

タンパク質会合状態に対する圧力効果の検討

富山 涼介¹、櫻井 一正^{1,2}

要旨

生体内のタンパク質には、会合体を形成して働くものが多くある。また、正常な天然構造とは異なる、異常なコンフォメーションにミスフォールドし、病気に関わるアミロイド線維を形成することもある。これらの会合体の形成と解離は、タンパク質の構造状態変化のひとつである。圧力はタンパク質の構造状態を変化させることが分かっている。さらに、その変化から種々の熱力学的特徴が調べられる。今回我々は、 β ラクトグロブリン (β LG) の二量体会合系と α シヌクレイン (α SN) のアミロイド線維という異なる種類のタンパク質会合体の解離会合への圧力の影響を NMR を用いて調べた。これらに圧力印加したところ、 α SN のアミロイド線維の解離は観測されたものの、 β LG ダイマーの解離会合平衡には影響が見られなかった。このような違いが見られた理由として(1)力学的圧縮による単量体構造の歪みの会合体全体への影響、(2)会合面の残基の水和体積の変化、(3)解離会合に伴う溶媒排除体積変化の違い、の寄与について考察する。

キーワード：圧力、NMR、タンパク質、自己会合、 β ラクトグロブリン、 α シヌクレイン

1. 結論

タンパク質とは、アミノ酸がペプチド結合にて多数つながったひも状の高分子である。生体内では天然構造という特有のコンフォメーションを取る。天然構造には二次構造や三次構造といった構造が含まれるが、これらの構造はアミノ酸残基主鎖間や側鎖間で水素結合、疎水性相互作用、静電相互作用といった様々な相互作用が働くことで安定化されている。そして、アミノ酸配列によってどの残基間で相互作用するかが規定されることで、固有の天然構造になると考えられている。

タンパク質の状態変化は、各状態に対応するギブスエネルギー (G) 変化で説明される。圧力による G の変化への大きな寄与として、構造状態を保つ疎水性相互作用の強さの変化が挙げられる。Hummer ら⁽¹⁾ や Rick ら⁽²⁾ は実験とシミュレーションから、疎水性の化学基が水に露出すると水の構造化 (いわゆる疎水性水和) を引き起こすが、加圧下では水の構造化がゆるくなりそれによるエントロピー増加が起きるため、疎水性相互作用が減弱すると考察している。タンパク質の天然構造の安定性には疎水性相互作用が重要であることから、タンパク質分子の圧力変性にこの疎水性相互作用の減弱が寄与している可能性がある。

このようなポリペプチド鎖の三次構造への圧力の影響に対し、圧力のタンパク質会合状態への影響はあまり研究されていない。そこで本論文では、モデル系として、 β ラクトグロブリン (β LG) の二量体会合系と、 α シヌクレイン (α SN) のアミロイド線維に対する圧力効果を調べ、背景にある熱力学的特徴を検討することを目的とした。

β LG は牛乳中に含まれる乳清タンパク質で、162 アミノ酸残基からなり、A-I の 9 本の β ストランドが 2 枚の β シートを形成した構造を持つ (図 1A)。 β LG は pH 1-8 という広い範囲で安定に天然構造を保持するが、溶媒条件に依存してモノマーダイマー会合平衡が変化する。例えば酸性 pH ではモノマー (単量体) で存在するが、中性 pH や等電点付近 ($pI = 4.7$) では図 1A で示したようなダイマー (二量体) に平衡が偏る。⁽³⁾酸性 pH でも高濃度下でダイマーを形成する。結晶構造から、会合面には疎水性残基が主に含まれており、疎水性相互作用がダイマー形成に主な寄与を示すと考えられている。⁽⁴⁾それに加え、結合界面において各モノマーの I ストランド間で逆平行 β シート形成し、また片方のモノマーの AB ループに存在する Asp33 ともう片方のモノマーの AB ループに存在する Arg40 の間で静電相互作用している。これらの構造要素間の相互作用はダイマー会合の配向を決めていると考えられる。⁽⁵⁾

原稿受付 2020年1月22日

1. 近畿大学先大学院生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所 高圧力蛋白質研究センター, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

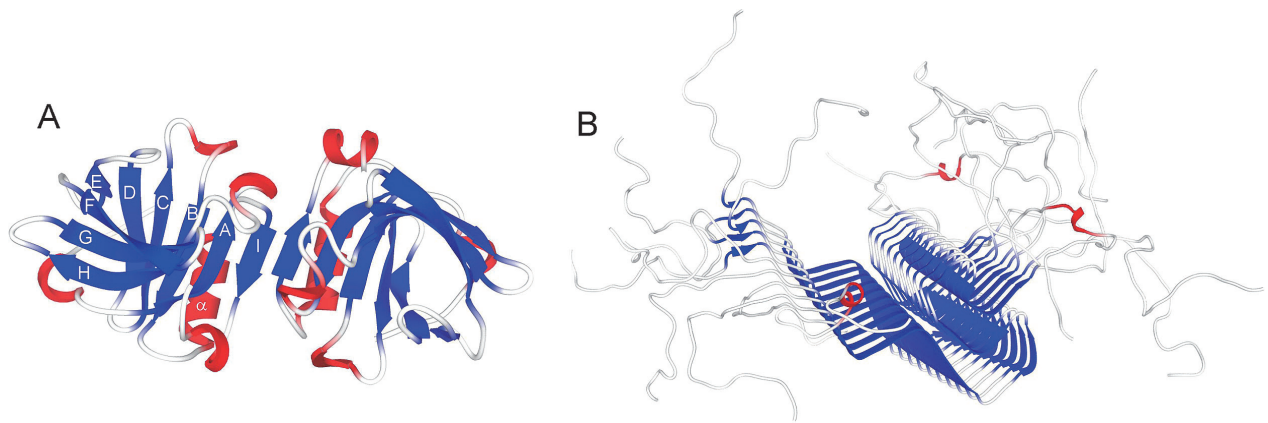


図1 (A) β LGのダイマー状態の結晶構造 (PDB ID: 1BEB⁽⁶⁾) のリボンモデル。 α ヘリックスと β ストランドはそれぞれ赤、青のリボンで示してある。 β ストランドはN末端側からA-Iと命名されている。ダイマー構造中、それぞれのモノマーのABループとIストランドが会合面を形成している。(B) α シヌクレインアミロイド線維中のプロトフィラメントの固体NMR構造 (PDB ID: 2N0A⁽⁷⁾) のリボンモデル。1つの α SN分子同士が主にNAC領域間で分子間 β シートを形成し、各 β ストランドが線維軸に直交するクロス β 構造をとっていると考えられる。

