

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770169

研究課題名（和文） 新規NMR解析法を用いたアミロイド線維の過渡的中間体の構造解析

研究課題名（英文） Characterization of the transient intermediate of the 2-microglobulin amyloid fibril using solution NMR techniques

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（和文）：本研究の目的は透析アミロイド病の原因蛋白質である β_2 ミクログロブリン（ β_2m ）が病発症時にどのような構造変化をするかを調べることである。そのために本研究では主に核磁気共鳴法（NMR）を用いた。従来の研究から、 β_2m の部分構造状態がアミロイド線維の前駆体だと考えられていた。ところが本計画の結果から、完全変性状態の方が真の前駆体だということが示された。これは他の蛋白質のアミロイド線維形成にも共通であると思われ、より一般的な理解につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify how β_2 -Microglobulin (β_2m), associated with the dialysis-related amyloidosis, changes its conformation when the disease develops by using nuclear magnetic resonance. It has been believed that β_2m forms amyloid fibril through a partially structured state. However, from the present data, we suggested that the partially structured state should be “activated” to be extensively unfolded state, in which the hydrophobic residues are exposed to associate with the seed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：蛋白質、生物物理、自己組織化、アミロイド線維、NMR

1. 研究開始当初の背景

近年、疾病に関連する蛋白質凝集体である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。現在は、アミロイド線維は、天然状態ではなく、部分変性した状態の蛋白質が、線維核に結合することで形成すると考えられている。この3年程の間、終状態のアミロイド線維の構造だけでなく、始状態の部分変性状態の構造も報告されてい

る。

最近、この部分変性状態とアミロイド線維の間に、更に過渡的な末端中間体が存在することが示唆された。このような速度論的中間体の構造情報はアミロイド形成機構を解明する上で必須のものであるが、フォールディング反応中に過渡的に現れる中間体と同様、存在時間が短いため、他の状態と比べ構造研究をすることが難しく、現在では構造情報が乏しい。

2. 研究の目的

本計画で目指すのは、 β_2 ミクログロブリン (β_2m) の線維形成過程に現れる、この過渡的な線維末端中間体のキャラクタリゼーションである。本計画開始以前に我々は予備実験として、酸変性状態の β_2m から線維が形成される過程の途中に、線維に結合した過渡的な中間体があることを蛍光分光法を用いて観測している。本計画では、近年発達した NMR 解析法がさらなるアミロイド線維速度論的中间体のキャラクタリゼーションに有効であると考え、これを行う。

3. 研究の方法

本研究で使用した NMR 手法には以下のような特徴がある。一般に、溶液 NMR ではアミロイド線維のような高分子量の凝集体の測定を行うことができない。しかし、今回用いた手法は、ある試料が可溶状態と凝集状態の平衡にある時(例えば A B)、可溶状態(A)を NMR 観測することで、もう片方の凝集状態(B)の情報を得ることができるというものである。そのため、線維末端中間体とその前状態である部分変性状態との平衡状態となる試料条件を見つければ、間接的に線維末端中間体の構造情報を得ることができると考えた。

これらの測定法を駆使し、以下の点について解明することに取り組んだ。

- 線維末端中間体の主鎖構造の決定
- 線維末端中間体と線維核との相互作用部位の決定
- 上の2点から β_2m アミロイド線維形成機構の推定

4. 研究成果

本実験では、申請書に述べた予定実験法のうち、重水素交換モノマーモニタリング、緩和分散法、交差飽和転移法、を遂行したのでこれらの結果について述べる。

β_2m は酸性条件下でアミロイド線維を形成する。従来の研究から、 β_2m はこの条件で部分的に構造を持つ状態をとるため、この部分構造状態がアミロイド線維の前駆体だと考えられていた。そこで、酸変性状態 β_2m の運動性について詳しく調べるために、緩和分散法を測定した(図1)。その結果、分子の様々な領域で残余構造を形成していることと、この残余構造が動的にほどけ、部分構造状態と完全変性状態の平衡にあるということが分か

った。

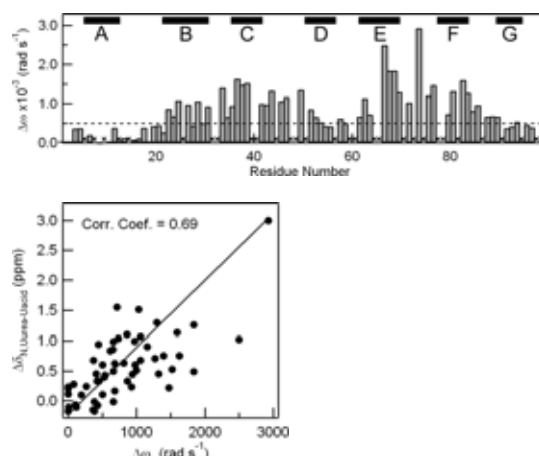


図1. 緩和分散法の測定結果。(上)部分構造状態と完全変性状態の間の化学シフト差。(下)上の図で得られた化学シフト差と、以前の実験で得られた酸変性状態と尿素変性状態の間の化学シフト差との相関プロット。

続いて、酸変性モノマーのどの残基が線維核と相互作用をしているかを調べるために、交差飽和転移法を行った(図2)。その結果、相互作用に関与している残基は部分構造状態で残余構造を持つ残基と一致することが分かった。

