

平成 22 年 6 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770122  
 研究課題名（和文）重水素交換によるアミロイド核依存性伸長反応中間体の構造解析  
 研究課題名（英文）Structural investigation of the fibrillation intermediate of  $\beta_2$ -microglobulin by H/D exchange-NMR

研究代表者  
 茶谷 絵理（CHATANI ERI）  
 立命館大学・薬学部・助教  
 研究者番号：00432493

研究成果の概要（和文）：アミロイド線維は、蛋白質のミスフォールディングによって形成される超分子重合体であり、数多くの変性疾患に関わることから注目を集めている。中でも、アミロイド線維が自らの末端構造を鋳型としてモノマー体が順次重合し、線維構造を複製する「核依存性伸長反応」が疾病の感染および伝播の分子基盤として重要視されているが、詳細な機構はまったく明らかになっていない。そこで、本研究では、トリプトファン蛍光および重水素交換-NMRを用いて、伸長過程に經由する中間体構造を捉え、構造特徴の詳細な解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Protein misfolding occasionally leads to the formation of supramolecular assemblies known as amyloid fibrils, the deposition of which is associated with over 30 degenerative diseases. One of the most unique and essential properties of amyloid fibrils is their template-dependent growth, which underlies the propagation of pathology of amyloidoses. We have investigated a monomer-fibril complex of  $\beta_2$ -microglobulin formed transiently during the fibril growth by using Trp fluorescence and hydrogen/deuterium (H/D) exchange-NMR methods.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物物理学

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、フォールディング、ミスフォールディング、アミロイド線維、水素 - 重水素交換、NMR、中間体構造、蛍光

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイド線維は、タンパク質の誤った折りたたみによって形成される立体構造であるが、数々の深刻な疾病に関わることから、その形成原理が解明すべき重要な課題とされ

ている。特に、アミロイド線維は、自らの末端構造を鋳型としてモノマー体が順次結合し、成長してゆくことによって、新たにアミロイド構造を複製し、疾病の伝播を引き起こす性質をもつことが知られている。この反応様式を「核依存性伸長」というが、アミロイド構造

がどのように線維末端を認識し、自己の構造を複製してゆくのかの分子機構はまったく明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

上述の線維複製機構を明らかにするには、アミロイド線維の伸長過程で経由する速度論的中間体を捉え観察することが大変重要である。そこで、本研究では、核依存性伸長反応中に経由する中間体構造を捉え特性を明らかにしようとした(図1)。

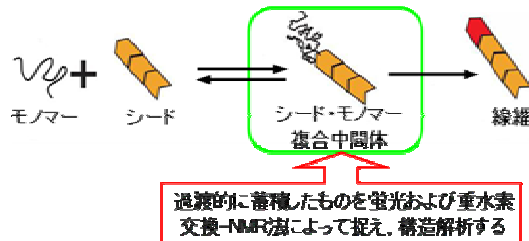


図1 核依存性伸長のスキームと本研究の目的

核依存性伸長反応は、シード(アミロイド線維断片)とモノマーの2分子反応であることを考えると、図1のように、核線維の末端にモノマー分子が結合した中間体を経由することが予想される。アミロイド線維の伸長過程に対する中間体の構造解析例は、現在のところ一例も存在していない。今回、アミロイド線維中間体の重水素交換パターンを解析することによって、アミロイド形成機構の理解につながる具体的な構造イメージを明らかにしようとした。

## 3. 研究の方法

本研究では、透析アミロイドーシスの原因タンパク質である $\beta_2$ ミクログロブリンのアミロイド線維における核依存性伸長反応に着目した。これまで、 $\beta_2$ ミクログロブリンのアミロイド線維の核依存性伸長過程では、中間体の存在は報告されていなかった。しかし、従来の伸長反応条件は、モノマー溶液にごく少量のシードを添加する方法であり、解析条件が限られている。図1のスキームにおいて、もし、過剰量のシードをモノマーに添加することができれば、反応開始時にモノマーとして添加したタンパク質が全てシード末端に結合し、シード・モノマー複合中間体を過渡的に蓄積できることが予想される。

