

業績紹介：薬物に結合した α -synuclein 2 量体の超高磁場 NMR 解析

山口芳樹

(理研・糖鎖構造生物学研究チーム)

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

長谷川成人

(東京都医学研究機構・精神研)

論文題目: "Characterization of inhibitor-bound α -synuclein dimer: Role of α -synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding"

著者: Yoshiki Yamaguchi, Masami Masuda, Hiroaki Sasakawa, Takashi Nonaka, Shinya Hanashima, Shin-ichi Hisanaga, Koichi Kato, Masato Hasegawa

雑誌巻号: *J.Mol. Biol.* **395**, 445-456 (2010)

α -synuclein は生理的条件下で立体構造を形成していない、天然変性タンパク質の一つである[1]。このタンパク質の会合体はパーキンソン病や他のシヌクレイン病に特徴的な filamentous inclusion の主要な構成成分となっていることが知られている。ポリフェノール化合物はこの会合を数 μ M オーダーの IC_{50} 値で阻害できることが報告されており、そのような条件下では α -synuclein は界面活性剤(SDS)を加えても解離しない、非毒性で可溶性のオリゴマーを形成することが示されていた[2,3]。しかしながら、これらポリフェノール化合物と α -synuclein のオリゴマー形成の詳細なメカニズムはこれまで不明であった。そこで私たちはポリフェノールおよびその類縁体である exifone, gossypetin、dopamine 存在下で α -synuclein 2 量体を調製して、阻害剤が結合した α -synuclein のオリゴマー構造を 920MHz NMR 装置を用いて解析し、これらの化合物による阻害メカニズムを明らかにした。

exifone を加えた条件下で調製した α -synuclein の単量体と 2 量体についてペプチドマッピング法と質量分析法により解析した結果、4つのメチオニン残基の全てが酸化されていることが明らかとなった。また、これらの試料を Asp-N プロテアーゼで分解してイムノブロット解析と redox-cycling staining を行った結果、N 末端側の領域 (1-60) が 2 量体化と exifone の結合に関与していることが明らかとなった。

次に、阻害剤が結合した α -synuclein 2 量体を NMR により解析した結果、N 末端側の領域のアミノ酸に由来するシグナルの顕著な広幅化が観測された。このことは N-末端側の領域が阻害剤により誘導される 2 量体化を媒介していることを示している。

このような N 末端側の変化に対して、C 末端側は、単量体と 2 量体の α -synuclein を比較してもほとんど差異がなく、ランダムコイルの状態のままであることが示された。

これらの結果は、 α -synuclein の N 末端領域が分子間の会合において重要な役割を果たしていることを意味している。

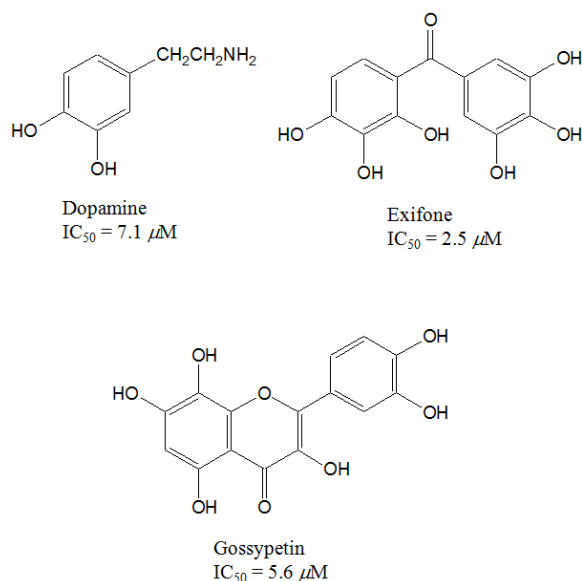


図: 本研究で用いた凝集阻害剤

参考文献

- [1] H. Sasakawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 795-799 (2007).
- [2] M. Masuda et al., *Biochemistry* **45**, 6085-6094 (2006).
- [3] M. Masuda et al., *FEBS Lett.* **583**, 787-791 (2009).

業績紹介：ガングリオシドミセルの構造およびアミロイドβとの相互作用

矢木・内海 真穂

(名古屋市立大学大学院薬学研究科)

加藤 晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目: "NMR characterization of the interactions between lyso-GM1 aqueous micelles and amyloid β "

著者: Maho Yagi-Utsumi, Tomoshi Kameda, Yoshiki Yamaguchi, Koichi Kato

雑誌巻号: *FEBS Letters*. **584**, 831-836 (2010)

一般に糖脂質は、細胞表面にクラスターを形成することにより、細胞間接着、シグナル伝達、あるいはウイルス毒素の受容など、様々な生体認識に関与していることが知られている。近年、神経細胞膜に豊富に存在する糖脂質である GM1 ガングリオシドは、アミロイドβペプチド(Aβ)の重合を促進する環境因子の1つとして注目されており、Aβと GM1 の複合体が核となって Aβの凝集が促進され、アルツハイマー病発症に関与している可能性が報告されている。したがって、Aβの重合開始を担う GM1-Aβ複合体の高次構造を解明することは、アルツハイマー病をターゲットとする創薬研究の基礎を築くとともに、Aβと GM1 との複合体形成を契機とする重合機構に関する分子科学的な理解を促す。これまでに私たちは、CD および NMR 解析を通じて、GM1 と共通の糖鎖構造を有するがセラミド部分が欠損した lyso-GM1 ミセルにも Aβは結合し、GM1 ミセルに結合した際と同様のコンフォメーションおよびトポロジーを形成することを明らかにしている[1]。また、溶液中で単分散した状態にある GM1 に関しては NMR 法を用いた構造解析が多数報告されているが、水溶液中でミセルを形成している状態の GM1 の構造解析はほとんどなされていなかった。

そこで、本研究において私たちは、920 MHz NMR 計測を行い、水溶液中で GM1 に比べて小型のミセル (60 kDa) を形成する lyso-GM1 と Aβとの相互作用に関する情報を得た。まず、NOE データに基づく距離情報を制限項として分子動力学計算を行うことにより、lyso-GM1 の糖鎖部分のコンフォメーションを決定した (図 1)。このミセルに Aβを添加した結果、脂質頭部

に由来するシグナルに選択的な化学シフト変化が観測された。また、部位特異的変異導入と化学修飾を利用して Aβの C 末端をスピララベル化し、常磁性効果を利用した NMR 解析を行った。その結果、lyso-GM1 の脂質頭部に加えて糖鎖の還元末端に位置する Glc^I や Gal^{II} に由来するシグナルに緩和の促進がみとめられた (図 1)。以上の結果から、Aβとの結合には、ガングリオシドクラスターの内部に位置する還元末端の糖残基および脂質の頭部部分が関与しているということが本研究により初めて明らかとなった。これは、コレラ毒素やポリオーマウィルスと相互作用する場合には、GM1 の非還元末端に位置する糖残基が関与しているのと対照的な結果であった。GM1 クラスターがこうした限定された空間を形成することこそが、Aβの構造変化および重合の契機となる特異な分子内・分子間相互作用を誘起するものと考察される。

Aβと GM1 の相互作用系にみられるように、細胞表面におけるタンパク質の糖鎖認識は、糖脂質分子がクラスターを形成してダイナミックな「相互作用の場」を提供することが要求される。このような揺らぎを伴う超分子系を解析対象とすることは実験・理論のいずれのアプローチにおいても困難を伴うが、こうした複雑なシステムに対しても構造生物学的な研究手法を開拓し、糖鎖-タンパク質相互作用さらには糖鎖-糖鎖相互作用の構造基盤を探索していきたいと考えている。

