媒による可溶化と組み合わせた重水素交換法は、アミロイド線維内部での蛋白質分子の二次構造を残基分解能で解析する手法として国内外を通じて高い評価を受けている。本手法はAβにも適用され、固体NMRによる解析結果とともに、C末端部分で規則正しい水素結合を形成した平行型βシート構造からなるアミロイド構造が提唱されている。

その一方で、最近の細胞生物学的研究によると、神経細胞死を引き起こす原因となっているのは、不溶性のアミロイド線維ではなく、Aβペプチド数分子からなる「可溶性オリゴマー」であることが明らかとなりつつある。しかしながら、神経細胞毒性をもつ可溶性オリゴマーがどのような構造をもつのか、また、本来可溶性のモノマー分子が、どのような機構により可溶性オリゴマーへと転移するのかといった多くの重要な点が未解明のままである。本研究では、アルツハイマー病の根幹的原因として現在最も有力視されている「可溶性オリゴマー」の構造およびその生成の分子機構を明らかにすることを最重要課題として設定し、その解明に挑む。

2. 研究の目的

アルツハイマー病発症の根幹的原因である可溶性オリゴマーの構造ならびに形成の分子機構を解明する上での最大の障壁として、線維形成反応の高い協同性が挙げられる(重合核依存性重合モデル:図1)。本来Aβ分子は可溶性であり、それ単独では自発的な線維形成は見られない。ところが、複数の分子が偶然衝突してオリゴマーが形成されると、それを鋳型(凝集核)として多数のAβ分子が速やかに付加重合し、ほぼ不可逆的に不溶性のアミロイド線維へと転移する。そのため、多数のモノマー分子が共存するなかで、ごく稀に、かつ過渡的にのみ形成される線維凝集核(可溶性オリゴマー)を再現性よく調製・回収する事は不可能である。

本研究ではこれらの問題点を克服するための画期的な手法として、ある一定数のAβ分子を微小空間内に封じ込める「逆ミセル封入法」を提唱する。これは、微小空間内に少数の分子を封じ込めることにより局所濃度を高め、通常の希薄溶液中ではごくまれにしか起き得ない「凝集核形成反応」を効率よく引き起こすことが可能である。それと同時に、逆ミセル中には少数のAβ分子しか存在しないため、通常反応の様に溶液中に多数存在する可溶性分子が連続的かつほぼ不可逆的に凝集核へと付加重合する反応を根本的に抑止することを可能とする。本研究で提唱する「逆ミセル封入法」をAβペプチドに適用し、その線維凝集核(可溶性オリゴマー)の構造を、溶液高分解能NMRを用いて世界に先駆けて解明する。



3. 研究の方法

野生型ならびに2番目のアラニン残基をシステインに置換した A2C 変異型 A β 分子は、ユビキチンとの融合タンパク質として大腸菌大量発現系により調製した。N末端に付加した His6 タグを用いて NiNTA-アフィニティークロマトグラフィーにより融合タンパク質を精製したのち、ユビキチンのC末端部で切断する酵素 Yeast Ubiquitin Hydrolyase-1 (YUH1) によりユビキチンと A β を分離し、逆相 HPLC により精製した。得られた A2C 変異型 A β タンパク質を 95% ジメチルスルフォキシド・2% 酢酸中で一週間インキュベートすることによりシステイン残基のジスルフィド結合形成反応を行い、A2C-ダイマー型 A β 分子を作製した。

野生型および A2C-ダイマー型 A β 分子の水溶液を、エアロゾル OT (AOT) の n-ヘキサン溶液と急速混合し、A β 水溶液の AOT/n-hexane 逆ミセルを作製した。

AOT/n-hexane 逆ミセル中における ^{15}N -標識 A β 分子の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルは、大阪大学蛋白質研究所の 950 MHz 超高磁場 NMR 分光器を用いて測定した。(2019-2020 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業)

4. 研究成果

(1) 野生型および A2C-ダイマー型 A β 分子の自発凝集反応

まずはじめに、野生型および A2C-ダイマー型 A β 分子のそれぞれについて、アミロイド線維形成反応をアミロイド特異的な色素チオフラビン T の蛍光強度を指標として追跡した(図 2 A)。その結果、野生型 A β では反応開始から 3 時間経過後も蛍光強度は低く、アミロイド線維の形成は認められなかったが、より長時間 (168 時間 = 7 日間) 経過後には高い蛍光値を示した。このことから、野生型 A β において、以前より提唱されている「核依存型重合モデル: 図 1)」とよく一致する結果が示された。一方、A2C-ダイマー型 A β においては、反応開始直後からチオフラビン T の蛍光強度が増加し、30 分程度で重合反応が完了する結果となった。野生型 A β とは異なり、重合核に依存することなく自発的にかつ速やかに凝集反応が進行することが示された。

