

アミロイドーシス感染・伝播の分子機構の解明と制御

神戸大学大学院理学研究科化学専攻生命分子化学分野

茶谷 絵理

1. はじめに

1-1. アミロイド線維について

アミロイド線維は、タンパク質のミスフォールディングによって形成される超分子集合体である。これまでに、プリオン病やアルツハイマー病、透析アミロイドーシスなどに関わる 30 種類以上のアミロイド線維が報告されている。さらに最近では、パーキンソン病やハンチントン病に代表される神経変性疾患に見られる沈着物もアミロイド線維に類似した特徴を示すことが明らかになったこともあり、アミロイド線維の構造形成原理解明の重要性が強く認識されている。

アミロイド線維構造は、「核依存性伸長」という、線維末端にモノマー体のタンパク質が付着し伸長していく様式で形成される。この反応により、アミロイド線維は、線維軸に沿って自己の構造を複製し、伝播させることができるため、疾病の感染および伝播の分子基盤として注目されている。ところが、鋳型構造をどのように認識し再現してゆくのかの詳細は全く明らかにされていない。そこで本研究では、アミロイド線維の末端で構造が複製し、構造伝播する分子機構をアミノ酸残基レベルで解明し、制御することを目的とした解析を行った。

1-2. これまでの経緯

アミロイド線維は、巨大な分子量で不溶性性質が詳細な解析を妨げるために、モノマー分子がどのように線維末端に結合し、線維構造を複製するかの詳細なメカニズムは不明である。そこで著者らは、アミロイド線維形成の分子機構解明の糸口をつかむための第一の研究として、透析アミロイドーシスの原因タンパク質である β_2 ミクログロブリンを用いて、アミロイド線維伸長反応にて經由することが予想される「伸長中間体」を捉え特性を明らかにする研究を進めてきた。

β_2 ミクログロブリンは、酸性条件下でアミロイド線維の断片（シード）を核として添加すると、アミロイド線維の伸長が速やかに進行するが、アミロイド線維の伸長過程に対する中間体の構造観察例は、現在のところ一例も存在していない。しかし、この反応には、少なくともシードとモノマータンパク質の 2 分子が関与することを考慮すると、シードの末端にモノマー分子が結合した伸長中間体を經由することが予想される。さらに、伸長反応を酵素反応に見立てると、過剰量の線維（酵素）に少量のモノマー（基質）を添加すれば、酵素反応の前定常状態のように伸長中間体（酵素・基質複合中間体）が過渡的に蓄積する可能性がある。

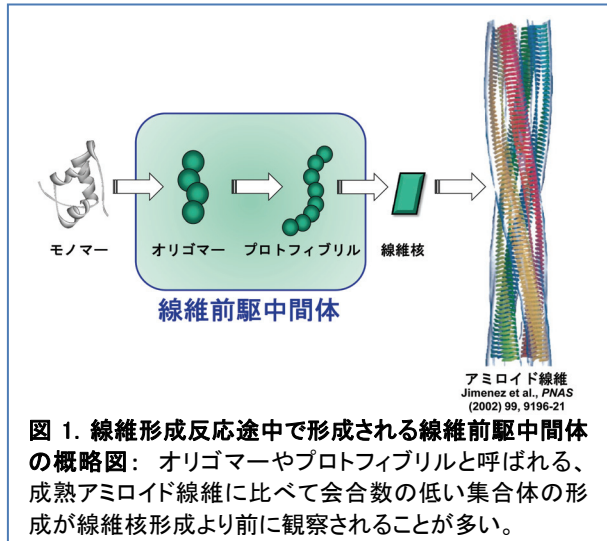
そこで、上記の考えに基づき、反応時のモノマーとシードの量比を調整することで中間体が蓄積する様子を捉えようとした。トリプトファン蛍光をプローブに用いて、一定濃度の希薄モノマー溶液に様々な濃度でシードを加えて測定を行った結果、これまで困難であった高シード濃度条件下での伸長反応の観察を実現し、過渡的な中間体の蓄積を確認することに成功した（参考文献 1）。続いて、より詳細な伸長中間体の構造特徴を明らかにするため、タンパク質フォールディングにおける中間体の解析を飛躍的に進めた画期的手法である水素/重水素 (H/D) 標識-NMR 法を用いての構造解析を試みた。中間体を蓄積させた直後に試料の pH を瞬時に変化させて、ごく短い H/D 交換パルスを与え、各アミノ酸残基の交換程度を ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルをもちいて調べた。その結果、中間体構造はほぼほどこけた状態で線維と弱く結合していることが明らかとなった。さらに、酸変性構造に存在する疎水性クラスターまでがほどこけているという興味深い特徴も明らかとなり、ほどこけて露出した疎水性クラスター領域が伸長時に線維との相互作用に貢献していることが示唆された。