上記の考えに基づき、まず蛍光スペクトルによる速度論的解析によってアミロイド線維形成中間体が蓄積の様子を捉えることとした。シード濃度を少しずつ変えながら伸長反応速度を解析し、過渡的な中間体の蓄積を捉えることができるかどうかを調べ、実際に高シード濃度において中間体の蓄積を確認することができた(後述)。その後、トリプトファ

ンを1残基のみ持つ数種類の変異体について同様の解析を行い、中間体構造の特徴を解明した。また、高シード濃度までのアミロイド線維伸長の定量解析を実施するには、サイズが揃った微細かつ末端数の多い高活性アミロイド粒子をシードとして添加することが重要である。そこで、超音波処理によって、微細で均質な線維を作製する方法の開発も行った。

さらに、核依存性伸長反応の最中に重水素交換反応を行い、中間体構造の重水素交換プロファイルを構築した(図2)。重水素交換の方法としては以下の2通りを用いた。

**競合的重水素交換：** 重水中のシードに軽水中の同位体標識モノマーを小容量添加することによって、伸長反応と重水素交換反応を競合的に開始した。アミロイド線維の巨大な分子サイズのためにモノマーに対してシードが過剰な場合には、モノマーとアミロイド線維の2状態反応では説明できない重水素交換パターンが現れてくる筈であるので、このパターンから中間体構造の構造特性を評価した。

**クエンチトフロー重水素パルス標識：** 反応条件である弱酸性に比べて、弱塩基性では5桁以上はやい時間スケールでアミドプロトンが交換することを利用してpHジャンプによる重水素パルス標識を試みた。中間体の蓄積量が最大となる時点で、瞬時に数十ミリ秒程度のパルス標識を入れ、中間体の重水素交換パターンを直接的に観察し、中間体における構造形成の程度および領域を詳細に評価した。

重水素交換後のサンプルは溶液NMRで直接的に観測することは困難であるが、近年、星野らによって、反応後の余剰の交換を抑えながらモノマー状態まで解離させて測定する方法が考案されて以来(Hoshino *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* (2003))、アミロイド線維構造の解析において非常に有効な手法となっている。今回の解析にも本手法を導入し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR測定を行った。

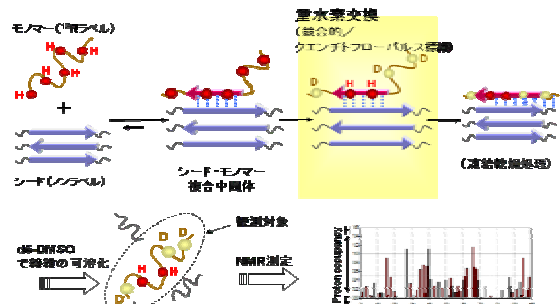


図2. 重水素交換実験の概略

#### 4. 研究成果

##### (1) 超音波処理による微細で均質なアミロイド粒子の作製方法の確立

アミロイド線維に対する超音波効果がよく知られているのは破碎効果である。線維核を作製する方法として広く利用されているが、近年、大橋らによって超音波によってアミロイド線維形成も同時に誘導されることが明らかにされた(Ohhashi *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2005))。面白いことに、超音波照射下でアミロイド線維を形成すると、先述の破碎効果が加わり、得られる線維サイズは小さくなる。この結果を踏まえ、超音波によるアミロイド線維の「形成誘導」と「破碎」をうまく組み合わせると、互いに競合し、最終的に平衡状態としてある一定のサイズに収束するのではないかと考え、 $\beta_2$ ミクログロブリン水溶液に1分間の超音波パルスを経り、9分から6秒の間のさまざまな時間間隔で繰り返し与え、形成されたアミロイド線維のサイズ分布を超速心分析(沈降速度法)により調べた。

その結果、いずれの条件でも超音波によってアミロイド線維の形成が誘導された(図3)。パルス間隔を短くするにつれ、より小さな線維が形成され、さらに、一旦長い線維が形成されてから小さくなるオーバーシュートの傾向が弱まり、より直接的に微細サイズに収束するようになった。得られた線維は、クロス $\beta$ 構造も伝播能も保持していた。微細均質線維は、沈降平衡法による分子量測定も可能にし、図3のアミロイド線維の場合、1線維あたりの分子量は約170万(約140量体)であった。