次に、反応直後および長時間経過後の野生型ならびに A2C-ダイマー型 A β について、遠視外部 CD スペクトルを測定した (図 2 B C)。その結果、両ペプチドともに反応開始直後はほぼランダムコイル様のスペクトルを示すのに対して、長時間経過後には β ストラントに富む構造へと転移していることが明らかとなった。

これらの結果から、野生型 A β では長時間のラグタイムの間に「ごく稀に」形成される凝集核を鋳型としてアミロイド線維への凝集反応が進行するのに対して、A2C-ダイマー型 A β の重合反応ではラグタイムは検出されず、A2C-ダイマー分子が「重合可能な構造状態」をはじめから形成している可能性が示唆された。

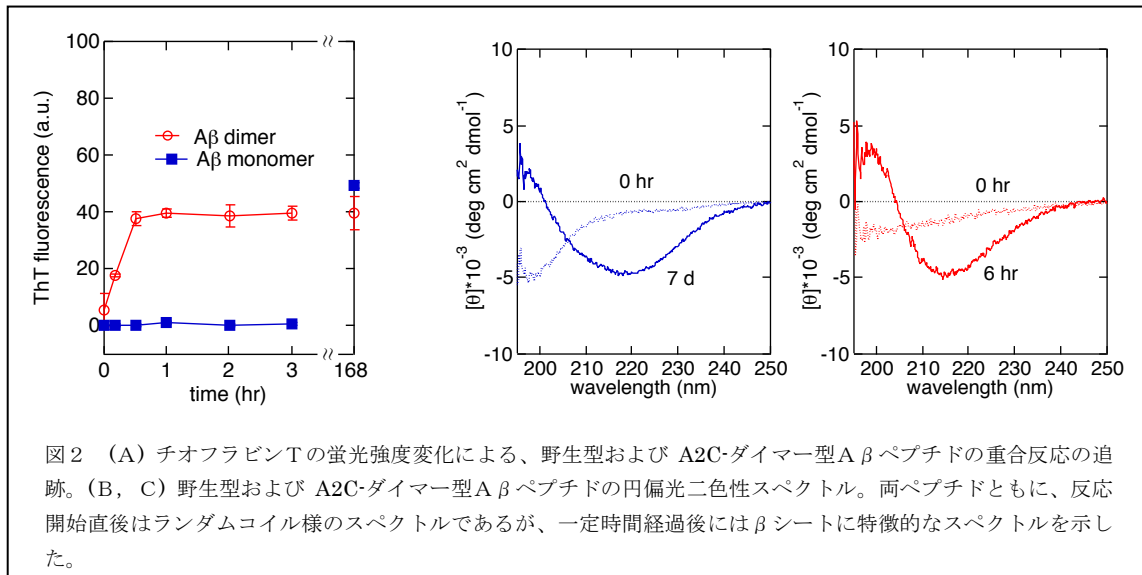
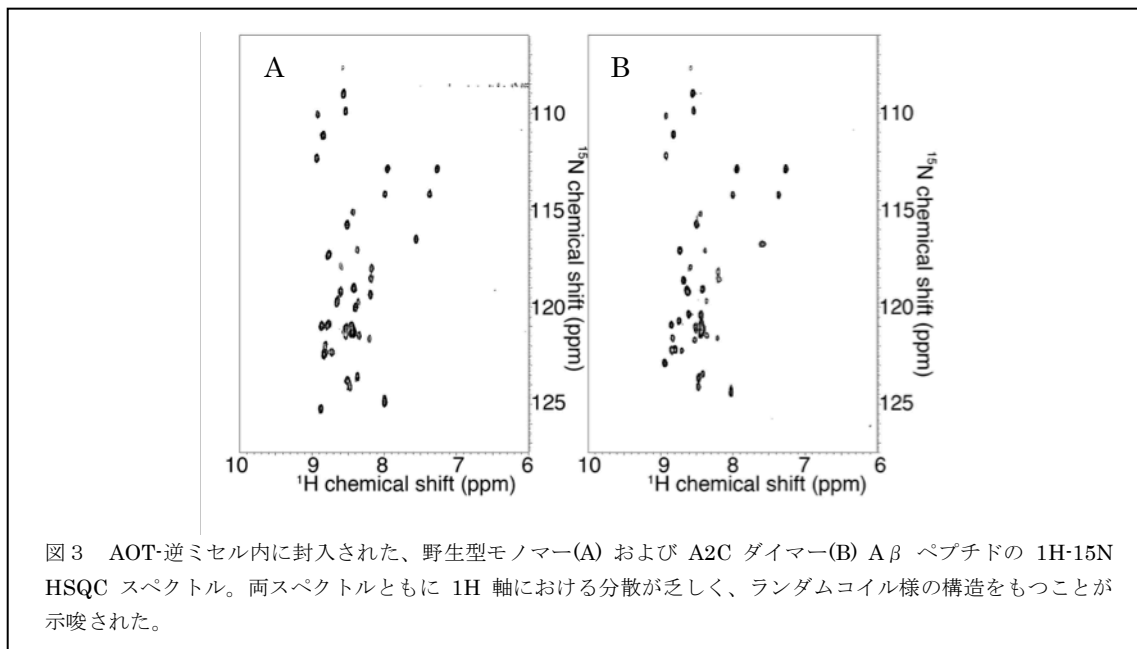


