

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370067

研究課題名(和文) アミロイド線維形成における過飽和の果たす役割

研究課題名(英文) Role of supersaturation in the formation of amyloid fibrils

研究代表者

後藤 祐児 (Goto, Yuji)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：40153770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド線維は変性蛋白質の形成する線維状の凝集体であり、アミロイドーシスの原因となる。アミロイド線維は原因蛋白質の過飽和溶液から、核形成、成長によって形成する。本研究ではアミロイド線維形成における過飽和の役割を研究した。超音波が過飽和を解消する特に有効なアジテーションであることを示した。超音波照射装置とプレートリーダーを組み合わせた装置HANABIを作製し、アミロイド線維形成のハイスループット解析を可能とした。また、別の蛋白質凝集としてアモルファス凝集がある。アミロイド線維とアモルファス凝集の関係が、物質の結晶とガラスとの関係にあることを示し、これにより、蛋白質凝集の一般的な原理を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Amyloid fibrils are fibrillar aggregates of denatured proteins associated with various amyloidoses. Amyloid fibrils form in the supersaturated solutions of precursor proteins through a nucleation and growth mechanism. We revisited "supersaturation" and studied its role in amyloid fibrillation.

We showed that ultrasonication is one of the most effective agitations to force spontaneous fibrillation and constructed a HANdai Amyloid Burst Inducer (HANABI), which combines the use of a water-bath-type ultrasonicator and microplate reader. HANABI makes possible a high-throughput analysis of amyloid fibrillation.

On the other hand, the term amorphous aggregate has been collectively used for other types of aggregates, which have not been the targets of intensive research. We showed that amyloid fibrils and amorphous aggregates were similar to the crystals and glasses of substances, respectively, explaining comprehensively the kinetics and thermodynamics of protein aggregation.

研究分野：蛋白質科学

 キーワード：蛋白質 フォールディング アミロイド線維 凝集 超音波 2ミクログロブリン アミロイド ペ
 プチド シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

蛋白質はフォールディングして特異的な立体構造を形成して機能を果たし、生命活動を担う。他方、蛋白質は凝集して機能的構造とは異なる構造をとる。このような異常凝集の代表に、「アミロイド線維」がある。アミロイド線維は蛋白質が線維状に重合した高分子凝集体であり、アルツハイマー病、透析アミロイド病、1型糖尿病、パーキンソン病など多くの深刻な疾病の原因あるいは、それらと深く関わる。研究代表者は、2000年頃より、アミロイド線維の構造と物性、形成機構の研究を行ってきた。

アミロイド線維の形成は、核形成と伸長反応からなる。原因蛋白質モノマーは、潜伏期間を経て重合核を形成し、その後、加速的に線維が増殖する。既存の線維の少量を、モノマー溶液に加えると、潜伏期を経ずに、線維形成は速やかに起きる(シーディング反応)。

このような線維形成の特徴は、物質の結晶成長と全く同じである。つまり、溶液に溶けた変性蛋白質が、溶解度を越えた過飽和状態にあり、何らかの刺激によって、過飽和状態の解消と共役してアミロイド線維が析出すると考えた。

2. 研究の目的

代表者は、「蛋白質異常凝集の統一原理」を提唱した。すなわち、アミロイド線維形成は、短いペプチドや変性した蛋白質が、溶解性を超えることによって析出する場合の、基本構造である。しかしながら、ペプチド溶液はしばしば過飽和となるためアミロイド形成は容易には起きない。このような統一原理によって、アミロイド線維だけでなく、三次元結晶から不定形凝集まで、蛋白質の構造転移を包括して理解することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 超音波照射によるアミロイド線維形成

システムの改良：超音波がアミロイド原因蛋白質の過飽和を解消しアミロイドを生成する有効な方法であることを既に発表した[Ohashi, et al. J. Biol. Chem. (2005)]。そして、これを効率的に行うために、96穴プレートリーダーと超音波装置を組み合わせることによって、アミロイド形成を効率よく、迅速に測定できることを発表した[So, M. et al. J. Mol. Biol. (2011)]。これを更に発展させ、プレートリーダーと超音波装置を合体させるシステムを開発する。

