

平成 23 年 6 月 24 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20550025

研究課題名（和文）

圧力軸から見たアミロイド線維の二次構造と分子機構

研究課題名（英文）

The molecular conformation of amyloid fibril revealed by pressure axis

研究代表者

谷口 吉弘 (TANIGUCHI YOSHIHIRO)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70066702

研究成果の概要（和文）：

インシュリンアミロイド線維について、1100MPa まで加圧して高圧 FT-IR 測定を行った。その結果、インシュリン中間体から初期段階で形成されたアミロイド線維は 550MPa の加圧により融解するが、十分熟成して形成されたアミロイド線維は 1GPa の圧力に対して極めて安定であった。高圧 NMR（一次元、二次元）法を用いてアミロイド線維形成の引き金になるインシュリン蛋白質（A 鎖、B 鎖）の詳細な分子構造変化を測定した。200MPa までの加圧で蛋白質分子中の水素結合距離は減少し、B 鎖の一部で圧縮が生じ、B 鎖 L15 メチル基が大きな変化を受け、さらに加圧すると部分的な水和（蛋白質分子への水の浸入）が促進された。100MPa までの加圧により A 鎖のヘリックス 1 と B 鎖の N、C 末ストランドで大きな部分構造の変化を観測し、この構造付近で共同した構造変化と体積揺らぎが生じていると予測した。

研究成果の概要（英文）：

The pressure-induced changes in the secondary structure of insulin amyloid fibril up to 1100MPa were studied by means of the high pressure Fourier transform infrared spectroscopy. The early amyloid fibril to come from intermediate state of insulin was melted by high compression up to 550MPa. But the aged amyloid fibril does not change to be rigid structure by very high compression up to 1GPa. The detail structure of insulin under high pressure was studied by high pressure one- and two-dimensional NMR spectroscopy. High pressure NMR showed large changes in amide proton chemical shift for the residues mainly in the N- and C-terminal strands of B chain and helix1 of A-chain. The structural changes in the N- and C-terminal strands of B-chain under high pressure is a key factor for the pressure induced molecular association and aggregation of insulin

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎科学・物理化学

キーワード：圧力、インシュリン、アミロイド線維、二次構造、分子構造、FT-IR, NMR

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経変性疾患の代表的なものにはアルツハイマー病、パーキンソン病、狂牛病、筋萎縮性側索硬化症 ALS などがあり、その病態の1つとして神経細胞内での蛋白質凝集が観測されている。凝集物の中でもアミロイド線維は規則的な構造をもち細胞死や疾患の直接的原因の1つと考えられている。アミロイド線維は幅 10nm の枝分かれのない線維構造を持ち、線維軸に垂直にシート構造が並んでいる。この短冊状のクロス構造が何層も集合することでプロトフィラメントが形成され、さらにそれらが集合してアミロイド線維ができる。これまでの研究から疾患と無関係な蛋白質やペプチドでもアミロイド線維の形成が確認されていることから、ポリペプチドの持つ1つの自己集積構造と考えられるようになった。よってアミロイド線維を形成するモデルタンパク質やペプチドを用いた研究から、その形成メカニズムの一般論の解明が可能と考えられる。

(2) アミロイド線維形成が確認されている蛋白質の多くは特定の機能を有する球状蛋白質であり、アミロイド線維化のメカニズムについて十分に理解されていない。1つの線維化のモデルとして未変性/変性過程で生じる中間体構造を経由したモデルが挙げられる。蛋白質の状態は、変性状態から天然状態までの化学平衡状態にあり、様々な中間状態をとることが分光学的研究により示されている。それら中間体の多くは、部分変性構造であり本来蛋白質内部にあるべき疎水性アミノ酸残基が露出しており、疎水性相互作用による分子会合を生じやすい。変性中間体や低分子量会合体(オリゴマー)の構造や物性を研究することにより、分子凝集やアミロイド線維の形成メカニズムが理解できると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 多くの蛋白質は、熱により天然立体構造は破壊されて、ある種の間状態を経て分子間β-シートから成る高次会合体を形成する。これらの会合体に、200MPa までの比較的低い圧力を作用させると、会合体は解離する。一方、300MPa を超える高い圧力では分子間会合を促進する興味ある圧力効果を発見した。さらに、圧力変性過程で中間体由来の二次構造を確認した。最近、蛋白質の二次構造に由来するアミロイドバンドの 1620cm^{-1} 付近のピークは、アミロイド線維の分子間平行β-シートに帰属される証拠が明らかになり、アミロイド線維形成によらない分子間逆平行β-シート会合体 (1615cm^{-1} と 1685cm^{-1}) と明確に区別できる。また、蛋白質の変性過程における中間体は、アミロイド線維形成の重要な因子であることより、熱・圧力変性過程で一

