

平成21年6月22日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570160
 研究課題名 (和文) アミロイド線維の構造形成における基本的共通原理の解明と
 検出技術への応用
 研究課題名 (英文) Analyses for fundamental and universal principle of amyloid fibril
 formation and its application for detection of amyloids
 研究代表者
 森井 尚之 (MORII HISAYUKI)
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門
 研究者番号：80358176

研究成果の概要：病原性アミロイド線維形成性のアミロイド β 等の複数のタンパク質について、そのアミノ酸配列から選んだ2つの配列部分と人工的な屈曲部分とを組み合わせた形の新規ペプチドを設計し、その系統的な合成とアミロイド形成能の評価から、アミロイド線維形成に必須の配列領域と共通の基本的相互作用様式を明らかにした。さらに線維形成に必要な幹領域を有するが線維形成しない単一変異を見だし検出技術への応用可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質・アミロイド・構造・アミロイドベータ

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初において、アミロイドに関する多くの研究が世界的に行われていた。特にアミロイド構造については、球状タンパク質に対するX線結晶構造解析や溶液系多次元NMR解析の適用がアミロイドについては根本的に困難であるという事情があり、当初は電子顕微鏡とX線回折線維周期解析が主要な解析手法として用いられ、クロスベータ構造と呼ばれる線維軸方向に連続したベータシート構造の存在が、多種類のタンパク質アミロイドについて比較的早期に報告されていた。続いて、研究開始時点において、水素/重水

素交換を観測するNMR法や、同位体ラベル化アミロイドのIR解析法、特異的同位体ラベル化アミロイドの固体NMR測定法などの手法を用いて、主鎖水素結合によって構造形成しているアミノ酸部分配列の同定や、特定残基の二次構造、特定原子間の距離情報などが明らかにされ、粗くはあるがアミロイドの分子構造モデルの構築が試みられるようになっていた。またスキヤニング変異体実験（例えば proline-scanning 法）によって各残基の構造形成への役割も推定された。しかしながらその時点で提案されていた構造モデルは、実験データから導いた任意の可能性のひとつ

つという範囲を出ず、また電子顕微鏡で見えるサイズ領域（約 10 nm）とアミノ酸残基レベル（約 0.5 nm）の間の構造的特徴を合理的に説明できるものではなかった。

これに対して、同時期に筆者らは多数のしかも独自のアイデアを施した変異体を作成することで、各アミノ酸残基の構造的役割の詳細を解明する研究を展開し、次の2つのアミロイド繊維の構造要因を明らかにした。ひとつは「クロスベータ構造（ベータシート構造）の表面で疎水性アミノ酸残基がアミロイド線維軸方向に列状に配置していること」、もうひとつは、「疎水性アミノ酸残基列はクロスベータ構造の両面に存在することが多い」という点である。実際にこれらの条件の片方が成立しない変異体ではアミロイド形成能は喪失するか低下した。これに加えて（グルタミン、グルタミン酸）あるいは（アスパラギン、アスパラギン酸）の側鎖間の水素結合がやはり線維軸方向に連続して形成存在していることを結論した。このような基本となる相互作用を同定できたことを基礎として、クロスベータ構造同士の相互作用を疎水性残基列間のスタッキングとしてとらえることで、合理的な階層性を有するアミロイド全体構造をアミノ酸残基レベルの分解能でモデル構築することに世界で初めて成功した。しかしながら、各論として個々のアミロイドの構造を解明するには至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質のアミロイド形成に起因あるいは関連する各種疾病（アミロイドーシス）に関して、その治療および診断、検出分析の技術発展に貢献するために、最も基本となるアミロイド（タンパク質の異常凝集体）の分子構造をアミノ酸残基レベルで解明することにある。同時にタンパク質のアミノ酸配列のあるものがアミロイドになり、別のあるものはアミロイドにならないという、配列に依存した差異が生じている原理は何か、すなわちアミノ酸残基間相互作用からみたアミロイド構造形成の共通的基本原理の解明が目的である。この基本原理の解明はさらに、アミロイド構造型自体を利用したアミロイド成分の検出にも応用できる可能性が高いため、これに基づくアミロイドの新規な分析技術の開発も視野に入れた研究展開を図ることにした。

具体的には、それまでの独自の先進的な研究展開をさらに進め、アミロイド構造形成の原理をより確実性の高いものとして確立することを目標として、タンパク質のアミノ酸配列のどの部分が、どの残基間の相互作用でアミロイドコアを形成し、またコア近接領域のどのような残基がアミロイド化の促進に

寄与しているかを、実際の数種のアミロイドーシスに関わるタンパク質について明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

前述の目的を達成するために、本研究は次に列挙する各個別課題を有機的に連携させつつ、ある程度並行して実施する計画を立てた。(i) アルツハイマー病アミロイドベータタンパク質におけるアミロイドコア領域の構造と残基間相互作用の解明、(ii) プリオンタンパク質のコア領域の構造と残基間相互作用の解明、(iii) ベータ 2 ミクログロブリンのコア領域の構造と残基間相互作用の解明、(iv) 各アミロイドに対する特異的認識プローブ分子開発のための基本設計。