超音波による線維形成の促進：超音波を用いて、さまざまな蛋白質のアミロイド線維形成が促進されることを検証する。材料の蛋白質としては、これまで主に使用してきた β 2ミクログロブリンに加え、アルツハイマー病に関わるアミロイド β 、パーキンソン病に関わる α シヌクレイン、角膜変性症に関わるケ

ラトエピセリンなどを用いる。

超音波による線維崩壊の促進：アミロイド線維が過飽和における析出であるならば、溶解度以下では線維はモノマーに解離することが予測される。既にでき上がった線維に超音波を照射することにより、これらを調べる。特に、溶解度と異常凝集の関係を明らかにする。

(2) 一線維蛍光顕微鏡による観察

蛍光二色観察：これまでは線維に特異的なチオフラビンTを用いて蛍光顕微鏡観察を行ってきた。アミロイド線維形成機構をさらに詳細に検討するには、線維を二色で観察することが有効である。このためにチオフラビンTとは異なる蛍光色素 Alexa 532 で蛋白質を修飾し、その線維形成反応を蛍光顕微鏡で観察する。

アミロイド線維のレーザーによる崩壊：アミロイド線維の蛍光顕微鏡観察を行う中で、照射レーザー光がチオフラビンTを励起し、活性酸素等を発生することにより、アミロイド線維を崩壊することを明らかにしてきた[Ozawa et al., J. Biol. Chem. (2010, 2011)]。この結果は、新たな治療法の可能性を示唆する。すなわち、特異的に結合する色素を用いて線維を崩壊させることができるかもしれない(光線力学療法)。アミロイド線維に対するレーザー照射実験を行う。

(3) 構造と物性の計測

CD と熱測定：蛋白質の構造と安定性の研究には熱測定が重要な手法として用いられるが、アミロイド線維に対しては、問題が多く活用されていない。温度に依存した線維の構造変化から、線維形成の熱力学的機構を解析する。

4. 研究成果

(1) 超音波照射によるアミロイド線維の形成システムの改良：超音波がアミロイド原因

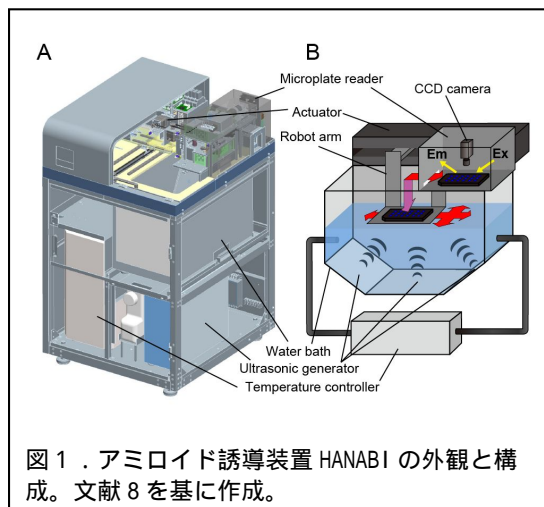
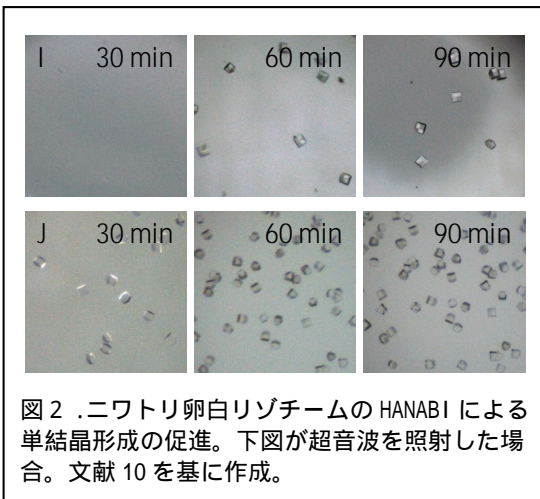


