

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770131
 研究課題名 (和文) NMRによるアミロイド線維の成長末端中間体の構造解析
 研究課題名 (英文) Structural analysis of growing-end intermediate of amyloid fibril using NMR
 研究代表者
 櫻井 一正 (SAKURAI KAZUMASA)
 大阪大学・蛋白質研究所・助教
 研究者番号：10403015

研究成果の概要：

本研究の目的は、 $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) アミロイド線維の形成中間体の構造の知見を、パルスラベル重水素交換をはじめとしたNMRの手法を用いて得ることである。19年度にはパルスラベルなしの重水素交換実験を行い、線維末端中間体が存在することを示唆する結果を得た。20年度にはパルスラベル実験とその他数種類の実験を行った。これらの結果から、過渡的な線維末端中間体では、モノマー $\beta 2m$ と線維が非特異的な相互作用を形成するが、最終的には線維の形態に変化していくものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	600,000	0	600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	480,000	2,680,000

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：アミロイド線維、NMR、重水素交換、フォールディング

1. 研究開始当初の背景

近年、アミロイド線維の形成機構を研究した論文が多数報告されている。それらの中には、アミロイド形成反応が二段階で進むというモデルを提唱している報告がある。その2つの段階とは、原因タンパク質が線維核の成長末端に結合し中間体構造（以下、成長末端中間体）をとる段階と、一度結合したタンパク質が完全なアミロイド線維構造に変化する段階と説明される。この成長末端中間体は反

応開始種のモノマー状態、反応生成物の線維状態と異なり、過渡的に存在するものである。そのため、モノマー状態、線維状態の構造解析が既に報告されているのに対し、この成長末端中間体の原子構造に関する報告はまだまだ少ない。しかし、この線維末端中間体の構造の理解は、線維伸長機構の理解に重要である。

2. 研究の目的

本計画で目指すのは、重水素交換法を利用した、成長末端中間体の構造のキャラクタリゼーションである。本計画の目的は①この重水素交換法を用いた線維末端中間体の解析の実験条件を確立すること、②線維末端中間体の構造に関する知見を得、そこから線維伸長の機構を解明することである。

3. 研究の方法

1. の項で述べたとおり、アミロイド形成反応は、原因タンパク質が線維核の成長末端に結合し線維末端中間体をとる段階と、一度結合したタンパク質が完全なアミロイド線維構造に変化する段階の二段階で進むと考えられている。このモデルに従うと、この二つの段階は酵素反応のミカエリス複合体形成、および反応物生成の段階に対応しており、酵素反応と同じ速度論でアミロイド形成反応も扱うことができると考えられる。つまり、以下のような反応機構となる。



ここで、E は線維核、S はモノマータンパク質、ES は成長末端中間体、P は線維に取り込まれたモノマータンパク質と置き換えて読むことができる。

ここで、少量のモノマータンパク質（基質に相当）に対し過剰量のアミロイド線維核（酵素に相当）を添加すると、成長末端中間体から完全なアミロイド線維になる反応を1ターンオーバーだけ起こすことができる。これは酵素反応の遷移相の速度論に基づく実験と同じ発想である。この実験から一度線維末端に結合したモノマータンパク質がどのような中間状態をとるのか、およびどのようにアミロイド線維構造に変化していくかを追跡することができる。

我々はこのモデルに基づき、 β_2 ミクログロブリン (β_2m) アミロイド線維の成長末端中間体構造を解析することにした。というのも、既に我々は、 β_2m モノマーが線維に結合した状態から線維構造へ変化していく様子を分光蛍光光度計を用いた実験で観測しており、上記の二段階反応のモデルが妥当であることを確認しているからである。

さらに我々は、線維末端中間体の構造解析を行う方法としてパルスラベル法とDMSO法の組み合わせを採用した。まずパルスラベル法とは、経時的に進行する反応の各時点で重水素交換ラベルを施す方法であり、分子のどの部分が溶媒に露出しているかが分かる。こ

の重水素化パターンから、各時点での存在するタンパク質分子のコンフォメーションが推測できる。元来、タンパク質のフォールディング研究のために開発された方法だが、これを過渡的に表れる線維末端中間体の構造解析に利用する。つづいてDMSO法とは、重水素化ラベルされた情報を効率よく取得するための手法である。このDMSO法は当研究室で考案された方法である。DMSO法の特徴は①不溶性のアミロイド線維をNMRで測定可能にする、②back exchangeを抑え、より高い時間分解能でタンパク質の構造変化を観測できる、という点が挙げられ、過渡的なアミロイド線維中間体のパルスラベル実験に必須の方法である。

4. 研究成果

19年度にはパルスラベル実験のための予備的な実験を行うために、①トリプトファン欠損変異体 β_2m を用いた反応過程の蛍光観察と②パルスラベルなしの重水素交換実験を行った。これらの結果から線維末端中間体が存在することが確認された。しかし、データ解析を行い線維末端中間体の保護部位を決定しようとしたものの結果に不明瞭な部分があったため、より高い時間分解能の実験が必要となった。

そこで20年度には当初予定していた③パルスラベル法/DMSO法実験を行った。また補足の実験として④モノマーと線維共存下における重水素交換実験、⑤アミロイド線維の直接スペクトル観察などの実験も行った。これらの結果を総合すると以下のような反応過程が提案された。まず、伸長した線維内では、モノマー β_2m の中央部全体が線維の内部に取り込まれており、N末端とC末端のみが線維の表面に露出している。しかし、過渡的に形成する線維末端中間体においては、N末端やC末端も線末端 β_2m 分子と相互作用しているのである。（図1）