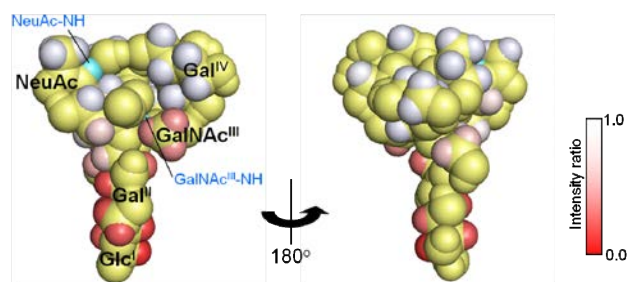


図1 lyso-GM1の糖鎖部分の立体構造およびAβの結合部位のマッピング(赤色)。Aβに付加したスピララベルがlyso-GM1のCHシグナルに及ぼす強度減弱の度合いをマッピングした。

参考文献

- [1] M. Utsumi et al., *Glycoconjugate J.*, **26**, 999-1006 (2009)

業績紹介：微細加工技術によるマイクロピラー基盤の使用により原子間力顕微鏡による1分子力学測定のカと粘性の感度向上を達成

川上勝

(北陸先端大・A01 公募研究代表者)

論文題目："Reduction of the damping on an AFM cantilever in fluid by the use of micro pillar stage"

著者：Kawakami, M., Taniguchi, Y., Hiratsuka, Y., Shimoike, M. and Smith, D. A.

雑誌巻号：Langmuir, 26, 2, 1002-1007, 2010

近年、1分子力学測定として原子間力顕微鏡（AFM）技術を用いた手法が発展してきている。AFM法は光ピンセット法などに比べカルの検出感度が低いカが大きナ問題であったが、基質の結合によるタンパク質のダイナミクス変化など、生物学的に意義の有る系に対しAFM法は精力的に応用されるようになり、より精度のが高い力学測定が求められている。また、分子を捕えているカンチレバーの「熱揺らぎ」や「強制振動」の解析により、1分子の「粘弾性」を測定してダイナミクス情報を得る新しいAFM手法が示されつつある。

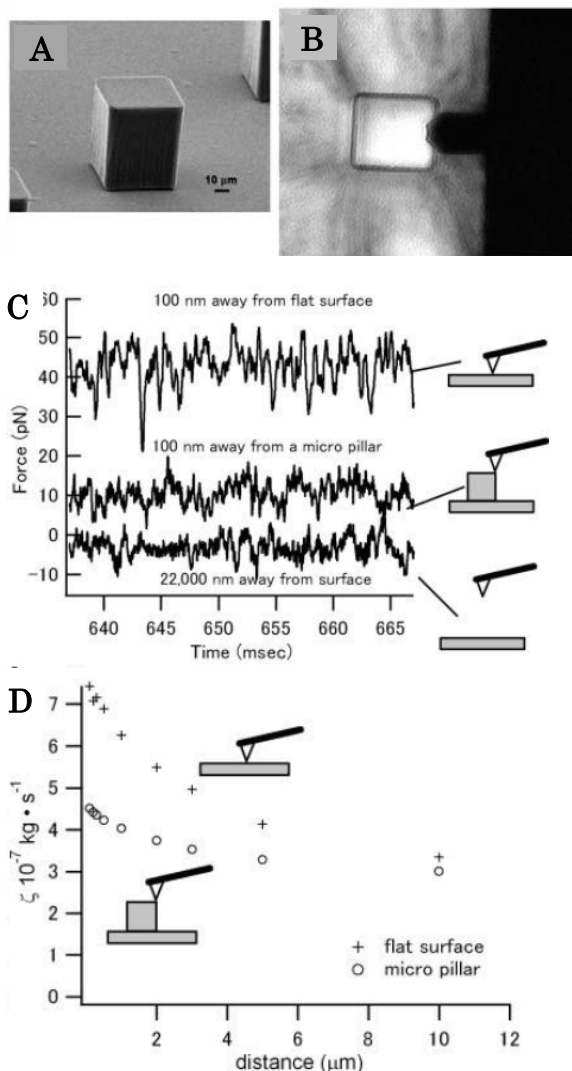
しかし液中での測定において、カンチレバー自身の大きな粘性値のばらつきが、1分子粘性の検出感度に大きく影響してしまうカが問題であった。カルの検出感度の限界値はカンチレバーの熱揺らぎによって理論的に決まってしまうが、揺らぎの振動数を高く保つことができれば、ローパスフィルタによって数学的に除去できる。またカンチレバー自身の粘性については、レバーの梁部分と、基板表面との間に生じる流体力学的作用による寄与が大きく、これがカンチレバーの共鳴ピークのQ値を低下させ、揺らぎ（ノイズ）の振動成分を低周波数へシフトさせている。この相互作用の低減が出来れば、1分子粘性と力学測定の双方での感度向上が期待される。

