

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370044

研究課題名（和文）一線維リアルタイム観察に基づくアミロイド線維形成機構の解明

研究課題名（英文）Understanding the mechanism of amyloid fibrillation on the basis of single fibril and real-time observation

研究代表者

後藤 祐児（GOTO YUJI）

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：40153770

研究成果の概要（和文）：いくつかのアミロイド蛋白質を材料として、全反射蛍光顕微鏡による一線維・リアルタイム解析を行い、アミロイド線維の形成機構を探った。また、重水素交換-溶液 NMR 解析によって、 β 2ミクログロブリンの線維形成中間体の解析を進めた。マイクロプレートリーダーと超音波処理と組み合わせたアミロイドアッセイ法を開発して、アミロイド形成反応を解析した。以上より、アミロイドは、過飽和条件下でペプチドや蛋白質が析出することによって形成する固体構造であること、過飽和が全体の反応を支配する重要な因子であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We studied the mechanism of amyloid fibrillation with a unique technique in which total internal reflection fluorescence microscopy is combined with amyloid-specific ThT. To gain insights into the possible kinetic intermediates, we performed hydrogen/deuterium exchange of amide protons during fibril elongation. Combining the use of ultrasonication and a microplate reader, we propose an efficient approach to studying the potential of proteins to form amyloid fibrils. Taken all results together, we propose that the amyloid fibrils formed via a nucleation-dependent mechanism in a supersaturated solution, analogous to crystallization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：変性とフォールディング、アミロイド線維、蛋白質の凝集、蛍光顕微鏡、超音波

1. 研究開始当初の背景

アミロイド線維は、蛋白質がミスフォールディング・重合して形成する細線維であり、その沈着を伴う約20種類の疾患はアミロイドーシスと呼ばれる。プリオン病、アルツハイマー病、透析アミロイドーシスなど、社会問題となっている深刻な疾病が含まれる。個々のアミロイドーシスに固有の原因蛋白

質が見出されているが、それらは、本来、重要な生命機能を果たすものが多い。他方、病気とは関係しない蛋白質もアミロイド線維を形成することが明らかとなり、「アミロイド線維は蛋白質のとる基本構造」という考えが定着しつつある。

研究代表者は、長期透析患者に多発する透析アミロイドーシスをモデル疾患として、そ

の原因となる $\beta 2$ ミクログロブリンの形成するアミロイド線維の形成機構や線維の構造と物性を研究した。また、アルツハイマー病に関わるアミロイド β についても研究を展開した。この中で、重水素交換を用いた線維の構造物性の解析、全反射蛍光顕微鏡を用いた一線維・リアルタイム観察法の開発、さらには、固体 NMR を用いた線維の原子構造の解明(業績 14)などを通じて、世界的なアミロイド研究進展の推進力を担った。

2. 研究の目的

これまでの一連の研究の中でも特に研究領域に対するインパクトが強かったのは、アミロイド線維の一線維、リアルタイム画像である。線維の伸長画像をみていると、線維形成機構の解明が、手の届くところまでできていることを実感する。本研究では、正にこれを達成することを目指す。

(1) 本研究の第一の目標は、線維形成の実態を、蛋白質の原子構造レベル、リアルタイムで明らかにすることである。 $\beta 2$ ミクログロブリンとアミロイド β を用いて、全反射蛍光顕微鏡を用いた一線維・リアルタイム解析を進める。並行して、「重水素交換-NMR 解析」により、線維形成中間体の立体構造を残基・原子レベルで解析する。

(2) 次に、アミロイド線維と天然構造と比較して、それらの構造物性を研究する。これにより、線維形成やその伝播機構を、蛋白質のフォールディングと対比して明らかにする。

(3) 更に、アミロイド線維の特異的な構造物性を検出・活用する手法を開発し、ナノ材料としての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 全反射蛍光顕微鏡によるアミロイド線維形成反応の一線維・リアルタイム観察

全反射蛍光顕微鏡を用いて、表面や環境に依存したアミロイド超分子構造形成の分子機構を研究する。アミロイド線維形成は、脂質膜やコラーゲンなどの生体内因子の影響を大きく受けることが示唆されている。これらの効果を全反射蛍光顕微鏡によって観察し、その仕組みを探る。

