トランスサイレチンの中性子結晶構造解析で明らかにする 水素結合ネットワークと pH 感受性

富山大学大学院医学薬学研究部(薬学) 横山武司, 水口峰之

茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター 日下勝弘, 田中伊知朗, 新村信雄

Takeshi YOKOYAMA, Mineyuki MIZUGUCHI, Katsuhiko KUSAKA, Ichiro TANAKA and Nobuo NIIMURA: Neutron Crystallographic Analysis Elucidates the Hydrogen-Bond Network and pH Sensitivity of Human Transthyretin

Transthyretin (TTR) is a plasma protein associated with human amyloid diseases. The dissociation of the TTR tetramer is considered to be the rate-limiting step in amyloid fibril formation. The amyloid fibril formation by TTR is known to be promoted by acidic pH. In order to reveal the molecular mechanisms of pH dependence of TTR amyloidogenesis, the neutron crystal structure of TTR was solved at 2.0 Å resolution using IBARAKI Biological Crystal Diffractometer. The neutron structure revealed that His88 was single protonated and involved in a large hydrogen-bond network consisted of Thr75, Trp79, Pro113 and water molecules. The double protonation of His88 by acidification breaks this hydrogen-bond network and causes the destabilization of the TTR tetramer. Furthermore, the comparison with X-ray structure solved at pH 4.0 indicated that the protonation occurred to Asp74, His88 and Glu89 at pH 4.0. Our structural analysis reveals a wealth of information about the hydrogen bonds and the pH sensitivity in human TTR.

1. はじめに

アミロイドーシスはアミロイド線維がさまざまな臓器に沈着してその機能障害を起こす病気の総称であり、厚生労働省が特定疾患として指定している。アミロイド線維はアミロイドβペプチド、プリオン、トランスサイレチン(TTR)などのアミロイド性タンパク質が変性・ミスフォールディングすることによって形成される。^{1,2)} TTRが形成するアミロイド線維は家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)や老人性全身性アミロイドーシスを発症している患者から見つかっている。³⁾ FAPはアミロイド性変異体TTRが原因の疾患であり、これまでに、FAPの原因となる100種類以上もの変異が同定されている。⁴⁾

TTRは血漿タンパク質であり、ホルモン物質サイロキシシン(T4)を運搬する役割を担っている。⁵⁾ TTRは血液中でホモ4量体を形成する(図1)。各サブユニットは127アミノ酸残基からなり、便宜上、A-Dと名付けている。TTRは主に4量体(ABCD)を形成しているが、血液中では2量体(AB, CD)、単量体の3者平衡状態にある。単量体同士の会合によってAB(CD)2量体を形成し、AB(CD)2量体同士の会合によって4量体を形成する。TTRは経時的に、あるいはpH低下によって単量体へ解離し、さらに単量体TTRがミスフォールディングし、可溶性凝集体を経てアミロイド線維を形成する。⁶⁾ その律速段階はTTR4量体の

図1 TTR4量体の結晶構造と2量体-2量体相互作用。(Crystal structure of TTR tetramer and dimer-dimer interaction.)

解離であると考えられている。⁷⁾ 実際に、タファミデイス(Vyndaqel®)はTTRに結合して4量体を安定化することでアミロイド線形成を阻害する薬剤であり、ヨーロッパと日本で実用化されている。⁸⁾

酸性条件下においてアミロイド線維形成が促進されることが知られているが、これはpH低下によるTTR4量体解離と変性によるものだと考えられる。⁹⁾ しかしながら、pH低下に伴うアミロイド線維化促進の分子機構は明らかになっておらず、また、通常の研究方法では明らかにする

のが難しい。実際、これまでに数多くのTTR結晶構造が明らかにされてきたが、その詳細は明らかになっていない。タンパク質におけるpH依存性は主に酸性・塩基性アミノ酸残基のプロトン化状態が変化することによって由来する。¹⁰⁾ TTRにおけるpH依存的構造安定性を構造学的に理解するためには水素原子やプロトン化状態の情報が必要である。そこで筆者らは、中性子結晶構造解析によってpHとTTRの構造安定性の関係を明らかにすることを考えた。X線は電子によって散乱されるが、中性子は原子核によって散乱される。したがって、中性子を用いれば水素原子を比較的容易に観測できる。例えば2.0 Å分解能のデータでもプロトン化状態や水分子の方位を決定することが十分に可能である。