般的に観測される蛋白質会合体がアミロイド線維かどうかを区別することが可能であり、さらにその詳細な立体構造の解明の手がかりがえられる。

蛋白質の圧力効果から得られる蛋白質の部分モル体積は、構造が壊れるほど減少する傾向にあり、蛋白質の体積原理と呼ばれる。つまり体積差を利用して、加圧により部分モル体積の大きな最安定状態から部分モル体積の小さな準安定状態、変性中間状態、変性状態へと順に状態転移させることができる。また、天然状態や変性中間状態など各状態を逸脱しない範囲でも揺らぎが存在する。加圧することにより各状態内でも部分モル体積のより小さな状態にシフトすると考えて良い。これらは圧力の熱力学的効果である。一方、それぞれの蛋白質分子に注目した場合、加圧により水素結合など非結合性の相互作用は強められ原子間距離は圧縮される。これは圧力による力学的効果である。統計熱力学的には、圧縮率は体積揺らぎと比例するため、蛋白質の力学的応答を解析することにより体積揺らぎの大きさを評価できると考えられる。

(2) 高圧下での FT-IR 測定からはアミロイド線維の二次構造が、NMR 測定により蛋白質の力学的応答と熱力学的応答を観測し、構造揺らぎの研究が可能である。本研究では、アミロイド線維の二次構造の情報が得られる高圧力 FT-IR 法により、アミロイド線維の二次構造を明らかにする。また、原子レベルの情報を得られる高圧力 NMR 法を用いて、インシュリンの構造揺らぎと変性中間体の構造研究を行う。

(3) インシュリンは 21 個のアミノ酸残基からなり、1つのジスルフィド結合を持つ A 鎖と、30 個のアミノ酸残基からなる B 鎖できている。A 鎖と B 鎖は 2 つのジスルフィド結合で結合されており合計 3 つのジスルフィド結合を有する。インシュリンはモノマー、ダイマー、テトラマー、ヘキサマーとの化学平衡状態にある。中性付近ではヘキサマーとして安定に存在するが、酸性条件下ではモノマーが安定化される。これまでの研究から、変性中間体が核形成に關与しアミロイド線維形成が生じるモデルが提案されている。

インシュリンを対象とする意義は以下である。糖尿病の薬として利用されるため、その製剤学的な観点から分子凝集の知見を得ること。体内でインシュリンの凝集物が観測されていること。針状、ひも状のほかに加圧下で環状のアミロイド線維が確認されており、線維形体(モルフォロジー)と分子構造の相関に注目している。

3. 研究の方法

FT-IR 測定用の D 化牛インシュリン D_2O 溶

液は 50 mg/ml, pH1.6 (100mM NaCl) に調整した。アミロイド線維形成は、60 °C で 0.3h, 1h, 3h, 6h, 12h, 72h 温置したものを測定試料とし、ダイヤモンドアンビルを用いて 1100MPa まで赤外スペクトルを測定した。牛インシュリン 20%酢酸溶液、pH2.4 の二次元高压 NMR 測定は、温度 20 ~ 40 °C、圧力 0.1 ~ 300MPa (25 °C) 下で高压 NMR ガラスセルを用いて行った。また、ヒトインシュリン 20%D 化酢酸溶液、pH2.6、軽水中での二次元高压 NMR 測定は、3MPa ~ 100MPa 下で測定を行った。