線維形成の直接観察をさらに進める。光刺激によって、アミロイド形成が抑制、あるいは爆発的に加速されることを見出した。全く予想しなかった現象であり、これを手がかりとして、アミロイド線維形成機構の理解を飛躍的に進めることが期待できる。さらには、アミロイドーシスの治療法開発に進展する可能性があり、徹底的な解析を進める。

また、注目するのは、アミロイド中間体の直接観察である。アミロイド原因蛋白質に特異的蛍光色素を導入する。「蛍光色素の自己消光」、「チオフラビン T との蛍光エネルギー移動」を利用して、線維の伸長末端のみが検出できるようにする。これにより、線維伸長の方向性、中間体の寿命などの未知の問題を明らかにする。

(2) 重水素交換-溶液 NMR 解析は我々が開発した方法であり、世界的に広く普及してきているが、これまでは全て出来上がった線維の構造解析に使用されてきた。本研究では新たにこれを線維形成中間体の解析に適用する。アミロイドシードにモノマーを加えてシード依存伸長反応を開始させるが、この際、超音波破碎によって微細均質化したシードを使用する。これによりシード濃度を高めて、中間体が最大量で蓄積する条件を選択する。直ちに重水素交換を行うことにより、中間体を重水素交換する。中間体を選択的に観測するために、 ^{15}N 標識したモノマーと、 ^{15}N 標識していないシードを用いる。本実験により、リアルタイムで伸長していくアミロイド線維の先端で起きている構造変化の実体を、残基レベルで明らかにすることが期待できる。

(3) 溶液 NMR を用いた微細均質アミロイド線維の直接測定

既に述べたようにアミロイド線維は高分子量の重合体であるために、直接溶液 NMR を測定することは困難である。しかしながら、分子量を 200 万程度に抑えることができれば、溶液 NMR を直接適用することが可能と期待される。我々は、超音波処理によって、比較的分子量でかつ均質なアミロイド線維を調製できることを見出した。このようなアミロイド線維断片は分析用超遠心機による解析が可能であり、 $\beta 2$ ミクログロブリンの微細線維については分子量約 200~300 万程度と推定している。これを蛋白質研究所の 800 MHz 溶液 NMR 装置によって直接解析する。アミロイド線維は小さな蛋白質が同じ構造に重合したものであるため、観測されるピークの数は多くはないと予想される。

4. 研究成果

いくつかのアミロイド原性蛋白質、ペプチドを材料として、全反射蛍光顕微鏡による一線維・リアルタイム解析を行い、アミロイド超分子構造の形成機構を探った。これと並行して、溶液 NMR と重水素交換反応を組み合わせた構造解析を行い、アミロイド中間体の立体構造を解析した。その結果、溶解度と過飽和が、アミロイド形成の考える上で特に重要な因子であることを提唱した。なお、本研究で用いた蛋白質は、透析アミロイドーシスの

原因となる β 2ミクログロブリン、アルツハイマー病の原因となるアミロイド β 、II型糖尿病の原因となるIslet Amyloid Polypeptide (IAPP)、角膜変性症の原因となるケラトエピセリンの断片ペプチドなどである。

(1) 全反射蛍光顕微鏡によるアミロイド線維形成反応の一線維・リアルタイム観察

全反射蛍光顕微鏡を用いて、アミロイド超分子構造形成の分子機構に関する研究を進めた。特にケラトエピセリンの部分ペプチドを用いて、レーザー光によるアミロイドの損傷の直接観察を進めた。レーザーによるアミロイドの破壊を利用することによって、アミロイドーシスの新たな治療方法を開発できることを示唆した。

また、2種類の蛍光試薬を用いることによって、アミロイド蛋白質が、既存のアミロイド線維の側面に結合した中間体を検出できることを示した。

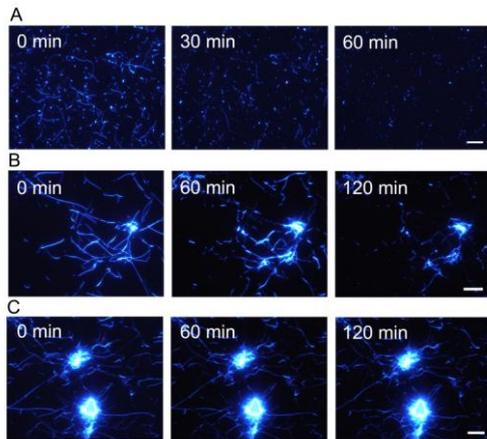


図1. ケラトエピセリンの部分ペプチドの形成したアミロイド線維を用いた、レーザー光による損傷の直接観察。

(2) 溶液 NMR による線維中間体の解析

超音波処理を利用によって分子量 200 万の微細均質アミロイド線維を作製する方法を開発した。特に β 2ミクログロブリンのアミロイド線維に適用して、アミロイド線維の構造と揺らぎの解析をおこなった。その結果、N 末端領域は、アミロイド線維のコア領域に含まれず、壊れた構造をとっていることを明らかにした。