本研究では、微細加工技術を用い、マイクロピラー構造を持った基盤(図A)を作成し、カンチレバー先端部のみがピラー上部に触れるように配置させる(図B)ことで、基盤との相互作用を減らし、カンチレバー自身の粘性値の低減と熱揺らぎ信号の除去を試みた。

その結果、狙い通りにカンチレバーの共鳴ピークは基盤に近い位置でも高く保たれており、熱揺らぎ信号

はローパスフィルタによって大幅に低減し(図C)、粘性値は平面基盤に比べて半減することを確認した(図D)。その結果として1分子のカと粘性の測定感度の大幅な向上を達成できた。

今後、この新規アプローチによるAFM測定法が広く普及し、生化学的に意義の高い、しかし低いカルの域で起こるようなイベントに対する鋭敏なタンパク質1分子力学測定、粘弾性（ダイナミクス）測定研究が発展することが期待される。



図A:マイクロピラーの電子顕微鏡写真 B:カンチレバーと基盤の上方からの顕微鏡像 C:カンチレバーの熱揺らぎ信号(ローパスフィルタ使用) D:カンチレバーの粘性の距離依存性。

業績紹介：小麦胚芽無細胞系を用いたアミノ酸標識 β 2 ミクログロブリンの発現と、フォールディング中間体のNMR解析

後藤祐児

(大阪大学蛋白研・A01 公募研究代表者)

論文題目："NMR-based characterization of a refolding intermediate of β 2-microglobulin labeled using a wheat germ cell-free system"

著者：Atsushi Kameda, Eugene-Hayato Morita, Kazumasa Sakurai, Hironobu Naiki, and Yuji Goto

雑誌巻号：Protein Science, 18, 1592–1601 (2009)

長期血液透析患者に頻発する透析アミロイドーシスは、 β 2 ミクログロブリン (β 2m) がアミロイド線維を形成することによって発症する。 β 2m の Pro32 は天然構造でシス異性をとる。アミロイド線維の形成には、Pro32 がトランス異性となった中間的構造をとることが必要である[1,2]。我々は NMR を用いて β 2m の酸変性状態からのフォールディング中間体の解析を行って来た[1]。しかしながら、中間体の HSQC スペクトルに特異的に出現するピーク (図 1 A, D) を帰属することは、その寿命が短いために困難であった。

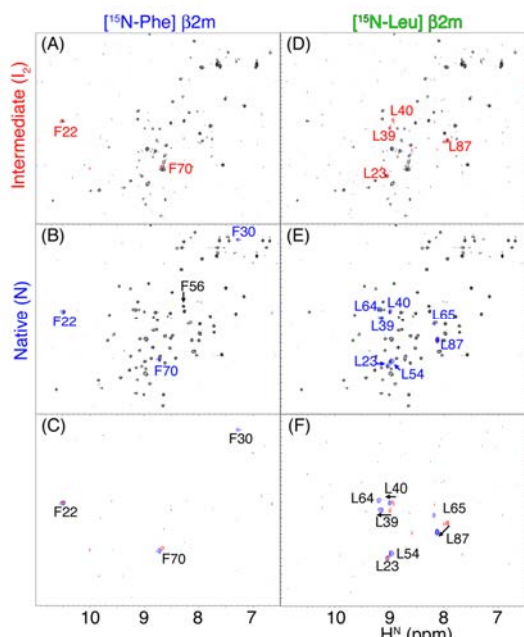


図1 ^{15}N -Phe, ^{15}N -Leu標識 β 2m の HSQC スペクトル。均一標識 β 2 m スペクトル (黒) を重ね表示。(C), (F)は、標識 β 2 m の中間体 (赤) と天然構造 (青) を重ね表示。

