

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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770158

研究課題名（和文）高圧 NMR によるプリオン蛋白質の励起構造とその構造特異性の解析

研究課題名（英文）Characterization of the excited state of prion protein using high-pressure NMR technique

研究代表者

前野 寛大（MAENO AKIHIRO）

近畿大学・先端技術総合研究所・研究員

研究者番号：70570951

研究成果の概要（和文）：本研究の目的はプリオン仮説に基づく一連のプリオン病に関して、蛋白質の励起構造を通じて感染機構の構造基盤及び異なる動物種間の構造特異性を解析することである。これまで NMR 測定のための十分な蛋白質発現が見込まれないとされてきた全長（アミノ酸番号 23-231）のハムスタープリオン蛋白質に関して、 ^{15}N 安定同位体標識を施した大量発現プロトコルを確立させた。高圧下で安定化される励起構造の定量解析を目指した横緩和分散測定では、解析に足る十分な緩和分散プロファイルが得られず、その後も測定条件の最適化を図ったが改善されなかった。このことから、 $haPrP^c$ の基底構造と励起構造の間の揺らぎが横緩和測定の検出範囲であるミリ秒オーダーから外れた時間域で生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the conformational basis of infection mechanism and to characterize the excited state of prion protein which causes a series of prion diseases defined by prion hypothesis. We established the protocols for the high-level expression and the purification of ^{15}N -labeled full length hamster prion. In the experiment of NMR transverse relaxation dispersion that expected to enable the quantitative analysis of the excited state which is stabilized under pressure, the typical CPMG profiles have not been obtained and those experimental conditions have failed to be optimized. These results suggest that conformational fluctuations between the basic folded state and the excited state for $haPrP^c$ may take place beyond detection range (milli-second time scale) of NMR R_2 dispersion measurement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：プリオン蛋白質、核磁気共鳴、圧力、励起構造

1. 研究開始当初の背景

Prusiner により提唱された“一連の感染

性海綿状脳症（総称としてプリオン病と呼ぶ）の病原体本体が病変脳組織に沈着した異

常型プリオン蛋白質 PrP^{Scrapie} (通常は PrP^{res}: Protease K-resistant 型として検出) そのものである”とする「プリオン仮説」に基づき、現在のところプリオン病は、 α -ヘリックスに富む正常型プリオン蛋白質 PrP^c から β -シートに富む異常型 PrP^{res} への構造転換に起因すると考えられている。一方、感染性はむしろ PrP^{Scrapie} の前駆体であるオリゴマー状態が担っているという報告も近年出てきている。また、プリオン病の感染機構においては、異なる動物種間の中には感染に伴う潜伏期間の延長や場合によっては発症しないいわゆる「種間障壁」が認められており、プリオン病の感染・伝播機構の全体像解明にはプリオン蛋白質の基本的なダイナミズムの他に、動物種間の構造特性の違いという面からも探る必要がある。

しかしながら、これまでに明らかにされてきた多様な動物種における PrP^c の結晶構造を比べると、それらに大きな差異はなく、非常に良く似ている。したがって、基底構造 (=天然構造) の情報からでは一連のプリオン病に関する全体像の把握には遠く及ばないのが現状である。これに対して、これまでの可変圧力 NMR 法を中心とした研究から、以下のような事が示された。

(1) アミノ酸番号 90-231 の正常型ハムスタープリオン蛋白質 haPrP^c (90-231) に可変圧力 NMR 法を適用した結果、加圧下で基底状態とは異なる励起状態 haPrP* が観測され、その後の熱力学解析から haPrP* の生理条件下での分布率は約 1% と見積もられた。このことから、生理条件下では基底構造 haPrP^c が、僅かな分布率 (~1%) で存在する haPrP* と平衡状態 (haPrP^c \rightleftharpoons haPrP*) にあることが示された (K. Kuwata et al., *Biochemistry*, **43**, 4439-4446 (2004).)。

(2) ヒトプリオン蛋白質 huPrP^c においてもハムスターと同様の平衡状態 (huPrP^c \rightleftharpoons huPrP*) が存在することが可変圧力 NMR 法によって示され (W. Kremer et al., *J. Biol. Chem.*, **282**, 22689-22698 (2007).)、基底構造 PrP^c と励起構造 PrP* の間で“かたち”を変えながら揺らぐプリオン蛋白質の実体が徐々に明らかとなってきた。同時に、異種間における PrP* が、それぞれに特徴的な構造特性を定性的に示す事がわかり、各動物種における励起構造 PrP* の違いが種間障壁に関与することが示唆された。