4. 研究成果

(1) 牛インシュリンアミロイド線維の FT-IR 測定

牛インシュリン溶液 (50 mg/ml in 100 mM NaCl, pH 1.6) を 60 °C で 72 時間温置後、測定した IR スペクトルを図 1 (A) に、その二次微分スペクトルを図 1 (B) に示す。

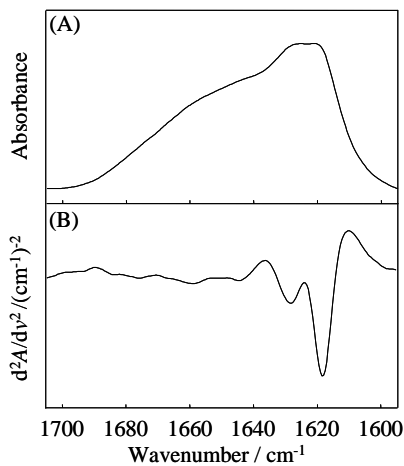


図 1 72 時間温置し形成した牛インシュリンアミロイド線維のアミド I/I' の赤外吸収スペクトル (A) とその二次微分スペクトル (B) (1 気圧、25 °C)

図 1 (A) より、常温常圧におけるインシュリンアミロイド線維の IR スペクトルは、1620 cm⁻¹ 付近に頂点を持つスペクトルを示す。アミロイド線維の二次構造はβ-Sheet 構造に富んだ構造であるため、各々のピークは二次微分により明確に分離される (図 1 (B))。1620 cm⁻¹ 付近に観測されたピークは、アミド I バンドで観測される一般的なタンパク質の二次構造の帰属として平行型β-シート構造と帰属される。また、Bouchard らの研究から、インシュリンアミロイド線維は平行型β-シート構造であることが示されている。したがって、本研究で観測された 1620 cm⁻¹ 付近のピークを平行型β-シート構造と帰属した。また、Dzwolak らは、1630 cm⁻¹ 付近に観測されるピークを 1620 cm⁻¹ に観測される平行型β-シート構造とは水素結合の強さが

異なる平行型β-シート構造と帰属している。しかしながら、1630 cm⁻¹ 付近のピークは水和α-ヘリックス構造に起因するという報告もあることから、現段階では帰属が不明確であるため、本実験で観測された 1628 cm⁻¹ は不明ピークとした。

(2) 牛インシュリンアミロイド線維の高压 FT-IR 測定

60 °C で 0.3h, 1h, 3h それぞれ温置して形成したアミロイド線維の約 600MPa までの高压 FT-IR 測定により、アミロイド線維会合体は 550MPa の加圧により、ほとんど消滅した。

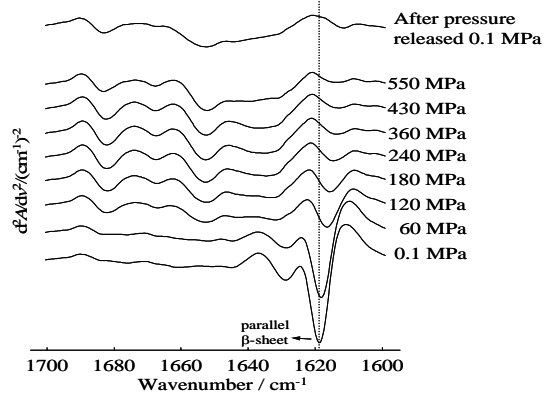


図 2. 各圧力下における 0.3 時間温置した牛インシュリンアミロイド線維のアミド I/I' 領域の二次微分赤外吸収スペクトル (25 °C)

さらに温置時間を長くした 6h, 12h, 72h のアミロイド線維会合体への圧力効果では、平行型β-シートに帰属されるピークは高端数側にシフトするが、スペクトル強度には大きな変化みられない。また、1100MPa の高压下から 0.1MPa (1 気圧) まで圧力もどすと、平行型β-シートのピークは元のピーク位置まで可逆的にもどった。