図1. アミロイド誘導装置 HANABI の外観と構成。文献8を基に作成。



蛋白質の過飽和を解消しアミロイドを生成する有効な方法である。これを効率的に行うために、96穴プレートリーダーと超音波装置を組み合わせることによって、アミロイド形成を効率よく、迅速に測定する装置 HANdai Amyloid Burst Inducer (HANABI) を製作した(図1)。特にプレートを移動させて超音波を均質に照射すること、浴槽内の水を脱気して、超音波の伝播効率を高めることができた。また、HANABI は蛋白質の単結晶の作製にも用いることができた(図2)。

アミロイド形成因子の探索: HANABI を用いてさまざまな蛋白質のアミロイド線維形成反応の因子を解析した。ニワトリ卵白リゾチームのアミロイド線維形成をさまざまな濃度の塩サイングアニジン存在下で調べた。塩酸グアニジンによって見かけの安定性が低下するとアミロイド線維形成は促進された。しかし、ラグ時間の揺らぎの目安となる変動係数(coefficient of variation)は、塩酸グアニジン濃度に依存しなかった。これより、アミロイド線維形成の律速段階は、変性状態において、コンパクトな中間状態を形成する段階にあることが示唆された。

超音波効果の一般性: 超音波照射が溶質の過飽和を解消し、アミロイド線維形成を促進する一般的で強力な手法であることを、さまざまな蛋白質を用いて示した。例えばニワトリ卵白リゾチームやヒトインスリンはアル

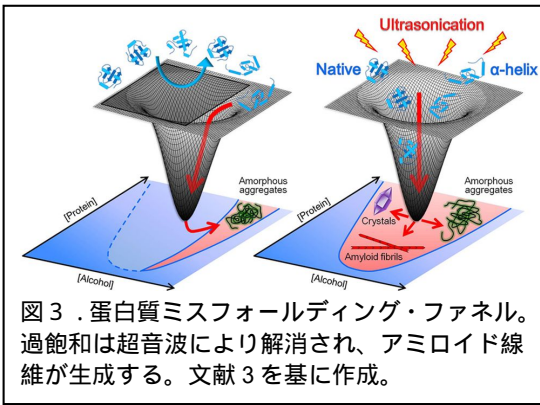


図3 .蛋白質ミスフォールディング・ファネル。過飽和は超音波により解消され、アミロイド線維が生成する。文献3を基に作成。

コール水混合溶媒で、見かけ溶けているが超音波によりアミロイド線維を形成する。蛋白質ミスフォールディング・ファネルを提唱した(図3)。

ケラトエピセリンは角膜変性症の原因蛋白質であり、その断片ペプチドがアミロイド線維を形成することが知られている。本研究では、野生型とアミロイド病を発症しやすい変異型のケラトエピセリンペプチドに対する界面活性剤である塩化ベンザルコニウム(Benzalkonium chloride)の効果調べた。塩化ベンザルコニウムは、臨界ミセル濃度付近でこれらのペプチドのアミロイド線維形成を促進した。塩化ベンザルコニウムは点眼薬に一般に添加されることから、その危険性が示唆された。

(2)超音波照射によるアミロイド線維の崩壊

臨界アミロイド濃度: アミロイド線維は、モノマー濃度が臨界アミロイド濃度よりも高い条件で形成されると考えられる。このような考えに従うと、一旦形成されたアミロイド線維も、臨界アミロイド濃度よりも低い濃度において、モノマーに崩壊することが予想される。また、これが物理的に困難である場合には、超音波によって溶解が加速すると期待された。

このような実験をアミロイド、シヌクレイン、 β 2ミクログロブリン、インスリンなど様々な蛋白質のアミロイド線維で行った。アミロイドやシヌクレインでは、超音波によってモノマーへの溶解が加速されたが、同時にアモルファス凝集も形成された。このような傾向は β 2ミクログロブリンやインスリンでより顕著であった。

超音波によるアモルファス凝集の形成を解析した結果、アミロイド線維とアモルファス凝集は競争的關係にあること、超音波を長時間照射すると、一旦できたアミロイド線維がアモルファス凝集に変わることがわかってきた。

