

萌芽研究課題：2010A1603 (BL40B2)

X線小角散乱法を用いたヒトおよびマウス由来リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素 (L-PGDS) とアミロイド β ペプチド複合体の構造解析

Structural analysis of human and mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase complexed with amyloid β -peptide by small-angle X-ray scattering

実験責任者

宮本優也

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 応用生命科学専攻 博士後期課程2年
日本学術振興会特別研究員 (DC1)

共同研究者

乾 隆^a、八木直人^c、久米慧嗣^a、高橋良輔^a、田畑瑞毅^a、河野正樹^b、篠原貴宏^b

^a大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 応用生命科学専攻

^b大阪府立大学 生命環境科学部 生物情報科学科

^cSPring-8/JASRI

背景と研究目的：

アルツハイマー病は、現代社会において最も頻度の高い神経変性疾患の一つであり大きな問題となっている。アルツハイマー疾患患者数は、認知症性疾患患者の半数以上を占めると考えられており、世界全体で1200万人以上、我が国の羅漢人口は100万人以上と推定されている。アルツハイマー疾患患者の脳内では、アミロイド β ペプチド ($A\beta$) からなる老人斑および微小管結合タンパク質Tauからなる神経原繊維変化が出現し、海馬や大脳皮質のシナプスが脱落することによって認知症が発症すると考えられている。これまでに、細胞外において $A\beta$ が立体構造変化により単量体からアミロイド繊維を形成し、それが蓄積することによって老人斑が形成されることがわかっている。 $A\beta$ には、40番目のアミノ酸残基で終わる $A\beta$ 1-40と、42番目のアミノ酸残基で終わる $A\beta$ 1-42があり、脳内においては圧倒的に $A\beta$ 1-40が多く合成されるが、 $A\beta$ 1-42は $A\beta$ 1-40に先行して蓄積することが知られている。また、健常高齢者でもみられるびまん性老人斑においては、 $A\beta$ 1-42は繊維を形成せず、不定型な沈着を呈するが、アルツハイマー病を発症した患者の老人斑では $A\beta$ 1-40および $A\beta$ 1-42の両方が蓄積していることがわかっている。これより、 $A\beta$ 蓄積過程において、まず $A\beta$ 1-42が蓄積し、それが核となり $A\beta$ 1-40が蓄積すると考えられる。さらに、健康な脳内では未確認の分子シャペロンによって、 $A\beta$ の凝集体形成が阻害されると推定されている。以上のことから、 $A\beta$ 、特に $A\beta$ 1-42を脳内で蓄積させないことが、アルツハイマー病の予防あるいは治療に強く貢献すると考えられる。

これまでに我々は、ヒト脳脊髄液中に存在するタンパク質であり、生体内輸送タンパク質群であるリポカリンファミリーに属するリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素（L-PGDS）が、様々な疎水性低分子をβバレル内に結合すること、また、その結合に伴いβバレルの上部の構造を変化させて、分子全体が小さくなることを明らかにしている^(1,2)（Fig.1）。

