

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19146

研究課題名（和文）レーザートラッピング法を利用したシトクロムcのアミロイド線維形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the amyloid formation mechanism of cytochrome c using the laser trapping method

研究代表者

廣田 俊（Hirota, Shun）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：90283457

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質は特定の立体構造を形成して機能することが多いが、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などでは、それぞれの疾病に特有のタンパク質が構造変性し、アミロイド線維として生体組織内に蓄積する。タンパク質のアミロイド線維化を空間的・時間的に制御することが難しいため、その形成機構の詳細は不明のままである。本研究では、シトクロムcをモデルタンパク質として、様々な位置にシステイン残基を変異導入し、構造柔軟性が制御されたジスルフィド架橋2量体を作製した。レーザートラッピングによりシトクロムc変異体の2量体を捕捉し、アミロイド線維形成を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内でのアミロイド線維の形成は多くの疾患と密接に関連しており、アミロイド線維形成機構の解明は生命科学の基礎研究の最重要課題の一つである。しかし、アミロイド線維の形成を空間的および時間的に制御する方法がないため、アミロイド線維形成機構の詳細は依然不明のままである。本研究では、シトクロムcのアミロイド線維形成にレーザートラッピングを利用することにより、アミロイド線維形成に関する新しい知見が得られ、これらの知見はタンパク質の構造変性と関連のある疾病の理解に役立つ。また、本手法はタンパク質立体構造研究に有用な手法であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Proteins often function by forming a specific three-dimensional structure, but in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, etc., proteins that are specific to these diseases are structurally denatured and accumulate as amyloid fibrils in living tissues. Since it is difficult to spatially and temporally control amyloid fibril formation of proteins, the details of the mechanism of amyloid fibril formation remain unknown. In this study, we used cytochrome c as a model protein. We introduced a cysteine residue at various positions of cytochrome c and made disulfide-linked cytochrome c dimers whose structural flexibility was controlled. We captured the dimers in solution by laser trapping and investigated the formation of amyloid fibrils.

研究分野：生体関連化学

キーワード：タンパク質 レーザートラッピング法 光圧 アミロイド線維 ドメインスワッピング ジスルフィド結合

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は特定の立体構造を形成して機能することが多いが、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などでは、それぞれの疾病に特有のタンパク質が構造変性し、アミロイド線維として生体組織内に蓄積する。また、アミロイド線維形成はタンパク質立体構造形成の一般原理と関係する。しかし、タンパク質のアミロイド線維化を空間的・時間的に制御することが難しいため、その形成機構の詳細は不明のままである。

2. 研究の目的

シトクロム *c* (cyt *c*) をモデルタンパク質として、レーザートラッピングにより cyt *c* のジスルフィド架橋 2 量体を捕捉し、cyt *c* 凝集体の形態と蛍光強度の時間変化を観測することにより、アミロイド線維形成機構を検討するとともに、アミロイド線維形成反応の新しい研究方法を提案した。分子間ジスルフィド結合するシステイン (Cys) 残基の位置を変えることにより、cyt *c* 2 量体の異なる領域の構造柔軟性を制御し、レーザートラッピングによる各 cyt *c* 変異体の 2 量体のアミロイド線維形成反応を調べ、cyt *c* のアミロイド線維形成に關与する構造領域を特定した。

3. 研究の方法

異なる残基位置に Cys を導入したウマ cyt *c* の変異体を作製し、分子間ジスルフィド結合により Cys 残基周辺の構造柔軟性が制限された 2 量体を作製した。cyt *c* の構造柔軟性の大きいループ領域 (Gly45 と Thr58)、ヘム鉄に配位しているメチオニン残基 (Met80) を含むループ領域 (Ala83)、C 末端 α ヘリックスの末端残基 (Glu104) の 4 ヶ所に Cys を変異導入した。

波長 1064 nm (300 mW) の連続波レーザー光を各 cyt *c* 変異体のジスルフィド架橋 2 量体を含む重水溶液中に対物レンズで集光し、レーザートラッピングによりジスルフィド架橋 2 量体を捕捉し、形成する凝集体の大きさと形状の時間変化を顕微鏡で観察した。さらに、アミロイド線維マーカーであるチオフラビン T (ThT) を cyt *c* の 2 量体の重水溶液に共存させ、2 量体をレーザートラッピングにより捕捉し、凝集体との相互作用により生じる ThT の蛍光観察 (405 nm 励起、10 μ W) により、アミロイド線維の形成を調べた。顕微鏡観察と蛍光観察を同時に行うことにより、凝集体の大きさとアミロイド線維形成の関係を調査した。

各 cyt *c* 変異体のジスルフィド架橋 2 量体を含む重水溶液中に対物レンズでレーザー光を集光し、顕微鏡のステージを移動させてガラス基板上に凝集体を連続的に作製した。作製した凝集体を超音波処理によってほどいた後、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

ウマミオグロビン (Mb) を用いて、同様のレーザートラッピングと TEM 観察の実験を行った。

4. 研究成果

(1) ジスルフィド架橋 cyt *c* 2 量体の作製と精製

各 cyt *c* 変異体をイオン交換カラムクロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した後、挿入した Cys を介して各変異体を分子間ジスルフィド架橋し、得られる 2 量体をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