(3)二色標識によるアミロイド線維の形成機構

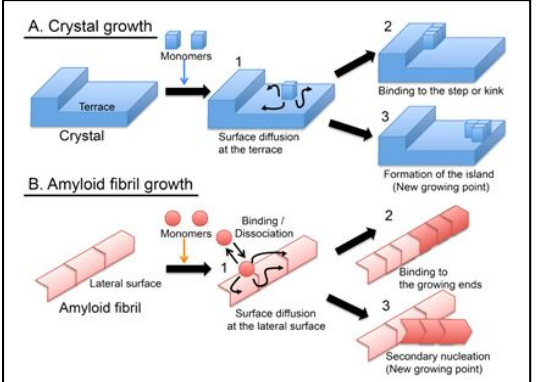


図4 .結晶化とアミロイド線維形成の類似性の比較。文献6を基に作成。

アミロイド線維の形成機構を詳細に調べるために islet amyloid polypeptide (IAPP) を用いた。蛍光色素 Alexa532 で特異的に標識した IAPP を調製し、Alexa532 の蛍光でアミロイド線維形成を一線維観測すると共に、チオフラビン T でも観測した。

その結果、モノマー分子は、既に存在するアミロイド線維の側面に結合して、その後、線維に先端に移動して成長する、側面結合モデルと一致する結果が示された。既存線維の側面には多くの弱い結合サイトがあると予想され、これにまず結合して、より安定な先端に移動すると考えられる。このような結果は、物質の単結晶形成の場合とよく似ている(図4)。

(4) アミロイド線維形成の熱力学

アミロイド線維は高分子量の凝集体であり、これまでアミロイド線維形成の熱測定は困難と考えられてきた。代表者らは等温滴定量熱計を用いることによって 2 ミクログロブリンのアミロイド線維とアモルファス凝集の熱測定を精度よく行うことに成功した。これにより、アミロイド線維やアモルファス凝集が、他の構造状態と同じ、熱力学的な状態であることが明らかになった(図5)。

それでも、アミロイド線維やアモルファス凝集にはさまざまな多型の存在することから、これらを区別して、構造安定性を理解することは容易ではないと考えられる。

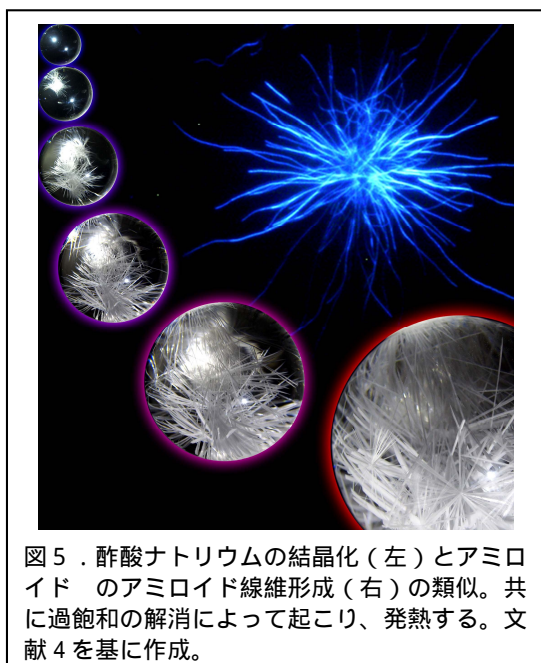


図5 . 酢酸ナトリウムの結晶化(左)とアミロイドのアミロイド線維形成(右)の類似。共に過飽和の解消によって起こり、発熱する。文献4を基に作成。

(5) シヌクレイン・アミロイド線維の低温変性

低温変性は球状蛋白質ではよく知られた現象であり、安定化に対する疎水的相互作用の寄与の大きなミオグロビンやラクトグロブリンで観察される。同様の低温変性現象が、シヌクレインでも観察されることを明