本論文では、このような中間体の立体構造を詳細に調べるために、Phe, Leu, Val のそれぞれをアミノ酸特異的に ^{15}N 標識した β 2m を、小麦胚芽無細胞蛋白質合成系によって発現精製した。それぞれ 5 mL の反応溶液から 0.5 mg の蛋白質の精製できた。これらの蛋白質の HSQC スペクトルを測定することによって、Phe, Leu, Val が特異的に標識されていることを確認した。次に酸変性状態からのリフォールディング中間体について HSQC スペクトルを測定し、中間体における挙動を調べた (図 1)。その結果、中間体は天然構造と類似したコア領域を形成していること、しかしながら、Pro32 の周辺の構造は壊れていることが示された。特にストランド B やストランド E の前半の揺らぎによってアミロイド前駆体構造の形成されることが示唆された。

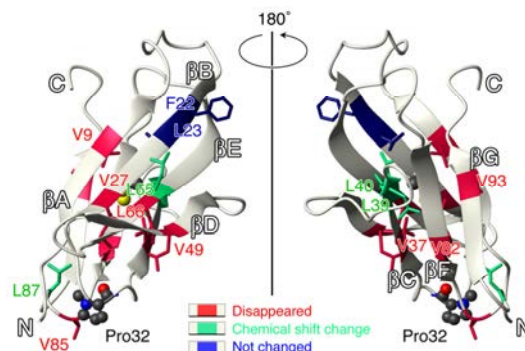


図2 アミノ酸特異的 ^{15}N 標識 β 2m を用いて解析したフォールディング中間体の構造。中間体の NMR 情報を、天然構造上に示した。Pro32 を中心とする分子の下半分の残基において、天然構造が形成されていなかった。

以上のように、小麦胚芽無細胞蛋白質合成系によってアミノ酸特異的に蛋白質を ^{15}N 標識し、そのリフォールディング中間体を NMR 解析して、中間体に関する詳細な情報を得ることができた。まだ、発現量は少なく、限られた実験しかできなかったが、これを発展させれば、蛋白質のフォールディング中間体だけでなく、アミロイド線維形成の中間体についても有用な情報を得ることができるであろう。

参考文献

- [1] Kameda et al. J Mol Biol. 348, 383–397 (2005).
- [2] Sakata et al. J. Mol. Biol. 382, 1242–1255 (2008).

業績紹介：フォールディング経路が保存されていない相同蛋白質

桑島邦博

(岡崎統合バイオ・A03 計画研究代表者)

論文題目: "Different folding pathways taken by highly homologous proteins, goat α -lactalbumin and canine milk lysozyme"

著者: Takashi Nakamura, Koki Makabe, Katsuaki Tomoyori, Kosuke Maki, Atsushi Mukaiyama, and Kunihiro Kuwajima

雑誌巻号: *J. Mol. Biol.* **396**, 1361-1378 (2010).

α ラクトアルブミンとリゾチムは互いにアミノ酸配列の類似した相同蛋白質であり、それらのフォールディング経路が進化的に保存されているか否かを明らかにすることは、蛋白質のフォールディング問題を考える上で重要である。

我々は、ヤギ α ラクトアルブミン (GLA) のフォールディング反応の速度論的解析を行い、以前に研究されたイヌ乳リゾチム (CML) の結果と比較した。GLA は Ca^{2+} 存在下では非存在下に比べて巻き戻り速度は 104 倍速くなるが、変性速度は Ca^{2+} の有無にあまり依存しない。一方、CML の巻き戻り速度は Ca^{2+} の存在・非存在でほとんど変わらないが、変性速度は Ca^{2+} 非存在下では存在下に比べて 1000 倍以上速い。また、水素/重水素交換 NMR から GLA は C-ヘリックス、CML は A、B-ヘリックスが巻き戻り中間体中で構造化していることがわかった。これらの実験から GLA と CML は互いに相同で立体構造も類似しているがフォールディング経路が異なることが明らかになった。