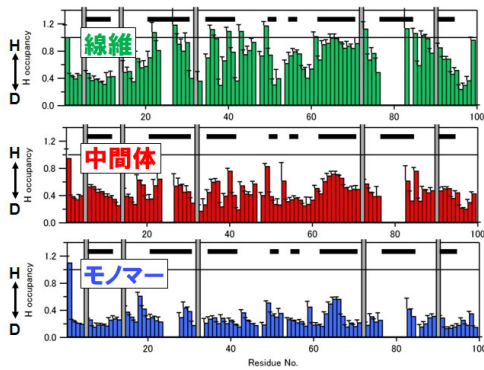


図1. アミロイド線維成長末端中間体のパルスラベル実験. それぞれ上と下の図は線維とモノマーの参照実験. 中段の図は伸長反応中にパルスラベル実験を行った時の結果. 線維とモノマーの交換パターンから中断のパターンは再現できないため(図中○)、中間体の交換パターンを示していると考えられる.

これらの結果から、モノマー β 2mが線維と相互作用する際、非特異的な相互作用の形成を繰り返すうちに、線維伸長に繋がる相互作用を形成し、そういった結合種のみが最終的な線維の形態に変化していくものと考えられる。(図2)

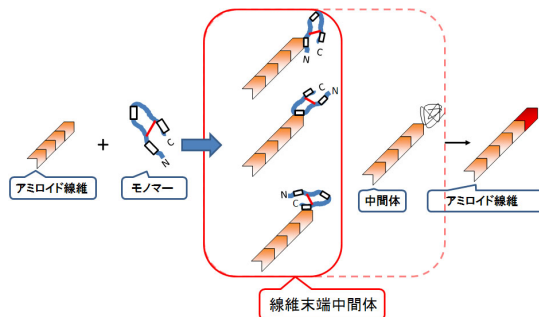


図2. 実験から提案するアミロイド線維伸長モデル

今回の実験から、研究の途上ではあるが興味深い結果を得ることができた。まずは、今回の基本的な理解の報告を科学雑誌に投稿したいと考えている。そして今後は、今回得られた線維伸長機構に更に新たな実験結果を加え、モデルを詳細にしていきたいと思っている。

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 2件)

- ① 坂田道子、茶谷絵理、亀田篤司、櫻井一正、内木宏延、後藤祐児. Kinetic coupling of folding and prolyl isomerization of β 2-microglobulin studied by mutational analysis. *Journal of Molecular Biology* **382**, 1242-1255 (2008). 査読有り
- ② 八木 寿梓、櫻井一正、後藤 祐児. アミロイド構造生物学の台頭. *蛋白質 核酸 酵素* **52**, 1445-1453 (2007). 査読なし

[学会発表] (計 8件)

- ① 柳浩太郎、櫻井一正、茶谷絵理、内木宏延、後藤祐児. 重水素交換法を用いたアミロイド線維伸長反応機構の解析. 第46回日本生物物理学会年会、福岡国際会議場 (福岡・博多区). 2008年12月3-5日
- ② 吉村優一、櫻井一正、茶谷絵理、亀田篤司、酒井美世、山口圭一、内木宏延、後藤祐児. β 2 ミクログロブリンのフラグメントが形成するアミロイド線維構造の構造解析. 第46回日本生物物理学会年会、福岡国際会議場 (福岡・博多区). 2008年12月3-5日
- ③ 小沼剛、茶谷絵理、八木正典、大西玲奈、櫻井一正、内木宏延、後藤祐児. H/D 交換法による β 2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成中間体の検出. 第47回NMR 討論会、筑波大学 大学会館講堂 (茨城・つくば市). 2008年11月12-14日
- ④ 小沼剛、茶谷絵理、大西玲奈、櫻井一正、内木宏延、後藤祐児. Detection of the kinetic intermediate on the amyloid fibrillation of β 2-microglobulin by NMR combined with H/D exchange. International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Sheraton San Diego Hotel & Marina (San Diego, CA, USA). 2008年8月24-29日
- ⑤ 柳浩太郎、櫻井一正、亀田篤司、茶谷絵理、内木宏延、後藤祐児. 重水素交換法を用いたアミロイド線維伸長反応機構の解析. 第8回日本蛋白質科学会年会、タワーホール船堀 (東京・江戸川区). 2008年6月8-10日
- ⑥ 吉村優一、茶谷絵理、酒井美世、櫻井一正、亀田篤司、山口圭一、内木宏延、後藤祐児.

藤祐児. $\beta 2$ ミクログロブリンのフラグメントが形成するアミロイド線維構造の構造解析. 第 8 回日本蛋白質科学会年会、タワーホール船堀 (東京・江戸川区). 2008 年 6 月 8-10 日

- ⑦ 大西玲奈、茶谷絵理、櫻井一正、内木宏延、後藤祐児. Observation of fibril-monomer complex during the extension process of $\beta 2$ -microglobulin amyloid fibrils. 第 80 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜. 2007 年 12 月 14 日
- ⑧ 三枝功史、亀田篤司、山口圭一、櫻井一正、内木宏延、後藤祐児. $\beta 2$ ミクログロブリンの部分ペプチドから成る $\beta 210$ アミロイド線維の重水素交換実験. 第 80 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜. 2007 年 12 月 14 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 一正 (SAKURAI KAZUMASA)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号：10403015

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし