

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07038

研究課題名 (和文) 温度・圧力依存性に基づく蛋白質異常凝集体およびオリゴマー中間体の熱力学的解析

研究課題名 (英文) Thermodynamic analysis of pressure- and temperature-dependent structural changes of amyloid fibril and its oligomeric intermediates

研究代表者

櫻井 一正 (Sakurai, Kazumasa)

近畿大学・先端技術総合研究所・准教授

研究者番号：10403015

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : アミロイド線維は数種の疾病に関わる不溶性の蛋白質凝集体である。線維形成中にオリゴマー中間体が現れる。これらの状態の熱力学的性質の知識は、線維形成反応の全容を理解するうえで重要である。我々は圧力と温度を調節することで、アミロイド線維や中間体の形成量を制御し、各種分光法にてその構造や熱力学的性質を同定できると考えた。しかし期間初期に、線維形成の可逆性が認められず熱力学的理論的解析が難しいと判断されたため、線維中間体の現れる条件の同定と、その中間体の構造情報の取得を目指した。具体的には $\beta 2m$ 、 αSyn 、 $A\beta$ の溶媒条件依存的な構造変化を調べ、アミロイド線維形成に対する各状態の寄与を考察した。

研究成果の概要 (英文) : Amyloid fibrils are insoluble proteinaceous aggregates, related with several diseases. During their formation reactions, oligomeric intermediates were known to appear. Knowledge of thermodynamics of such intermediate states are relevant to understanding the mechanism of fibrillogenesis. We planned to control the population of the fibril and intermediate states by adjusting the pressure and temperature conditions, then spectroscopically characterize the targeted states. Unfortunately, since irreversibility of fibrillogenesis was confirmed, ideal thermodynamic analysis was considered to be inappropriate. Therefore, we focused our efforts on finding the conditions where the intermediate states will dominantly populate and characterizations of structural properties of such states. According to this aim, we investigated condition-dependent structural changes of $\beta 2m$ 、 αSyn 、 $A\beta$ and discussed the contributions of these intermediate state to the fibrillogenesis based on the obtained results.

研究分野：蛋白質物理化学

キーワード：アミロイド線維 フォールディング 凝集中間体 高圧NMR

1. 研究開始当初の背景

アミロイド線維とはアルツハイマー病やプリオン病などの患者体内で見られる不溶性の凝集体である。蛋白質分子の全体もしくは一部が変性し形成される。2000年代初めころにアミロイド線維の物理化学的研究がはじめられ、アミロイド線維形成には複数の状態が関わっていることが分かってきた。特に線維形成中にオリゴマーという少数の分子の会合中間体が現れることも報告されており、このような状態が線維形成や疾病発症に強く関わっていると考えられている。

これらの状態の熱力学的性質の知見を得ることは、線維形成反応の全容を理解するうえで重要だと考えられるようになり、様々な研究者が中間状態のキャラクタリゼーションに着手している状況である。

2. 研究の目的

我々は試料溶液の圧力(P)と温度(T)を調節することで、アミロイド線維や中間体の形成量を制御し、各種分光法にてその構造や熱力学的性質を同定できると考えた。

そもそも P と T は物質の各状態の化学ポテンシャルを決定する基本的な状態量である。蛋白質の天然状態の安定性の P と T 依存性も理論的に記述されている。そこで我々は、この理論をアミロイド線維や中間体といった異常凝集状態の解析にも適用することを考えた。線維構造状態の PT 依存性を熱力学的な理論式で解析することで、線維状態やオリゴマー状態の熱力学的性質についての知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

上の目的を果たすため以下のような基本方針を掲げた。(i): 圧力蛍光装置を用いアミロイド線維の構造状態の P (圧力) T (温度)状態図を同定する、(ii): 各状態の PT 依存性を解析することで、 ΔV や ΔC_p などの熱力学的パラメータを決定する、(iii): (i)で見出した線維もしくはオリゴマーが有意に蓄積する条件で分光測定し、これらの構造情報を得る、(iv): (ii)と(iii)の結果に基づき、中間体の構造と熱力学的性質の関連性を議論するという流れである。

しかしながら期間初期に、熱力学的解析の大前提である線維形成の可逆性が認められず(ii)の理論的解析が難しいと判断された。そのため、(i)線維中間体の現れる条件の同定と、(iii)その中間体の構造情報の取得を中心的な目標に再設定し、研究を継続した。なお、当初の予定では特に蛋白質の状態の摂動方法として P と T を考えていたが、様々な中間状態の検出のために、さらに異なる条件依存性(pH や塩、膜分子などの添加剤濃度)も検討した。具体的な測定手法として蛍光、CD、NMR、熱量計、AFM などを用いた。

実験の主な対象として、それぞれパーキンソン病、透析アミロイドーシス、アルツハイマー病の発症に関わる α シヌクレイン(α Syn)、 β 2ミクログロブリン(β 2m)やアミロイド β (A β)を用いた。

4. 研究成果

(1)本課題の研究の遂行過程

上で述べた通り、研究期間の初期にアミロイド線維の圧力変性が可逆的に進むことを前提とし、 α Syn のアミロイド線維の圧力変性の温度・圧力依存性を測定し、状態図の作成を行うことを目指した。しかし、圧力解離した α Syn 線維は除圧後再形成されない、圧力解離の挙動が線維の構造の成熟度によって異なる、といった、この想定から外れる挙動を示すことが観測された。そこで、当初の方針に修正を要することとなった。

しかし、一定の時間内で状態が可逆性を示さないのはヒステリシスがあるからであり、線維形成条件では多くの状態を実質上不可逆的にとることを示している。この性質が線維の多型の原因であると考えられる。そこで、圧力や温度、その他の条件を改変し蛋白質の構造変化を引き起こし、その多型状態のそれぞれの構造の特性を理解することが重要と方針転換をし、以下に挙げるような種々の実験を行った。

(2)圧力変性実験による β 2m の折り畳み中間体のキャラクタリゼーション

β 2m の折りたたみ過程に現れる I_T 中間体がアミロイド線維形成の前駆体であると考えられている。圧力変性状態からの折りたたみを観察することで、この状態の性質を知ることを目指した。測定の結果、中間体形成を示す速い相と、32番目のプロリンのシス-トランス異性化による遅い相からなる折り畳み挙動が観測された。得られた蛍光の圧力依存性データを解析することにより変性状態、天然状態、遷移状態間の ΔG 、 ΔV の値を得た。(図1上)その結果、 I_T 状態は非天然の構造を含み、折りたたみの過程で一度ほどける必要があることが示唆された。(図1下)

β 2m には D76N という家族性病原変異体が存在する。この変異体でも同様の測定と解析を行ったところ、 I_T 状態がより蓄積しやすく、かつ疎水性が高いことが示された。これがより高い線維形成能を持つ理由であると考えられる。

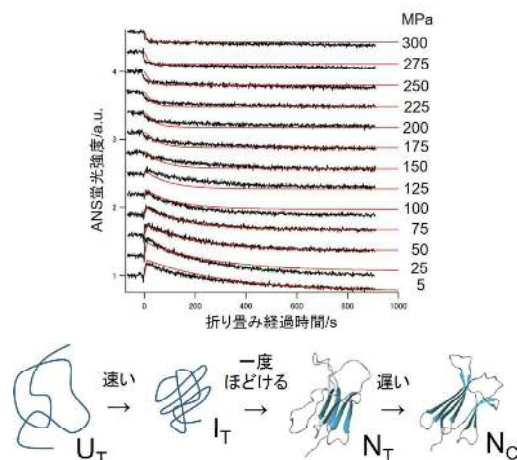


図1 (上) 高压変性状態からの折りたたみ過程の観察データ(黒線)理論曲線(赤線)。(下) 本解析から提案された、 β 2m の折りたたみ過程。

(3) β_2m モノマー構造の圧力と塩濃度依存性

β_2m は酸性 pH、中程度の濃度の塩の存在下でもアミロイド線維を形成する。種々の NMR 実験から、 β_2m は部分的に構造をもつ状態から疎水性残基が露出する「活性化」状態になり、線維核または他のモノマーと会合すると示唆されている。さらなる構造情報を得るために、我々は、これらの条件における圧力および塩濃度依存性を詳細に調べた。

圧力は蛋白質の構造に、(i) 機械的圧縮と (ii) 熱力学的転移の2通りの変化を引き起こす。我々は CS-PCA という解析法を使用し、得られた化学シフトデータを、(i)、(ii)、および塩濃度依存的なコンフォメーション変化の寄与に分解した(図2)。(ii)の構造変化は、残存構造の崩壊を反映する。塩の添加は、圧力とは異なる構造変化を引き起こし、疎水性クラスターの形成を促進し、アミロイド線維形成能を上昇させていることが示された。