(3) ヒトプリオン蛋白質オリゴマー huPrP^{oligo} については、加圧に伴い huPrP* へと可逆的に解離することが明らかになった。このことから、huPrP* はオリゴマー状態の前駆体である可能性が示唆され、全体として正常

型からオリゴマー状態までの huPrP* を介した平衡状態 huPrP^c \rightleftharpoons huPrP* \rightleftharpoons huPrP^{oligo} が提唱された。(K. Sasaki et al., *Prion*, **2**(3), 118-122 (2008).)。

以上の背景を踏まえ、プリオン蛋白質の励起構造 PrP* に関するダイナミクスを詳細に解析することが、プリオン病の感染性・種間障壁を解明する糸口になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、圧力摂動を利用した高圧 NMR 法および高圧下での NMR 横緩和分散法 (NMR R_2 dispersion 法: NMR-RD 法) をプリオンタンパク質に適用する。高圧 NMR 法は、定性的ではあるが、励起構造アンサンブルの平均化された情報がスペクトルに反映されるため、あらゆる時間域・構造空間で生じる揺らぎを探索できる利点がある。一方、NMR-RD 法は二状態間の化学交換を仮定した上で、比較的遅い時間域 (ミリ秒オーダー) で生じるダイナミクスを定量的に解析することができる利点がある。これらの方法を組み合わせることで、プリオン蛋白質励起状態の構造特性を詳細に解析し、感染機構の構造基盤及び異なる動物種間の構造特異性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの高圧 NMR 研究から、プリオンの特殊性・感染性・細胞毒性が、プリオン蛋白質の励起構造と特に密接に関わっている可能性が示されている。そこで、励起構造の検出および解析に特化した高圧 NMR 法と NMR-RD 法を利用して以下の点について取り組んだ。

(1) 「¹⁵N 安定同位体標識を施したプリオン蛋白質 PrP^c の大量培養及び精製」: 多次元 NMR 測定の実施には安定同位体標識した蛋白質を大量に得ることが必要となる。そこで、¹⁵N 安定同位体標識を施した全長 (アミノ酸番号 23-231) の正常型ハムスタープリオン蛋白質 haPrP^c (23-231) の大量発現および精製プロトコルの確立を目指した。

(2) 「種間障壁と励起構造との相関」: ハムスターとマウスの正常型プリオン蛋白質に対して高圧 NMR 法と NMR-RD 法を適用する。それぞれの解析結果から得られた励起構造の構造特性を異なる動物種間で比較し、種間障壁と励起構造との関連を調べる。

4. 研究成果

(1) 「¹⁵N 安定同位体標識プリオン蛋白質 PrP^c の大量培養及び精製プロトコルの確立」: Recombinant haPrP^c では、アミノ酸番号

23-90 のフレキシブルな N 末端を含む全長領域において、その発現量が著しく低いことが知られている。そのため多くの場合、高濃度の蛋白質試料を得るためには N 末端領域を取り除いた *haPrP*(90-231) が用いられてきた。本研究では、本来の状態に近い全長の *PrP^C* における構造揺らぎの解析を行うべく、大量発現の条件を検討した。

pET41/Rosetta cell のグリセロールストックから正常型ハムスタープリオン蛋白質 *haPrP^C* (23-231) を LB 培地で大量発現させたところ、見積もられた蛋白質量は約 150mg/L culture であった。ここで、IPTG を添加する方法では目的蛋白質の収量があまり上がらなかったため、Auto-induction 法を採用した。

多次元 NMR 測定用に ¹⁵N-安定同位体標識を施した *PrP^C* を発現させるため、M9 培地に変更し条件検討を行った。窒素源を ¹⁵N-塩化アンモニウムにし、最少培地の成分を検討したところ、最終的に ¹⁵N- *haPrP^C* (23-231) の収量を約 50mg/L culture にまで増やすことに成功した。菌体破碎後、可溶化した封入体を Ni アフィニティークロマトグラフィーにて精製を行った。本研究では一般的な His タグを付加せず、N 末端側のフレキシブルな領域のヒスチジンを含むオクタペプチドリピート配列 (PHGGGWGQ が 5 回繰り返し) と Ni²⁺ とのキレート結合を利用した。希釈法によりゆっくりと *PrP^C* をリフォールディングさせ、透析によって適切な緩衝液に置換した。得られた *PrP^C* を NMR で測定したところ、既知のフォルドした *haPrP^C* (90-231) の NMR スペクトルとほぼ一致した。これは *PrP^C* (23-231) の N 末端側が二次構造を取っていないために、得られた *PrP^C* (天然構造) の化学シフト値が一部のアミノ酸を除いて互いに同じ値を示すためと考えられる。

以上の結果より、1L スケールの培養から多次元 NMR 測定に十分な 1mM 以上の高濃度蛋白質試料を得る事が可能となった。これまで、全長 (23-231) のプリオン蛋白質に関して大量発現は難しいとされてきただけに、この成果は今後の NMR を中心とした研究を推進していく上で大きな成果である。

(2) 「種間障壁と励起構造との相関」:

耐圧セルを搭載したオンライン型高圧 NMR システムを用いて 1 気圧から 2,250 気圧までの二次元 NMR 測定 (¹H-¹⁵N HSQC) を行った。その結果、過去に (90-231) の *haPrP^C* で観測された励起状態 *PrP** と同様の構造領域周辺で部位特異的な構造変化が観測された。

この *haPrP** を定量的に解析するために、常圧下と圧力下 (1,000 気圧) でそれぞれ NMR-RD 測定を行った。その結果、高圧 NMR 測定で示された *haPrP** の構造特性を支持する典型的な緩和分散プロファイルが得られるだろう

という当初の予想に反して、常圧および高圧下のどちらにおいても励起構造を特徴付けるに十分な緩和分散プロファイルは得られなかった。

一般的に、NMR-RD 法では励起状態を含むミリ秒オーダーの中間的な化学交換 (揺らぎ) が検出の対象となるが、今回設定した 1,000 気圧、25°C の条件がそれには不適當であったと考えられる。その後も、温度・圧力並びにデータ取得パラメータの最適化を変えながら検討を行ったが、大幅な改善は見られなかった。

この理由として、NMR-RD 法で検出される二状態間の化学交換において、許容される速度の範囲が非常に限定されていることが挙げられる。つまり、*haPrP^C* (23-231) における基底構造-励起構造間の揺らぎが、ミリ秒オーダーの化学交換から外れていたために、同法により検出されなかったと考えられる。

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 1 件)

① Buddha R Shah, Akihiro Maeno, Hiroshi Matsuo, Hideki Tachibana and Kazuyuki Akasaka, (2011) Pressure-accelerated dissociation of amyloid fibrils in wild-type hen lysozyme., *Biophys. J.*, 102 (1), 121-126. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

① 前野覚大, Crucial roles of cavity in the conformational fluctuation of a protein., 第 51 回 NMR 討論会, ウィンクあいち (愛知県) (2012.11.9).

② 前野覚大, Crucial roles of cavity in the conformational fluctuation of a protein., 7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, ピアザ淡海 (滋賀県) (2012.10.29)

③ 前野覚大, Single mutation on a loop alters the key dynamics of the core, but not the average structure., 第 50 回日本生物物理学会年会, 名古屋大学 (愛知県) (2012.09.23)

④ 前野覚大, Cavity hydration and the dynamics of a protein., 6th International Meeting on Biomolecules under Pressure, 津市旧公会堂 (滋賀県) (2011.12.15)

⑤ 前野覚大, High pressure NMR study of DHFR from a deep-sea bacterium., International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, 大槻橋ホール (神奈川県) (2011. 11. 17)

⑥ 前野覚大, Cavity hydration and the dynamics of a protein., 第 49 回生物物理学会年会シンポジウム, 兵庫県立大学 (兵庫県) (2011. 09. 16).

⑦ 前野覚大, Cavity Hydration: A Gate Way to the High-Energy Paradigm?, 第 48 回生物物理学会年会シンポジウム, 東北大学 (宮城県) (2010. 09. 21)

⑧ Maeno A, et al., Conformational fluctuation of highly stable form of staphylococcal nuclease Δ +PHS and its V66K variant studied by high pressure NMR spectroscopy., 24th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, ケアンズ (オーストラリア) (2010. 08. 23)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前野 覚大 (MAENO AKIHIRO)
近畿大学・先端技術総合研究所・研究員
研究者番号：70570951

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し