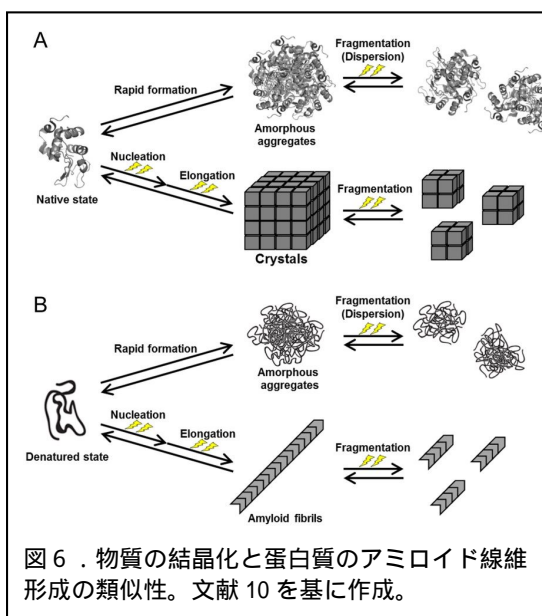


図6 . 物質の結晶化と蛋白質のアミロイド線維形成の類似性。文献10を基に作成。

らかにした。その分子機構は不明であるが、アミロイド線維の構造安定性を考える上で、特に重要な発見と考えられる。

(6) まとめ: アミロイド線維の構造安定性と過飽和

本研究により、アミロイド線維は変性蛋白質が、溶解度以上に存在した場合に形成する結晶性の析出物であることが明らかとなった(図7)。このような結晶性の析出には過飽和が伴う。また、シーディングによってアミロイド線維の析出が促進されることも重要な特徴である。他方、結晶性でないガラス性の析出はアモルファス凝集であり、過飽和を伴わない。

従来、アミロイド線維形成は、ユニークな構造構築現象として構造生物学的な興味を持たれてきた。アミロイド線維を安定化する構造や相互作用は重要な問題であるが、溶解度を越えた変性蛋白質の過飽和を伴った析出という視点は、新たな視点であり、重要である。

以上の視点から更に研究を進展させることによって、蛋白質の構造物性の基本的理解が広がると共に、蛋白質凝集の関わる病気の予防や治療にも貢献するであろう。

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 21件)

1. Small Liposomes Accelerate the Fibrillation of Amyloid β (1-40). Terakawa, M.S., Yagi, H., Adachi, M., Lee, Y.H. and Goto, Y. J. **Biol. Chem.** 290, 815-826 (2015). (以下、全て査読有)
2. Ultrasonication-dependent formation and degradation of α -synuclein amyloid fibrils. Yagi, H., Mizuno, A., So, M., Hirano, M., Adachi, M., Akazawa-Ogawa, Y., Hagihara,

