

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570143

研究課題名(和文)ミスフォールディングタンパク質凝集における分子シャペロンダイナミクス

研究課題名(英文)Role of molecular chaperone protein in aggregation of misfolded proteins

研究代表者

座古 保 (ZAKO, TAMOTSU)

愛媛大学・理工学研究科・教授

研究者番号：50399440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：分子シャペロンタンパク質がアルツハイマー病などの疾病の原因とされるアミロイド凝集に与える影響を検証した。分子シャペロンの1種であるプレフォルディングはアミロイド(A^{*})やポリグルタミンタンパク質の凝集を抑制した。得られた可溶性オリゴマーは低毒性であり、高毒性オリゴマーと比較して表面構造が異なることが示唆された。また別の分子シャペロンであるスモールヒートショックプロテインはアミロイド凝集体の低毒性化に寄与することが分かった。

研究成果の概要(英文)：We investigated effect of molecular chaperone protein on aggregation of misfolded proteins, which is considered to cause various diseases including Alzheimer's disease (AD). Prefoldin (PFD) is a chaperone that captures unfolded proteins and delivers them to chaperonin for functional folding. We found that human PFD (hPFD) inhibited amyloid (A^{*}) fibrillation and induced formation of soluble A^{*} oligomers, which showed lower cell toxicity and different surface structure compared with toxic oligomers. These results suggest a relation between cytotoxicity of A^{*} oligomers and structure. We also demonstrated that hPFD could prevent aggregation of polyglutamine (polyQ) that causes Huntington disease, and could protect neuronal cells from polyQ toxicity. It was also found that small heat shock protein (sHsp) from yeast could induce formation of less-toxic A^{*} aggregates, suggesting a possible protective role of sHsp in disease pathology.

研究分野：生物科学・構造生物化学

キーワード：アミロイド凝集 分子シャペロンタンパク質 アルツハイマー病 一分子蛍光イメージング プレフォ
ルディング スモールヒートショックプロテイン

1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質ミスフォールディング病とよばれる、天然構造が壊れ、間違っただフォールディング(ミスフォールディング)をしたタンパク質が凝集することが原因で病気が引き起こされる例が多く見つかっており、社会的問題となっている。代表的な疾病であるアルツハイマー病においてはアミロイドβタンパク質(Aβ)などの凝集体が主な病因と考えられている。特に、Aβの凝集形成中間体である可溶性オリゴマーは毒性が高いことから、近年は主な病因の一つと考えられているが、その形成機構・毒性メカニズムはまだ明らかではない。

一方、生体内では、分子シャペロンタンパク質がタンパク質の凝集抑制に関与していることが知られている。申請者はこれまで、プレフォルディン(PFD)と呼ばれる分子シャペロンにより、Aβの幅広い重合度(3~数十量体)の可溶性オリゴマーが生成することを発見した。生成した可溶性オリゴマーは高毒性を有し、アポトーシスによる細胞死を誘導したことから、プレフォルディンがアルツハイマー病発症に関与している可能性が初めて示唆された。

プレフォルディンはクラゲ状のきわめてユニークな構造を有し、様々なタンパク質のフォールディングに関与すると考えられている分子シャペロンの1つである。申請者はこれまでにプレフォルディンが他の分子シャペロンであるシャペロニンとともにタンパク質のフォールディングを促進するメカニズムの一端を明らかにしてきた。分子シャペロンは本来凝集を抑制し、細胞には有利に働くと考えられていたので、これは予想外の結果であった。そこで本研究では、まずこの発見をさらに発展させ、プレフォルディンによるオリゴマー形成メカニズムを詳細に分析するとともに、ポリグルタミンタンパク質など疾病の原因とされる他のタンパク質凝集における分子シャペロンの働きを明らかにすることを目的とした。