(参考文献 2, 3)。

2. 本研究の概要

以上の結果は、アミロイド線維の核依存性伸長には、ごく限られた領域が線維末端の認識に関与する可能性が示唆するものである。そこで、伸長と解離に重要な役割を果たす配列領域をより具体的に特定するために、本研究では、「アミロイド線維前駆中間体」を新たに捕捉し構造解析することを試みた。

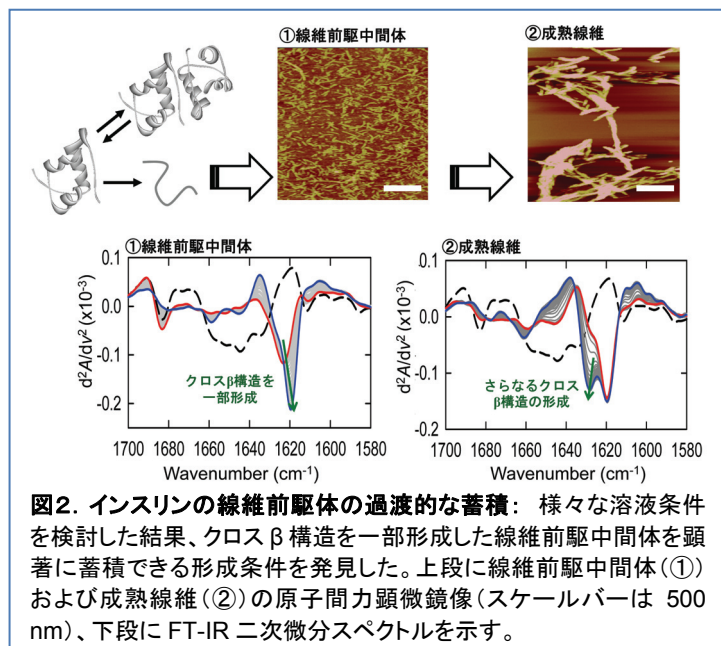
アミロイド線維の形成初期過程においては、オリゴマーやさらに集合レベルや構造化の進んだプロトフィブリルなど、いくつかの異なるサイズおよび構造レベルの凝集体を経由することが報告されている(図1)。最終的に形成されるアミロイド線維は β シート構造に富んだ立体構造(クロス β 構造)を特徴的に示すが、線維化初期段階に形成されるオリゴマーやプロトフィブリルのような前駆中間体では、クロス β 構造が完全には構築されておらず、伝播性も未発現である。そこで、この中間体を捕捉して成熟アミロイド線維と構造比較することによって、伝播性が発現するために必要なクロス β 構造の領域を明らかにできるのではないかと考え、インスリンをモデルタンパク質に用いて捕捉を試みた。



