

R-GIROの活動報告

Project Theme 蛋白質のフォールディングおよびフォールディング病発症機構の解明のための統合研究

神経変性疾患治療に迫るタンパク質フォールディングの研究

タンパク質の構造形成とそれに関わる疾患を究明し物理学、生理学、医学・薬理学の発展に貢献します。

タンパク質は、ペプチド結合でアミノ酸の連なった直鎖が自ら折り畳まれ（フォールディング）、固有の立体構造を形成することで多種多様の働き＝機能を持ちます。しかし、折り畳みの原理は60年以上の間解明されていませんでした。そこでこのプロジェクトではタンパク質のフォールディング問題とそれに関わる疾患（フォールディング病）の解明を目的に、物理化学、生物物理学、分子生物学、薬理・病理学にまたがる統合的な研究を行っています。

フォールディングは、無秩序な（アンフォールド）構造からクルクルと折り畳まれたヘリックス構造や、隣同士の鎖が水素結合してきたβシート構造などが形成され、さらにそれらが特異的に配向してタンパク質固有の立体構造をつくるプロセスによって行われます。アンフォールド構造からフォールド構造へ転移する間に、やや不安定な準安定構造の中間体を経由します。ごくまれに中間体がフォールディングに失敗し（ミスフォールディング）、異常な構造を持つβシートへ転移すると、タンパク質分子同士が次々と凝集して硬いアミロイド線維を形成し、タンパク質本来の機能を果たさなくなってしまいます。近年の研究で、このアミロイド線維がアルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患の発症と関わることが確認されており、それだけに、このメカニズムの解明は基礎科学はもとより、医学、薬理学にも大きく貢献するもの

となるはずですが。

本プロジェクトは、3つの研究に分けて進められています。第一はタンパク質のフォールディング原理の解明、第二はミスフォールディングによってアミロイド線維が形成される過程の解明、第三は実際に神経変性疾患が発病する過程に焦点を当てた研究です。

フォールディング過程での加圧がヘリックス構造の形成を促進することを見出しました。

第一の目的は、タンパク質が正常にフォールディングする原理を明らかにすることです。その一つとして、人工的に設計したペプチドやタンパク質を用いてフォールディング過程で温度や圧力がどのような影響を及ぼすかを調べました。一般に、温度を高くしたり圧力をかけたりすると、立体構造が壊れる（アンフォールドする）ことが知られています。そこでまず1本鎖ヘリックスの温度・圧力応答を調べたところ、温度を上げた時は予想通りヘリックス構造が壊れることがわかりました。ところが圧力をかけた場合には驚くことにヘリックスは安定化し、その形成が促進されたのです。生体内のタンパク質の構造によく見出される2本鎖のコイルドコイルや4本鎖のヘリックスバンドルでも同様の傾向が見られました。そしてこの現象を矛盾なく説明する仮説も提唱することができました。

研究にあたって新たに導入したのが、高圧力NMR（注1）システムで

す。NMR法を適用することで、それまで見えなかったタンパク質の準安定状態を原子レベルで捉えることが可能になりました。もっとも、高圧力下での現象は、実際の生体には起こり得ないことであり、フォールディングの解明には結びつかないという見解があるかもしれません。しかし高圧力下で見出される準安定状態は、新たに発生したものではなく、もともと常圧で存在しているマイナーなものが圧力によって見えてきたと私たちは考えています。

フォールディング病発症のメカニズムを解明する糸口が見えてきました。

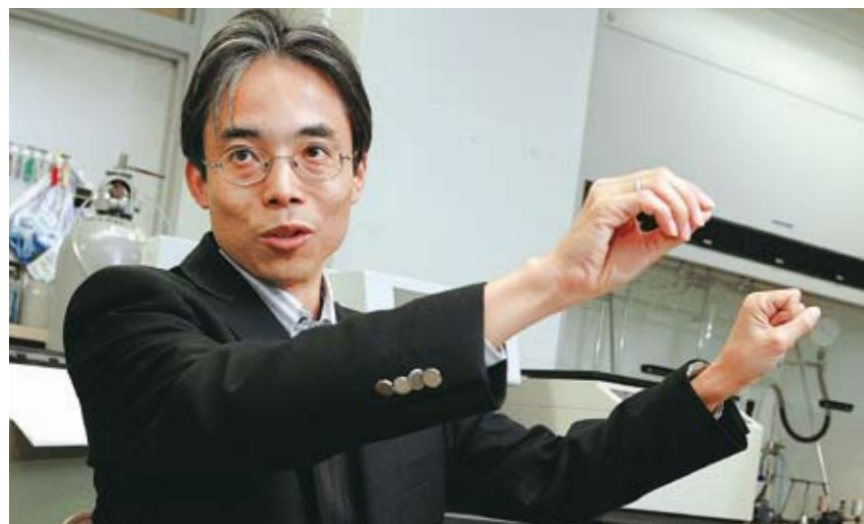
第二のプロジェクトでは、モデルタンパク質や合成ペプチドを用い、アミロイド線維が形成されるメカニズムを詳しく明らかにしようとしています。前述のやや不安定な中間体からオリゴマーやプロトフィブリルを経由してアミロイド線維が形成されるといわれていますが、その実態はまだ明白ではありません。