分子シャペロンには様々な種類があり、これまでもシャペロニン、スモールヒートショックプロテインなど、他の分子シャペロンタンパク質もミスフォールディングタンパク質の凝集を抑制し、疾病に関与することが知られている。一方で、これらの分子シャペロンはダイナミックな構造変化をおこす。申請者はこれまでにスモールヒートショックプロテインの熱などのストレス依存的な会合状態変化などのダイナミックな構造変化が分子シャペロンとしての機能発現に重要なことを明らかにしてきた。そこで本研究課題では、これまで明らかでなかった、これら分子シャペロンと疾病の関与メカニズムを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、分子シャペロンタンパク質がアミロイド凝集に与える影響を明らかにするために、以下の項目について研究を行った。

- ① 分子シャペロンプレフォルディンによるAβ凝集への影響
- ② ポリグルタミンタンパク質など、Aβ以外の凝集形成への関与の解明
- ③ スモールヒートショックプロテインなど他の分子シャペロンタンパク質のアミロイド凝集への関与の解明

3. 研究の方法

生化学的手法や1分子蛍光イメージング法などを用いてプレフォルディンがAβやポリグルタミンタンパク質などのアミロイドタンパク質の凝集に与える影響を調べた。

①では、まずヒト由来プレフォルディンがAβ凝集に与える影響を検証する。これまで古細菌由来のプレフォルディン存在下でAβ凝集の可溶性オリゴマーが生成することを見出したが、ヒト由来プレフォルディンで同様の現象がおこるかを調べる。生成した可溶性オリゴマーに関しては、細胞毒性や抗体反応性などにより、その性質を明らかにする。

②ではヒトポリグルタミンタンパク質(ハンチントン病)など、疾患の原因とされる代表的なタンパク質にも同様の働きをし得るかを明らかにする。アミロイドタンパク質は凝集形成過程で様々な分子量のオリゴマーを形成するが、1分子レベルで観察することにより可能となる。さらにアミロイドタンパク質発現細胞において、プレフォルディンをノックダウンしたときの細胞内凝集体の量変化や細胞の生存に与える影響を生化学的手法により明らかにする。

③ではスモールヒートショックプロテインなど、他の分子シャペロンの凝集性タンパク質への関与機構を明らかにする。とくに申請者がこれまでに明らかにしたダイナミックな構造変化と凝集抑制効果との相関を明らかにする。スモールヒートショックプロテインは熱などのストレスに応じて会合状態を変えることでタンパク質凝集を抑制するシャペロン活性を発揮すると考えられているが、この構造ダイナミクスがAβ凝集への影響は明らかでなかった。我々はこれまでに酵母由来のスモールヒートショックプロテイン(SpHsp)が温度によりオリゴマー・ダイマーの会合状態を変えることを見出しているおり、SpHspをモデルsHspとして会合状態のAβ凝集への影響を調べた。

4. 研究成果

① 分子シャペロンプレフォルディンによるA β 凝集への影響

分子シャペロンの一つであるヒト由来プレフォルディン (hPFD) がA β 凝集に与える影響を調べた。hPFDが脳内で発現していることは分かっていたが、本研究で、アルツハイマー病モデルマウスの脳内でPFDが通常マウスより多く発現していることが分かった。さらに、本研究によりhPFDがA β 凝集を抑制していることが明らかとなった。これらは可溶性オリゴマー構造をとっていたが、興味深いことに細胞毒性を示さなかった。特にA β オリゴマーに関しては毒性の高いオリゴマーと比較して、異なる抗体認識を示したことから、可溶性オリゴマーの毒性と表面構造に相関があることが明らかとなった。

② ポリグルタミンタンパク質など、A β 以外の凝集形成への関与の解明

進行性神経変性疾患の一つであるハンチントン病の原因とされる、ポリグルタミンタンパク質 (polyQ) 凝集に対するヒト由来プレフォルディン (hPFD) の与える影響を調べた。今回hPFDがpolyQ凝集を抑制していることが明らかとなった。またPFDノックダウン細胞内では可溶性PolyQ凝集が増加しており、PFDがオリゴマー形成の段階で凝集抑制することが示唆された。またhPFDノックダウン細胞では、PolyQ凝集による細胞死が増加しており、hPFDの神経保護作用が示唆された。また、一分子解析の結果、hPFD存在下では数量体以内の低分子量オリゴマー構造をとることが示唆された。これらの結果は、プレフォルディンがポリグルタミンタンパク質の凝集を抑制し、低毒性の低分子量オリゴマー状態で安定化していることを示唆している。

③ スモールヒートショックプロテインのA β 凝集への関与の解明

分子シャペロンの一つであるスモールヒートショックプロテイン (sHsp) のA β 凝集への影響を調べた。sHspはアルツハイマー病患者脳で見つかっており、A β 凝集への関与が考えられる。sHspは熱などのストレスに応じて会合状態を変えることでタンパク質凝集を抑制するシャペロン活性を発揮すると考えられているが、この構造ダイナミクスのA β 凝集への影響は明らかでなかった。我々はこれまでに酵母由来のsHsp (SpHsp) が温度によりオリゴマ

ー・ダイマーの会合状態を変えることを見出しているおり、SpHspをモデルsHspとして会合状態のA β 凝集への影響を調べた。その結果オリゴマー状態のSpHspはA β 凝集を抑制し、ダイマー状態ではA β 凝集を抑制はしないが、無毒性のA β 凝集形成に貢献していることを見出した。これらはsHspが異なる構造状態において、異なるメカニズムによりA β 凝集の抑制もしくは低毒性化に貢献していることを示している。

さらにヒト由来のスモールヒートショックプロテイン (hsHsp) がA β 凝集に与える影響を調べた。今回リン酸化により会合状態を制御したhsHspを用いてA β 凝集への影響を調べたところ、会合状態であっても解離状態であってもA β 凝集を抑制することが示された。さらにhsHsp存在下ではA β サンプルの毒性も低減していた。これらの結果はヒト由来sHspでは構造状態に関わらずA β 凝集および毒性を抑制していることを示している。

④ A β 凝集を高感度に検出する手法の開発

さらに金ナノ粒子を用いてアミロイド凝集を超高感度に検出する手法を開発した。A β 抗体を修飾した金ナノ粒子がA β 凝集に結合して生成するナノ粒子凝集を暗視野顕微鏡により単一クラスターレベルで観察することで、40 pMのA β 凝集を検出することに成功した。

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 14 件)

- ① Tamotsu Zako, Muhamad Sahlan, Sayaka Fujii, Yohei Y. Yamamoto, Phan The Tai, Kotaro Sakai, Mizuo Maeda and Masafumi Yohda "Contribution of the C-terminal region of a group II chaperonin to its interaction with prefoldin and substrate transfer" *J. Mol. Biol.*, 428, 2405-17 (2016) DOI: 10.1016/j.jmb.2016.04.006 査読有
- ② Tong Bu, Tamotsu Zako and Mizuo Maeda "Dark field microscopic sensitive detection of amyloid fibrils using gold nanoparticles modified with antibody" *Anal. Sci.*, 32, 307-11 (2016) DOI: 10.2116/analsci.32.307 査読有
- ③ Tong Bu, Tamotsu Zako, Martin Zeltner, Karin M. Sorgjerd, Christoph M. Schumacher, Corinne J. Hofer, Wendelin J. Stark and Mizuo Maeda "Adsorption and separation of amyloid beta aggregates using ferromagnetic nanoparticles coated with charged polymer brushes" *J. Mater.*