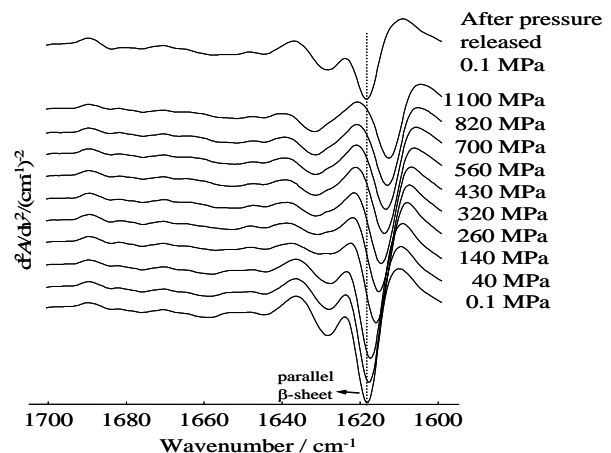


図 3. 各圧力下における 72 時間温置した牛インシュリンアミロイド線維のアミド I/I' 領域の二次微分赤外吸収スペクトル

(3) 牛インシュリンの温度・圧力可変NMR測定

牛インシュリンについて 20~45 (0.1 MPa)、70~3020bar (2.5 , 1bar = 0.1MPa) の範囲で 1 次元NMR測定を行った。明確に分離、帰属されている信号について化学シフト値の温度、圧力依存性を調べた。

図 4 より温度上昇に伴い C11NH(A-chain) など複数のアミド水素で顕著な高磁場シフトが観測された。全ての化学シフト変化は可逆的变化である。一般にアミド水素の高磁場シフトは水素結合距離の増加を意味し、蛋白質内で水素結合を形成しているアミド水素についての化学シフト値の温度依存性は平均値で -0.0045ppm/K と見積もられている。a-f のいずれのアミド水素についても -0.0045ppm/K より大きな値を示した。モノマー状態のインシュリンのNMR構造解析はモノマー化変異体(DKP-insulin)を用いて解析されており、酸性条件下で 2.5 状態ではヘキサマーでみられる天然構造に類似の立体構造を形成している。一方、酸性条件下 6.0 では、多くの遠距離相関(NOE)が失われ、立体構造のパッキングは減弱した変性中間体に転移することが知られている。2.0 ~ 4.5 で観測された化学シフト変化は、熱揺らぎに伴う水素結合距離の平均的な膨張のみならず、このような変性中間体への構造転移の寄与を含む可能性がある。

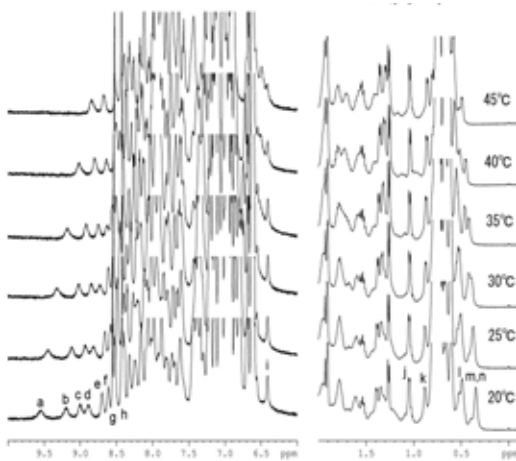


図 4 . 各温度における牛インシュリンの 1 次元 NMR (0.1MPa)

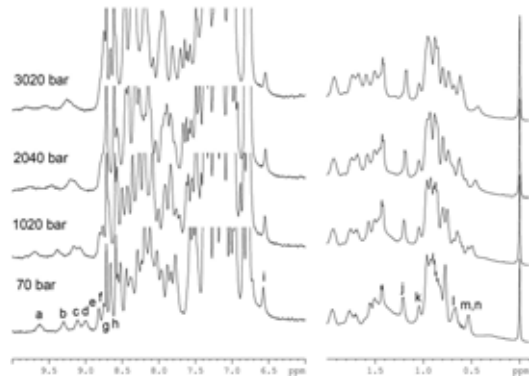


図 5 . 各圧力における牛インシュリンの 1 次元 NMR (25)