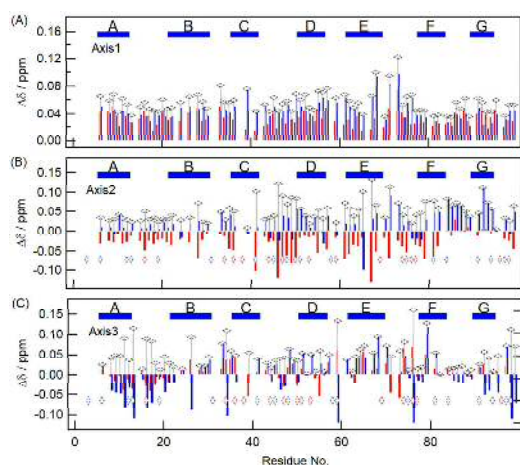
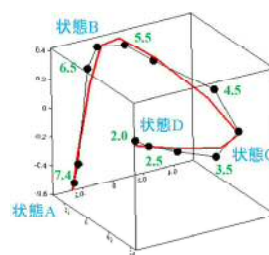


図2 圧力と塩濃度依化学シフトデータを主成分解析した結果。(A)力学的圧縮、(B)熱力学的転移、(C)塩の効果に伴う化学シフトの寄与。

(4) αSyn モノマー構造の pH 依存性

αSyn は中性 pH では剛直な、酸性 pH では短く不定形なアミロイド線維を形成する。そこで、中性から酸性への pH 変化に伴う αSyn モノマー構造変化と、アミロイド線維の形態の関連を理解することを旨とした。

pH 7.4-2.0 の各 pH において NMR 測定を行い、得られた化学シフトデータを CS-PCA 法によって解析した。すると A~D の4状態の構造変化を経由していることが分かった。各状態間 AB, BC, CD の pKa は 6.84, 4.61, 3.37 であり、それぞれ N 末端アミノ基、側鎖カルボキシル基、C 末端カルボキシル基の pKa に近い値であった(図3上)。実際、AB では N 末端、BC では酸性残基、CD では C 末端残基の化学シフト差が大きいことが分かり、それぞれ該当する解離基のプロトン化による変化に伴う構造変化に対応していることが示された(図3下)。モノマーの疎水性は pH2.5 付近で最大になることから、C 末端のカルボキシル基のプロトン化が不定形凝集形成に重要であることが示唆された。



A-B (pH7.4-5.7)

図3 (上) αSyn 構造の pH 依存化学シフトデータの理論曲線に対する回帰分析の結果。(下) 解析によって得られた、各状態転移に関与するアミノ酸残基の位置。青、橙、赤の三角は該当する解離基の位置を示す。

(5) αSyn や $A\beta$ の膜分子誘起線維形成

脂質膜存在下における前駆体蛋白質の構造状態がアミロイド線維形成にどのように寄与するか理解するために、野生型 αSyn および C 末端の負電荷領域を切断した変異体 (αSN_{103}) とシナプス前小胞を模したモデル膜に対する線維形成との関係を調べた。野生型、変異体共に膜と相互作用する際に α ヘリックス構造を形成し、アミロイド原線維を形成した。興味深いことに、モデル膜の濃度増加に伴い、野生型の線維形成の促進と阻害が観察された(図4左)。低脂質濃度では、膜結合 αSyn の局所濃度を増加させる一方、高脂質濃度では、モデル膜の数の増加による希釈によって線維形成が阻害されたと考えられる。一方変異体は、どの濃度でもモデル膜上でアミロイド原線維を形成した(図4右)。この結果から、N 末端領域の α ヘリックス形成が線維形成に必須であり、C 末端領域がその線維形成能を制御していることを示した。(発表論文 2 参照)

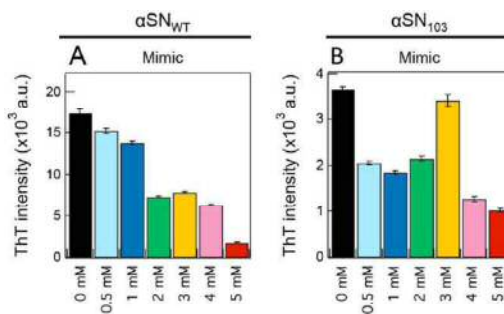


図4 野生型 αSyn (左)と変異体(右)の線維形成量のモデル膜分子濃度依存性。

また我々は、POPC という脂質分子からなる小型 (SUV) および大型単層ベシクル (LUV) 上での $A\beta_{1-40}$ と $A\beta_{1-42}$ ペプチドのアミロイド形成についても調べた。 $A\beta_{1-42}$ は SUV 上で POPC 濃度に依存して様々な形態の線維を形成した。一方 LUV 上では低 POPC 濃度で線維化に影響は見られなかったものの高濃度下では線維化は抑制された。