- Chem. B*, 3, 3351-7 (2015) DOI: 10.1039/C4TB02029D 査読有
- ④ Tamotsu Zako and Mizuo Maeda "Application of biomaterials for the detection of amyloid aggregates" *Biomater. Sci.* 2, 951-5 (2014) DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C4BM00026A> 査読有
- ⑤ Eisuke Takai, Ken Uda, Shuhei Matsushita, Yui Shikiya, Yoichi Yamada, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda and Kentaro Shiraki "Cysteine Inhibits Amyloid Fibrillation of the Lysozyme and Directs the Formation of Small Worm-like Aggregates through Non-Covalent Interactions" *Biotech. Prog.* 30, 470-8 (2014) DOI: 10.1002/btpr.1866 査読有
- ⑥ Eisuke Takai, Gai Ohashi, Tomonori Yoshida, Karin M. Sorgjerd, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Katsuhisa Kitano and Kentaro Shiraki "Degeneration of Amyloid- β Fibrils by Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma in Aqueous Solution" *Appl. Phys. Lett.* 104, 023701 (2014) DOI: 10.1063/1.4861842 査読有
- ⑦ Eisuke Takai, Ken Uda, Tomonori Yoshida, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Yoichi Yamada and Kentaro Shiraki* "Cysteine Inhibit Fibrillization and Cytotoxicity of Amyloid- β 40 and 42: Implication for Contribution of Thiophilic Interaction" *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 3566-72 (2014) DOI: 10.1039/c3cp54245a 査読有
- ⑧ Aline C.C. Rotzetter, Christoph M. Schumacher, Tamotsu Zako, Wendelin J. Stark and Mizuo Maeda "Rapid Surface-Biostructure Interaction Analysis using strong Metal-based Nanomagnets" *Langmuir* 29, 14117-14123 (2013) DOI: 10.1021/la4026427 査読有
- ⑨ Helene Vignaud, Claude Bobo, Ioan Lascu, Karin M. Sorgjerd, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Benedicte Salin, Sophie Lecomte and Christophe Cullin "A structure-toxicity study of Abeta42 reveals a new anti-parallel aggregation pathway" *PLoS ONE* 8,e80262 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0080262 査読有
- ⑩ Erika Tashiro, Tamotsu Zako, Hideki Muto, Yoshinori Ito, Karin Sorgjerd, Naofumi Terada, Akira Abe, Makoto Miyazawa, Akira Kitamura, Hirotake Kitaura, Hiroshi Kubota, Mizuo Maeda, Takashi Momoi, Sanae M.M. Iguchi-Ariga, Masataka Kinjo, and Hiroyoshi Ariga "Prefoldin protects neuronal cells from polyglutamine toxicity by preventing aggregation formation" *J. Biol. Chem.* 288, 19958-72 (2013) DOI: 10.1074/jbc.M113.477984 査読有
- ⑪ Karin M. Sorgjerd, Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Peter C Stirling, Michel R Leroux, Takashi Saito, Per Nilsson, Misaki Sekimoto, Takaomi C. Saido, and Mizuo Maeda "Human prefoldin inhibits Abeta fibrillation and contributes to formation of non-toxic Abeta aggregates" *Biochemistry* 52, 3532-42 (2013) DOI: 10.1021/bi301705c 査読有
- ⑫ Naofumi Terada, Tamotsu Zako and Mizuo Maeda "Photon counting histogram using numerical data of point spread function" *Jpn. J. Appl. Phys.* 53, 038001 (2013) DOI: 10.7567/JJAP.52.038001 査読有
- ⑬ Masafumi Sakono, Arata Utsumi, Tamotsu Zako, Tetsuya Abe, Masafumi Yohda and Mizuo Maeda "Formation of non-toxic A β fibrils by small heat shock protein under heat-stress condition" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 1259-64 (2013) DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.059 査読有
- ⑭ Katarzyna M. Psonka-antonczyk, Julien Duboisset, Bjorn T. Stokke, Tamotsu Zako, Takahiro Kobayashi, Mizuo Maeda, Sofie Nystrom, Jeff Mason, Per Hammarstrom, K. Peter. R. Nilsson, Mikael Lindgren "Nanoscopic and photonic ultrastructural characterization of two distinct insulin amyloid states" *Int. J. Mol. Sci.* 13, 1461-80 (2012) DOI: 10.3390/ijms13021461 査読有
- [学会発表] (計 22 件)
- ① Tamotsu Zako "Nanoparticles for sensitive bio-detection and bioimaging" 2016 International Biomedical Interface Symposium, 2016.3.4, Taipei, Taiwan
- ② 座古保「ナノ粒子を用いた高感度生体分子検出」第3回 ISIT ナノ・バイオフォーラム、2016年2月15日、福岡市産学連携交流センター (福岡県・福岡市)
- ③ 座古保「ナノ粒子を用いた生体分析化学」第13回プラスモニクスシンポジウム、2016年1月22日、愛媛大学 (愛媛県・松山市)
- ④ Tamotsu Zako "Ultrasensitive detection of biomolecules using aggregation of functionalized gold nanoparticles", *Pacificchem2015*, 2015.12.15, Honolulu, USA
- ⑤ 座古保「産業応用にむけた分子シャペロンタンパク質の機能探索」第67回生物工学会年会ワークショップ、2015年10月28日、城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市)
- ⑥ Tamotsu Zako "Nanoparticle engineering