図 5 から圧力増加に伴い、a-d の 4 つのアミド水素で顕著な低磁場シフトが観測された。それらは 2040bar までは直線的なシフト変化であることから線形的な力学応答と考えられる。低磁場シフトは水素結合距離の短縮を意味することから、加圧により B 鎖の一部で圧縮が生じたと考えられる。また分子内部にある B 鎖 L15 メチル基でも大きな変化が観測されており、A 鎖に比べ B 鎖で圧力効果が大きいことが分かった。上述のような線形的な力学応答は、統計熱力学的には分子の体積揺らぎと比例している。圧縮率と体積揺らぎの相関関係を局所的な圧力応答にも適用できるとすれば、B 鎖の方が体積揺らぎが大きいと考えて良い。また 2040bar 以上では、a-d のアミド水素ピークが顕著に広幅化しており、周辺環境の多様性や部分的な水和が促進されたと考えられる。化学シフト変化も低圧に比べ高圧でやや非線形性が見られることから、異なる状態への状態転移(熱力学応答)が生じた可能性がある。しかしながら、観測された信号が僅かであるため多次元 NMR による研究展開が必要である。

(4) ヒトインシュリンの 2 次元高圧 NMR 測定

30bar、500bar、1020bar にて $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY 測定を行った。高圧 NMR ガラスセルを用いた本測定条件 (t_1 2024 \times t_2 256 データポイント、積算 360 回) での 1 スペクトルの測定時間は 38 時間であり、分子凝集の経時的な変化を考慮するとこれ以上の信号/ノイズ比での測定は困難と考えた。高圧 NMR ガラスセル (内径 1) を用いた本実験では感度不足のため限られた信号しか捉える事が出来なかった。加圧とともにアミド水素の多くの信号が低磁場シフトした。1000bar の測定時には信号強度の減弱が顕著に生じ信号/ノイズ比が著しく低下していたためそれ以上の加圧は行わなかった。また測定終了時には高

圧NMRガラスセル内に白濁が生じていた。各測定に38時間を要するため経時的に不可逆的な凝集反応が生じたと解釈できる。

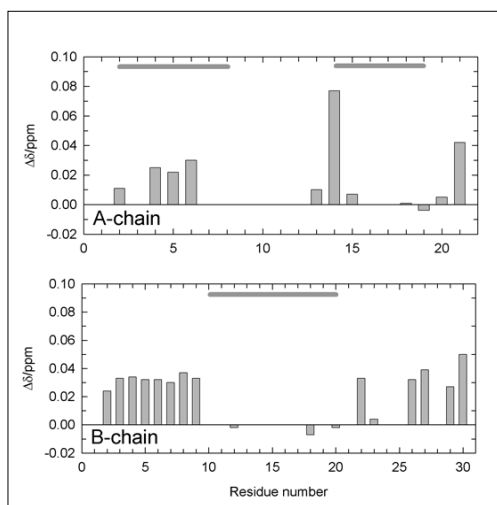


図 6. ヒトインシュリンのアミドプロトンの化学シフト

図 6 は立体構造への変化量マップを示す。A鎖では 3-4, 14, 21 番で大きな低磁場シフトを示し、B鎖では、2-9, 22, 26, 27, 29, 30 で大きな低磁場シフトが観測された。これらの低磁場シフトは、アミド水素とカルボニルとの水素結合、アミド水素と水の水素結合の加圧による圧縮と考えられる。B鎖のヘリックス内では僅かに高磁場シフトが観測されており、水素結合の伸長と考えられる。500bar 程度の低圧領域では一次元NMR測定でも線形的な化学シフト変化を示す圧力領域である。これらの線形圧力応答の大きな部分は、上述のような統計熱力学の解釈を当てはめると体積揺らぎの大きい部分と考えられる。

大きな変化が生じたA鎖のヘリックス1とB鎖のN、C末ストランドは近距離に位置するため協同した構造変化、体積揺らぎが生じていると考えられる。A鎖C7とB鎖C7はSS結合を形成しており、A鎖ヘリックス1とB鎖N、C末ストランドは立体構造上近接している。またA鎖C20とB鎖C19もSS結合を形成しており、A鎖21番とB鎖22番は近接している。化学シフト変化が大きかった領域の多くはSS結合周辺に位置しており、加圧によりA鎖とB鎖の相対配向が変化しSS結合部位で磁場環境が大きく変化したと考えられる。またA鎖Y14のNHは、これらSS結合領域からは離れるが顕著な低磁場シフトを示した。Y14はA-B鎖の2か所のSS結合の中間領域にあり2点での大きな構造変化の蝶番の役割になっていると考えられる。また高圧蛍光測定では、500~1000barでもチロシン蛍光強度の顕著な減少