- Y., Ikenoue, T., Lee, Y.-H., Kawata, Y. and Goto, Y. **Biochim. Biophys. Acta** 1854, 209-217 (2015).
3. Solubility and supersaturation-dependent protein misfolding revealed by ultrasonication. Lin, Y.†, Lee, Y.-H.†, Yoshimura, Y., Yagi, H. and Goto, Y. **Langmuir** 30, 1845-1854 (2014). †Equal contribution.
 4. Heat of supersaturation-limited amyloid burst directly monitored by isothermal titration calorimetry. Ikenoue, T.†, Lee, Y.-H.†, Kardos, J., Yagi, H., Ikegami, T., Naiki, H. and Goto, Y. †Equal contribution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 111(18), 6654-6659 (2014).
 5. Supersaturation-limited amyloid fibrillation of insulin revealed by ultrasonication. Muta, H., Lee, Y.-H., Kardos, J., Lin, Y., Yagi, H., and Goto, Y. **J. Biol. Chem.** 289,18228-18238 (2014).
 6. Elongation of amyloid fibrils through lateral binding of monomers revealed by total internal reflection fluorescence microscopy. Yagi, H., Abe, Y., Takayanagi, N. and Goto, Y. **Biochim. Biophys. Acta** 1844, 1881-1888 (2014).
 7. Cold denaturation of α -synuclein amyloid fibrils. Ikenoue, T.†, Lee, Y.-H.†, Kardos, J., Sakai, M., Yagi, H., Kawata, Y. and Goto, Y. **Angew. Chem. Int. Ed.** 53, 7799-7804 (2014). †Equal contribution.
 8. High-throughput analysis of the ultrasonication-forced amyloid fibrillation reveals the mechanism underlying the large fluctuation in the lag time. Umemoto, A.,† Yagi, H.†, So, M.†, and Goto, Y. **J. Biol. Chem.** 289, 27290-27299 (2014). †Equal contribution.
 9. 超音波による蛋白質のアミロイド形成・結晶化の促進. 宗正智、八木寿樟、後藤祐児, **生物物理** 6, 297-302 (2014).
 10. A common mechanism underlying amyloid fibrillation and protein crystallization revealed by the effects of ultrasonication. Kitayama, H.†, Yoshimura, Y.†, So, M., Sakurai, K., Yagi, H. and Goto, Y. **Biochim. Biophys. Acta** 1834, 2480-2485 (2013). †Equal contribution
 11. Principal component analysis of chemical shift perturbation data of a multiple-ligand-binding system for elucidation of respective binding mechanism. Konuma, T., Lee, Y.-H., Goto, Y. and Sakurai, K. **Proteins** 81, 107-118 (2013).
 12. Review: Application and use of differential scanning calorimetry in studies of thermal fluctuation associated with amyloid fibril formation. Sasahara, K. and Goto, Y. **Biophys.** 5, 259-269 (2013).
 13. Review: Ultrasonication, an efficient agitation for accelerating the supersaturation-limited amyloid fibrillation of proteins. Yoshimura, Y., So, M., Yagi, H. and Goto, Y. **Jpn. J. Appl. Phys.** 52, 07HA01 (2013).
 14. Benzalkonium chloride accelerates the formation of the amyloid fibrils of corneal dystrophy-associated peptides Kato, Y.†, Yagi, H.†, Kaji, Y., Oshika, T. and Goto, Y. **J. Biol. Chem.** 288, 25109-25118 (2013). †Equal contribution.
 15. Acceleration of the depolymerization of amyloid β fibrils by ultrasonication. Yagi, H., Hasegawa, K., Yoshimura, Y. and Goto, Y. **Biochim. Biophys. Acta** 1834, 2480-2485 (2013).
 16. Structure, folding dynamics and amyloidogenesis of Asp76Asn β 2-microglobulin: roles of shear flow, hydrophobic surfaces and α crystallin. Mangione, P. P., Esposito, G., Relini, A., Raimondi, S., Porcari, R., Giorgetti, S., Corazza, A., Fogolari, F., Penco, A., Goto, Y., Lee, Y. H., Yagi, H., Cecconi, C., Naqvi, M. M., Gillmore, J. D., Hawkins, P. N., Chiti, F., Rolandi, R., Taylor, G. W., Pepys, M. B., Stoppini, M., and Bellotti, V. **J. Biol. Chem.** 288, 30917-30930 (2013)..
 17. 過飽和生命科学の開拓. 後藤祐児、領域融合レビュー 2, e002 (2013).
 18. 超音波によるタンパク質のアミロイド線維形成反応の促進. 宗正智、吉村優一、八木寿樟、後藤祐児、ケミカル・エンジニアリング 58, 302-309 (2013).
 19. A back hydrogen exchange procedure via the acid-unfolded state for a large protein. Suzuki, M., Sakurai, K., Lee, Y.-H., Ikegami, T., Yokoyama, K. and Goto, Y. **Biochemistry** 51, 5564-5570 (2012).
 20. Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. Yoshimura, Y., Lin, Y., Yagi, H., Lee, Y.-H., Kitayama, H., Sakurai, K., So, M., Ogi, H., Naiki, H. and Goto, Y. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 109, 14446-11451 (2012).
 21. Review: Kinetic intermediates of amyloid fibrillation studied by hydrogen exchange methods with nuclear magnetic resonance. Lee, Y.-H. and Goto, Y. **Biochim. Biophys. Acta** 1824, 1307-1323 (2012).
- [学会発表](計 16件)
1. The role of supersaturation in amyloid fibrillation Goto, Y. Chemistry Mini-Symposium, New York University Abu Dhabi, October 30, 2014, Abu Dhabi, UAE

2. 蛋白質のアミロイド線維形成における過飽和の役割、後藤祐児、アミロイドーシス研究会、2014年8月22日、KKR 東京
3. 蛋白質科学会ワークショップ「蛋白質凝集と溶解性は同じコインの裏と表？その物理化学的な解明を目指す研究」世話人、後藤祐児、2014年6月27日、ワークピア横浜
4. Supersaturation-limited protein misfolding revealed by ultrasonication. Goto, Y. 15th International Union of Biochemistry and Molecular Biology, October 23, 2014, Taipei, Taiwan
5. Supersaturation-limited protein misfolding revealed by ultrasonication. Goto, Y. 2014 International Biophysics Congress, August 6, 2014, Brisbane, Australia
6. Supersaturation-sealed protein misfolding revealed by ultrasonication. Goto, Y. Joint Congress of ACTS-2014 and CGOM11, June 17-20, 2014, Nara, Japan
7. 蛋白質の凝集と病気、後藤祐児、再生医療と創薬の最前線、第2回シンポジウム「脳を守る」2014年3月29日、岐阜大学
8. 超音波による蛋白質のアミロイド線維形成反応、後藤祐児、第6回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム、2013年12月20日、滋賀医科大学
9. Toward a comprehensive understanding of protein folding and misfolding. Goto, Y. The Asian Pacific Prion Symposium (APPS), July 22, 2013, Huis Ten Bosch, Nagasaki
10. Toward a comprehensive understanding of protein folding and misfolding. Goto, Y. BioComplex-Taiwan, July 19, 2013, National Taiwan University
11. Supersaturation-Sealed Protein Misfolding Funnels Revealed by Ultrasonication. Goto, Y. AWEST2013, Awaji Yumebutai, June 17, 2013
12. 蛋白質のアミロイド線維形成、後藤祐児、第117回日本眼科学会総会、基礎研究セミナー「他分野の基礎研究から学ぶ」2013年4月5日、東京国際フォーラム
13. Ultrasonication-triggered amyloid fibrillation of proteins. Goto, Y. USE2012, 2012年11月13日、千葉大学
14. 超音波による蛋白質溶液の過飽和状態の解消、後藤祐児、第21回ソノケミストリー討論会2012年11月9日、松本
15. Toward understanding a unifying principle of protein folding and aberrant aggregation. Goto, Y. 15th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry, August 20-24, 2012, Kinki University, Higashi-Osaka
16. Toward understanding a unifying principle

of protein folding and aberrant aggregation. Goto, Y. The 3rd Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins, July 6, 2012, Seoul National University, Seoul, Korea

〔図書〕(計 1件)

1. 櫻井一正、後藤祐児、アミロイド線維の構造と形成機能 - 研究の歴史と現在の試み、**揺らぎ・ダイナミクスと生体機能 物理化学的視点から見た生体分子** (寺嶋正秀編) pp. 170-182 化学同人(2013).

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1件)

- 名称：過飽和析出物検出装置および過飽和析出物検出方法
 発明者：後藤祐児他
 権利者：大阪大学、エレコン科学
 種類：特許 5360447
 番号：2012-119133
 出願年月日：2012年5月25日
 取得年月日：2013年9月13日
 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/physical/yoeki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 祐児 (GOTO, Yuji)
 研究者番号：40153770

(2) 研究分担者

八木 寿梓 (YAGI, Hisashi)
 平成 24-25 年度
 研究者番号：10432494
 鳥取大学工学部、助教

(3) 連携研究者

櫻井 一正 (SAKURAI, Kazumasa)
 研究者番号：10403015
 近畿大学先端科学研究所、講師

加治 優一 (KAJI, Yuichi)

研究者番号：50361332
 筑波大学人間総合科学研究科、准教授