図 2 (A) チオフラビン T の蛍光強度変化による、野生型および A2C-ダイマー型 A β ペプチドの重合反応の追跡。(B, C) 野生型および A2C-ダイマー型 A β ペプチドの円偏光二色性スペクトル。両ペプチドともに、反応開始直後はランダムコイル様のスペクトルであるが、一定時間経過後には β シートに特徴的なスペクトルを示した。

(2) 野生型および A2C-ダイマー型 A β 分子の NMR 測定

A2C-ダイマー型ペプチドがはじめから凝集可能な立体構造、すなわち β ストラントに富んだ構造を形成しているのかを明らかにするために、AOT/n-hexane 逆ミセル中に A β を一分子ずつ隔離し、その NMR スペクトルを測定することを試みた。

15N-標識した野生型および A2C-ダイマー型 A β ペプチドを AOT / n-hexane 逆ミセル中に封入し、1H-15N HSQC スペクトルを測定した結果、両ペプチドともにほぼ同様のスペクトルを示すことが明らかとなった (図3)。特に 1H の化学シフトの分散が乏しく、ほぼ全てのピークが 8~9 ppm に集中して存在していることから、強固な水素結合を形成することなくほぼランダムコイル様の構造を形成していると考えられる。本研究結果から、A β 分子がランダムコイル様の可溶性構造から、 β シートに富む不溶性のアミロイド線維へと転移するためには、二分子以上のペプチドからなるより高次の会合状態必要であることが世界で初めて示された。



アミロイド線維形成の律速段階は反応初期の凝集核形成反応だと考えられている。凝集核形成のエネルギー障壁は高く、線維形成反応は一般に非常に長いラグタイムを伴う。一方、ひとたび凝集核が形成されると、その末端への可溶性分子の重合反応は速やかに進行する。そのため、あらかじめ形成されたアミロイド線維を超音波破碎したものはアミロイド線維の凝集核として作用し、可溶性分子に少量添加することにより長いラグタイムを消失させることが知られている。また、アミロイド線維は「一次元の結晶」とも称されるように、分子間の選択性が高く、異なる構造をもつタンパク質分子が同一の線維中に共存することはないと考えられている。このことから、あるタンパク質により形成された線維が別の可溶性タンパク質分子の凝集核として作用するかを調べることにより、二種類のタンパク質が同一のアミロイド線維構造を形成するかを調べることができる (クロスシーディング検査)。

これまでの研究から、A2C-A β ダイマーペプチドにより形成された凝集体は、繊維状構造をもつものの野生型 A β ペプチドの凝集核とはならないことが示されている。一方で、「逆ミセル封入法」により、単離された A2C-A β ダイマーペプチドは野生型 A β ペプチドと同様の溶液構造をもつことが明らかにされた。A2C-ダイマーペプチドが野生型 A β とは異なる凝集体を形成する原因として、A2C-ダイマーの高い疎水性に注目した。すなわち、野生型 A β が長いラグタイムの間に結合・解離を繰り返しているのに対し、疎水性が極めて高い A2C ダイマーペプチドは野生型と同様のアミロイド線維を形成する性質はあるものの、結合・解離のバランスが崩れることにより「構造の最適化」をすることなく不定形の凝集体を爆発的に形成してしまうのだと考えた。