(2) レーザートラッピングによる cyt *c* 2 量体の捕捉と凝集体形成

波長 1064 nm の連続波レーザー光を G45C、T58C、E104C 変異体のジスルフィド架橋 2 量体を含む重水溶液中に対物レンズで集光すると、集光点に直径約数 μ m の凝集体が形成されることが顕微鏡で観察された (図 1B)。この現象は、ドメインスワッピングした野生型 cyt *c* の 2 量体

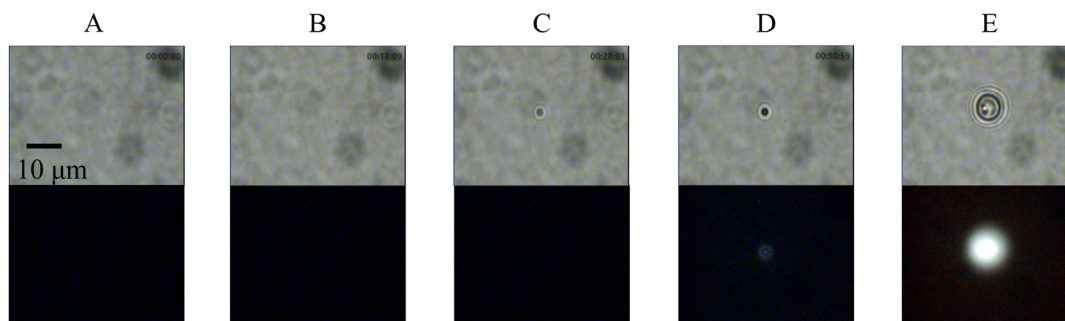


図 1. T58C 変異体の 2 量体のレーザートラッピングの顕微鏡観察。(上) 実体顕微鏡観察、(下) 蛍光観察。レーザー光照射 (A) 前、(B) 18 分後、(C) 28 分後、(D) 31 分後、(E) 60 分後。

のレーザートラッピングの結果と類似していた。形成した G45C、T58C、E104C の各変異体の凝集体にレーザー光を照射し続けると、大きさをほぼ一定に保ちながら凝集体の透過率が徐々に減少した (図 1C)。さらにレーザー光を照射し続けると、比較的短い時間の間に凝集体の透過率が著しく減少し、その低透過率の部分が凝集体の中心 (見かけ直径 0.4 μm 程度減少) に集まるとともに、溶液に共存させた ThT による蛍光強度が著しく増大し、アミロイド線維の形成が示唆された (図 1D)。その後、レーザー光照射に伴い、凝集体は ThT による強い蛍光を示しながら、速い速度でさらに大きくなったことから、アミロイド線維の伸長が速い速度で起こったと推測された (図 1E)。一方、A83C 変異体のジスルフィド架橋 2 量体にレーザー光を集光すると、他の *cyt c* 変異体の 2 量体と同様、直径数 μm の凝集体の形成は観察されたが、蛍光強度の非線形な増加は見られなかった。

(3) 凝集体の透過型電子顕微鏡観察

ガラス基板上に作製した G45C、T58C、E104C の各凝集体を超音波処理によってほどいた後、TEM で観察したところ、全ての凝集体において、幅数 nm のアミロイド線維構造が確認された (図 2)。以上より、*cyt c* の G45C、T58C、E104C 変異体の 2 量体はレーザー

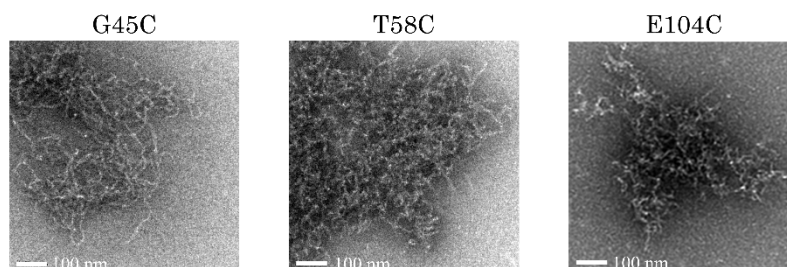


図 2. *cyt c* 変異体の 2 量体のレーザートラッピングにより得られたアミロイド線維の透過型電子顕微鏡像

トラッピングにより、ドメインスワッピングした野生型 *cyt c* の 2 量体と同様、光圧によってアミロイド線維を形成することが確認された。

(4) ジスルフィド架橋 *cyt c* 2 量体のアミロイド線維形成の比較

cyt c のアミロイド線維形成機構を解明するため、G45C、T58C、A83C、E104C の 4 つの *cyt c* 変異体のジスルフィド架橋 2 量体のレーザートラッピングの結果を比較したところ、凝集体を形成するのに要する時間が T58C < G45C < E104C 変異体の順に長くなった。一方、A83C 変異体の 2 量体のレーザートラッピングでは、溶液に共存させた ThT は強い蛍光を示さなかった。*cyt c* の天然立体構造でループ構造を示す Ile75-Lys87 領域が β ヘアピン構造に変化する *cyt c* 変異体の X 線結晶構造が報告されている。A83C 変異体の 2 量体は、Ile75-Lys87 のループ領域に含まれる 83 番目のアミノ酸位置間でジスルフィド結合を形成することにより 83 番目のアミノ酸位周辺の構造柔軟性が制限され、アミロイド線維形成が阻害された。この結果より、Ile75-Lys87 のループ領域が β ヘアピン構造へ変化することがアミロイド線維形成に重要であることが示唆された。