これらの結果から、以下のようなベシクルサイズ依存的 $A\beta$ アミロイド形成のモデルを提案した。(図5)つまり、SUV には不均質な膜構造の欠陥があり、その局所構造の違いにより様々な形態の線維核生成を誘導することで多型を生じさせていると考えられる。一方 LUV の方はそのような局所構造の差異はなく、LUV 増加により α Syn の時のような希釈効果を引き起こしていることが考えられる。(発表論文 6 参照)

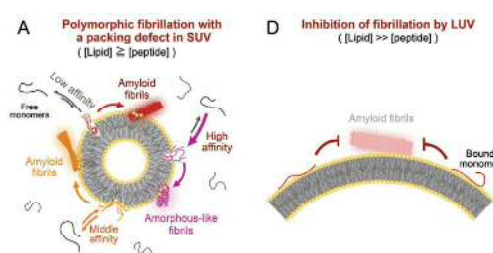


図5 本実験から提案された、SUV 上の構造多型の機構(左)と LUV 上の線維形成阻害機構(右)の模式図。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Lee Y.-H. and Ramamoorthy A. Semen-Derived Amyloidogenic Peptides – Key Players of HIV Infection. (2018) *Pro. Sci.* In press (査読有。以下特筆ない場合は査読有)
2. Terakawa M.S.*, Lee Y.-H.*, Kinoshita M.*, Lin Y., Sugiki T., Fukui N., Ikenoue T., Kawata Y. and Goto Y. Membrane-induced initial structure of α -synuclein control its amyloidogenesis on model membranes. (2018) *Biochim. Biophys. Acta.-Biomembranes* 1860, 757-766 (*equal contribution)
3. Nitani, A., Muta, H., Adachi, M., So, M., Sasahara, K., Sakurai, K., Chatani, E., Naoe, K., Ogi, H., Hall, D., and Goto, Y. Heparin-dependent aggregation of hen egg white lysozyme reveals two distinct mechanisms of amyloid fibrillation. (2017) *J Biol Chem*, 292, 21219-21230.
4. Sakurai, K., Yagi, M., Konuma, T., Takahashi, S., Nishimura, C., and Goto, Y. Non-Native alpha-Helices in the Initial Folding Intermediate Facilitate the Ordered Assembly of the beta-Barrel in beta-Lactoglobulin. (2017) *Biochemistry*, 56, 4799-4807.

5. Korshavn K.J., Satriano C., Lin Y., Zhang R., Dulchavsky M., Bhunia A., Ivanova M.I., Lee Y.-H., La Rosa C., Lim M.H. and Ramamoorthy A. Reduced Lipid Bilayer Thickness Regulates the Aggregation and Cytotoxicity of Amyloid- β . (2017) *J. Biol. Chem.* 29, 4638-4650.
6. Kinoshita M., Kakimoto E., Terakawa M.S., Lin Y., Ikenoue T., So M., Sugiki T., Ramamoorthy A., Goto Y. and Lee Y.-H. Model Membrane Size-dependent Amyloidogenesis of Alzheimer's Amyloid- β peptides. (2017) *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 16257-16266
7. Kinoshita M., Lin Y., Nakatsuji M., Inui T. and Lee Y.-H. Kinetics and polymorphs of yeast prion Sup35NM amyloidogenesis. (2017) *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 1241-1249
8. Kinoshita M., Kim J.Y., Kume S., Lin Y., Mok K. H., Kataoka Y., Ishimori K., Markova N., Kurisu G., Hase T., Lee Y.-H. Energetic basis on interactions between ferredoxin and ferredoxin NADP⁺ reductase at varying physiological conditions. (2017) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 909-915.
9. Alsanousi N., Sugiki T., Furuita K., So M., Lee Y.-H., Fujiwara T. and Kojima C. Solution NMR Structure and Inhibitory Effect against Amyloid- β Fibrillation of Humanin Containing a d-Isomerized Serine Residue. (2016) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 647-653.
10. Lin Y., Kardos J., Imai M., Ikenoue T., Kinoshita M., Sugiki T., Ishimori K., Goto Y. and Lee Y.-H. Amorphous Aggregation of Cytochrome c with Inherently Low Amyloidogenicity Is Characterized by the Metastability of Supersaturation and the Phase Diagram. (2016) *Langmuir* 32, 2010-2022.
11. Sakurai K., Nakahata R., Lee Y.-H., Kardos J., Ikegami T. and Goto Y. Effects of a Reduced Disulfide Bond on Aggregation Properties of the Human IgG1 CH3 Domain. (2015) *Biochim. Biophys. Acta.-Proteins and Proteomics* 1854, 1526-1535
12. Micsonai A., Wien F., Kernya L., Lee Y.-H., Goto Y., Réfrégiers M. and Kardos J. Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy. (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E3095-103
13. Oktaviani N.A., Risør M.W., Lee Y.-H., Megens R.P., de Jong D.H., Otten R., Scheek R.M., Enghild J.J., Nielsen N.C., Ikegami T. and Mulder F.A.A. Optimized Co-Solute

Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Rapid NMR Analysis of a Highly Fibrillogenic Peptide. (2015) *J. Biomol. NMR* 62, 129-142

14. 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. Ultrasonication-Dependent Formation and Degradation of α -Synuclein Amyloid Fibrils. (2015) *Biochim. Biophys. Acta.-Proteins and Proteomics* 1854, 209-217
15. Terakawa M.S., Yagi H., Adachi M., Lee Y.-H. and Goto Y. Small Liposomes Accelerate the Fibrillation of Amyloid beta (1-40). (2015) *J. Biol. Chem.* 290, 815-826

[学会発表] (計 23 件)

1. 櫻井 一正. 蛋白質圧力変性のNMR 化学シフトデータの二次式回帰分析法と主成分分析による解析結果の比較. 第 58 回高圧討論会. 2017 年 11 月 10 日、名古屋大学、名古屋市.
2. Lee Y.-H. Thermodynamics of protein misfolding and aggregation. *Samsung Global Research Symposium on Structure, Dynamics, and Thermodynamics of Biomolecular Networks*, November 2-4, 2017, Seoul, Korea
3. Lee Y.-H. Delicate interprotein interactions control the onset of Parkinson's disease and apoptosis. *The 8th KRIBB ASIA-PACIFIC IDP SYMPOSIUM*, October 19-21, 2017, Deajeon, Korea
4. Lee Y.-H. Thermodynamics of protein misfolding and aggregation. *Invited seminar at Kanazawa University*, October 4, 2017, Kanazawa, Japan
5. 牟田 寛弥、宗 正智、櫻井 一正、後藤 祐児. 複数のアミロイド性ペプチドの混在する複雑な系におけるアミロイド線維形成機構. 第 55 回日本生物物理学会年会. 2017 年 9 月 20 日、熊本大学 黒髪北地区.
6. 李 映昊. New approaches for the diagnosis and treatment of protein misfolding diseases. Symposium on Biophysical approach on disease-related proteins toward application for medical and pharmaceutical sciences, 第 55 回日本生物物理学会年会. 2017 年 9 月 19-21 日、熊本大学 黒髪北地区.
7. Lee Y.-H. Protein misfolding and aggregation for neurodegenerative diseases and amyloidosis. *Invited seminar at the Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials of Tohoku University*, September 7, 2017, Sendai, Japan
8. 李 映昊. Lessons from the recent studies on protein aggregation for neurodegenerative diseases and amyloidosis. 2017 年光化学討論会, 2017 年 9 月 4-6 日、東北大学、仙台
9. Sakurai, K. Comparison between conventional, quadratic analysis and chemical-shift-PCA on data of pressure-dependent chemical shift changes. *8th International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP)*. August 21-24, 2017, Syoren Kaikan, Kyoto, Japan.
10. Lee Y.-H. Thermodynamics of protein misfolding and aggregation. *International Symposium on Protein Misfolding Diseases*, July 31-August 3, 2017, University of Catania, Catania, Sicily, Italy
11. Lee Y.-H. Simple and Informative NMR Application to the Study on Protein Folding, Misfolding, and Interaction. *The Annual Meeting of Korean Magnetic Resonance Society*, June 28-30, 2017, Pusan, Korea
12. Lee Y.-H. Thermodynamics and calorimetry on the biological system and disease-related protein aggregation. *Invited seminar at Konkuk University*, June 27, 2017, Chungju, Korea
13. 李 映昊. Thermodynamic study on interprotein interactions using isothermal titration calorimetry. 第 17 回日本蛋白質科学会 (ランチョンセミナー招待講演). 2017 年 6 月 20 日、仙台国際センター.
14. 櫻井 一正、中田 翔貴、中谷 歩、藤井 啓太、八谷 如美. アミロイド解離補助タンパク質アンフォルジンの発現系確立. 第 17 回日本蛋白質科学会. 2017 年 6 月 20 日、仙台国際センター.
15. 牟田 寛弥、宗 正智、櫻井 一正、後藤 祐児. Amyloid Fibrillation in Promiscuous Systems Containing Various Amyloidogenic Peptides. 第 17 回日本蛋白質科学会. 2017 年 6 月 20 日、仙台国際センター.
16. Lee Y.-H. Understanding of misled protein behavior and its control. *Invited seminar at Sookmyung Women's University*, April 18, 2017, Seoul, Korea
17. Lee Y.-H. New findings on thermodynamic properties of disease-inducing protein aggregation. *Japan-Korea Bilateral Symposium on Multi-Scale Structural Biology*, December 22, 2016, Osaka, Japan
18. Lee Y.-H. Toward understanding of thermodynamic property of protein misfolding and aggregation. The 5th Korean Society for Protein Science (KSPS) Annual Symposium and the 5th Asia-Pacific