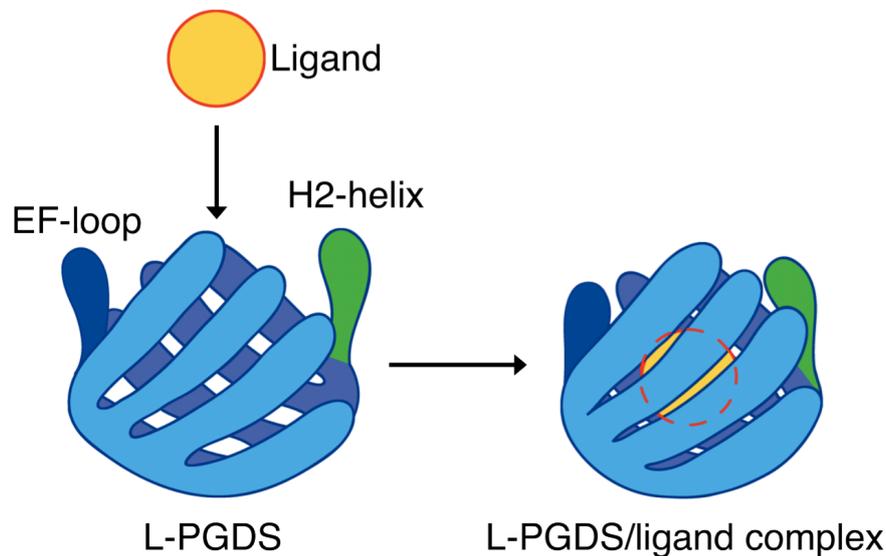


Fig. 1. Conceptual illustration of conformational changes of the L-PGDS molecule upon binding of a lipophilic ligand. A small lipophilic ligand enters the large cavity of the β-barrel via hydrophobic interactions, then the loops which are located on the edge of the β-barrel lean and the L-PGDS molecule becomes compact. This structural change leads to confinement of the ligand inside the L-PGDS molecule.

また、L-PGDSがAβ1-42を高い親和性で結合することを見出している（ $K_d = 20$ nM）。さらに、L-PGDSが、アルツハイマー病患者とアルツハイマー病モデルマウスの双方の老人斑に局在していること、およびL-PGDSとAβ1-42が高い親和性で結合し、Aβ1-42のミスフォールディングを防いで凝集体形成を阻害することが報告されている⁽³⁾。以上のように、L-PGDSが脳脊髄液中に非常に多く存在すること、および老人斑蓄積に関与すると考えられているAβを高い親和性で結合することから、L-PGDSはAβに対して分子シャペロンあるいはスカベンジャーとしての役割を果たしていると考えられる。この性質を利用することにより、L-PGDSを新規アルツハイマー病予防薬あるいは改善薬として利用できる可能性が期待される。

以上のことから、L-PGDSとAβの複合体の構造を解明することは、タンパク質医療薬としての可能性を開拓することにつながり、非常に意義があると考えられる。そこで、本申請研究では、X線小角散乱法を用いてヒト由来L-PGDSとAβとの複合体の溶液状態での構造を解明することを目的として実験を行った。

実験：

X線小角散乱実験は、ビームラインBL40B2において標準的な小角散乱用のセットアップで行った。単色化されたX線を集光ミラーによって集光した後、スリットで整形し、試料に入射した。X線の波長は1.0 Å、カメラ長は1.0 m、25 °Cの条件において実験を行った。また、検出器としてビームラインに設置してある自動読み取り型イメージングプレート (R-AXIS VII system) を用いた。実験には、大腸菌を用いて発現させたヒト由来L-PGDSを用いた。精製したL-PGDS溶液を2.0 ~ 8.0 mg/ml (50 mM Sodium phosphate/30 mM NH₃, pH 7.0) に調製し、実験に用いた。L-PGDS/Aβ複合体サンプルは、Aβ粉末をL-PGDS溶液に1:1のモル比になるように混合して調製した。

結果：

まず、脳内においてAβ1-40に先行して蓄積することが知られているAβ1-42とL-PGDSの複合体のX線小角散乱測定を行った。各濃度のL-PGDS/Aβ1-42複合体の小角散乱実験の結果、小角領域において、散乱曲線の上方への屈曲が観測されたことから、L-PGDS/Aβ1-42複合体が溶液中において凝集していることがわかった。また、タンパク質濃度の低濃度域 (2.0 mg/ml) においても凝集していることがわかった (data not shown)。

次に、脳内においてAβ1-42よりも多く生成されるAβ1-40とL-PGDSの複合体のX線小角散乱測定を行った。高濃度域 (4.0 ~ 8.0 mg/ml) では、L-PGDS/Aβ1-42複合体と同様に散乱曲線の上方への屈曲が観測され、L-PGDS/Aβ1-40複合体が溶液中において凝集していることがわかった。一方、L-PGDS/Aβ1-40複合体の低濃度域 (2.0 mg/ml) における散乱曲線では上方への屈曲は観測されず、L-PGDSの散乱曲線と比較して小角領域において変化が見られた (Fig. 2)。そこで、小角領域においてギニエプロット解析を行い、分子の慣性半径 (R_g) を求めた。その結果、L-PGDSおよびL-PGDS/Aβ1-40複合体の R_g は、それぞれ 19.0 ± 0.8 Åおよび 21.6 ± 1.2 Åとなり、Aβ1-40の結合によってL-PGDSの慣性半径が大きくなることが判明した。また、L-PGDS/Aβ1-40複合体の散乱曲線は、複合体が球状タンパク質であることを示していた (Fig. 2)。