(5) ミオグロビンのレーザートラッピング

cyt c のアミロイド線維形成機構に関する知見を得るため、ウマホロミオグロビン (holoMb) およびアポミオグロビン (apoMb) のレーザートラッピングの実験を行った。いずれのタンパク質を含む溶液にトラッピングレーザーを数分間照射すると、レーザー集光点に凝集体が形成した。ThT を共存させた holoMb と apoMb 溶液を用いてレーザートラッピングの実験を行うと、*cyt c* と同様の形態変化と蛍光変化が観測された。holoMb と apoMb を含む重水の緩衝液溶液中に対物レンズでレーザー光を集光すると、集光点に直径約数 μm の凝集体が形成され、溶液に共存させた ThT の蛍光強度は僅かに増加した。凝集体にレーザー光を照射し続けると、凝集体は急激に直径が 30 μm を超えて成長するとともに、共存させた ThT による蛍光強度が著しく増大し、早い速度でのアミロイド線維の形成が示唆された。ガラス基板上に作製した凝集体を超音波処理した後 TEM 観察を行うと、*cyt c* 変異体の 2 量体同様、多数のアミロイド線維が確認された。このことより、レーザートラッピングの捕捉によるアミロイド線維形成は一般的な現象であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shun Hirota	4. 巻 194
2. 論文標題 Oligomerization of Cytochrome c, Myoglobin, and Related Heme Proteins by 3D Domain Swapping	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 170 ~ 179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.002	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14件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Shun Hirota
2. 発表標題 Supramolecular Assemblies of c-Type Cytochromes Based on 3D Domain Swapping
3. 学会等名 233rd ECS Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of Protein Supramolecules by 3D Domain Swapping
3. 学会等名 The 18th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan (Workshop: 35th Anniversary of Protein Engineering since 1983)（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi
2. 発表標題 Domain Swapping-Based Assemblies of c-Type Cytochromes
3. 学会等名 Tenth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣田俊、太虎林、樋口芳樹、柳澤幸子、小倉尚志
2. 発表標題 Vibrational Spectroscopic Studies of Cytochrome c and Hydrogenase
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会（シンポジウム：ピコバイオロジーが目指すもの）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shun Hirota
2. 発表標題 Oligomerization of Cytochrome c, Myoglobin, and Related Heme Proteins by 3D Domain Swapping
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC19) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shun Hirota
2. 発表標題 Constructing Heme Protein Supramolecules by 3D Domain Swapping
3. 学会等名 2nd International Conference on Bioinformatics, Biotechnology, and Biomedical Engineering (BioMIC 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shun Hirota
2. 発表標題 Oligomerization of Heme Proteins by 3D Domain Swapping
3. 学会等名 The 6th National Conference on Biophysical Chemistry (NCBPC-6) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ChunLiang Chiu, PeiHua Lo, ChiehJu Chang, Hongxu Yang, Shun Hirota, Hiroshi Masuhara, Teruki Sugiyama
2. 発表標題 Fabrication of Amyloid Fibrils of Cytochrome c Disulfide Dimers by Optical Trapping
3. 学会等名 The 67th Japan Society of Applied Physics Spring Meeting 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shun Hirota
2. 発表標題 Reaction Mechanism Elucidation and Supramolecular Creation of Metalloproteins
3. 学会等名 The 100th Chemical Society of Japan Annual Meeting (中止) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田俊
2. 発表標題 3Dドメインスワッピングによる金属タンパク質の超分子創成
3. 学会等名 錯体化学会オンライン研究会「錯体化学に基づく分子の構造変換設計と機能制御」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山輝樹、廣田俊、藤原正裕、藤田咲子、大野智子
2. 発表標題 光圧によるアミロイド線維の人工作製
3. 学会等名 文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム令和2年度利用成果発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田俊
2. 発表標題 金属タンパク質：反応機構解明と超分子創製
3. 学会等名 フロンティア生命化学研究会 特別シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山輝樹、廣田俊、藤原正裕、藤田咲子、大野智子
2. 発表標題 光圧によるアミロイド線維の人工作製
3. 学会等名 第20回国際ナノテクノロジー総合展・技術会議（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山輝樹、廣田俊、藤原正裕、藤田咲子、大野智子
2. 発表標題 光圧によるアミロイド線維の人工作製
3. 学会等名 文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム令和2年度「秀でた利用成果」発表会（招待講演）
4. 発表年 2021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		
台湾	National Yang Ming Chiao Tung University		