このフォールディング経路の違いを考察するために、天然状態の GLA 及び CML について、それぞれ全原子-全原子間の距離を計算し、相互作用の密度を調べた。GLA では C-ヘリックスと β ドメイン間 (図上 G8)、CML では A、B-ヘリックスと D-ヘリックス及び C 末端間 (図下 C9, C10, C11) に相互作用密度の高い領域があった。この天然立体構造中の相互作用高密度領域の分布の違いが GLA 及び CML のフォールディング経路の違いをもたらしていると推察される。また、これら相互作用高密度領域には高い割合で芳香族側鎖を持つアミノ酸残基 (Trp, Tyr) が含まれていた。これらと相

互作用しているアミノ酸残基も嵩高くて疎水的な側鎖を持つアミノ酸残基 (Phe, Ile, Val) や嵩高く極性側鎖を持つアミノ酸残基 (Gln, Asn, Glu, His, Lys) であった。これらのアミノ酸残基と芳香族側鎖を持つアミノ酸残基間の疎水相互作用や水素結合が、GLA と CML のフォールディング経路を決定するのに重要な役割を果たしていると考えられる。

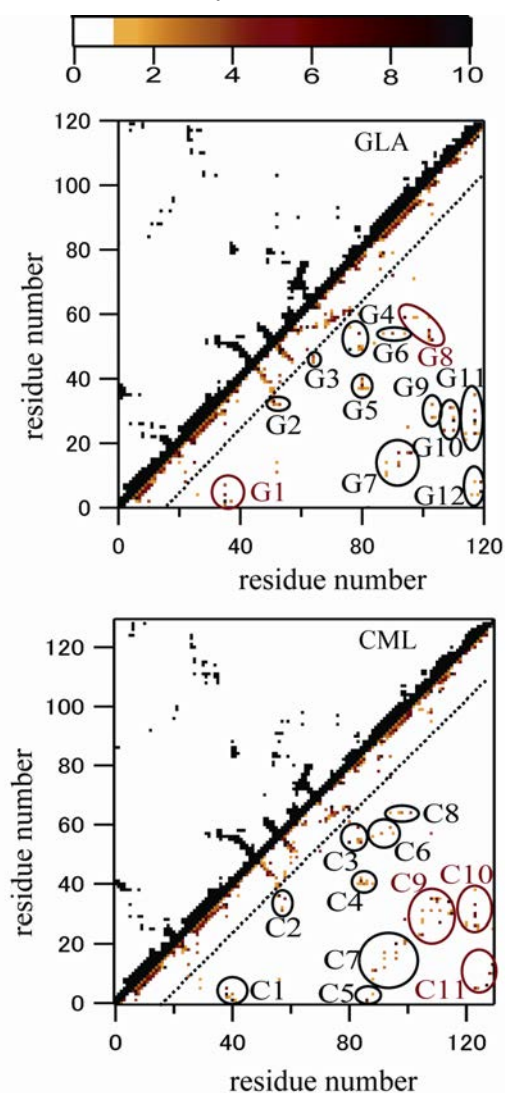


図. GLA (上) と CML (下) の C^{α} - C^{α} (左上側) 及び全原子 (右下側) のコンタクトマップ。上部にあるスケールは、全原子のコンタクトマップにおいて、各残基間で 4Å 以内にある原子対数を示している。赤い丸に囲まれている領域が相互作用密度が高かった。

業績紹介：カリウムチャネルの開閉に伴う細胞内ドメインの構造変化

井出 徹

(阪大生命機能・A03 公募研究代表者)

論文題目：" Rearrangements in the KcsA Cytoplasmic Domain Underlie Its Gating"