手法的にはアミロイド性検出に適した独自設計を加えた変異体部分配列ペプチドを多数作成することで解明を進めた。部分配列ペプチドのみを合成する研究は従来から存在するが、全体構造モデルと相互作用2条件に基礎を置く本提案者の設計は全く独自のもので、しかもアミロイド性検出についての有効性が高い点が最大の有利な点であり、アミロイドーシスに関わるタンパク質が示すアミロイド形成性の本質部分を全体構造を意識しつつ導出できる可能性がある。このようなペプチドは2本の6残基程度の天然型部分配列を主に L-アスパラギン酸と D-アラニンによって接続したもので、天然型部分配列をタンパク質の残基配列に沿って系統的に選択した。合成した多数のペプチドのアミロイド形成性の確認はチオフラビン T 色素の特異的結合を蛍光スペクトルで検出し確認した。この際に蛍光強度だけではなく蛍光極大波長のデータも活用した。また、円二色性 (CD) スペクトル測定も行った。計画(iv)については、アミロイド形成性を有するコア領域のアミノ酸配列はそのままにして、それに近接する領域、とくにループ構造部分に着目してその変異体を作成して同様のアミロイド検出手法を適用した。

4. 研究成果

(1) アルツハイマー病アミロイドベータタンパク質に関して、アミロイド形成傾向性の高い領域を独自開発の予測プログラムを使用して抽出した結果、分子内ターン構造を形成しうる2つのベータストランドが42残基の分子中央部とC端側領域に存在することが推測された。またこれらストランドの組み合わせ様式には複数の可能性が予想された。そこで、2本の7残基ストランドを有し、その間の4-5残基ループ部分をターン誘導性の2残基に変換した「ストランド・ターン・ストランド」型の分子を約50種類系統的に設計合成してアミロイド形成性を調べた（図1 参

照)。チオフラビン T 色素結合性等の解析結果を総合すると、合成したこれらのペプチドのうち特定の 1 種のみが分子内ターン構造に基づくと考えられる顕著なアミロイド性を示した。この結果を受けて、さらにストランド長を 6 残基にしたもの、また 5 残基にしたものについても系統的な 2 本のストランドを組み合わせたペプチドを多数合成してアミロイド性を検証した。その結果、アミロイドベータタンパク質のアミロイド形成性に対応すると思われる 2 本のストランドは特定の 2 領域に限定されるものであることが明らかとなった。この実験結果は予測結果とよい一致を示し、これらストランド間で疎水性のアミノ酸残基側鎖間相互作用が効率的に実現していた。さらに正負荷電性の残基がストランド間で静電的相互作用をしていることが予想された。これらの相互作用がアミロイド形成時の主要な相互作用である可能性が高く、見出した 2 つのストランド部分が全長配列においてもアミロイド形成時の幹構造になることが強く示唆された。

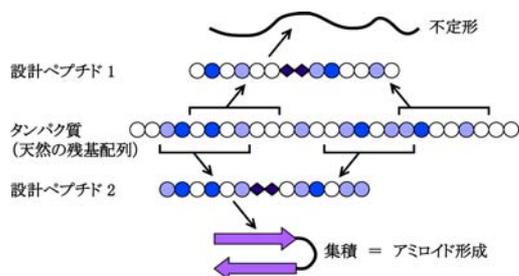


図 1. 天然タンパク質の残基配列に対する「ストランド-ターン-ストランド」型設計ペプチド（配列領域によって、不定形となる場合の例 1 とアミロイド化する場合の例 2 を示す。菱形はターン誘導性の人工配列。）

(2) 部分配列からなる「ストランド-ターン-ストランド」型分子の解析に加えて、蛍光性のチロシン残基を系統的に導入した 20 数種の全長配列の変異体アミロイドベータタンパク質の分光学的解析から、予想されるアミロイドの幹構造部分に近接する領域においてチロシン残基への変異がアミロイド指向性の蛍光色素の結合量あるいは蛍光強度に影響を与えることを見出した。このことは上記の分子内ターン構造に基づくアミロイド構造モデルを支持するとともに、幹構造以外のコイル部分とループ部分がともにアミロイド線維に沿ったグループ壁を構成していることを示唆している。これらの結果は従来の報告モデルに比べて、より詳細な残基間の相互作用に関する知見を含んでいる。

(3) アルツハイマー病のアミロイドベータタンパク質 42 残基について、ストランド長

と短縮する元のループ長を多数変動させて、「ストランド-ターン-ストランド」型設計分子を系統的に作成してコア領域のより精密な絞り込みを行った。その結果、分子内でペアとなってコア領域を形成する 2 本のベータ構造ストランドのうち 1 本は(16-21)部分で共通であるが、もう 1 本のストランドは、最もアミロイド形成性の高い特定の残基配列部分の他に、これより 1 あるいは 2 残基分をシフトさせた残基配列部分においても、アミロイド形成性が認められた。このように幹構造領域が単一の組み合わせでないことは、本タンパク質が形成するアミロイド性凝集体が、線維状及び顆粒状などの多様な形態をとりうること、すなわち多形性との関連性を示唆しており、アミロイド化の分子基盤解明において重要な発見である。