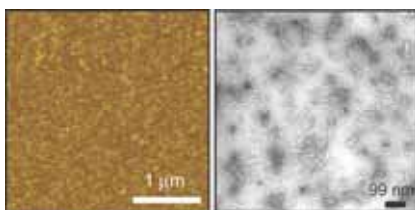


図3 超音波により形成した $\beta_2$ ミクログロブリンの微細均質線維のAFM画像(左)と電子顕微鏡画像(右)

以上のように、超音波によって微細で均質なアミロイド線維が生成することがわかった。超音波照射条件では、図4の赤線のように、核形成相の遷移状態自由エネルギー障壁が下がり、且つ、大きなサイズ側の自由エネルギーが上昇することで自由エネルギー極小が形成され、サイズ収束がおきると考えられる。以降、超音波によって得られた、末端数を多く持った微細な高活性アミロイド線維を用

いて、以降の中間体捕捉を試みた。

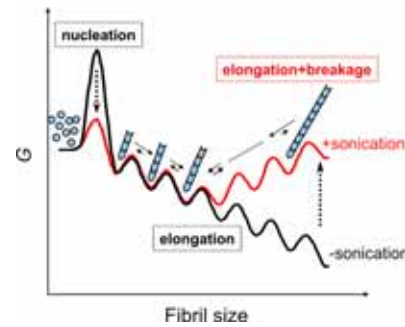


図4 微細均質アミロイド線維の形成機構を説明するエネルギー地形図

##### (2) トリプトファン蛍光をもちいた伸長過程の線維・モノマー複合中間体の観察

$\beta_2$ ミクログロブリンは、トリプトファンを60と95位に2残基持つ。まず、これらのトリプトファン残基をすべてフェニルアラニンに置換した無蛍光性の変異体で線維を形成し、超音波による処理を行うことによってシードを作製した。これに少量の野生型タンパク質を添加することによって、反応開始時点でモノマーとして添加したタンパク質由来の蛍光のみを観測することが可能になり、これまで困難であった高シード濃度条件でのトリプトファン蛍光スペクトル変化の追跡が可能となった(図5A-C)。

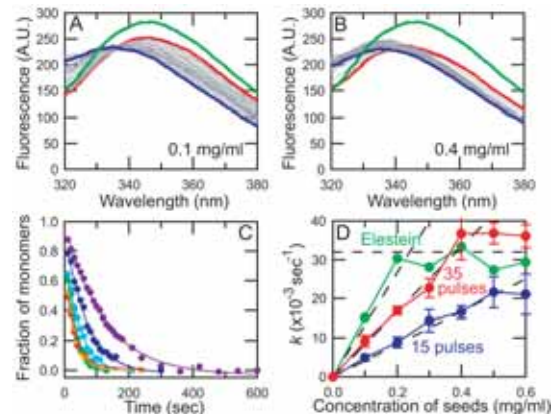


図5 (A,B)アミロイド線維伸長反応にともなうトリプトファン蛍光スペクトル変化(A) 0.1 mg/ml, (B) 0.4 mg/ml); (C) 蛍光強度をもちいた伸長反応プロット; (D) 速度定数のシード濃度依存性

従来解析されてきた低シード濃度の条件下では、みかけの伸長速度定数はシード濃度に比例し、偽一次反応様式で進行することが報告されているのみで、中間体は見出されていない。ところが、一定のモノマー濃度に対して、シードの濃度比を変えていきながら

反応を観察した結果、高シード濃度において伸長速度が飽和する現象が見られた(図5D)。これは、いわば酵素反応の前定常状態に相当するような速度論的挙動が見られたことを意味し、過渡的に中間体が蓄積したことになる。興味深いことに、速度定数が一定になるのはシードとモノマーの濃度比が約 10 程度であった。すなわち、線維の末端には、モノマーが 1 分子ではなく複数同時に結合しているようであり、アミロイド線維形成に関わる新たな構造イメージを捉えたと考えられる。

さらにトリプトファン残基を 60 位あるいは 95 位のどちらか一方のみにもつ変異体をモノマーとして用いて同様の解析を行い、中間体における蛍光スペクトルを解析したところ、両残基とも溶媒に露出していることが判明し、中間体構造の構造形成レベルは低いことが示唆された。

