

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770193

研究課題名(和文) NMRで読み解くアミロイドの形成と分解のメカニズム

研究課題名(英文) NMR study of the formation and dissolution mechanisms of Sup35 amyloid fibrils.

研究代表者

大橋 祐美子 (Ohhashi, Yumiko)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：10422669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質のアミロイド化は、神経変性疾患等の重篤な疾患と関わっている。本研究ではその様な疾患の病態を左右するアミロイド構造多形の形成メカニズムについて、酵母プリオン蛋白質Sup35を用いて解明した。Sup35NMの揺らぎや部分構造に着目した数種のNMR測定から、Sup35NMは配列上に二箇所のアミロイド形成開始点を持ち、片方が選択されることで構造多形が生じることを明らかにした。また、WT Sup35NMの一部にコンパクトな部分構造を発見し、その部分構造が片側の開始点領域を含んでいた。つまりWTでは片側の開始点が不活性な状態にあることで、安定してもう片側が選択されていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Protein aggregates (amyloid) are common pathological feature of most neurodegenerative diseases. In this study, I investigated the molecular mechanism controlling of determination of amyloid structural polymorphism which affects the clinical state of such diseases, using a yeast prion protein, Sup35. From measurements of several NMR methods focusing on the Sup35 structural fluctuation and local conformation, I found two amyloid initiation sites on Sup35 sequence. Thus, it was conceivable that amyloid structural polymorphism arises from the competition of these two sites. Next, I found the relatively compact local conformation in a part of WT Sup35NM. This result exhibited that the one initiation site is included in this compact area, so another site is advantageous in WT amyloid formation. In conclusion, it was suggested that amyloid structural polymorphism is induced by the destruction of local conformation by amino acid substitution.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：アミロイド 核磁気共鳴法 構造多形 Sup35

1. 研究開始当初の背景

蛋白質が線維状に凝集したものの、それが「アミロイド」である。通常種類の蛋白質が分子間シート構造をコアとして線維状に連なっている。このアミロイドに関係するヒトの疾患は現在 25 種程度知られており、プリオン病、ハンチントン病をはじめ、致死性の神経変性疾患がその多くを占める。しかしその治療法は確立されておらず、最も盛んに研究が行われているアルツハイマー病においても進行をわずかに遅らせる程度に留まっている。

十数年前から疾患とは無関係の蛋白質がアミロイド化するという報告が相次いでなされ、この現象が特定の蛋白質で起きる特殊なものではなく「蛋白質を構成するポリペプチド鎖に共通する性質」との考え方が一般的となり、医学のみならず、構造生物学、分子生物学、物理学等の分野からも注目されることとなった。そのように、多分野から精力的に研究が行われているにも関わらず未だ治療法の確立に至らない理由としてアミロイドに共通して見られる性質が、研究の妨げとなっているということが挙げられる。1) アミロイド、及びその中間産物(オリゴマー)の分子量が均一ではない 2) アミロイド、オリゴマーに構造多形がある 3) オリゴマーが一過性のものである 4) アミロイドが難溶性である 等がその一例であり、近年その構造情報は次第に明らかになりつつあるものの、まだ不明な点が多く残っている。

2. 研究の目的

蛋白質 Sup35 は酵母の翻訳終止因子であるが、哺乳動物のプリオン蛋白質と酷似した振る舞いをみせることから「酵母プリオン」と呼ばれ、プリオン現象及びアミロイド化のモデル蛋白質として広く用いられているものである。申請者はこれまでの研究でこの Sup35 のアミロイド化性質について調べてきた経験から、モノマー及びオリゴマー状態で静置するとアミロイド化が起らず、核磁気共鳴法による残基レベルの解析が行える

蛋白質であることを見出した。そこでアミロイド病の更なる理解のため、毒性の異なるアミロイドがひとつの蛋白質から形成されるメカニズムの解明を構造生物学的視点から捉えること目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

Sup35 の 17 番目のアミノ酸「セリン」を「アルギニン」に置換した変異体 (S17R) と、変異の入っていないワイルドタイプ (WT) との比較のため、主に以下のような研究手法を用いた。