一方、 α SNはパーキンソン病の原因タンパク質として知られている。この病気は、 α SNを主成分とするレヴィ小体という凝集体が中脳黒質の神経細胞中に蓄積することで、神経細胞数、および神経伝達物質ドーパミンの生産量の減少が起こる、進行性の神経変性疾患の一種である。 α SNは分子量14460、140アミノ酸残基からなる、生理条件下で特定の立体構造をとらない天然変性タンパク質であり、両親媒性のN末端領域(1~65残基)、疎水性のNAC (Non-Amyloid β Component) 領域(66~95残基)、酸性のC末端領域(96~140残基)の3領域から構成されている。特に、NAC領域は疎水性の残基が多く、凝集能を有し、 β 構造を形成する傾向が強いとされている⁽⁸⁾。上述のレヴィ小体内で α SNはアミロイド線維を形成しており、固体NMRやクライオ電子顕微鏡で線維状態の構造が報告されている(図1B)^(7, 9-11)。アミロイド線維とはタンパク質が形成する不溶性の凝集体であり、アミロイド線維が体内の特定部位に蓄積することでアミロイドーシスと呼ばれる種々の疾病を引き起こすとされている。アミロイド線維はミスフォールドしたタンパク質が重合したものである。線維軸に対し β ストランドが直交するように配向したクロス β 構造を有するプロトフィラメントが形成し、これが数本束なって構成されていると考えられている⁽¹²⁾。

疎水性のアミノ酸を多く含む領域がアミロイド線維形成能を示すことから、このプロトフィラメント間の会合には疎水的な相互作用も重要であると考えられている。このようにアミロイド線維構造の安定化には β シート形成と疎水性相互作用といった、天然構造と共通の相互作用が寄与するため、解離反応は正の ΔH (吸熱反応)や正の ΔC_p の値を示すなど、天然構造の変性と同じような熱力学的特徴を示す。⁽¹³⁾しかし、一般的にアミロイド線維は天然構造よりアミノ酸残基のパッキングが密ではないと考えられている。⁽¹⁴⁾その残基間の隙間における溶媒の水分子の分布については様々な報告がある。例えばSup35のコア領域のペプチドが形成するアミロイド線維の周辺には水和水がほとんどなく、結合に伴う水の排斥がエントロピー的に会合を促進しているという議論がなされている。⁽¹⁵⁾他方で、 $A\beta$ が形成する線維の周辺には流動性の異なる水分子が分布しているという報告もあり⁽¹⁶⁾、形成条件やアミノ酸配列によって水和状態は大きく異なるものと考えられる。

β LG二量体会合面における残基分布の解析⁽⁴⁾、および α SN線維の推定構造⁽⁹⁾及び尿素感受性⁽¹⁷⁾に関する過去の報告から、どちらの会合体も疎水性相互作用が重要だと考えられる。そこで、圧力印可により上述のような疎水性相互作用が減弱し、これらの会合体が解離することが期待される。その仮定に基づく圧力解離実験を行い、その結果について考察を行うこととした。

2. 材料と方法

2. 1 ¹⁵N 標識疑似野生型 β ラクトグロブリンおよび ¹⁵N 標識 α シヌクレインの発現と精製

本実験では βLG 試料として C121A 変異 βLG を疑似野生型として用いた。この変異体は βLG の構造や安定性が野生型とほとんど同じだが、折り畳みの回復能が改善されているため、物理学的測定に適しているからである。⁽¹⁸⁾ ¹⁵N 標識疑似野生型 βLG の発現は、このタンパク質の遺伝子を含む pPIC11 プラスミドによって形質転換したメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* GS115 株(Invitrogen) を用いて行った。タンパク質の発現と精製の方法は以前報告した論文に記載した通りに行った。⁽¹⁹⁾ ¹⁵N 標識 α シヌクレインの発現は、このタンパク質の遺伝子を含む pET43a-1 プラスミドによって形質転換した大腸菌 BL21(DE3)株を用いて行った。タンパク質の発現と精製の方法は以前報告した論文に記載した通りに行った。⁽²⁰⁾ いずれも、精製後は凍結乾燥した粉末標品として試料を得た。

2. 2 β ラクトグロブリンのトリプトファン蛍光の圧力依存性測定

βLG の圧力蛍光測定は高圧用サンプルセルを備えた日本分光社製蛍光分光光度計 FP6500 を用いて行った。測定タンパク質溶液は 0.2 mg/ml C121A βLG, 20 mM Gly (pH 3.0), 0.1 M NaCl と 0.2 mg/ml C121A βLG, 20 mM NaAc (pH 4.5)とした。5~225 MPa におけるトリプトファン蛍光を励起波長 280 nm、測定範囲 300 nm~400 nm で測定した。得られたスペクトルデータの頂点付近を二次関数でフィッティングし、極大波長を求めた。解析は Igor Pro (Lake Oswego, OR) という市販の表計算ソフトを用いて行った。

2. 3 α シヌクレインのアミロイド線維サンプルの調製

線維形成の溶媒条件は、1.43 mg/ml αSN, 20 mM NaPi (pH 6.5), 0.1 M NaCl とした。調製した溶液 1 ml に αSN アミロイド線維を超音波破碎した線維核を 20 μL 加え、750 rpm での旋回攪拌を 10 秒、静置を 110 秒のサイクルで 37°C でインキュベートした。チオフラビン T 蛍光の上昇からアミロイド線維の形成を確認した。

2. 4 NMR 測定

NMR 測定はブルカー社製 AVANCEIII-600 分光器を用いて行った。βLG の測定の溶媒条件は、モノマーサンプルは 3.7 mg/ml C121A βLG, 20 mM Gly (pH 3.0), 10% D₂O、静電遮蔽ダイマーサンプルは 3.7 mg/ml C121A βLG, 20 mM Gly (pH 3.0), 0.1 M NaCl, 10% D₂O、等電点会合ダイマーサンプルは 3.7 mg/ml C121A βLG, 20 mM NaAc (pH 4.5), 10% D₂O とした。測定は 1 次元(1D)¹H-¹⁵N HSQC を行った。一方 αSN の測定時の溶媒条件は、1.45 mg/ml αSN, 20 mM NaPi (pH 6.5), 0.1 M NaCl, 10% D₂O, 0.01 mM DSS とした。高圧条件下における NMR 測定は赤坂らによって作製された高圧用サンプルセル⁽²¹⁾を用いて行った。βLG の測定時の溶媒条件は、上記常圧測定の溶媒条件に 0.02 mM DSS を加えたものとした。なお、等電点会合ダイマーサンプルのみタンパク質濃度を 6.1 mg/ml とした。一方 αSN の測定時の溶媒条件は常圧測定時と同じ溶媒条件とした。高圧 NMR 測定では、高圧用サンプルセル内の気泡の発生を抑えるために 5 MPa の測定を常圧時の測定とした。常圧、25 MPa、50 MPa の各点で βLG は 1D ¹H-¹⁵N HSQC 測定を、αSN は 1D ¹H スペクトル測定を行った。NMR 測定データは専用のデータ変換プログラム nmrPipe⁽²²⁾によって処理した。

2. 5 溶媒排除体積 (ΔV_{void}) の見積もり

βLG の二量体の結晶構造 (PDB ID: 1BEB) と αSN の線維の固体 NMR 構造 (PDB ID: 2N0A) から溶媒の排除体積の見積もりを行った。計算は CASTp 3.0⁽²³⁾ というプログラムサイトにて行った。CASTp 3.0 にて予測された溶媒排除領域のうち、βLG の方は二量体会合面に位置するもの、αSN の方は解離時に構造が失われる疎水性コア領域に位置するものを目視で選択し、体積計算を行った。

3. 結果

はじめに、分子会合に伴う NMR スペクトルの変化を調べた。まず、 β LG の NMR 測定を pH 3.0 塩なしの条件、pH 3.0 0.1 M NaCl の条件、pH 4.5 の条件の計 3 条件で行った (図 2A)。pH 3.0, 0.1 M NaCl と pH 4.5 条件下の信号強度は pH 3.0 塩なし条件より減少していることがわかる (図 2B)。pH 3.0 塩なしの条件では β LG は等電点 ($pI = 4.7$) より低いため分子全体が正に帯電しており、分子間の静電反発のため溶液中ではモノマーとして存在している。しかし、ここに塩を加えるとその β LG 分子の正電荷間に陰イオンが入り込むことで静電遮断が起こり、会合が引き起こされダイマーの割合が増加することが分かっている。⁽⁴⁾一方 pH 4.5 は β LG の等電点付近であることからタンパク質分子の総電荷が 0 に近くなることで分子間反発が弱くなるため、等電点沈殿と同様の機構でダイマーを形成する。⁽³⁾一般的に、NMR の信号強度は、大きなタンパク質分子ほど信号強度が弱くなるため、どちらの条件の結果も β LG モノマー分子同士が会合することで NMR の信号強度が減少したものと判断した。なお今後、各条件で形成したダイマーをその形成機構から、pH 3.0, 0.1 M NaCl の方を静電遮蔽ダイマー、pH 4.5 の方を等電点会合ダイマーと便宜的に称することとする。

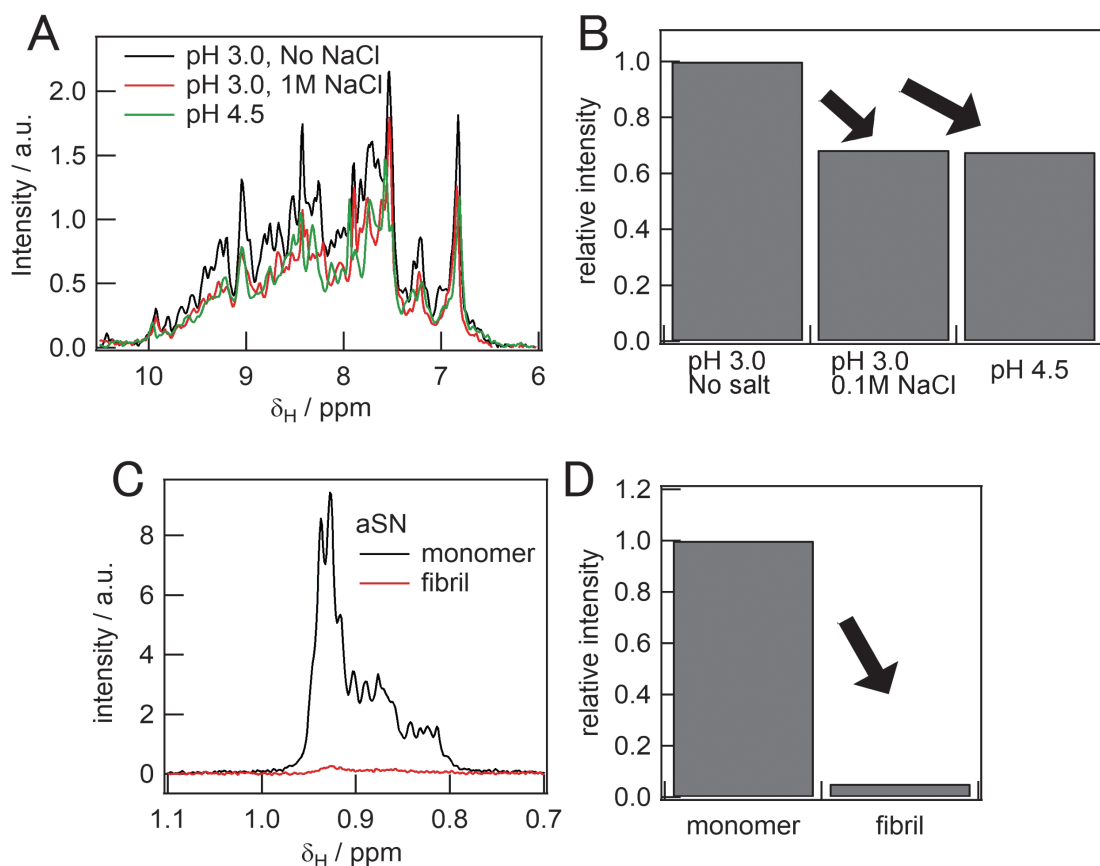


図2 会合体形成時の NMR 信号強度変化の観察。(A,B) β ラクトグロブリン二量体会合時の NMR 信号強度の変化を 1D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルのアミド領域 (10.5~6.0 ppm) でモニタした。(A)黒線はモノマー条件 (pH 3.0, 塩なし)、赤線は静電遮蔽ダイマー形成条件 (pH 3.0, 0.1 M NaCl)、緑は等電点会合ダイマー形成条件 (pH 4.5) で測定した結果である。(B)各条件のアミド領域の信号の面積強度の相対値。pH 3.0, 塩なしの時に比べ、pH 3.0, 0.1 M NaCl ならびに pH 4.5 の時は二量体形成によるものと考えられる信号強度の減少が見られた。(C,D) α シヌクレインアミロイド線維形成時の NMR 信号強度の変化を 1D ^1H スペクトルのメチル領域 (1.1~0.7 ppm) でモニタした。(C)黒線は線維形成前のモノマー状態、赤線は線維形成後の試料の測定結果である。(D)各条件で測定したときのメチル領域の信号の面積強度の相対値。モノマー状態の時に比べ、線維形成試料は信号強度が減少していることがわかる。

一方、 α シヌクレインの方は、線維形成前のモノマー状態のサンプルと線維形成後のサンプルで NMR 測定を行った (図 2C)。線維形成後のサンプルは線維形成前のサンプルと比較して強度が減少している

ことがわかる (図 2D)。モノマー同士が複数会合しアミロイド線維を形成したことで見かけの分子量が増加し、信号強度が減少したものと判断した。

次に圧力の β LG 分子の天然構造への影響を調べるために、上述のダイマー形成条件でトリプトファン蛍光の圧力依存性を調べた (図 3A,B)。横軸の圧力点に対し、pH 3.0, 0.1 M NaCl と pH 4.5 各条件で得られたスペクトルの極大波長を縦軸にプロットしたのが図 3C である。静電遮蔽ダイマー、等電点会合ダイマーのどちらも圧力上昇による蛍光強度の減少と極大波長の長波長側へのシフトが見られた。一般的にトリプトファン蛍光の極大波長の長波長側へのシフトは、タンパク質の変性によるものとされている。そのため極大波長のシフトからどちらの条件でも 75 MPa 以上では β LG 分子に変性が起きており、50 MPa まで天然構造を保っていることが分かった。

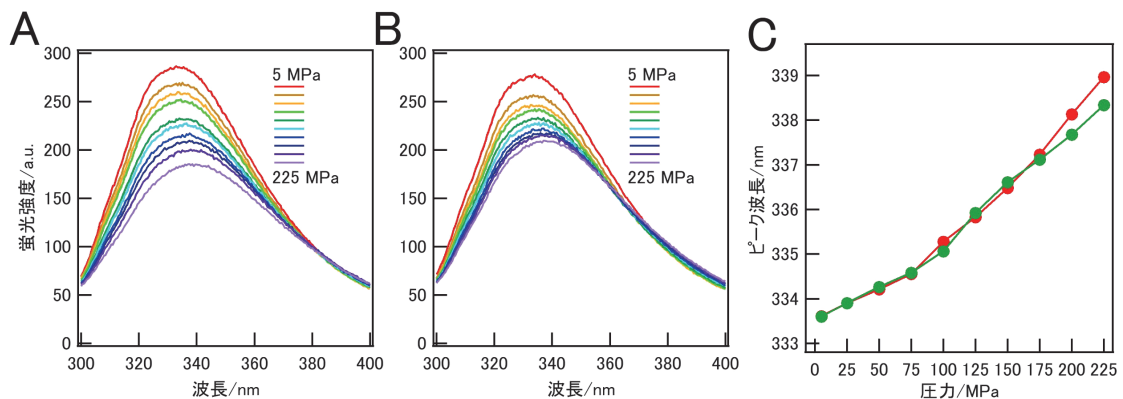


図 3 β ラクトグロブリン二量体試料への圧力印可時のトリプトファン蛍光強度の変化。(A,B)励起波長 280 nm におけるトリプトファン側鎖由来の蛍光スペクトルの圧力依存性。(A)は pH 3.0, 0.1 M NaCl の条件、(B)は pH 4.5 の条件下での測定の結果。(C)蛍光極大波長の圧力依存性。圧力増加に伴い極大波長が長波長にシフトするが、これは β LG 単量体構造が徐々に変性していることを示す。

続いて圧力により β LG ダイマーの解離が起こるか高圧 NMR 測定を用いて検証した (図 4A,B)。単量体構造が変性するとダイマー解離することは自明なので、圧力蛍光の結果から変性の起こらない 50 MPa までを測定域とした。静電遮蔽ダイマーと等電点会合ダイマーどちらの条件も、25、50 MPa のスペクトルには形状の変化がなかったため、加圧に伴う構造変化はなかった。そして、信号強度も常圧の時と比べの有意な強度増加が見られなかった。そのため、静電遮蔽ダイマーと等電点会合ダイマーのどちらも、50 MPa までは単量体の構造変化もダイマーの解離も起こらないと分かった。

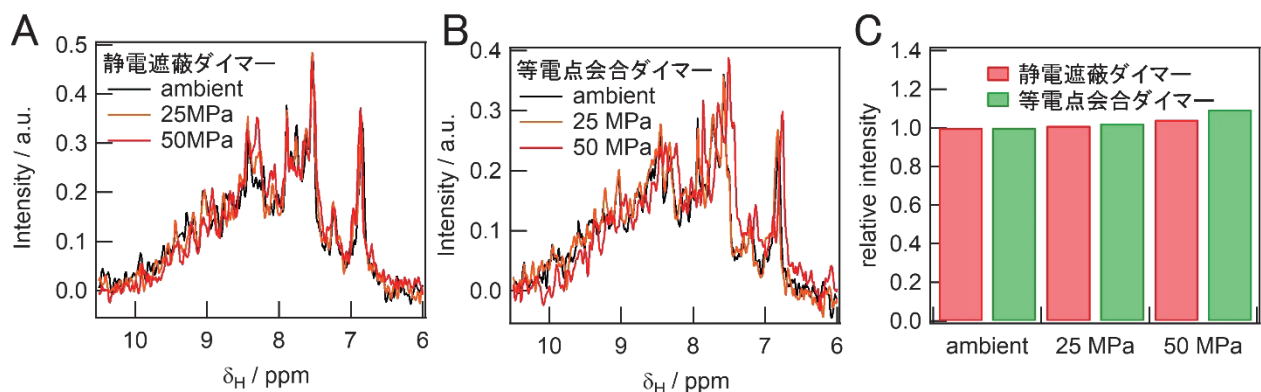


図 4 β ラクトグロブリン二量体試料への圧力印可時の NMR 信号強度の変化。(A,B) 1D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルのアミド領域 (10.5~6.0 ppm) の拡大図。(A)は pH 3.0, 0.1 M NaCl の条件、(B)は pH 4.5 の条件下での測定の結果。(C)圧力印可時のアミド領域の信号の相対面積強度の圧力依存性。(A),(B)どちらの条件でも圧力印可に伴う信号強度変化がみられず、 β LG の二量体会合に変化がないことを示す。

同様に α -SN 線維サンプルも、常圧、25、50 MPa で高圧 NMR 測定を行った (図 5A)。その結果、圧力印加による信号強度の増加が見られた。信号の見えた 0.9 ppm は特に変性状態のタンパク質分子が信号を示す領域である。このことから、解離した α SN は変性状態であることも示された。この結果は、期待通り圧力印加による α シヌクレインアミロイド線維からのモノマーの解離が起きていることを示す。

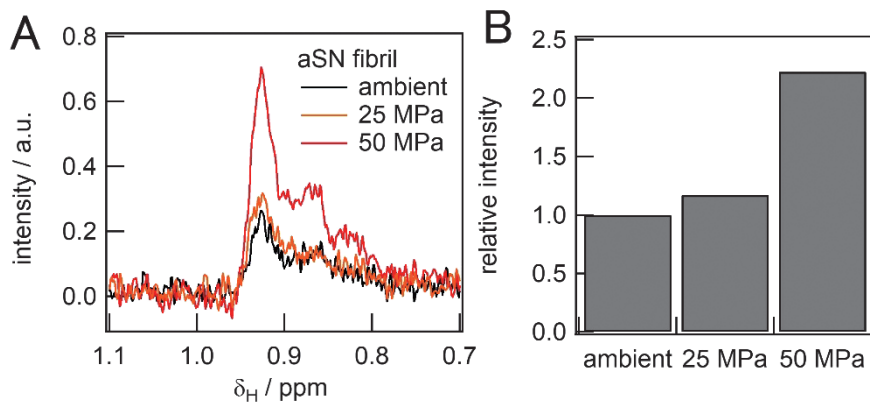


図5 α シヌクレインアミロイド線維試料への圧力印可時の NMR 信号強度の変化。(A) 1D ^1H スペクトルのメチル領域 (1.1~0.7 ppm) の拡大図。(B) 圧力印可時のメチル領域の信号の相対面積強度の圧力依存性。圧力印可に伴い信号強度が増加しているが、これは線維からモノマーが解離していることを示す。

4. 考察

今回の結果をまとめると、 β LG 二量体については静電遮蔽ダイマーも、等電点会合ダイマーも、50 MPa の印可では単量体構造の変化もダイマーの解離も見られなかった。一方、 α SN のアミロイド線維の解離は 50 MPa の印可時でも有意に観測された (図 6 A,B)。線維状態の α SN 分子が解離し、変性状態となって溶媒中に放出されたと考えられる。どちらの会合体もその形成に疎水性相互作用の寄与があると考えられるため、圧力による解離が期待されたが、 β LG の二量体については予想とは異なる結果であった。そこでそのほかに考慮すべき点として、(1)力学的圧縮による単量体構造の歪みの会合体全体への影響、(2)会合面の残基の水和体積の変化 (ΔV_{hyd})、(3)解離会合に伴う溶媒排除体積変化の違い (ΔV_{void})、の3点が思いあたる。それぞれについて今回の結果を説明できるか考察する。