### (3) 重水素交換-NMR によるシード・モノマー複合中間体の構造解析

さらに、中間体構造について残基レベルの詳細な構造情報を得るために、水素-重水素(H/D)交換-NMR法による解析を試みた。まず、重水中のシードに軽水中の同位体標識モノマーを小容量添加することにより、伸長反応と重水素交換反応を同時に開始した。その後、一定時間放置し、伸長反応過程に起きた構造変化の累積的な情報を記録した(図6)。さまざまなシード濃度で解析をおこなった結果、低シード濃度では、モノマーの重水素交換とアミロイド線維の重水素交換の加算的なパターンが得られる(図6B)。高シード濃度では、いわば酵素反応における前定常状態に相当する状態に至り、2 状態反応では説明できない重水素交換パターンが現れることが判明した(図6C)。

このことは、速度論的な中間体が一時的に蓄積したことを意味するものであり、蛍光実験と同様に速度論的中间体を確認することができた。しかしながら、反応条件の酸性では、伸長速度に対して重水素交換速度が十分に速くないため、中間体自体の詳細な水素占有パターンの抽出までには至ることができなかった。

そこで、中間体が蓄積した時点でクエンチトフロー重水素パルス標識を適用することにより、中間体の重水素交換パターンを解析することにした。現在、パルス標識の諸条件をセッティングした後、実際の測定を行っている最中である。これまでの解析結果より、モノマー構造にかなり近い一方でありほ

どけた領域をもつ様子が分かりつつあり、間もなく中間体特有の構造特徴を明らかにできると考えている。最終的に、中間体における構造形成の程度および領域が具体的に明らかとなることが期待される。

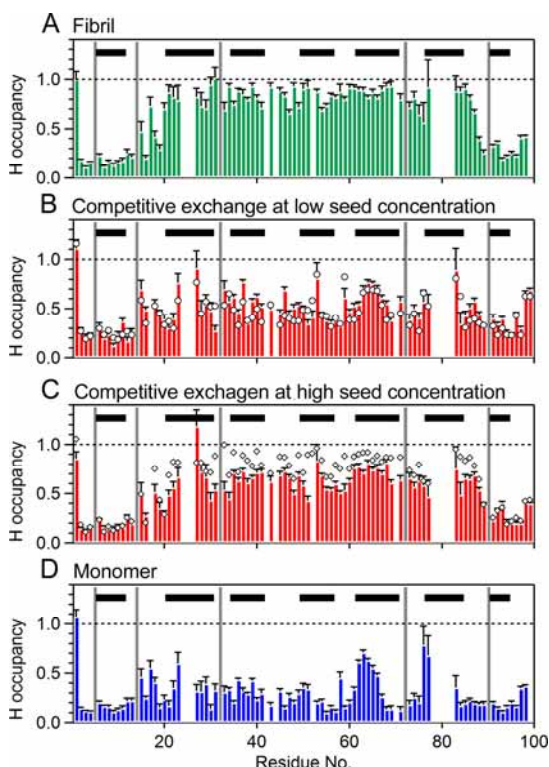


図6 アミロイド線維(A)、重水素交換反応と競合した伸長反応(B,C)と酸変性モノマー(D)の水素占有率。低いシード濃度(B)では線維とモノマーの二状態モデル( )で説明できるが、高シード濃度(C)ではずれが見られた

### 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)

1. Tsubasa Yamamoto, Eri Chatani, and Minoru Kato  
"FTIR observation of compression recovery of the secondary structure of heat denatured ribonuclease A in sucrose solution"  
*J. Phys. Conf. Ser.* **215**, 012155 (2010)
2. Eri Chatani, Young-Ho Lee, Hisashi Yagi, Yuichi Yoshimura, Hironobu Naiki, and Yuji Goto  
"Ultrasonication-dependent production and breakdown lead to minimum-sized amyloid fibrils"  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 11119-11124 (2009)
3. Young-Ho Lee, Eri Chatani, Kenji Sasahara, Hironobu Naiki, and Yuji Goto  
"A comprehensive model for packing and

hydration for amyloid fibrils of  $\beta_2$ -microglobulin"  
*J. Biol. Chem.*, **284**, 2169-2175 (2009)

4. Yuji Goto, Hisashi Yagi, Keiichi Yamaguchi,  
Eri Chatani, and Tadato Ban  
"Structure, formation and propagation of amyloid  
fibrils"

*Curr. Pharm. Des.*, **14**, 3205-3218 (2008)