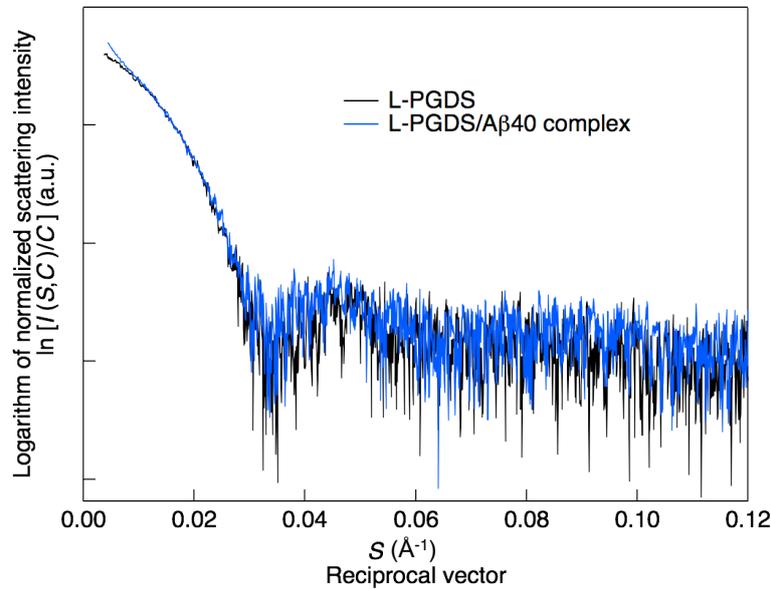


Fig. 2. SAXS profiles of human L-PGDS and human L-PGDS/A β 1-40 complex. SAXS profiles of L-PGDS (black line) and L-PGDS/A β 1-40 (blue line) are shown. The logarithm of scattering intensity is shown as a function of reciprocal vector, S .

また、2.0 mg/mlのタンパク質溶液の測定では、散乱曲線の $S > 0.035 \text{ \AA}^{-1}$ の領域においてノイズが大きくなった。溶液状態でのL-PGDSとA β の複合体の構造を解明するためには、低濃度のタンパク質溶液においても高感度な測定が望まれる。そこで、サンプルセルの検出器側の膜を20 μm の石英板から0.2 μm のシリコンナイトライド (SiN) 膜に変えて実験を行った。Fig. 3に、石英板およびSiN膜セルを用いて測定した2.0 mg/mlにおけるL-PGDSの散乱曲線を示す。