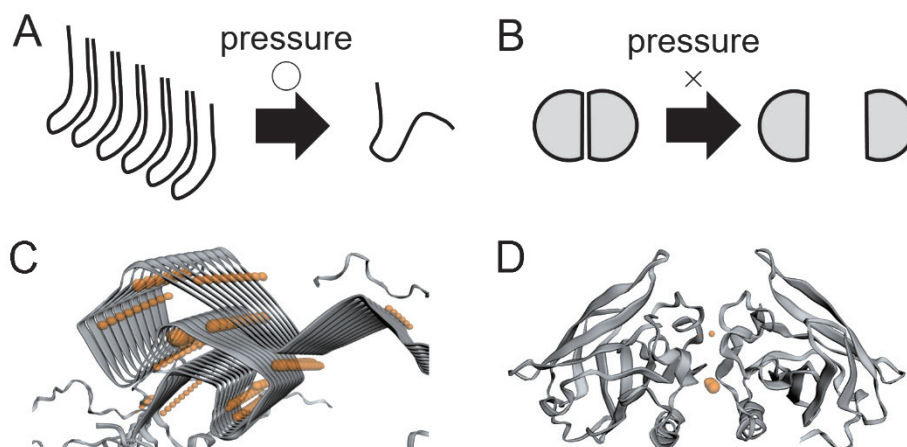


図6 異なる形態のタンパク質会合体の圧力の影響における今回の実験結果の模式図。(A) α SN アミロイド線維は圧力による解離が見られた。一方、(B) β LG 二量体は、50 MPa において、モノマーの天然状態は保持されたままであったものの、ダイマーの解離挙動は見られなかった。(C,D) CASTp 3.0 というプログラムによる会合に伴う溶媒排除体積 (ΔV_{void}) の検出。橙色で示した領域が、会合に伴い生じる溶媒排除領域 (ボイド) である。

タンパク質の状態変化は、各状態に対応するギブスエネルギー (G) 変化で説明される。各状態の G の変化は $dG = V_m dP + S_m dT$ によって表されるので、 G の圧力 (P) 依存性はその状態のモル体積 (V_m) によって決まることがわかる。これまでの研究から、圧力によってタンパク質構造に力学的圧縮と熱力学的転移という2つのタイプの変化が引き起こされると考えられている。⁽²⁴⁾ 力学的圧縮とは、タンパク質が天然状態や中間状態といった同一の熱力学状態を保ったまま、その部分モル体積変化 (ΔV_m) が、 $\Delta V_m = V_m^0 \times \beta_T \times (P - P^0)$ に従い、圧力 P に対して変化する構造変化である。式中の β_T はタンパク質分子の等温圧縮率を表し、添え字の 0 は常圧における値を表す。一方、熱力学的転移とは、例えば天然状態から変性状態へとといった異なる熱力学的状態への変化である。この二つの状態間にはモル体積差 ΔV_m ($\Delta V_m = V_{m,final} - V_{m,initial}$) があるため、上述の G と P の関係式から導かれる $\Delta G = \Delta G^0 + P \Delta V_m$ の式で二状態間の自由エネルギー差 ΔG が求められ、その ΔG の値に従って各状態の占有数が増える。⁽²⁴⁾ ここで ΔV は $\Delta V = \Delta V_{vdw} + \Delta V_{hyd} + \Delta V_{void}$ に細分化できる。右辺第1項から分子ファンデアワールス体積、水和体積、溶媒分子排除体積の変化を表す。タンパク質の状態変化では第1項は変化しないと考えられるので、 ΔV は ΔV_{hyd} と ΔV_{void} で決まると考えられる。上で挙げた(1)~(3)はそれぞれ、力学的圧縮による影響、熱力学転移の ΔV_{hyd} 、熱力学的転移の ΔV_{void} に対応する。それぞれの可能性について考察する。

1つ目は、力学的圧縮に伴う、分子構造の歪みが会合構造に影響を与えた可能性である。タンパク質分子間会合のためには、単量体構造が会合に適した構造をとっていることが重要である。力学的圧縮により単量体構造が歪み、相互作用に重要な残基の位置変化を引き起こしうる。近年 Kurpiewska ら⁽²⁵⁾ は高圧下で β LG の結晶構造を報告し、単量体構造が歪むものの二量体構造が保持されていることを示した。その点は今回の結果と矛盾がない。しかし、 β LG 二量体のように限られた数の分子のみが会合する系に比べ、アミロイド線維のように、複数の分子が繰り返し構造をもって会合する系の場合、各分子からの歪みが蓄積し、会合体全体の安定性に大きな影響を与える可能性がある。この効果を正しく検証するには NMR やシミュレーションを用い、圧力によるアミロイド線維中の単量体の構造変化をサブ Å レベルで正確にとらえる必要があるが、現状ではそのような解析例がないため、今後の検証課題であると考えられる。

2つ目は、解離会合に伴う、会合面残基の水和体積、 ΔV_{hyd} 、の変化である。以前 Chalikian⁽²⁶⁾ はアミノ酸残基が溶媒の水に露出すると、接触した水分子の水和構造を変化させると報告している。そして、親水性残基の露出は系の体積を減少させる一方、疎水性残基は増加させると述べている。⁽²⁶⁾ 会合体が解離し疎水性残基が溶媒に露出すると、水和体積が増加することになるが、体積増加は高圧条件下では好まれないため、むしろ解離は抑えられるはずである。一方、緒言で述べた通り、疎水性相互作用は高圧力条件下で弱くなる効果も提唱されている。つまり、疎水性残基には加圧下で会合を促進する効果と解離を促進する効果の二つがあることになる。会合面における疎水性残基が占める割合や分布によって圧力による影響が異なり、それが β LG と α SN の結果の違いを生んだ可能性がある。しかし現時点では3次元構造からそれぞれの寄与を精度よく見積もるには至っておらず、今回の結果の十分な説明を得るのは難しい状況だと考えられる。