3. 実験方法と結果

3-1. 凝集中間体を過渡的に蓄積する経路の探索

インスリンは、酸性条件下で加熱するだけで容易に核形成し、自発的な線維形成が進行する。これを基本条件としたうえで塩化ナトリウムの濃度を調整した結果、1.0 Mという高塩濃度条件下では、反応開始直後に著しいチオフラビンT蛍光の上昇が確認され、その後低い値へと収束する2段階の変化が確認された。原子間力顕微鏡観察と赤外吸収スペクトル解析を行った結果、高いチオフラビンT蛍光を示す時間領域では、クロス β 構造が未成熟で微細なアミロイド線維が形成しており、その後、これらが会合してさらにクロス β 構造を発達させ、太く成熟したアミロイド線維になることが分かった(図2)。さらに、得られた中間体および成熟線維を超音波破碎により断片化し、新たなインスリン水溶液に転嫁してシーディング反応を行ったところ、後半のクロス β 構造の形成が形成するまでアミロイド線維の伝播性も発揮されておらず、反応開始直後に形成される微細なアミロイド線維は、オリゴマーやプロトフィブリルに相当するアミロイド線維前駆中間体に相当することが考えられた。



3-2. 中間体および成熟アミロイド線維の構造解析

今回得られた前駆中間体は、室温に戻せば非常に安定であり、成熟化の進行が止まることが判明し、安定に捕捉できることが分かった。そこで、得られた前駆中間体についてプロテアーゼ消化による構造解析を行い、クロスβ構造形成部位を明らかにしようとした。

線維前駆中間体および成熟したアミロイド線維をそれぞれ一定時間トリプシン処理し、生成したペプチドフラグメントをMALDI-TOFマウス解析により同定することで、切断されたアミノ酸配列領域を決定した。その結果、前駆体のみで酵素消化されやすい領域が存在することが確認された(図3)。当該領域は、線維前駆中間体からアミロイド線維へと構造成熟化する時にクロスβ構造を形成する領域であることを考慮すると、アミロイド線維の伝播に貢献する部位に相当すると考えられる。このように、アミロイド線維の伝播性とアミノ酸配列との関連性が初めて実験的に提案された。本研究成果については、学会発表をおこない(学会発表1)、さらに論文投稿にむけて準備を進めている。

4. 考察

以上の結果から、アミロイド線維末端でモノマー分子が結合し構造変化する際に関わるのは、全アミノ酸配列のうちのごく限られた領域に限定されていることが考えられた。これは、構造複製の基本原則をアミノ酸残基レベルで理解を進めるために重要な知見であると考えている。

今後、アミロイド線維の構造複製と伝播に関わるアミノ酸配列領域のより詳細な役割を解明するために、アミノ酸置換効果の解析を行いたいと考えている。そのため、大腸菌を宿主とした組み換えインスリンの発現系構築および精製方法の確立を行っている。プロ体として良好な発現量までを確認したので、さらに検討を重ね高効率なインスリン変異体作製系を完成させることで、変異体解析を実施する予定である。本解析をとおしてアミロイドーシスの感染や伝播の根底にある分子機構を解明し、最終的に高効率な線維化の阻害手法の確立を目指したいと考えている。

5. 本研究に関連する参考文献および学会発表

参考文献

1. [Eri Chatani](#)[†], Reina Ohnishi[†], Tsuyoshi Konuma, Kazumasa Sakurai, Hironobu Naiki, and Yuji Goto ([†]equally contributed)
"Pre-steady-state kinetic analysis of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin with tryptophan mutagenesis" *J. Mol. Biol.* **400**, 1057-1066 (2010)
2. Tsuyoshi Konuma[†], [Eri Chatani](#)[†], Masanori Yagi, Kazumasa Sakurai, Takahisa Ikegami, Hironobu Naiki, and Yuji Goto ([†]equally contributed)
"Kinetic intermediates of β_2 -microglobulin fibril elongation probed by pulse-labeling H/D exchange combined with NMR analysis" *J. Mol. Biol.* **405**, 851-862 (2011)
3. [茶谷 絵理](#)、小沼 剛、後藤 祐児"アミロイド線維伸長における中間体構造の捕捉と構造解析"
生物物理 **52**, 印刷中 (2012)

学会発表

1. [茶谷 絵理](#) 「インスリンアミロイド線維前駆中間体の捕捉と構造解析」
第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 2012年6月