このモデルの妥当性を検証するために、A2C-ダイマーペプチドの濃度を 1/100 に下げ、結合・解離の平衡を解離側へとシフトさせた結果、A2C ダイマーペプチドにおいても野生型と同様の構造をもつアミロイド線維が形成されることが明らかとなった。さらに、同低濃度条件下において形成された線維は、野生型 A β の凝集核となること、すなわち野生型 A β と同一のアミロイド線維を形成することが明らかとなった。

本研究により、「一次元の結晶」とも称されるアミロイド線維の形成反応は、ラグタイム中に個々の分子が幾度となく結合・解離を繰り返し、構造を最適化しつつ比較的ゆっくりと進行するものであることが示唆された。今後さらに詳細な解析を進めてゆく予定である。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Y. Okada, K. Okubo, K. Ikeda, Y. Yano, M. Hoshino, Y. Hayashi, Y. Kiso, H. Itoh-Watanabe, A. Naito & K. Matsuzaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Toxic amyloid tape: A novel mixed antiparallel/parallel beta-sheet structure formed by amyloid beta-protein on GM1 clusters.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chem. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 563-572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acchemneuro.8b00424	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 F. Ihama, M. Yamamoto, C. Kojima, T. Fujiwara, K. Matsuzaki, Y. Miyata & M. Hoshino	4. 巻 1867
2. 論文標題 Structural characterization of the N-terminal kinase-interacting domain of an Hsp90-cochaperone Cdc37 by CD and solution NMR spectroscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom.	6. 最初と最後の頁 813-820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2019.06.007	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 日比野 絵美, 星野 大	4. 巻 59
2. 論文標題 天然変性タンパク質の新しい相互作用機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 202-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.202	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 N. Itoh, E. Takada, K. Okubo, Y. Yano, M. Hoshino, A. Sasaki, M. Kinjo & K. Matsuzaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Not Oligomers but Amyloids are Cytotoxic in the Membrane-Mediated Amyloidogenesis of Amyloid-beta Peptides.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 430-433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201700576	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 Y.Kobayashi, M. Hoshino, T. Kameda, K. Kobayashi, K. Akaji, S. Inuki, H. Ohno & S. Oishi	4. 巻 57
2. 論文標題 Use of a compact tripodaltris(bipyridine) ligand to stabilize a single metal-centered chirality: stereoselective coordination of iron(II) and ruthenium(II) on a semi-rigid hexapeptide macrocycle.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inorg. Chem.	6. 最初と最後の頁 5475-5485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.8b00416	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 M. Hoshino	4. 巻 17
2. 論文標題 Letter to the Editor: A still unresolved mystery in the interaction between intrinsically disordered proteins: How do they recognize multiple target proteins?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 159-160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.BSJ-2020028	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 E. Hibino & M. Hoshino	4. 巻 17
2. 論文標題 A novel mode of interaction between intrinsically disordered proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 86-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.BSJ-2020012	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 M. Hoshino
2. 発表標題 Dynamic equilibrium between amyloid- molecules required for "mature" fibril formation.
3. 学会等名 Pavia Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野 大
2. 発表標題 高分解能溶液NMRによるタンパク質の動的構造解析
3. 学会等名 第20回若手NMR研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 大雅、西井 一郎、松崎 勝巳、星野 大
2. 発表標題 高分解能溶液NMRによるアミロイド 凝集初期過程の解析
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 石野 聡、矢野 義明、河田 康志、松崎 勝巳、星野 大
2. 発表標題 シャペロンGroEのフットボール型複合体におけるリング交換反応
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星野 大、中川 大雅、釣 大佑、西井 一郎
2. 発表標題 アミロイド ペプチド凝集初期過程の解析
3. 学会等名 第10回 タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaru Hoshino
2. 発表標題 Dynamic equilibrium between oligomeric states of amyloid- peptide studied by solution NMR
3. 学会等名 The 3rd Ulm Meeting - Biophysics of Amyloid Formation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野 大、加藤 恵威、森島 健、井上 倫太郎、杉山 正明、八木 寿梓
2. 発表標題 海藻由来フコイダンによるアミロイド凝集抑制機構の解析
3. 学会等名 第54回 京都大学原子炉実験所学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Maeda, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Katsumi Matsuzaki & Masaru Hoshino
2. 発表標題 Interaction between Mint3 and FIH-1 analyzed by high-resolution NMR
3. 学会等名 The 20th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan / 第20回日本蛋白質科学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------