3つ目は、解離会合に伴う溶媒分子の排除体積の変化、 ΔV_{void} 、の寄与である。以前 β 2 ミクログロブリン (β 2m) の線維も圧力下で解離することが報告された。⁽²⁷⁾ また、密度測定から、 β 2m アミロイド線維の形成に伴い、分子体積が増加することがわかった。⁽¹⁴⁾ これらの結果から、アミロイド線維内部の側鎖間パッキングはあまり密でなく、ポイドという溶媒分子の入り込めない隙間が生じていると考察された。⁽¹⁴⁾ 今回用いた α シヌクレインでも線維内にポイド領域があると提案されている。⁽⁹⁾ α SN 線維の PDB データを用いて CASTp 3.0 というサイトにて ΔV_{void} の見積もりを行ったところ、 $6.66 \text{ \AA}^3/\text{モノマー}$ という比較的大きな値が得られた (図 6 C、橙色の領域)。よってアミロイド線維状態の体積の方が大きくなり、上述の $\Delta G = \Delta G^0 + P \Delta V_m$ の式から高圧下で不安定になったと考えられる。一方、 β LG ダイマーの会合面は面積が比較的小さくかつその面の形状の相補性が比較的高い。^(5, 6) こちらも同様に ΔV_{void} の見積もりを行ったところ $0.59 \text{ \AA}^3/\text{ダイマー}$ という小さな値であった (図 6 D、橙色の領域)。つまり、会合に伴う大きな分子体積変化はなく、圧力による解離が起こらなかったのではないかと考えられる。よって、 ΔV_{void} の効果が会合体の圧力による挙動変化の説明として妥当だと考えられる。

先行研究のアミノ酸置換の研究結果を参照し、今回の β LG ダイマーと α SN の線維形成に関する ΔV_{void} の寄与についてさらに検証したい。緒言で述べた通り、 β LG ダイマーの界面には、片方のモノマーの Asp33 ともう片方のモノマーの Arg40 が静電相互作用している。また、双方のモノマーの I ストランドに属する His146 から Ser150 までの5残基同士が逆平行 β シートを形成している。これらの相互作用にかかわるアミノ酸を置換すると二量体会合能が大きく減少することから⁽⁶⁾、会合面に存在する残基がすべて

合に寄与しており、これらの残基が比較的狭い領域に密に配置していることが示唆される。よって、会合に伴う余分な空間もあまり生じないと考えると今回の結果や考察と矛盾がない。一方、Koo ら⁽²⁸⁾は α SN の配列上様々な位置に網羅的にアミノ酸変異を導入し、線維形成への影響を調べた。その結果、線維形成コアである 37-89 の位置に変異を導入すると線維形成能の減少が多く見られたが、この領域の残基で置換をしても大きな影響を示さない残基もいくつか見られた。これは、一部の残基の周辺にボイド領域があり、このような側鎖を置換しても影響が出なかったためと解釈することができる。つまり、これらのアミノ酸残基置換の寛容性は、ボイドの存在によるものだと考えられる。

今回は状態変化に伴う二つの体積変化の寄与、 ΔV_{hyd} と ΔV_{void} 、のうち後者の方が実験結果を説明すると結論したが、天然構造の安定性においても、それぞれのタンパク質の圧力依存性と ΔV_{void} に相関があると報告されている。⁽²⁹⁾ 繰り返しになるが、このような結果は、各アミノ酸の ΔV_{hyd} への寄与の見積もり値が十分に正確ではなく、予想されるアミノ酸残基の露出表面積から計算される総 ΔV_{hyd} が実験値と合いにくいのに対し、 ΔV_{void} は ΔV_{hyd} に比べ体積計算のみで済むため、相対的に実験値と合いやすくなるからだと考えられる。今回の β LG ダイマーと α SN アミロイド線維の挙動も、同様の理由で ΔV_{void} と関連づけられたのではないだろうか。

5. 結論

今回の結果をまとめると、 β LG 二量体については静電遮蔽ダイマーも、等電点会合ダイマーも、50 MPa の印可では解離は見られなかった。一方、 α SN のアミロイド線維の解離は 50 MPa の印可時でも有意に観測された。いずれも疎水性相互作用が会合に大きな寄与をしていたと考えられるが、同じ結果とならなかったため、疎水性相互作用の圧力による減弱だけではこの結果を説明できない。他の可能性を考察した結果、会合時に生じるボイドと呼ばれる空間の有無が、これらの結果をもっともよく説明するのではないかと考えられる。しかしそれ以外の効果（力学的圧縮による構成単量体の歪みによる会合面の変化や疎水性残基の水和体積変化への寄与の違い）も可能性としては残されており、今後十分な検証が必要だと思われる。これらの寄与を正確に見積もることができれば、圧力によるタンパク質分子複合体の解離会合のコントロールや、逆に圧力で会合をコントロールできるタンパク質複合体の人工デザインなどにも応用ができるものと期待される。

6. 謝辞

実験で用いた α シヌクレインの発現用プラスミドは、李映昊博士 (Korean Basic Science Institute) に提供して頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。

7. 参考文献

- (1) Hummer, G., Garde, S., Garcia, A. E., Paulaitis, M. E. and Pratt, L. R. (1998) The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 1552-1555.
- (2) Rick, S. W. (2000) Free energy, entropy and heat capacity of the hydrophobic interaction as a function of pressure. *J. Phys. Chem. B* 104, 6884-6888.
- (3) Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefss, S. P. and de Kruijff, K. G. (1999) Association behavior of native β -lactoglobulin. *Biopolymers* 49, 11-20.
- (4) Sakurai, K., Oobatake, M. and Goto, Y. (2001) Salt-dependent monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH 3. *Protein Sci.* 10, 2325-2335.
- (5) Sakurai, K. and Goto, Y. (2002) Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin by amino acid substitution. *J. Biol. Chem.* 277, 25735-25740.
- (6) Brownlow, S., Morais Cabral, J. H., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. and Sawyer, L. (1997) Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution--still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5, 481-495.
- (7) Tuttle, M. D., Comellas, G., Nieuwkoop, A. J., Covell, D. J., Berthold, D. A., Kloepper, K. D., Courtney, J. M., Kim, J. K., Barclay, A. M., Kendall, A., Wan, W., Stubbs, G., Schwieters, C. D., Lee, V. M., George, J. M. and Rienstra, C. M. (2016) Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 409-415.
- (8) Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A., Kondo, J., Ihara, Y. and Saitoh, T. (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 11282-11286.