Symposium on Intrinsically Disordered Proteins, October 8-9, 2015, Daejeon, Korea

19. Sakurai K., Maeno K., Akasaka, K. Principal component analysis of chemical shift perturbation data of a pressure-dependent conformational change of amyloidogenic precursor state of β 2-microglobulin, *XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, August 21-26, 2016, Kyoto International Conference Center, Japan.
20. 李 映昊、The interaction of sulfite reductase with ferredoxin and its relation to enzyme activity, 日本生物物理学会北海道支部(招待講演)、2016年2月26日、北海道大学、北海道札幌市
21. 李 映昊、The study on thermodynamic property of protein misfolding and aggregation, 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会大会、2015年12月3日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市
22. Sakurai, K., Insights into the transition state of pressure-induced denaturation of β 2-microglobulin and its pathogenic variants, *Joint Symposium between the Institute of Protein Research and the Research School of Chemistry at the Australian National University (Invited lecture)*, November 14-16, 2015, The Australian National University, Canberra, Australia
23. 櫻井 一正、豊増 明博、前野 寛大、赤坂 一之、野生型および病原性変異体 β 2 ミクログロブリンの圧力変性反応の研究、日本生物物理学会第53回年会、2015年9月13日～15日、金沢大学、石川県金沢市

[図書] (計4件)

1. Ikenoue T., Lin Y., Kinoshita M., Sakurai K., Goto Y. and Lee Y.-H. Molecular Structure of Amyloid Fibrils Revealed by Thermodynamics, Protein-Protein Interactions (PPIs): Types, Methods for Detection and Analysis (Nova Science Publishers, Inc. (NOVA)), 2017, 81-96
2. Kim J.Y., Kinoshita M., Inui T., Kurisu G., Goto Y., Hase T., Ishimori K. and Lee Y.-H. Thermodynamics of Protein-Protein Interactions Examined by Isothermal Titration Calorimetry, Protein-Protein Interactions (PPIs): Types, Methods for Detection and Analysis (Nova Science Publishers, Inc. (NOVA)), 2017, 67-80
3. Kinoshita M., Kim J.Y., Lin Y., Markova N., Hase T. and Lee Y.-H. Biochemical and Biophysical Methods to Examine Effects of

Site-directed Mutagenesis on Enzymatic Activities and Interprotein Interactions. *Methods in Molecular Biology (In Vitro Mutagenesis: Methods and Protocol)* (Springer), 2017, 1498, 439-460

4. Kim J.Y., Ikegami T., Goto Y., Hase T. and Lee Y.-H. Investigation of Protein-Protein Interactions of Ferredoxin and Sulfite Reductase under Different Sodium Chloride Concentrations by NMR spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry, *Molecular Physiology and Ecophysiology of Sulfur* (Springer), 2015, 169-177

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ

近畿大学生物理工学部生物工学科

<http://www.waka.kindai.ac.jp/tea/biotech/>

大阪大学 蛋白質研究所

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 一正 (Sakurai, Kazumasa)

近畿大学・先端技術総合研究所・准教授

研究者番号: 10403015

(2)研究分担者

李 映昊 (Lee, Young-Ho)

大阪大学・たんぱく質研究所・講師

研究者番号: 70589431

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし