

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：63903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24654112

研究課題名(和文)パルス ESR による距離計測技術を用いたプリオン凝集体構造の解明

研究課題名(英文)DISTANCE MEASUREMENTS OF FIBROUS PRION PROTEINS BY PULSE ESR SPECTROSCOPY

研究代表者

中村 敏和 (NAKAMURA, Toshikazu)

分子科学研究所・物質分子科学研究領域・准教授

研究者番号：50245370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究はプリオン凝集体形成の解明のために行った。プリオンは一定の構造を持たないN末端領域とC末端には三つのヘリックス構造から成っている。本研究では各ドメインにスピンプローブを導入し、凝集させ、連続波あるいはパルス電子スピン共鳴(ESR)計測した。分子間の距離計測は得られたスペクトルデータをモンテカルロシミュレーション法によるフィティングにより算出した。その結果、プリオン凝集体は互いの分子のN末端領域間は一定の分子間距離を持たないが、C末端ヘリックス領域間は近接している事が明らかとなった。これはプリオンが凝集する際にヘリックス領域が凝集体コアの形成に関わっている可能性が大きいことを示している。

研究成果の概要(英文)：This research was performed to clarify the mechanism of formation of the prion filaments. The structure of prion monomer consists of a tertiary C-terminal domain (three alpha-helices, H1, H2 and H3) and an N-terminal random domain. In the experiments, recombinant prion protein with a cysteine mutation was created by E. Coli expression system and the cysteine residue was labeled by nitroxide spin probe. After aggregated prion filaments induced by detergent, the spin-spin interaction was measured by X-band and continuous-wave (CW) electron spin resonance (ESR) or Q-band pulse ESR spectrometer. The inter-spin distance was determined by Monte Carlo fitting for electron-electron interaction signals. The inter-spin distance of prion filaments spin-labeled at H1 or H2 is shorter than that of H3. However, the inter-spin distance of N-terminal domain was not estimated because of polydispersity in distance. These data suggested that H1 and H2 were involved in formation of prion filaments.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・物性II

キーワード：プリオン凝集体 クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD) 狂牛病(ウシ海綿状脳症、BSE) 電子スピン共鳴法(ESR) 電子-電子二重共鳴法(DEER) 電子間相互作用 距離計測

1. 研究開始当初の背景

ヒトクロイツヘルトヤコブ病 (CJD) やウシ海綿状脳症 (BSE) はプリオンが長期の時間をかけて線維状の凝集体が脳に過剰に蓄積することが原因である考えられている。しかし、その形成機構は良く解っていないのが現状である。CJD やヒトの致死性家族性不眠症などの家族性プリオン病には特定のプリオンの 178 番目のアスパラギン酸 (D178) がアスパラギン (N) に突然変異を起こしていることが引き金となって凝集体を形成しやすい病態があり、しばしば凝集体形成メカニズムに用いられてきている。現在までプリオンタンパク質の C 末端領域の一部のフラグメントやドメインを対象とした NMR (Bioinorg Chem Appl. 2007:10720, 2007) や ESR (PNAS 104:18945, 2007) などの磁気共鳴法を用いた研究が行われているが、全長のプリオンタンパク質を対象とした動力学的研究や構造生物学的研究は方法論の制約から殆ど行われておらず、繊維状凝集体の実像は分かっていない。

部位特異的にスピラベルを導入し ESR 法で解析する方法 (SDSL 法) は高分子物質や結晶構造の作成が困難な物質の動的解析に広く用いられてきている (Biol Chem. 294:1281, 2013)。北大の研究グループではプリオンタンパク質がシステイン (Cys) 残基を持たないことに着目し、組換えプリオン蛋白質の任意のアミノ酸残基に Cys 残基を導入し、ニトロオキシドプローブによりスピラベルを行い (Fig. 1) ヘリックス構造の運動性 (BBRC. 335:785, 2005)、pH 感受性 (BBRC. 350:549, 2006, J Biomol Struct Dyn. 26:355, 2008, BBRC. 366:244, 2008)、新しい Cu^{2+} との結合部位の解析などを報告している (BBRC. 394:522, 2010)。この研究では組換えプリオンタンパク質は凝集体を形成する効率が極めて低く、凝集体の構造解析を行う事はできなかった。また、近年、この SDSL 法で 2 点のニトロオキシド間の距離計測を行う事ができ、これを用いて他の方法で解析困難な分子の構造解析に広く、応用されてきている (Methods in Mol. Biol. 752:73, 2011)。この方法では通常の X バンドの持続波 (CW) ESR を用いた場合は 2.5 nm 程度まで、パルス ESR を用いた場合は 2.5 nm 以上で 8 nm までの長距離の 2 点間の距離測定が可能である。また、Q バンド (34 GHz) (Biochemistry. 48:5782, 2009) や W バンド (95 GHz) (Phys Chem Chem Phys, 14:10771, 2011) のマグネットを用い、高磁場化することで高感度化の試みも行われている。