(1) マススペクトルによる凝集体構造観察。アミロイド凝集体の詳細な構造を決定する事は極めて困難な作業であるが、申請者はマススペクトルによる簡便な方法で凝集体のコア領域を比較し、その構造の違いを定性的に確認した。まず、作成した Sup35 アミロイドを蛋白質分解酵素で処理すると、構造を持たない領域のみが切断され、凝集体のコアとなる部分が残る。それを遠心で回収した後変性剤で可溶化し、質量分析で分子量を確認、さらにタンデム質量分析で短ペプチドの配列を確認し、アミロイドコアの領域を特定した。

(2) 凝集前のモノマー、オリゴマー-Sup35 の構造、揺らぎ情報の解析のため、核磁気共鳴法を用いた。核磁気共鳴法では多種の測定方法が蛋白質解析に用いられるが、その中で特に天然変性蛋白質の性質の解析に有用であると思われる次の測定を行った。¹H-¹⁵N HSQC シグナル強度解析でオリゴマー相互作用の部位を特定。緩和測定で構造揺らぎを観察。CLEANEX-PM 測定で、蛋白質のアミド水素の溶媒水素の交換速度から、溶媒露出の程度を観察。飽和移動差法から、Sup35 同士の分子間相互作用の観察。常磁性緩和促進法からモノマー時の部分的構造形成を観察。

4. 研究成果

Sup35 は 3 つのドメイン (N, M, C) から成る 685 残基の蛋白質である。C ドメインは構造と機能を持ち、NM ドメインはアミロイド形成に關与する天然変性領域である。この研究は Sup35-NM ドメインのみを用いて行った。

Sup35-NM の S17R 変異体から成るアミロイドは、酵母に導入した際、母娘遺伝の安定性が WT より低く、また酵母内の正常 Sup35 のアミロイド化率が WT より低いことから、アミロイド構造が異なる事が予想された。まず、マスペクトル法でアミロイドコア領域を調べたところ、WT は N 末端、S17R は N、M ドメインをまたぐ中央付近にコアを持ち、ほとんど重複のない完全に異なる領域であることがわかった。このようなアミロイド構造多形のメカニズムはモノマー及び、アミロイド形成中間体であるオリゴマーに潜んでいると考えられる。そこでモノマー及びオリゴマーの揺らぎや部分構造を NMR の各種測定法を用いて解析した。

まず ^1H - ^{15}N HSQC シグナル強度解析で WT 及び S17R Sup35-NM のオリゴマー形成によるシグナル強度変化を比較した。オリゴマー相互作用がアミロイド構造を決定する重要な因子である事が、申請者の以前の研究で示唆されていたため、S17R 変異体のアミロイド構造変化にも關与していることが考えられた為である。結果、相互作用部位としての両者の違いはほとんど無かったが、S17R のオリゴマー量の低下が見られた。ここでオリゴマーの構造変化という要因は排除された。

次に、モノマーの揺らぎを捉えるため、緩和測定の ^{15}N - ^1H 異種核 NOE を行った。この方法ではピコ秒からナノ秒の早い時間スケールの構造揺らぎの程度を觀察する事ができる。結果、Sup35 は C 末端側半分に大きな揺らぎが集中しており、N 末端側半分は天然変性領域と考えられている部分にも関わら

ず、比較的揺らぎが少なく、部分構造が存在することが示唆された。さらにここでも S17R のオリゴマー量低下に起因すると考えられる揺らぎの増加が觀察された。

また、CLEANEX-PM 測定から、Sup35-NM の主鎖アミド水素と溶媒の水素との交換速度を調べた。このアミド水素の交換速度は、溶媒に露出している残基ほど速くなり、つまり露出度を見積もる事ができる。C 末端側の揺らぎの大きな部分は、大きく溶媒に露出している事が示され、また揺らぎの少ない N 末端側にも、比較的露出している部分を 2 箇所発見した。この領域はアミロイド形成に非常に重要であることが示されているアスパラギン残基が集中する部分であった。