本稿では、大強度陽子加速器施設(J-PARC)の物質・生命科学実験施設(MLF)に建設された茨城県生命物質構造解析装置(iBIX)を利用してTTR単結晶の中性子回折データを収集し、構造解析によって明らかにしたTTRにおけるプロトン化状態、水素結合ネットワーク、pH感受性について議論する。¹¹⁾

2. 中性子結晶構造解析

2.1 大型結晶作製

一般的に、中性子回折データを収集するためには1 mm³以上の結晶を用意することが望ましい。また、中性子は(軽)水素原子によって強い非干渉性散乱を起こし、タンパク質結晶の回折点が埋もれてしまう。重水素であればこの問題を回避することができるため、結晶化に使用する試料はすべて重水素置換するか、重水で調製した結晶化剤・緩衝液を用いる。これまでにTTRの中性子結晶構造解析の成功例はなく、まずは生理条件に近い中性付近での結晶化を試みた。TTRの大型結晶は、5 mLのリザーバー溶液(1.85 M クエン酸3アンモニウム pD 7.4)と平衡化した400 µLのドロップレット(9.5 mg/mL タンパク質, 1.0 M クエン酸3アンモニウム pD 7.4, 0.2 M 塩化マグネシウム)から得られた。結晶は2~3週間程度で析出し始め、3カ月程成長を続けて最終的に2.5 mm³まで成長した(図2a)。結晶を石英キャピラリーに封入して常温で回折測定を行った。

2.2 中性子回折測定

J-PARCはパルス中性子を供与しており、iBIXでは飛行時間測定法で中性子データを収集する。これは中性子がエネルギーによって異なる速度で飛行することを利用したものであり、白色中性子によるラウエ回折を時分割測定できるため、効率良くデータを収集できる。データ収集時の波長範囲は2.7~6.7 Åで、41セット(結晶方位)を13台の検出器を用いて収集した。1セット当たりの照射時間はJ-PARCの加速器出力が120 kWの時20時間、220 kWのとき12時間とした。全体的に回折強度が弱いものの

図2 (a) TTR結晶写真。(Photograph of TTR crystal.)
(b) iBIXで測定した回折像。(Diffraction image collected at iBIX.)

(全体の $I/\sigma(I) = 4.3$, 最外殻: 1.5), それぞれの回折点は鋭く観測できているため、構造解析が十分に可能であることがわかる(図2b)。2.0 Å分解能までのデータを用いて積分強度計算を行った結果、 R_{sym} が19.1%, 完全性が86.4%だった。常温のX線結晶構造を初期モデルに用いて構造精密化を行い、最終的な R_{factor} と R_{free} はそれぞれ23.4%, 27.2%だった。

3. TTRの中性子結晶構造

3.1 水素結合ネットワークとpH感受性

タンパク質に含まれるアミノ酸残基のなかで中性付近の pK_a 値をもつのはヒスチジン側鎖(とN末端アミノ基)であるため、まずヒスチジン側鎖のプロトン化状態の決定を試みた。ヒスチジン側鎖の(重)水素原子をオミットして計算した差フーリエ図から、すべてのヒスチジン残基のプロトン化状態を決定することができた。同様に、水分子の方位も重水素原子をオミットして計算した差フーリエ図から決定した。観測された55の水分子の内、14分子をDODとして精密化することができた。これらの中で最も興味深いのがHis88とその周辺の水分子である。His88の $N^{\delta 2}$ 原子はプロトン化されている一方で、 $N^{\delta 1}$ 原子はプロトン化されておらずアクセプターとして水分子と水素結合を形成していた(図3)。この水分子はさらに2つの水分子、Thr75とTrp79の側鎖、Ser112とPro113の主鎖カルボニル基を含めた大きな水素結合ネットワークを形成していた。この水素結合ネットワークは計8本の水素結合からなり、TTRの立体構造安定性に寄与していることが強く示唆された。pHが低下するとTTRの構造が不安定化するのは、His88の $N^{\delta 1}$ 原子がプロトン化されることによってこの水素結合ネットワークが維持できないからであると推測される。

実際に酸性pH下でHis88がダブルプロトン化されるのかを検証するために、pH 4.0での結晶構造と比較した(PDB ID: 3D7P)。¹²⁾ この結晶構造ではHis88を含む領域が、中性付近での結晶構造と異なっていることが知られている。したがって、これらの構造を比較することによって

図3 His88と水分子のオミット差フーリエ図(+3.0 σ). (Omit difference Fourier map around His88 and water molecules (+3.0 σ).)

図5 2量体-2量体界面で形成されている水素結合. (Hydrogen bonds at dimer-dimer interface.)

図4 pD 7.4とpH 4.0の結晶構造比較. (Structural comparison between pD 7.4 and pH 4.0.)