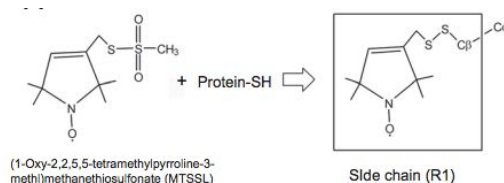


Fig. 1

2. 研究の目的

本研究は全長プリオンタンパク質にスピンプローブを導入し、繊維状凝集体を形成させたときの距離計測を行う事で、プリオン繊維状凝集体の構造の実体に迫ることを目的とした。背景でも述べたように、近年、D178N の変異をもつプリオンは容易に試験管内でプリオン凝集体を形成させる事が出来ることから、この変異タンパクを用いて構造研究に用いられている。本研究でもこの凝集しやすさに着目し、組換え D178N プリオンタンパク質を作成し、X バンド CW-ESR 法と Q バンドパルス ESR 法を用いて凝集機構の研究を行った。

3. 研究の方法

まず、ヒトプリオン DNA コドン 23-240 を大腸菌発現プラスミド pRSETba の BamHI/EcoRI サイトにクローニングし、Fig. 2 に示す様に D178 をアスパラギン残基へ、そして非凝集状態でランダム構造である N 末端の S36 と S97、Helix1 上の D144、Helix2 上の T188、Helix3 上の K204 及び C 末端の Y225 の 6 カ所のアミノ酸残基をそれぞれシステイン残基に PCR による部位特異的変異法によって変換した。この様にして D178N 変異を持ち、更に Cys 残基に置き換えた各種ヒトプリオンタンパク質を大腸菌発現系で作成した。生成した組換えタンパク質は Fig. 1 で示した反応でスピンプローブを導入した (ラベル側鎖を R1 と表記)。その後、円二色性分光法で立体構造が維持されていることを確かめた。

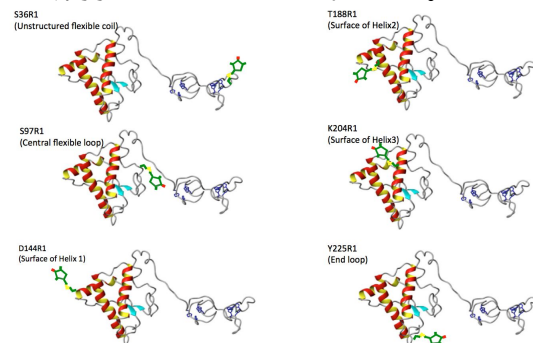


Fig. 2

X バンド CW-ESR は 77 K で計測を行い、凝集前のスペクトルと 1 M 塩酸グアニジン処理で凝集後のスペクトルを比較し、その線幅の広がりから、Monte-Carlo 法によるフィッティングにより、距離を求めた。具体的には MatLab 用の Senらにより公開されているフリーリソースソフトウェア CwdipFit (<http://ilkersen.wordpress.com/2011/05/16/cwdipfit/>) を用いて計算した。Q-バンドパルス ESR での計測の場合は凝集後、Fig. 3 に示す 4 パルス PELDOR シークエンスによる測定を 50K にて行った。観察用の 3 パルスによりエコーのシグナルを得るが、刺激用の 1 パルスを別の周波数で、入れるタイミング (t) を変えなが