(4) 上記と同様の手法によるベータ 2 ミクログロブリンの系統的解析では、高いアミロイド形成性を有する領域として 20 番残基付近から始まる 2 本のストランドペアを特定することに成功し、さらに単一ストランド型のアミロイド形成が 2 か所の部分配列領域で可能であることを見いだした。これはタンパク質変性の程度に応じて異なるアミロイド線維が形成される現象を説明する上で重要な知見であると考えられる。

(5) プリオンタンパク質に関する「ストランド-ターン-ストランド」型設計分子を用いた系統的解析では、比較的近接する 2 本のストランドから形成されるアミロイドは、ほぼ 1 種類の組み合わせに限られていることが明らかになった。これら 2 本のストランドは正常型プリオンの構造においては 2 本の長いヘリックス構造部分の一部を占めており、ヘリックスからベータ構造への二次構造転移がアミロイド化を引き起こしていることを強く示唆する結果である。これら一連のタンパク質についての実験結果から構築されるアミロイド構造モデルは「N 端部-ストランド-ループ-ストランド-C 端部」型にまとめることができる。この構造においてストランド部以外の領域はコア領域のサイズの制約を強く受けるために、タンパク質残基長の増大に伴ってベータシート積層数が減少し、ついには線維形成が困難になる可能性があることを理論的に導いた。この考え方は特に、通常条件では線維化しない異常型プリオンの構造特性を合理的に説明する。

(6) 各アミロイドに対する特異的認識プローブ分子開発に資するために、上記のように独自の構造モデルを利用して同定したアミロイド幹構造形成領域を用いて設計したアミロイド性ペプチドにおいて、そのループ構

造領域を短いターン構造部分に代替したペプチドを作成した。さらにこのターン部分における各種変異体について検討した結果、プロリンを導入することにより、自己単独アミロイド化能が著しく低下することを見いだした。このプロリン導入ペプチドの幹構造形成領域は、もとのアミロイド化するペプチドと共通であるので、この分子設計はアミロイド認識分子への応用が可能である。

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 6 件)

① 清水洋輔、森井奈保子、小中原猛雄、田之倉優、岡田知子、森井尚之、Analysis on inter-molecular alignment in amyloids using systematic tyrosine mutation for amyloid β , *Peptide Science*, 査読無, vol.2008, p.365-366, (2009 年).

② 佐伯政俊、日高雄二、奈良雅之、森井尚之、Exploration on amyloidogenic core β -structure causing abnormal prion, *Peptide Science*, 査読無, vol.2008, p.363-364, (2009 年).

③ 小池正紘、奈良雅之、小中原猛雄、岡田知子、森井尚之、IR analysis on amyloids of isotope-labeled amyloid β peptides, *Peptide Science*, 査読無, vol.2008, p.335-336, (2009 年).

④ 森井奈保子、小中原猛雄、岡田知子、森井尚之、Amyloid formation of tyrosine-mutant amyloid- β (1-42), *Peptide Science*, 査読無, vol.2007, p.401-402, (2008 年).

⑤ 森井尚之、岡田知子、Probing on cross- β region of amyloid- β (1-42) with designed turn-inducing fragments, *Peptide Science*, 査読無, vol.2007, p.399-400, (2008 年).

⑥ 吉田研誠、奈良雅之、小中原猛雄、岡田知子、森井尚之、Structural analysis on amyloid fibril of amyloid- β (1-42) by systematic isotope labeling, *Peptide Science*, 査読無, vol.2007, p.99-100, (2008 年).

[学会発表] (計 5 件)

① 森井尚之、他、アミロイド β 分子の集積体中における高次構造, 第 8 回日本蛋白質科学会年会, 2008/06/12, 東京.

② 吉田研誠、他、森井尚之、位置特異的同位体ラベルによるアミロイド β 集積体の高次構造解析, 日本生物物理学会第 45 回年会, 2007/12/22, 横浜.

③ 吉田研誠、他、森井尚之、系統的同位体ラベル法によるアミロイド β (1-42) のアミロイド線維の解析, 第 44 回ペプチド討論会, 2007/11/09, 富山.

④ 森井尚之、他、ターン誘導性の設計フラグメントを用いたアミロイド β (1-42) のクロスベータ領域の探索, 第 44 回ペプチド討論会, 2007/11/08, 富山.

⑤ 森井奈保子、他、森井尚之、アミロイド β (1-42) のチロシン変異体のアミロイド形成, 第 44 回ペプチド討論会, 2007/11/07, 富山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森井 尚之 (MORII HISAYUKI)

産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員

研究者番号: 80358176

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者