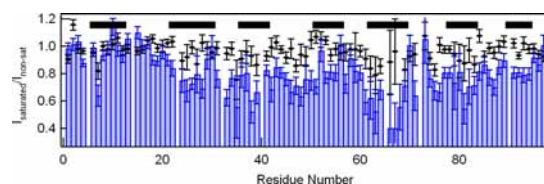


図2. 交差飽和転移法の結果。青線で強度の下がっている残基が線維核と相互作用している残基。これらの残基の分布が図1上のもので一致していることが分かる。

これらの結果から以下のことが分かった。まず酸変性条件下で、 β_2m 部分構造状態と完全変性状態との構造転換をしていることが分かった。また、部分構造状態に重要な残基が線維核との相互作用にも重要であることが分かった。これらの結果から、部分構造状態が完全変性状態に一度ほどけ、その状態で線維核に相互作用すること、つまり、完全変性状態の方が真の前駆体だということが示唆された(図3)。

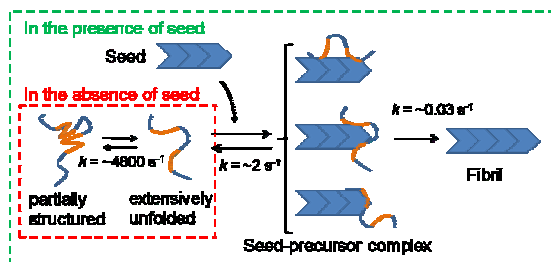


図3. 本結果が示唆するアミロイド線維伸長モデル

このような反応機構は他の蛋白質のアミロイド線維形成機構にも共通である可能性があり、より一般的なアミロイド線維形成機構の理解につながると考えられる。

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4件)

小沼 剛、茶谷 絵理、八木 正典、櫻井 一正、池上 貴久、内木 宏延、後藤 祐児 . Kinetic Intermediates of β 2-Microglobulin Fibril Elongation Probed by Pulse-Labeling H/D Exchange Combined with NMR Analysis. *J. Mol. Biol.* **405**, 851-862 (2010). 査読有り

吉村 優一、櫻井 一正、李 映昊、池上 貴久、茶谷 絵理、内木 宏延、後藤 祐児 . Direct Observation of Minimum-Sized Amyloid Fibrils Using Solution NMR Spectroscopy. *Protein Sci.* **12**, 2347-2355 (2010). 査読有り

茶谷 絵理、大西 玲奈、小沼 剛、櫻井 一正、内木 宏延、後藤 祐児 . Pre-Steady-State Kinetic Analysis of the Elongation of Amyloid Fibrils of β 2-Microglobulin with Tryptophan Mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **400**, 1057-1066 (2010). 査読有り

亀田 篤司、森田 勇人、櫻井 一正、内木 宏延、後藤 祐児 . NMR-based characterization of a refolding

intermediate of β 2-microglobulin labeled using a wheat germ cell-free system. *Protein Sci.* **12**, 2347-2355 (2010). 査読有り

[学会発表](計12件)

櫻井 一正、柳 浩太郎、吉村 優一、小沼 剛、池上 貴久、内木 宏延、後藤 祐児 . 溶液 NMR を用いた β 2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成における過渡的中間体のキャラクタリゼーション . 日本生物物理学会第48回年会、2010.9.21、東北大川内キャンパス・仙台市

宗 正智、八木 寿梓、櫻井 一正、荻 博次、内木 宏延、後藤 祐児 . 超音波による高速アミロイド線維形成反応 . 日本生物物理学会第48回年会、2010.9.21、東北大川内キャンパス・仙台市

櫻井 一正、柳 浩太郎、吉村 優一、小沼 剛、池上 貴久、内木 宏延、後藤 祐児 . Identification of transient intermediates of the formation of the β 2-microglobulin amyloid fibril by cross saturation transfer experiment. XXIVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems. 2010.8.23-24、ケアンズコンベンションセンター・オーストラリア

吉村 優一、櫻井 一正、李 映昊、池上 貴久、茶谷 絵理、内木 宏延、後藤 祐児 . Analysis of the mechanism of the amyloid fibril extension through H/D exchange experiment. XXIVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems. 2010.8.23-24、ケアンズコンベンションセンター・オーストラリア

柳 浩太郎、櫻井 一正、李 映昊、池上 貴久、内木 宏延、後藤 祐児 . Analysis of the mechanism of the amyloid fibril

extension through H/D exchange experiment. XXIVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems. 2010.8.23-24、ケアンズコンベンションセンター・オーストラリア

小沼 剛、茶谷 絵理、八木 正典、櫻井 一正、池上 貴久、内木 宏延、後藤 祐児。パルスラベル H/D 交換法と NMR を用いた $\beta 2$ ミクログロブリンの線維伸長中間体の解析。第 10 回日本蛋白質科学会、2010.6.18、札幌コンベンションセンター

吉村 優一、櫻井 一正、李 映昊、池上 貴久、茶谷 絵理、内木 宏延、後藤 祐児。 $\beta 2$ 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。第 10 回日本蛋白質科学会、2010.6.18、札幌コンベンションセンター

宗 正智、八木 寿梓、櫻井 一正、内木 宏延、後藤 祐児。超音波による超高速アミロイド線維形成反応。第 10 回日本蛋白質科学会、2010.6.18、札幌コンベンションセンター

宗 正智、八木 寿梓、櫻井 一正、内木 宏延、荒田 敏昭、後藤 祐児。SDSL-ESR を用いたアミロイド線維構造に関する研究。日本生物物理学会第 47 回年会、2009.11.31、アステイ徳島

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。 $\beta 2$ 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。日本生物物理学会第 47 回年会、2009.11.31、アステイ徳島

柳 浩太郎、櫻井 一正、李 映昊、池上 貴

久、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機構の解析。日本生物物理学会第 47 回年会、2009.11.31、アステイ徳島

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。 $\beta 2$ 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。第 9 回蛋白質科学会、2009.5.20、熊本全日空ホテルニュースカイ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/physical/yoeki.html>

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