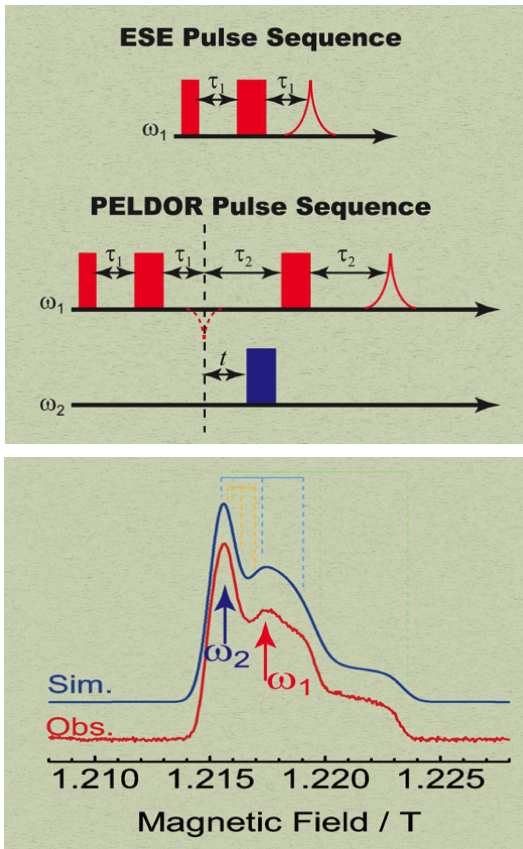


Fig. 3

ら行うことで、スピン-スピン相互作用によるエコーシグナルへの変調を計測する。このシグナルを同様に Fitting 法により解析した。解析に用いたのは同じく MatLab 用のチュリッヒ工科大学 ESR research group より公開されているフリーリソースソフトウェア-DEER2012 (<http://www.epr.ethz.ch/software/index>)を用いて行った

4. 研究成果

まず、Xバンド CW-ESR 法による凝集体のスピン間距離計測を行った。Fig.4 に青線は凝集する前のモノマーの ESR スペクトル、赤線は塩酸グアニジン処理で凝集体を形成させたものを重複させて表示したものである。上から D178N 変異を持った S34R1、S97R1、D144R1、T188R1、K204R1 ならびに Y225R1 にスピンプローブを導入したものを示している。S34R1 と S97R1 は N 末端領域で非凝集ではランダムコイルで一定の構造を持たない領域であるが、CW-ESR 法ではスペクトルが重なってしまい、距離の算出が不可能であった。これは CW-ESR での計測が 2.5 nm-3 nm が計測限界の可能性があった。そこで、Qバンドパルス ESR による計測を行っても、刺激パルスによるエコーへの修飾効果は見られなかった。これは凝集体でも N 末端領域ではランダムな構造を持ち、一定の構造を持たないため、スピン間距離は多分散となり、計測できないのでは無いかと考えられた。もう一つの可能性としてはパルス ESR 法での計測限界である 8 nm を越えている可能性も有る。既に

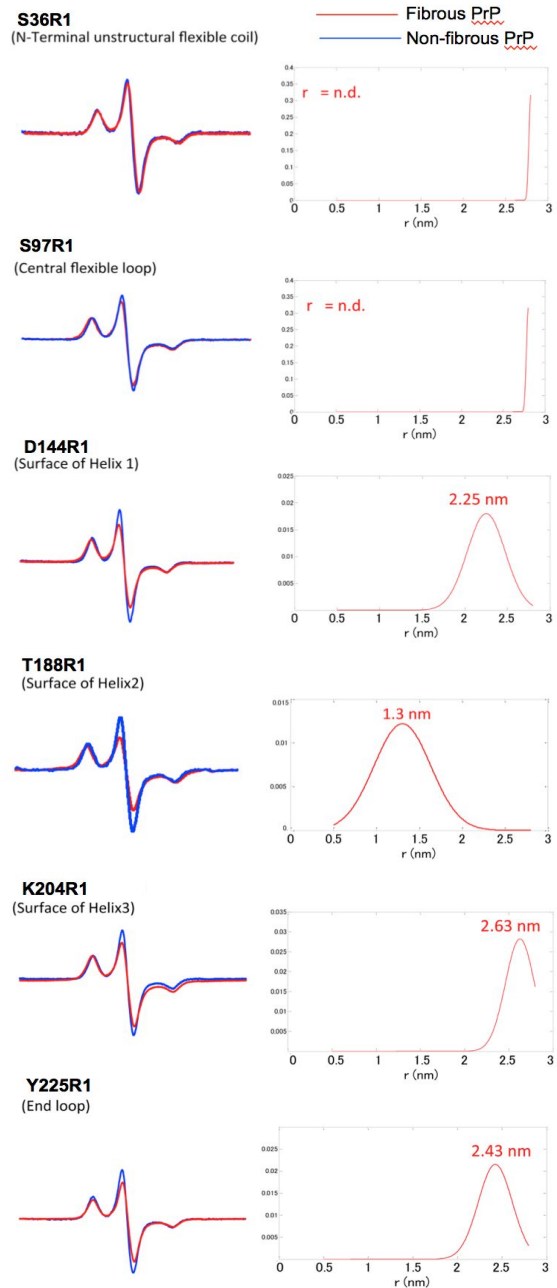


Fig. 4

報告されている電子顕微鏡や分子シミュレーションの結果 (Biochemistry, 45:15573, 2006), Biologies. 328:847, 2005)から類推すると、前者の可能性が高いと考えられる。更に、D144R1、T188R1、K204R1 ならびに Y225R1 の凝集体では、スピン-スピン相互作用を示す、線幅の広がりが見られる。スペクトルより距離計測を行うと、それぞれ 2.25nm、1.30nm、2.63nm ならびに 2.43nm をピークとする距離分布が得られた。このうち K204R1 と Y225R1 は CW-ESR 法では検出距離限界に近いので、さらに、分析を進めるためにこの二つの試料については Qバンドパルス ESR により計測した。Xバンドでは測定試料が 200 μ l が必要なのに対して同一濃度比較で 30 μ l で十分な測定が可能であった。その刺激パルスの入力時間 (Fig.3 の t) に対す

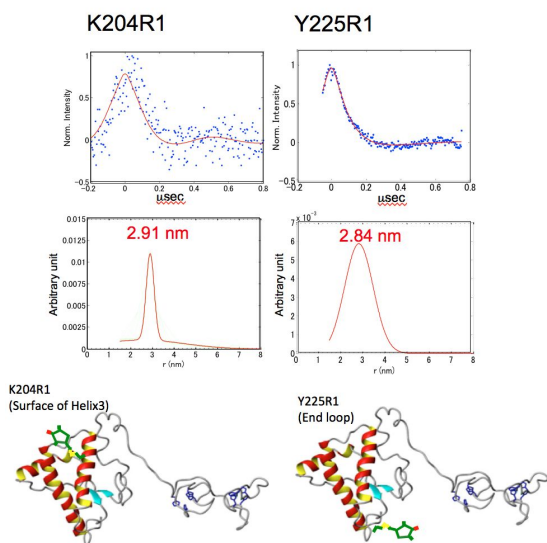


Fig. 5

るエコーシグナルの変調の関係を示す。このタイムドメインから距離を求めると、K204R1とY225R1はそれぞれ2.91 nmと2.84 nmであった。

以上の結果からN末端領域はプリオン繊維状凝集体の形成の関与は少なく、距離に近いT188R1を含むヘリックス2、D144R1を含むヘリックス1が相互作用に関わっている可能性が示唆された。今まで報告されているシミュレーションによって提唱されているモデルに当てはめてみるとFig.6の右に示したプリオンタンパク質が三量体となってディスクを形成し、これがさらに重層して繊維状になることが予想される。

今回の結果で部位特異的スピラベル法とQバンドESR法を組み合わせることで、高感度に距離計測を行う事が可能であることが明らかとなった。この方法でプリオン凝集体の立体構造形成に与するドメインの存在を明らかにする事が出来た。今後、スピラベルする場所を増やし、その距離計測を行う事によって、より明瞭なプリオン線維状構造をあきらかにすることが出来ると思われる。

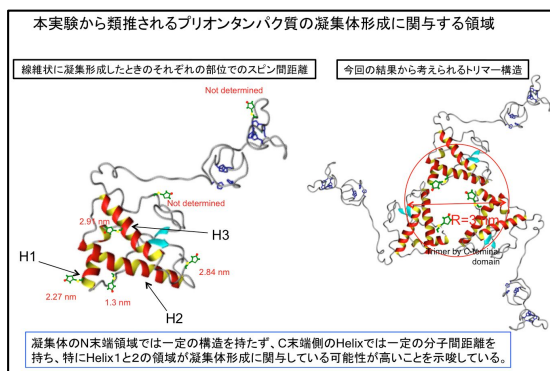


Fig. 6

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 6 件)(全て査読有り)

Nishida N, Yasui H, Nagane M, Yamamori T, Inanami O. 0.3-Methyl pyruvate enhances radiosensitivity through increasing mitochondria-derived reactive oxygen species in tumor cell lines. J Radiat Res. 2014 in press
doi: 10.1093/jrr/rrt142.

Yasui H, Takeuchi R, Nagane M, Meike S, Nakamura Y, Yamamori T, Ikenaka Y, Kon Y, Murotani H, Oishi M, Nagasaki Y, Inanami O. Radiosensitization of tumor cells through endoplasmic reticulum stress induced by PEGylated nanogel containing gold nanoparticles. Cancer Lett. 2014 347(1):151-158.
doi: 10.1016/j.canlet.2014.02.005.

