トピックス

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

茶谷絵理 神戸大学大学院理学研究科

小沼 剛 サントリー生命科学財団生物有機科学研究所

後藤祐児 大阪大学蛋白質研究所

1. はじめに

アミロイド線維は、タンパク質の誤った折りたたみにより形成される超分子の重合体である。アミロイド線維の沈着を伴う疾患はアミロイドーシスと総称され、約 30 種類報告されている。さらに最近では、神経変性疾患での沈着物もアミロイド線維構造をもつことが明らかとなり、アミロイド線維の形成原理には強い関心が寄せられている。

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重合していく様式で形成される¹⁾。これにより、アミロイド線維は、線維軸に沿って自己の構造を複製しながら一方向に伸びてゆく。伸長によるアミロイド線維の増幅は、疾病が感染し伝播する際の分子基盤と考えられたいへん重要であるが、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いまだに明らかにされていない。

これを解明するため、筆者らは、透析アミロイドーシスの原因タンパク質である β_2 ミクログロブリンのアミロイド線維について、伸長過程で経由する速度論的中间体を捉えて観察しようとした。本稿では、これまでに行ってきた一連の解析について紹介したい。

2. どのようにすれば伸長中間体を捉えられるか

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。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経由することが予想されるものの、捕捉した事例は報告されていない。しかし、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（図 1）。

3. トリプトファン蛍光測定による伸長中間体の実証

上記の考えに基づき、筆者らは、中間体が蓄積するようすを反応速度論の観点から捉えようとした。伸長反応の追跡にはトリプトファン蛍光スペクトル変化を用いたが、高シード濃度条件では、シード由来の蛍光が測定のための大きな妨げとなり、モノマーとして添加したタンパク質由来のスペクトル変化をうまく観測できなかった。そこで、タンパク質分子内部のトリプトファン残基を潰した無蛍光性の変異体シードを作製したところ、あらゆるシード濃度条件で蛍光スペクトル変化の追跡ができるようになった（図 2a）。一定濃度の希薄モノマー溶液にさまざまな濃度でシードを加えて測定を行った結果、見かけの速度定数が高シード濃度領域で飽和することが確認された（図 2b）。これは、酵素反応の前定常状態で見られる現象であり、伸長中間体の存在がはじめて確認された。

興味深いことに、速度定数の飽和は予想に比べてはるかに低いシード濃度で観察され、結合しているモノマー数は、1つのシード末端に対しおおよそ数十にもなることが示された。筆者らにとっても予想外であったが、線維末端の側面付近にも複数のモノマーが不活性型として結合することでリザーバーのような役割を果たし、線維軸方向に効率よく伸長するという新たなモデルが提案された（図 2c）。

4. 水素-重水素(H/D)標識による中間体の構造解析

さらに、伸長中間体のより詳細な構造特徴を知るため、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 H/D 標識-NMR 法を用いての構造解析を試みた。図 3a はクエンチフロー装置の概要である。4 種類の溶液を逐次

Kinetic Intermediate of β_2 -microglobulin Fibril Elongation Probed by Tryptophan Fluorescence Spectroscopy and H/D Exchange-NMR

Eri CHATANI¹, Tsuyoshi KONUMA² and Yuji GOTO³

¹Graduate School of Science, Kobe University

²Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences

³Institute for Protein Research, Osaka University

※図 3 は、電子ジャーナル (<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

図 1 核依存性伸長反応過程に經由することが予想される速度論的中間体。

図 2 (a) 伸長反応に伴うトリプトファン蛍光スペクトル変化の 1 例。鎖線 (反応開始 10 秒後) から実線 (600 秒後) に向かって変化するようすが観察された。破線は反応前の酸変性モノマーのスペクトル。(b) 高シード濃度領域での速度定数の飽和のようす。シードの破碎レベルを変えたところ、線維末端数が多くなるにつれて飽和濃度が低濃度側にシフトした。(c) 解析結果より提案された線維の伸長スキーム。

図 3 (a) パルス H/D 標識の概略。(b) その後の NMR 解析により得られた重水素交換プロファイル。酸変性モノマーを差し引いた差プロファイルとして示した結果、酸変性構造に残存する疎水性クラスター領域 (63-68 位) に負のピークが確認された。上部の横線は、ネイティブ構造での β シート領域を示す。

混合することにより、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、120 ミリ秒というごく短い H/D 交換パルスを与えた。その後、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。溶液 NMR によるアミロイド線維の直接観測は困難であるが、星野らが開発したジメチルスルホキシドで解離させる方法³⁾を組み合わせ、実施することができた。

その結果、中間体構造の H/D 交換は酸変性状態に類似しており、ほぼほど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。先述のように、伸長中間体ではモノマーは線維側面にも結合していることが予想される。もし不活性型が強固に線維側面と相互作用していれば、線維末端へのダイナミックな移動、あるいは再結合が阻まれるであろう。弱い相互作用様式は、1つの線維末端に多数結合しながら伸長するスキームにおいて、たいへん合理的である。

同時に、酸変性構造に存在する 63-68 位の疎水性クラスター領域までがほどけているという、興味深い特徴も明らかとなった (図 3b)。筆者らは、同領域が線維末端の認識に関与するのではないかと考えている。

5. おわりに

今回の伸長中間体の捕捉および構造解析により、アミロイド線維化に伴うタンパク質分子の構造変化に大きく迫ることができた。アミロイド線維は扱いが難しく構造情報が乏しいが、今後さらに解析条件や方法の工夫を行い、これまでのフォールディング研究で行われてきた中間体構造の観察に並ぶ残基レベル、定量レベルでの解析をめざすことで、アミロイド線維形成機構の解明の道がより大きく拓けることが期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、大西玲奈氏、櫻井一正博士、八木正典博士、池上貴久博士、内木宏延教授との共同研究であり、ここに深く感謝いたします。

文 献

- 1) Jarrett, J. T., Lansbury P. T. Jr. (1993) Cell 73, 1055-1058.
- 2) Chatani, E. *et al.* (2010) J. Mol. Biol. 400, 1057-1066.
- 3) Hoshino, M. *et al.* (2002) Nat. Struct. Biol. 9, 322-326.
- 4) Konuma, T. *et al.* (2011) J. Mol. Biol. 405, 851-862.

茶谷絵理

茶谷絵理 (ちゃたに えり)

神戸大学大学院理学研究科准教授
京都大学大学院農学研究科修了、博士 (農学)。
日本学術振興会特別研究員 (阪大蛋白研)、立命館大学薬学部助教などを経て 2011 年より現職。
研究内容: アミロイド線維の形成機構
連絡先: 〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1
E-mail: chatani@crystal.kobe-u.ac.jp

小沼 剛 (こぬま つよし)

サントリー生命科学財団生物有機化学研究所研究員
連絡先: 〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1
E-mail: konuma@sunbor.or.jp

後藤祐児 (ごとう ゆうじ)

大阪大学蛋白質研究所教授
連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2
E-mail: ygoto@protein.osaka-u.ac.jp