中性からpH 4.0に低下する際にプロトン化されるアミノ酸残基を特定することができる。構造比較した結果、Asp74, His88, Glu90の3つのアミノ酸残基がpH 4.0とpD 7.4では異なる相互作用を形成していた(図4)。Asp74は中性条件下ではSer77と水素結合を形成しているのに対して、酸性条件下ではその側鎖が分子の外側に向き、TTRと溶媒の接触面で水分子と水素結合を形成していた。His88は前述のとおり中性条件下で大きな水素結合ネットワークを形成しているのに対して、酸性条件下では分子の外側の溶媒領域にはじき出され、どのアミノ酸残基とも相互作用していなかった。Glu89は中性条件下でLys76と塩橋を形成している一方で、酸性条件下では塩橋の代わりに水分子と水素結合を形成していた。中性解析によって中性条件下ではAsp74, Glu89はプロトン化しておらず、His88はシングルプロトン化状態であることを確認している。つまり、pHが低下するとこの3つのアミノ酸残基がプロトン化され、中性条件下での構造を維持できず、構造が不安定化することが強く示唆された。

3.2 水素結合ネットワークと四次構造

前項で議論したHis88を含む水素結合ネットワークは四次構造安定性にも深く関係している。His88を含む水素結合ネットワークはThr75, Trp79, Ser112, Pro113, 水分子などが関わっている(図3)。これらの水素結合はすべてサブユニット内で形成されている。一方で、Ser112, Pro113は2量体-2量体界面に位置している(図5)。サブユニットAのSer112(A)とTyr114(A)はそれぞれサブユニットDのSer112(D), Ala19(D)と水素結合を形成しているが、Ser112IleやTyr114Hisはアミロイドーシスを発症する変異体であることが知られており、これらの水素結合が4量体維持に重要であることがわかる。^{13),14)} His88を含む水素結合ネットワークが形成されるとSer112とPro113の構造が安定化され、4量体維持に重要なSer112(A)-Ser112(D), Tyr114(A)-Ala(D)間で形成される水素結合も安定化され、結果的に4量体安定性に寄与していると考えられる。Ser112とPro113の平均温度因子を全体の平均温度因子で割った値を比較してみると、pH 4.0では0.79であったのに対し、pD 7.4では0.63であった。相対的な比較ではあるが、これらのアミノ酸残基はpD 7.4のほうが安定な状態を保持していることが結晶構造からも示唆される。

以上のことをまとめると、pHが低下するとHis88のN δ 1原子がプロトン化され、サブユニット内で形成されていた水素結合ネットワークが破壊される。4量体形成に重要なSer112やTyr114はこの水素結合ネットワークに直接関わっており、この水素結合ネットワークの消失はサブユニット間相互作用を弱めることが示唆された。pH低下とHis88のダブルプロトン化、サブユニットおよび四次構造の不安定化の関係を中性子結晶構造解析によって明らかにした。

4. おわりに

本稿では、中性子結晶構造解析によって決定したプロトン化状態・水素結合ネットワークとpH感受性・構造安定

性の関係を考察し, 酸性pHがアミロイド線維形成を促進する分子機構を明らかにした. TTR アミロイド線維形成カスケードの律速段階はTTR4量体の解離であると考えられており, 構造安定性に関する知識は重要であると考えている.

最近筆者はプレニル化フラボノイドであるグラブリジンとTTR複合体のX線結晶構造解析を行った.¹⁵⁾ その結果から, より阻害活性の高いアミロイド線維形成阻害剤を開発するためには, 疎水性相互作用による結合エネルギーを定量的に得る必要があり, そのための方法として中性子結晶構造解析が有効な手法であると考えられた. なぜなら, 阻害剤結合部位 (T4 結合部位) にはLeu17, Ala108, V121などの疎水性アミノ酸残基が存在し, これらの側鎖とどのように相互作用するかを検証するためには, メチル基の配座を決定する必要があるためである. しかし, 本研究で得られたのはアポ型の結晶構造であったことと, 2.0 Å分解能のデータではH/D交換されないメチル基水素のフーリエピークはばやけて観測されることが多いため, 新規阻害剤開発の足掛かりとなる知見は得られなかった. J-PARC 加速器の出力は今後も上昇させて運転される見込みであり, さらに大きな結晶を用意すれば, メチル基の立体配座を決定できる回折データを収集できると期待している.