著者：Minako Hirano, Yuko Takeuchi, Takaaki Aoki, Toshio Yanagida, Toru Ide

雑誌巻号：J Biol Chem. **285**, 3777-3783 (2010)

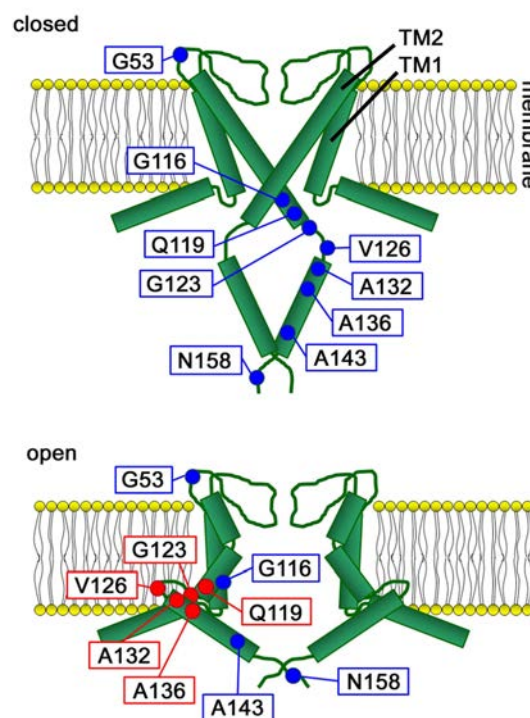
イオンチャネルは生体膜に存在し、細胞内外のイオン環境を調節することにより細胞の生理機能を制御するタンパク質である。本研究では、K チャネルの一つである KcsA チャネルの活性の制御に重要な細胞内ドメインの構造変化を、蛍光強度の変化として捉えたことを報告する。

KcsA チャネルは不活性化（閉）状態の結晶構造は解かれているが、そのチャネル開閉機構は明らかになっていない。活性化（開）状態の構造が明らかとなっている他の K チャネルとの比較や MNR による構造情報から、チャネルの活性化に伴い大きく構造が変わる可能性が示唆されていた。

我々は、タンパク内（特に細胞内領域）の特定部位のアミノ酸をそれぞれ特異的にテトラメチルローダミンマレイミド(TMRM)で蛍光標識し、リポソームに再構成後、活性化(開)条件下(pH4)と不活性化(閉)条件下(pH7)で蛍光強度を測定した。TMRM は疎水性環境下では蛍光強度が高く、親水性環境下ではその強度が低いことが知られており、蛍光強度変化から蛍光分子の環境変化、即ちタンパクの構造変化が検出される。実験の結果、特異的に標識された9つの蛍光標識変異体のうち膜貫通領域のC末端とそれに続く細胞内ドメインに蛍光標識した5つの変異体では、pH4 では蛍光強度が高く、pH7 では低くなることがわかった。このことから、これらの領域は活性化（開）状態では疎水性の環境下に存在し、不活性化（閉）状態では親水性環境下に存在すると考えられる。

この結果から、細胞内領域はチャネルが閉状態にあるときは溶液中に突き出した構造を取るが、開状態にあるときは中央付近で屈曲し、その一部が膜内（あるいは近傍）に入り込むことが予想された（図）。

さらに、5 つの変異体でみられた活性化条件下での高い蛍光強度が疎水的な膜との相互作用に依ることを確認するため、膜局在消光剤(DPA)存在下で活性化状態での蛍光強度を調べた。その結果、これらの蛍光強度は DPA 非存在下のおよそ 4-5 分の 1 に低下した。このことから、これらの部位は開状態のときには膜中もしくは膜近傍に存在すると考えられる。以上のことにより、膜貫通領域の C 末端とそれに続く細胞内ドメインはチャネルの活性化に伴って大きく構造が変化し、チャネルが開くときは膜に向かって移動することが明らかになった。



図：KcsA チャネルの開閉に伴う構造変化モデル
細胞内領域が開状態では膜近傍あるいは膜中に移動する。4つのサブユニットの内2つのみを表示している。