Jung SB, Kim CS, Kim YR, Naqvi A, Yamamori T, Kumar S, Kumar A, Irani K. Redox factor-1 activates endothelial SIRTUIN1 through reduction of conserved cysteine sulfhydryls in its deacetylase domain. PLoS One. 2013 8(6):e65415.
doi: 10.1371/journal.pone.0065415.

Yamamori T, Meike S, Nagane M, Yasui H, Inanami O. ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51. FEBS Lett. 2013 587(20):3348-3353.
doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.030.

Nagane M, Yasui H, Yamamori T, Zhao S, Kuge Y, Tamaki N, Kameya H, Nakamura H, Fujii H, Inanami O. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013 437(3):420-425.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.093.

Yasui H, Asanuma T, Kino J, Yamamori T, Meike S, Nagane M, Kubota N, Kuwabara M, Inanami O. The prospective application of a hypoxic radiosensitizer, doranidazole to rat intracranial glioblastoma with blood brain barrier disruption. BMC Cancer. 2013 13:106.
doi: 10.1186/1471-2407-13-106

〔学会発表〕(計 9 件)

Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C., Inanami O. Longitudinal analysis of tumor oxygenation after the metabolic-targeted treatment with dichloroacetate using pulsed esr imaging. The FIRST Joint International Symposium (Sapporo meeting)/ The 1st GI-CoRE Medical Science and Engineering Symposium 2014/2/23 ~ 2/24 Sapporo Park Hotel (Sapporo, Hokkaido)

Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C., Inanami O. Optimization of the metabolic-targeted radiosensitizing treatment by longitudinal analysis of tumor oxygenation. The 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR I 2014) 2014/03/23 ~ 3/26. Kyoto International Conference Center (Kyoto, Kyoto)

Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C., Inanami O. The metabolic-targeted treatment with dichloroacetate transiently decreases tumor oxygenation in a murine squamous cell carcinoma model. The 20th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine. 2013/11/20 ~ 11/24 Sheraton Seattle (Seattle, USA)

安井博宣、齋藤圭太、西田直哉、松元慎吾、山盛徹、Murali Krishna、稲波修。パルス EPR イメージングを用いたがん代謝標的薬剤ジクロロ酢酸処理後の腫瘍内酸素環境の経時的解析。第 52 回電子スピンサイエンス学会年。2013/10/24 ~ 10/26 大宮ソニックシティ (さいたま市, 埼玉)

稲波修、山本栄輔、永根大幹、安井博宣、山盛徹。チャイニーズハムスターV79 細胞における硫化水素による放射線防護効果の検討。日本放射線影響学会第 56 回大会。2013/10/18 ~ 10/20 クラウンパレス青森 (青森市, 青森)

安井博宣、松元慎吾、齋藤圭太、山盛徹、Murali C. Krishna、稲波修。電子スピン共鳴法を用いた酸素イメージングによる腫瘍内間欠的低酸素の描出とその意義。日本放射線影響学会第 56 回大会。2013/10/18 ~ 2013/10/20 クラウンパレス青森 (青森市, 青森)

稲波修、山盛徹、安井博宣、堀内基広、平岡和佳子、古川貢、中村敏和。プリオンタンパク質凝集体の電子スピン共鳴-スピラベル法による解析。第 156 回日本獣

医学会学術総会。2013/9/20 ~ 9/22 岐阜大学 (岐阜市, 岐阜)

永根大幹、安井博宣、山盛徹、丹羽光一、稲波修。放射線による内皮型一酸化窒素合成酵素活性化における ATM および HSP90 の関与。第 156 回日本獣医学会学術総会。2013/9/20 ~ 9/22 岐阜大学 (岐阜市, 岐阜)

藤本桃子、山盛徹、安井博宣、永根大幹、大津航、木崎皓太、稲葉睦、稲波修。赤血球膜の不安定性を示すウシスペクトリンの局所的構造変化に関する研究。第 156 回日本獣医学会学術総会。2013/9/20 ~ 9/22 岐阜大学 (岐阜市, 岐阜)

〔その他〕

<http://www.ims.ac.jp/know/material/nakamura/nakamura.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 敏和 (NAKAMURA, Toshikazu)
分子科学研究所・物質分子化学研究領域・准教授
研究者番号：50245370

(2) 研究分担者

山盛 徹 (YAMAMORI, Tohru)
北海道大学大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：00512675