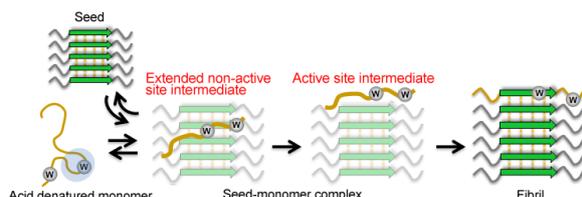


図2. アミロイド線維形成中間体の構造。

重水素交換-溶液 NMR 解析によって、アミロイド線維形成中間体の構造を解析する手法を開発した。これを用いて、 β 2ミクログロブリンの線維形成中間体の解析を進めた。溶液状態では比較的コンパクトな前駆体が、より広がった変性構造を形成することによって、アミロイド線維の側面に結合することを示した。

(3) 超音波によるアミロイド線維形成

マイクロプレートリーダーと超音波処理と組み合わせたアミロイドアッセイ法を開発した。これにより、少量のアミロイド蛋白質を用いて、高速、高感度でアミロイド形成反応を解析できるようになった。 β 2ミクログロブリンのアミロイド線維形成が、超音波の強度と相関することを示した。

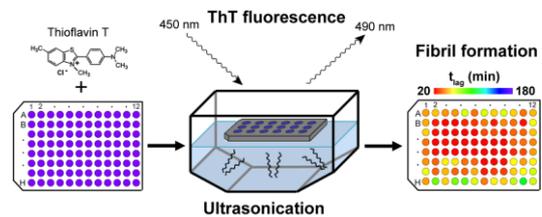


図3. マイクロプレートリーダーと超音波処理と組み合わせたアミロイドアッセイ法の開発。

(4) アミロイド線維形成の統一的原理

アミロイド線維は、過飽和条件下で比較的短いペプチドや蛋白質が析出することによって形成する固体構造であること、また、過飽和が全体の反応を支配する重要な因子であることを提唱した。過飽和は、物理化学的な基本現象である。これに対して、生体では個体・組織・病態によって異なる生物学的因子が存在し、これが過飽和を維持あるいは解消する役割を果たすと考えられる。物理化学的な過飽和現象と生物学的な因子が相互作用することがアミロイドーシス発症を決定していると考えられる。

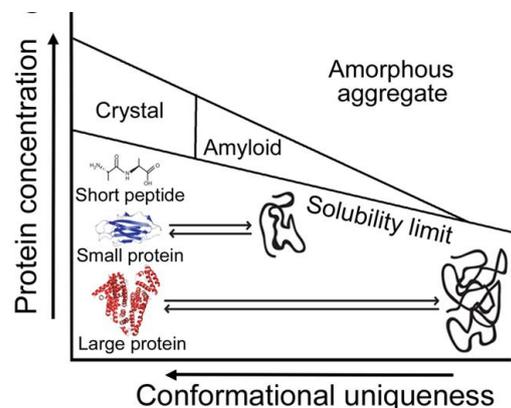


図4. 蛋白質結晶、アミロイド線維、不定形凝集を含む構造状態の相図。構造のユニークさと濃度によって安定な構造状態が変わる。また、過飽和が相転移を支配する。

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 23 件)