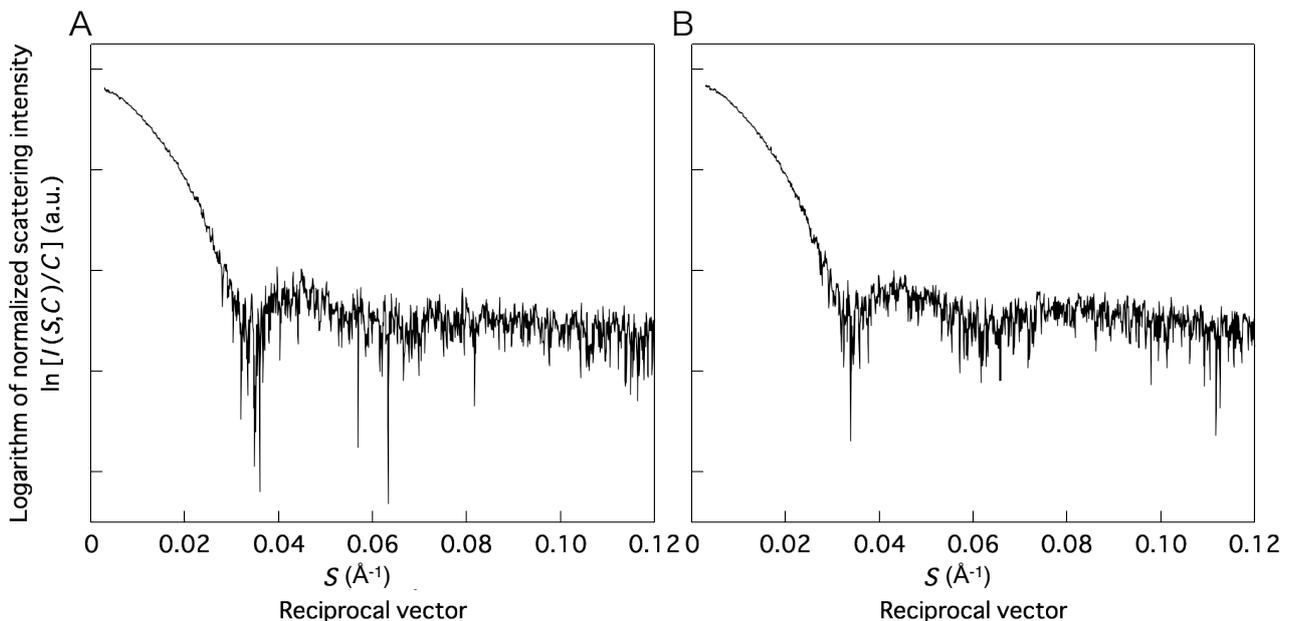


Fig. 3. SAXS profiles of human L-PGDS using quartz cell (A) and SiN plate (B). The logarithm of scattering intensity is shown as a function of reciprocal vector, S .

Fig. 3より、石英板セルを用いて測定した散乱曲線と比較して、SiN膜セルを用いることで散乱曲線のノイズを小さくすることに成功した。今後、積算回数などの条件を改善することで低濃度域でのL-PGDS/A β 複合体のX線小角散乱実験が可能であると考えられる。

考察：

本研究課題では、L-PGDSとA β 1-42の複合体の溶液構造解析を試みたが、低濃度である2.0 mg/mlのタンパク質溶液においてもL-PGDSとA β 1-42が凝集し、良好な散乱曲線を得ることはできなかった。この原因として、A β 1-42が脳内においてA β 1-40に先行して蓄積することからもわかるように、A β 1-42が本実験で用いた濃度域では容易に凝集してしまうからだと考えられる。今後は、より低濃度のタンパク質溶液での小角散乱実験を行い、L-PGDS/A β 1-42複合体の溶液構造解析を行う。

A β 1-40を用いた実験では、低濃度のタンパク質溶液において、L-PGDS/A β 1-40複合体の慣性半径を求めることができ、A β 1-40の結合によって分子が大きくなることがわかった。この結果は、我々が報告しているL-PGDSの疎水性低分子結合メカニズムと異なっていた。A β の分子量がMw = 4300 とこれまでの研究で使用してきた疎水性低分子（Mw = 250 ~ 600）より大きいことから、今回の実験結果はL-PGDSのA β 結合メカニズムが疎水性低分子結合メカニズムと異なることを示唆している。今後、L-PGDSのA β 結合メカニズムを詳細に解明するには、A β をより高い親和性で結合し、安定な複合体を形成するL-PGDS変異体の作製が必要であると考えられる。現在、多次元NMR法を用いてL-PGDSとA β の相互作用部位について調べており、次の申請課題ではL-PGDS変異体とA β の複合体のX線小角散乱実験を試みる。

L-PGDS/A β 複合体を高濃度にすると凝集体が生じたため、低濃度条件での実験が適していると考えられる。本研究課題では、サンプルセルに使用する膜について検討を行った。その結果、石英板よりもSiN膜を使用した場合に散乱曲線のノイズが小さくなることを確認した。L-PGDS/A β 複合体のような不安定なタンパク質の実験において、SiN膜は有効であり、積算回数などの条件を改善することで低濃度条件での実験が可能であると考えられる。

参考文献：

1. Inoue, K., Yagi, N., Urade, Y., and Inui, T. (2009) J Biochem **145**, 169-175
2. Miyamoto, Y., Nishimura, S., Inoue, K., Shimamoto, S., Yoshida, T., Fukuhara, A., Yamada, M., Urade, Y., Yagi, N., Ohkubo, T., and Inui, T. (2010) J Struct Biol **169**, 209-218
3. Kanekiyo, T., Ban, T., Aritake, K., Huang, Z.L., Qu, W.M., Okazaki, I., Mohri, I., Murayama, S., Ozono, K., Taniike, M., Goto, Y., Urade, Y. . (2007) Proc Natl Acad Sci U S A **104**, 6412-6417