謝 辞

本研究で用いたタンパク質試料の調製は富山大学の鍋島裕子が行った. 当時のiBIX開発コアメンバー (茨城大学 山田太郎, 細谷孝明, 友寄克亮, CROSS 大原高志, JAEA 栗原和男) との共同研究として行い, 中性子回折測定は茨城県の県プロジェクトとして行ったものである.

文 献

- 1) A. Surguchev and A. Surguchov: *Brain Res. Bull.* **81**, 12 (2010).
- 2) Y. Ando, S. Araki and M. Ando: *Intern. Med.* **32**, 920 (1993).
- 3) M. J. Saraiva, P. P. Costa and D. S. Goodman: *J. Clin. Invest.* **76**, 2171 (1985).
- 4) J. N. Buxbaum and C. E. Tagoe: *Annu. Rev. Med.* **51**, 543 (2000).
- 5) L. Bartalena and J. Robbins: *Clin. Lab. Med.* **13**, 583 (1993).
- 6) T. R. Foss, R. L. Wiseman and J. W. Kelly: *Biochemistry* **44**, 15525 (2005).
- 7) J. W. Kelly, W. Colon, Z. Lai, H. A. Lashuel, J. McCulloch, S. L. McCutchen, G. J. Miroy and S. A. Peterson: *Adv. Protein Chem.* **50**, 161 (1997).
- 8) C. E. Bulawa, S. Connelly, M. Devit, L. Wang, C. Weigel, J. A. Fleming, J. Packman, E. T. Powers, R. L. Wiseman, T. R. Foss, I. A. Wilson and J. W. Kelly: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 9629 (2012).
- 9) A. R. Hurshman, J. T. White, E. T. Powers and J. W. Kelly: *Biochemistry* **43**, 7365 (2004).
- 10) M. Schaefer, M. Sommer and M. Karplus: *J. Phys. Chem. B* **101**, 1663 (1997).
- 11) T. Yokoyama, M. Mizuguchi, Y. Nabeshima, K. Kusaka, T. Yamada, T. Hosoya, T. Ohhara, K. Kurihara, K. Tomoyori, I. Tanaka and N. Niimura: *J. Struct. Biol.* **177**, 283 (2012).

- 12) S. K. Palaninathan, N. N. Mohamedmohaideen, W. C. Snee, J. W. Kelly and J. C. Sacchettini: *J. Mol. Biol.* **382**, 1157 (2008).
- 13) M. Mizuguchi, T. Yokoyama, Y. Nabeshima, K. Kawano, I. Tanaka, N. Niimura: *Amyloid* **19**, 5 (2012).
- 14) Y. Shinohara, M. Mizuguchi, K. Matsubara, M. Takeuchi, A. Matsuura, T. Aoki, K. Igarashi, H. nagadome, Y. Terada and K. Kawano: *Biochemistry* **42**, 15053 (2003).
- 15) T. Yokoyama, Y. Kosaka and M. Mizuguchi: *J. Med. Chem.* **57**, 1090 (2014).

プロフィール

横山武司 Takeshi YOKOYAMA
富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学)
Faculty of Pharmaceutical Sciences University of Toyama
〒930-0914 富山県富山市杉谷 2630
2630 Sugitani, Toyama 930-0914, Japan
専門分野: 構造生物学・医薬品化学
現在の研究テーマ: タンパク質の中性子結晶構造解析・天然物を利用した創薬研究

水口峰之 Mineyuki MIZUGUCHI
富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学)
Faculty of Pharmaceutical Sciences University of Toyama
〒930-0914 富山県富山市杉谷 2630
2630 Sugitani, Toyama 930-0914, Japan
専門分野: 構造生物学・タンパク質科学
現在の研究テーマ: 疾患関連タンパク質の構造・機能解析

日下勝弘 Katsuhiro KUSAKA
茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター
Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University
〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 162-1
162-1 Shirakata, Tokai, Naka, Ibaraki 319-1106, Japan
専門分野: 結晶学・中性子構造解析
現在の研究テーマ: 生体高分子用 TOF 単結晶回折装置の開発とその利用研究

田中伊知朗 Ichiro TANAKA
茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター
Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University
〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 162-1
162-1 Shirakata, Tokai, Naka, Ibaraki 319-1106, Japan
専門分野: 中性子構造生物学・中性子回折実験技術開発
現在の研究テーマ: 水和水や水素結合に着目した構造生物学・核偏極中性子回折法の開発

新村信雄 Nobuo NIIMURA
茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター
Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University
〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 162-1
162-1 Shirakata, Tokai, Naka, Ibaraki 319-1106, Japan
専門分野: 中性子構造生物学
現在の研究テーマ: 極性アミノ酸残基のpKa評価