本プロジェクトでは、モデルタンパク質の一つとしてインスリンを使った実験で、アミロイド線維が形成される様子を段階的に明らかにすることができました。この点を時間軸で追うと、最初約20分のラグタイムを経て、急激にβシート構造の形成が始まりますが、その形成はさらに二段階で進行します。そしてまず初期に単純なβシートができ、その後初期とは異なるβシート構造が形づくられることが確かめられました。

フォールディング病の発症機構の解明の糸口は、成熟したアミロイド線維よりむしろ未成熟の線維形成初期の構造（オリゴマー）にあるといわれています。本プロジェクトの結果は線維形成初期過程の内部構造変化を初めて捉えたことです。今後、同様の解析をアルツハイマー病の原因タンパク質であるAβタンパク質、およびパーキンソン病の発症に関わるαシヌクレインでも試してみる予定です。そのためにAβタンパク質およびαシヌクレインの合成・生成にも取り組んでいます。αシヌクレイン遺伝子を発現用の大腸菌に組み込み、遺伝子組換え大腸菌を作成することで大量のαシヌクレインの生成を可能にしました。Aβタンパク質については固相合成反応を利用した全合成を進めています。

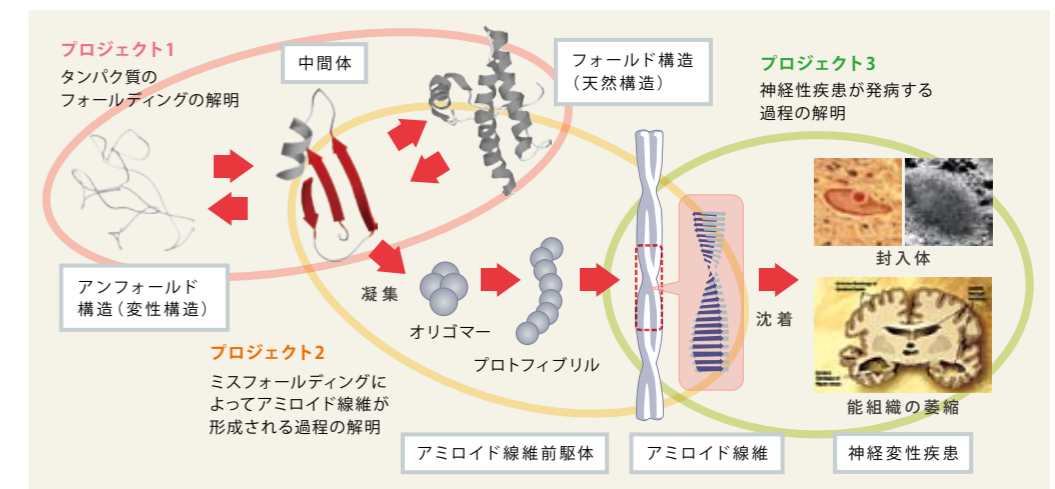
第三のプロジェクトでは、in vitro、in vivoの両方から疾患が発症するメカニズムの究明と、さらには創薬までを視野に入れ研究を進めています。in vivoにおいては、マウスに農薬の一種であるロテノンを長期間投与することで、新規パーキンソン病モデルマウスの作出に成功しました。また糖尿病からアルツハイマー病が発症する機構の解明にもアプローチしています。Aβタンパク質重合の基盤となるGM1ガングリオシド（GM1）の分布量はアルツハイマーの発症と強い相関があることが知られています。今回の実験によって、野生型マウスと比較して、糖尿病モデルマウスの神経細胞にはGM1の分布量が多いことを明らかにし、糖尿病から誘導されるアルツハイマー病の発症に関わるメカニズムを解明する糸口を掴むことに成功しました。

今後さらにモデルマウスを使った実験も進めていく予定です。



加藤 稔 教授

Minoru Kato



蛋白質のフォールディングおよびフォールディング病発症機構の解明のための統合研究プロジェクト

(注1) NMR … Nuclear Magnetic Resonance (核磁気共鳴)

● 参考文献 / 1 “Effect of pressure on helix-coil transition of an alanine-based peptide: an FT-IR study”, Proteins Vol.75, 911-918, 2009. 2 “Effect of pressure on the secondary structure of coiled coil peptide GCN4-p1”, Biochim. Biophys. Acta Vol.1804, 193-198, 2010. 3 Insulin inhibits Aβ fibrillogenesis through a decrease in the GM1 ganglioside-rich microdomain of neuronal membranes. J. Neurochem., Vol.113, 628-636, 2010.

● 連絡先 / 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(BKC)加藤研究室 電話:(外線) 077-561-2761 HP: <http://www.ritsumei.ac.jp/se/rc/staff/kato/LAB.html>