が観測されており、高圧NMR測定から示唆される構造変化に対応するものと考えられる。酸性条件下ではA鎖とB鎖の相互作用は減弱していることがNMR構造解析により明らかにされており、本実験条件pH2.4、25でもA鎖とB鎖の配向は天然状態に比べ弱い状態と考えて良い。高圧力下では、SS結合により安定性を保っていた部分、すなわちA鎖のヘリックス1とB鎖のN、C末ストランド領域でも構造変化が生じていることが分かった。

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 5 件)

Y. Taniguchi, A. Okuno, M. Kato: Pressure effects on the structure, kinetic, and thermodynamic properties of heat-induced aggregation of protein studied by FTIR spectroscopy: *J. Physics: Conference Series*, 査読有、**215**、2010、12156-12159

R. Maeda, Y. Taniguchi, N. Takeda, A. Ado, High pressure FT-IR spectroscopic study on the secondary structure changes in insulin amyloid and aggregates, *High Pressure Research*, 査読有、**29**, 2009, 676-679

T. Imai, Y. Hisadomi, S. Sawamura, Y. Taniguchi, Uncovering the physical origin of the difference between aliphatic chain and aromatic ring in the "hydrophobic" effect on partial molar volume, *J. Chem. Phys.*, 査読有、**128**, 2008, 44502-1-6

T. Takekiyo, Y. Yoshimura, A. Okuno, A. Shimizu, M. Kato, Y. Taniguchi, Pressure-induced helix-coil transition of poly-L-glutamic acid in water, *J. Physics Conference Series*, 査読有、**121** 2008, 42003-1-5

[学会発表](計 6 件)

R. Kitahara, A. Tanji, S. Kitazawa, Y. Taniguchi, High Pressure NMR reveals a locally disordered conformation for insulin, Pacificchem 2010, 2010年12月19日、ハワイ(米国)

R. Kitahara, T. Hirano, M. Yagi, K. Hata, Y. Taniguchi, K. Akasaka, K. Kato, Conformational fluctuation of Lys48-linked diubiquitin characterized by high pressure NMR spectroscopy, 第

48回日本生物物理学会年会、2010年9月21日、東北大学（宮城）

R. Kitahara, T. Hirano, M. Yagi, K. Hata, Y. Taniguchi, K. Akasaka, K. Kato, High-pressure NMR characterizes conformational fluctuation Lys48-linked diubiquitin, 24th International Conference on Magnetic Resonance Biological Systems, 2010年8月23日、ケアンズ（オーストラリア）

北原亮、北沢創一郎、坂田絵理、平野貴志、矢木内海真穂、谷口吉弘、水島恒裕、赤坂一之、加藤晃一、高圧NMR法ニヨルコピキチンの高エネルギー構造に基づく構造機能相関研究、第10回日本蛋白質科学年会、2010年6月18日、札幌コンフェレンスセンター（北海道）

Y. Taniguchi, N. Takeda, K. Ado R. Maeda, High pressure FT-IR spectroscopic study on the secondary structural changes in insulin amyloid fibril and aggregate, XLVIIth EHPRG (European High Pressure Research Group) Conference, 2009年9月8日、パリ（フランス）

Y. Taniguchi, A. Okuno, R. Yokoyama, M. Kato, The secondary structure of pressure- and heat-induced protein aggregates and amyloid fibrils studied by high pressure FTIR spectroscopy, 5th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2008年9月18日、Scripps Institution of Oceanography, サンディエゴ（米国）

なし（ ）
研究者番号：

〔図書〕（計 1 件）

近藤和生・上野正勝・芝田隼次・木村隆良・

谷口吉弘、朝倉書店、物理化学[第2版]、2011、165

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 吉弘（TANIGUCHI YOSHIHIRO）

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70066702

(2)研究分担者

なし（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者