更に飽和移動差法により、Sup35-NM 同士の分子間相互作用の存在の確認を行った。モノマー条件でも Sup35-NM 同士は多少の分子間相互作用があることが、他の測定方法では確認できるのだが、この測定法の性質から、モノマーの条件では分子間相互作用が見られなかった。しかしオリゴマーの存在する条件での測定ではシグナルが得られ、オリゴマー相互作用部位と、WT では N 末端側、S17R では中央付近のそれぞれのアミロイドコアが出来る領域内に相互作用が見られ、それは先の CLEANEX-PM でやや露出している事が示された 2 領域と一致していた。

そこでこの 2 領域がアミロイド形成時の開始点としての役割を持つものであると仮定し、アミノ酸変異による開始点の破壊を試みた。アミロイド形成開始にはアスパラギン残基が重要な役割を持つと考えられたため、アスパラギンをアラニンに置換する変異を複数個入れ、アミロイド構造の変化を確認した。中央領域は 2 残基置換により開始点の破壊に成功した。N 末端側は比較的領域が広いため少数の置換では破壊は困難であったが、3 残基置換で部分的な開始点の破壊が見ら

れた。この結果は、2領域が実際にアミロイド形成開始点であるということを示唆するものである。

最後に、常磁性緩和促進 NMR 法を用いて Sup35-NM モノマーの大まかな部分構造を調べた。タンパク質の安定な天然構造はアミロイド形成を妨害する重要な因子であることが知られている為である。結果、異種核 NOE で示された揺らぎの小さい領域がかなりコンパクトな部分構造を取っていることが分かった。中央付近のアミロイド形成開始点はそのコンパクトな領域に含まれており、N 末端の開始点は含まれていなかった。

以上の研究から、Sup35-NM の分子内には 2 箇所のアミロイド形成開始点が存在し、そのどちらかが選択される事で大きなアミロイド構造多形が誘導されていると考えられる。また、WT が N 末端側の開始点を常に選択し、N 末端側にアミロイドコアを作るのは部分構造が中央付近の開始点をマスクしている為であることが示唆された。また S17R 変異体がアミロイド構造を変化させるのは、N 末端のアミロイド形成に重要な領域に入るアルギニンという比較的大きな残基が立体障害になるという事と、オリゴマー量の変化で見られるように分子のフォールドがややほぐれている為だと考えられる。

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)

Foo CK, Ohhashi Y, Kelly MJ, Tanaka M, and Weissman JS. Radically different amyloid conformations dictate the seeding specificity of a chimeric Sup35 prion. **J Mol Biol**, 408(1):1-8, 2011 (査読有)

[学会発表](計 5 件)

招待講演：大橋祐美子、山口芳樹、鎌

足雄司、花島慎弥、桑田一夫、田中元雅「酵母プリオン Sup35 を用いたアミロイド構造多形形成メカニズムの解明」第 13 回日本蛋白質科学会年会 鳥取市とりぎん文化会館(2013.06.12 - 14)

大橋祐美子、田中元雅 「アミロイド構造の決定におけるタンパク質揺らぎの役割の解析」第 50 回日本生物物理学会年会 名古屋市・名古屋大学東山キャンパス (2012.09.22 - 24)

Yumiko Ohhashi and Motomasa Tanaka 'Protein fluctuation in monomer determines prion strain conformations' Asian Pacific Prion Symposium 2012, Pacifico Yokohama, Japan. (2012.07.29 - 30)

Yumiko Ohhashi and Motomasa Tanaka 'Role of protein fluctuation in determination of amyloid conformation.' The 11th International symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, OSANBASHI Hall, Yokohama, Japan. (2011.11.15 - 18)

Yumiko Ohhashi and Motomasa Tanaka 'Structural basis for the diversity of prion strain conformations' Asian Pacific Prion Symposium 2011, Hotel Marroad Karuizawa, Nagano, Japan. (2011.07.10 - 11)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 祐美子 (Ohhashi Yumiko)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・研究員

研究者番号：10422669