1. Ultrasonication-dependent acceleration of amyloid fibril formation. So, M., Yagi, H., Sakurai, K., Ogi, H., Naiki, H. & Goto, Y. *J. Mol. Biol.* **412**, 568-577 (2011). (以下、全て査読有)
2. Hexafluoroisopropanol induces amyloid fibrils of islet amyloid polypeptide by enhancing both hydrophobic and electrostatic interactions. Yanagi, K., Ashizaki, M., Yagi, H., Sakurai, K., Lee, Y. H. & Goto, Y. *J. Biol. Chem.* **286**, 23959-23966 (2011).
3. Destruction of amyloid fibrils of keratoepithelin peptides by laser irradiation coupled with amyloid-specific thioflavin T. Ozawa, D., Kaji, Y., Yagi, H., Sakurai, K., Kawakami, T., Naiki, N. & Goto, Y. *J. Biol. Chem.* **286**, 10856-10863 (2011).
4. Seed-dependent deposition behavior of A β peptides studied with wireless quartz-crystal-microbalance biosensor. Ogi, H., Fukunishi, Y., Yanagida, T., Yagi, H., Goto, Y., Fukushima, M., Uesugi, K., Hirao, M. *Anal. Chem.* **83**, 4982-4988 (2011).
5. A circumventing role for the non-native intermediate in the folding of β -lactoglobulin. Sakurai, K., Fujioka, S., Konuma, T., Yagi, M. & Goto, Y. *Biochemistry* **50**, 6498-6507 (2011).
6. Binding energetics of ferredoxin-NADP+ reductase with ferredoxin and its relation to function. Lee, Y.-H., Ikegami, T., Standley, D. M., Sakurai, K., Hase, T. & Goto, Y. *ChemBio. Chem.* **12**, 2062-2070 (2011).
7. Reversible heat-induced dissociation of β 2-microglobulin amyloid fibrils. Kardos, J., Micsonai, A., Pál-Gábor, H., Petrik, E., Gráf, L., Kovács, J., Lee, Y. H., Naiki, H. & Goto, Y. *Biochemistry* **50**, 3211-3220 (2011).
8. Inhibition of β 2-microglobulin amyloid fibril formation by α 2-macroglobulin. Ozawa, D., Hasegawa, K., Lee, Y. H., Sakurai, K., Yanagi, K., Ookoshi, T., Goto, Y., Naiki, H. *J. Biol. Chem.* **286**, 9668-9676 (2011).
9. Kinetic intermediates of β 2-microglobulin fibril elongation probed by pulse-labeling H/D exchange combined with NMR analysis. Konuma, T., Chatani, E., Yagi, M., Sakurai, K., Ikegami, T., Naiki, H. & Goto, Y. *J. Mol. Biol.* **405**, 851-862 (2011).
10. Laser-induced propagation and destruction of amyloid β fibrils. Yagi, H., Ozawa, D., Sakurai, K., Kawakami, T., Kuyama, H., Nishimura, O., Shimanouchi, T., Kuboi, R., Naiki, H. & Goto, Y. *J. Biol. Chem.* **285**, 19660-19667 (2010).
11. Amyloid fibrils of the constant domain of immunoglobulin light chain. Yamamoto, K., Yagi, H., Lee, Y. H., Kardos, K., Hagihara, Y., Naiki, H. & Goto, Y. *FEBS Lett.* **584**, 3348-3353 (2010).
12. Isolation of short peptide fragments from α -synuclein fibril core identifies a residue important for fibril nucleation: a possible implication for diagnostic applications. Yagi, H., Takeuchi, H., Ogawa, S., Ito, N., Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., Goto, Y. & Kawata, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 2077-2087 (2010).
13. アミロイドーシス発症の分子機構解明、八木寿梓、後藤祐児、メディカルバイオ 7, 30-31 (2010).
14. Direct observation of minimum-sized amyloid fibrils using solution NMR spectroscopy. Yoshimura, Y., Sakurai, K., Lee, Y.-H., Ikegami, T., Chatani, E., Naiki, H. & Goto, Y. *Protein Sci.* **19**, 2347-2355 (2010).
15. Pre-steady state kinetic analysis for the elongation of amyloid fibrils of β 2-microglobulin with tryptophan mutagenesis. Chatani, E., Ohnishi, R., Konuma, T., Sakurai, K., Naiki, N. & Goto, Y. (2010) *J. Mol. Biol.* **400**, 1057-1066.
16. タンパク質のアミロイド形成—過飽和条件で揺らぎが引き起こす晶析現象、後藤祐児、李映昊、メディカルバイオ 10月号別冊 (寺嶋正秀監修) 38-43 (2010).
17. Ultrasonication establishes the equilibrium between production and breakdown leading to the minimum-sized amyloid fibrils. Chatani, E., Lee, Y.-H., Yagi, H., Yoshimura, Y., Naiki, N. & Goto, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 11119-11124 (2009).
18. Thermal response with exothermic effects of β 2-microglobulin amyloid fibrils and fibrillation. Sasahara, K., Yagi, H., Naiki, H. & Goto, Y. *J. Mol. Biol.* **389**, 584-594 (2009).
19. Destruction of amyloid fibrils of a β 2-microglobulin fragment by laser beam irradiation. Ozawa, D., Yagi, H., Ban, T., Kameda, A., Kawakami, T., Naiki, H., & Goto, Y. *J. Biol. Chem.* **284**, 1009-1017 (2009).
20. Branching in amyloid fibril growth. Andersen, C. B., Yagi, H., Manno, M., Martorana, V., Ban, T., Christiansen, G., Otzen, D., Goto, Y. & Rischel, C. *Biophys. J.* **96**, 1529-1536 (2009).
21. NMR-based characterization of a refolding intermediate of β 2-microglobulin labeled amino acid selectively using a wheat germ cell-free system. Kameda, A., Morita, E.-H., Sakurai, K., Naiki, N. & Goto, Y. *Protein Sci.* **18**, 1592-1601 (2009).
22. Structural dynamics and folding of