-
- (9) de Oliveira, G. A., Marques, M. A., Cruzeiro-Silva, C., Cordeiro, Y., Schuabb, C., Moraes, A. H., Winter, R., Oschkinat, H., Foguel, D., Freitas, M. S. and Silva, J. L. (2016) Structural basis for the dissociation of α -synuclein fibrils triggered by pressure perturbation of the hydrophobic core. *Sci. Rep.* 6, 37990.
 - (10) Li, Y., Zhao, C., Luo, F., Liu, Z., Gui, X., Luo, Z., Zhang, X., Li, D., Liu, C. and Li, X. (2018) Amyloid fibril structure of α -synuclein determined by cryo-electron microscopy. *Cell Res.* 28, 897-903.
 - (11) Guerrero-Ferreira, R., Taylor, N. M., Mona, D., Ringler, P., Lauer, M. E., Riek, R., Britschgi, M. and Stahlberg, H. (2018) Cryo-EM structure of α -synuclein fibrils. *Elife* 7.
 - (12) Eisenberg, D. and Jucker, M. (2012) The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148, 1188-1203.
 - (13) Kardos, J., Yamamoto, K., Hasegawa, K., Naiki, H. and Goto, Y. (2004) Direct measurement of the thermodynamic parameters of amyloid formation by isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Chem.* 279, 55308-55314.
 - (14) Lee, Y. H., Chatani, E., Sasahara, K., Naiki, H. and Goto, Y. (2009) A comprehensive model for packing and hydration for amyloid fibrils of β 2-microglobulin. *J. Biol. Chem.* 284, 2169-2175.
 - (15) Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. O., Riekel, C., Grothe, R. and Eisenberg, D. (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773-778.
 - (16) Wang, T., Jo, H., DeGrado, W. F. and Hong, M. (2017) Water Distribution, Dynamics, and Interactions with Alzheimer's beta-Amyloid Fibrils Investigated by Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 6242-6252.
 - (17) Zhang, F., Lin, X. J., Ji, L. N., Du, H. N., Tang, L., He, J. H., Hu, J. and Hu, H. Y. (2008) Assembly of alpha-synuclein fibrils in nanoscale studied by peptide truncation and AFM. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 388-394.
 - (18) Yagi, M., Sakurai, K., Kalidas, C., Batt, C. A. and Goto, Y. (2003) Reversible unfolding of bovine beta-lactoglobulin mutants without a free thiol group. *J. Biol. Chem.* 278, 47009-47015.
 - (19) Yagi, M., Kameda, A., Sakurai, K., Nishimura, C. and Goto, Y. (2008) Disulfide-linked bovine β -lactoglobulin dimers fold slowly, navigating a glassy folding landscape. *Biochemistry* 47, 5996-6006.
 - (20) Yagi, H., Kusaka, E., Hongo, K., Mizobata, T. and Kawata, Y. (2005) Amyloid fibril formation of α -synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: implications for the mechanism of transmissible conformational diseases. *J. Biol. Chem.* 280, 38609-38616.
 - (21) Akasaka, K., *Protein Studies by High-Pressure NMR*, in *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy*, A. Naito, Editor 2018, Springer: New York. p. 3-36.
 - (22) Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. and Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR.* 6, 277-293.
 - (23) Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J. and Liang, J. (2018) CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.* 46, W363-W367.
 - (24) Kitahara, R., Hata, K., Li, H., Williamson, M. P. and Akasaka, K. (2013) Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins. *Prog. Nucl. Magnet. Reson. Spectrosc.* 71, 35-58.
 - (25) Kurpiewska, K., Biela, A., Loch, J. I., Swiatek, S., Jachimska, B. and Lewinski, K. (2018) Investigation of high pressure effect on the structure and adsorption of beta-lactoglobulin. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 161, 387-393.
 - (26) Chalikian, T. V. (2001) Structural thermodynamics of hydration. *J. Phys. Chem. B* 105, 12566-12578.
 - (27) Chatani, E. and Goto, Y. (2005) Structural stability of amyloid fibrils of β 2-microglobulin in comparison with its native fold. *Biochim. Biophys. Acta* 1753, 64-75.
 - (28) Koo, H. J., Lee, H. J. and Im, H. (2008) Sequence determinants regulating fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 772-778.
 - (29) Roche, J., Caro, J. A., Norberto, D. R., Barthe, P., Roumestand, C., Schlessman, J. L., Garcia, A. E., Garcia-Moreno, B. E. and Royer, C. A. (2012) Cavities determine the pressure unfolding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 6945-6950.

英文抄録

The pressure effect on the assemblies of protein molecules investigated by high-pressure NMR observation

Ryosuke TOMIYAMA¹, Kazumasa SAKURAI^{1,2}

Many proteins *in vivo* form multimolecular assemblies to be functional. Some proteins may misfold into abnormal conformations distinct from their native structures and form disease-related amyloid fibrils. The association and dissociation of these assemblies are ones of the changes in the structural state of proteins. It has been reported that pressure changes the equilibrium of the structural state of protein molecules, and analysis of pressure-dependent structural changes can give information about various thermodynamic characteristics. Here, we investigated the effect of pressure on dissociation of protein assemblies using NMR. As the target sample, the monomer/dimer equilibrium of β -lactoglobulin (β LG), which is dependent on the solvent conditions, and the amyloid fibril of α -synuclein (α SN) were used. Upon pressure applications to these samples, the dissociation of α SN amyloid fibrils was observed whereas the dissociation/association equilibrium of β LG was not affected. As the explanations for these results, we discussed following three possible reasons; (1) the effect of the mechanical distortion of the monomer structure to the entire assemblies, (2) the difference in the hydration volume due to the difference in the composition of amino acid residues on the association interface, (3) a difference in the volume change upon the association of the monomers due to the formation of exclusive space of the solvent, called as void, between the assembly interfaces.

Key words: high-pressure NMR, protein, self-assembly, β -lactoglobulin, α -synuclein.

1. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Advanced Technology Research Institute, Kindai University, Wakayama 642-0017, Japan