for sensitive bio-detection and bioimaging" KSBBS, 2015.10.13, Seoul, Korea

- ⑦ Tamotsu Zako (Keynote) "Biomolecule detection using functionalized nanoparticles" YABEC 2015, 2015.10.14, Chunchon, Korea
- ⑧ 座古保、Bu Tong、前田瑞夫 「金ナノ粒子凝集を利用した、単一クラスター観察によるタンパク質アミロイド凝集体の高感度検出」 日本分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 11 日、九州大学伊都キャンパス（福岡県・福岡市）
- ⑨ 座古保、Bu Tong、前田瑞夫 「金ナノ粒子凝集を利用した、タンパク質アミロイド凝集体の高感度検出」 第 75 回分析化学討論会、2015 年 5 月 23 日、山梨大学（山梨県・甲府市）
- ⑩ 座古保「分子シャペロンタンパク質の新機能探索」第 14 回蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 27 日、ワークピア横浜（神奈川県・横浜市）
- ⑪ Tamotsu Zako "Formation of protein aggregates and their toxicity" KIFIEE 2014, 2014.3.18, Kyoto, Japan
- ⑫ 座古保「分子シャペロンタンパク質の機構解明と機能探索」、九州大学未来化学創造センター ナノバイオアセンブリワークショップ、2013 年 11 月 15 日、福岡市産学連携交流センター（福岡県・福岡市）
- ⑬ 吉田知識、座古保、カリン ソルヤード、前田瑞夫 「分子シャペロン sHsp の会合状態のアミロイド β 凝集への影響」第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12 日、とりぎん文化会館（鳥取県・鳥取市）
- ⑭ 吉田知識、座古保、カリン ソルヤード、前田瑞夫 「分子シャペロン sHsp の会合状態のアミロイド β 凝集への影響」第 85 回日本生化学会年会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
- ⑮ 座古保、前田瑞夫 「シャペロン工学：分子シャペロンタンパク質の新しい機能探索」第 64 回生物工学会年会、2012 年 10 月 26 日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）
- ⑯ Tamotsu Zako "Chaperone engineering - New bio-functions of molecular chaperone protein" KIFEE 2012, 2012.9.11, Trondheim, Norway

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：アミロイド凝集状態にある化合物の金属コロイドを用いた検出システム

発明者：迫野昌文、座古保、前田瑞夫

権利者：独立行政法人科学技術振興機構

種類：特許権

番号：第 5368284 号

取得年月日：平成 25 年 9 月 20 日

国内外の別：国内

〔その他〕

報道関連情報

- ① 愛媛新聞 2016 年 4 月 25 日 4 面「アルツハイマー病原因物質/高感度検出法開発」
- ② 日刊工業新聞 2015 年 9 月 10 日 25 面「アルツハイマー病の原因物質/金ナノ粒子で高感度検出」
- ③ 日刊工業新聞 2013 年 5 月 3 日 15 面「分子シャペロン/アミロイド凝集抑制/アルツハイマー病に影響」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

座古保 (ZAKO TAMOTSU)

愛媛大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：50399440