β -lactoglobulin probed by heteronuclear NMR. Sakurai, K., Konuma, T., Yagi, M. & Goto, Y. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 527-537 (2009).

23. A comprehensive model for packing and hydration for amyloid fibrils of β 2-microglobulin. Lee, Y.-H., Chatani, E., Sasahara, K., Naiki, H. & Goto, Y. *J. Biol. Chem.* 284, 2169-2175 (2009).

[学会発表] (計 20 件)

1. Goto, Y. Toward understanding a unifying principle of protein folding and aggregation. The First Korean Protein Society Symposium. September 23, 2011, Seoul National University, Seoul, Korea.
2. Goto, Y. Toward understanding a unifying principle of protein folding and aggregation. International Symposium of the Protein Society of Thailand, August 31, 2011, Chulabhorn Conference Center, Bangkok, Thailand
3. 後藤祐児、「蛋白質のフォールディングと異常凝集の一般原理の解明を目指して」、関西学院大学・理工学部 50 周年記念講演会、文科省オープン・リサーチセンター成果報告会「ナノマテリアルと生体分子の物理化学」2011 年 10 月 8 日、関西学院大学 (西宮)
4. 後藤祐児、「蛋白質のフォールディングとアミロイド線維形成」、日本物理学会 2011 年周期大会シンポジウム「巨大分子～サブミクロン粒子の自己集積」2011 年 9 月 21 日、富山大学
5. Goto, Y. Amyloid fibril growth visualized by thioflavin T fluorescence and probed by H/D exchange. Gordon Research Conference: Protein Folding Dynamics, January 10-15, 2010, Ventura CA, USA
6. Goto, Y. Amyloid fibril growth visualized by thioflavin T fluorescence and probed by H/D exchange. Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins, July 9-10, 2010, Seoul National University, Seoul, Korea
7. Goto, Y. Visualization of amyloid fibril formation of proteins. 10th KIAS Conference on Protein Structure and Function, September 30-October 2, 2010, Seoul, Korea
8. Goto, Y. Amyloid fibril growth visualized by thioflavin T fluorescence and probed by H/D exchange. International Bunsen Discussion Meeting on Structure of Amyloid Fibrils and Mechanism of Amyloid Formation, February 8-11, 2009, Universität Halle, Halle an der Saale, Germany
9. Goto, Y. Amyloid fibril growth visualized by thioflavin T fluorescence and probed by H/D exchange. The 23rd Symposium of The Protein Society, July 24-29, 2009, Boston, USA
10. Goto, Y. Amyloid fibril growth visualized by

thioflavin T fluorescence and probed by H/D exchange. The 3rd Asian-Pacific Peptide Symposium, Nov. 8-11, 2009, Jeju island, Korea

[図書] (計 1 件)

1. Ban, T. & Goto, Y. (2010) Real-time observation of amyloid- β fibril growth by total internal reflection fluorescence microscopy. in *Protein Misfolding Disease* (eds. Ramirez-Alvarado, M., Kelly, J. & Dobson, C.) (John Wiley & Sons) pp. 699-709.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 祐児 (YUJI GOTO)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：40153770

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

藤原 敏道 (FUJIWARA TOSHIMICHI)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：20242381

茶谷 絵理 (CHATANI ERI)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00432493

内木 宏延 (NAIKI HIRONOBU)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：10227704