5. Michiko Sakata<sup>†</sup>, Eri Chatani<sup>†</sup>, Atsushi Kameda,  
Kazumasa Sakurai, Hironobu Naiki, and Yuji  
Goto (<sup>†</sup>equally contributed)

"Kinetic coupling of folding and prolyl  
isomerisation of  $\beta_2$ -microglobulin studied by  
mutational analysis"

*J. Mol. Biol.*, **382**, 1242-1255 (2008)

[学会発表](計 12 件)

1. 「 $\beta_2$ ミクログロブリンが形成するアミロイ  
ド線維の溶液NMR による直接観察」

吉村 優一、櫻井 一正、茶谷 絵理、李 映  
昊、池上 貴久、亀田 篤司、内木 宏延、後藤  
祐児

第 47 回生物物理学会、2009 年 10-11 月、徳  
島

2. 「スクロース溶液内における RNase A の  $\beta$   
- シートの体積挙動」

山本 翼、茶谷 絵理、加藤 稔

第 47 回生物物理学会、2009 年 10-11 月、徳  
島

3. "Compression recovery of  $\beta$ -Sheets of heat  
denaturated RNase A in sucrose solution"

Tsubasa Yamamoto, Eri Chatani, and Minoru Kato  
Joint AIRAPT-22 & HPCJ-50, 2009 年 7 月、東  
京

4. "Effect of pressure on helices of peptides and  
proteins"

Minoru Kato, Hiroshi Imamura, Yuzu Ikeuchi,  
Tsubasa Yamamoto, Eri Chatani, Yasuhiro Isogai  
Joint AIRAPT-22 & HPCJ-50, 2009 年 7 月、東  
京

5. "Ultrasonication-dependent production and  
breakdown lead to monodispersed and  
minimum-sized amyloid fibrils"

Eri Chatani, Young-Ho Lee, Hisashi Yagi, Yuichi  
Yoshimura, Hironobu Naiki, and Yuji Goto

The 23rd Annual Symposium of The Protein  
Society, 2009 年 7 月、米国

6. 「 $\beta_2$ ミクログロブリンが形成するアミロイ  
ド線維の溶液 NMR による運動性の解析」

吉村 優一、櫻井 一正、茶谷 絵理、亀田 篤  
司、池上 貴久、内木 宏延、後藤 祐児

第 9 回日本蛋白質科学会年会、2009 年 5 月、  
熊本

分散アミロイド線維作製法の確立」

茶谷 絵理、李 映昊、八木 寿梓、吉村 優  
一、内木 宏延、後藤 祐児

第 9 回日本蛋白質科学会年会若手奨励賞シ  
ンポジウム、2009 年 5 月、熊本

8. "Ultrasonication establishes an equilibrium  
between production and breakdown leading to  
minimum-sized amyloid fibrils"

Eri Chatani, Young-Ho Lee, Hisashi Yagi,  
Hironobu Naiki, and Yuji Goto

International Bunsen Discussion Meeting, 2009  
年 2 月、ドイツ

9. "Monitoring the fibrillation intermediate of  
 $\beta_2$ -microglobulin by Trp fluorescence and H/D  
exchange-NMR"

Eri Chatani, Reina Onishi, Tsuyoshi Konuma,  
Kazumasa Sakurai, Hironobu Naiki, and Yuji  
Goto

日本生物物理学会第 46 回年会、2008 年 12 月、  
福岡

10. 「NMR でアミロイド形成中間体を捉え  
る：H/D 交換法による構造解析」

茶谷 絵理、小沼 剛、大西 玲奈、亀田 篤  
司、櫻井 一正、内木 宏延、後藤 祐児

立命館大学工学研究所シンポジウム「タン  
パク質 NMR 研究の最前線」2008 年 11 月、  
滋賀

11. 「圧力応答から考えるアミロイド線維の  
パッキング特性」

茶谷 絵理、内木 宏延、後藤 祐児  
高圧討論会、2008 年 11 月、兵庫

12. 「アミロイド線維の形成反応中間体の構造  
解析」

茶谷 絵理、小沼 剛、大西 玲奈、櫻井  
一正、内木 宏延、後藤 祐児

日本ヒトプロテオーム機構 第 6 回大会、2008  
年 7 月、大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

茶谷 絵理 (CHATANI ERI)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：00432493