

固体 NMR による阻害剤および脂質膜存在下での アミロイド線維形成阻害機構の解明

(横浜国大院工¹、東北大多元研²)

○内藤 晶¹、伊藤ひかり¹、山根衣寿美¹、阿部友樹¹、川村出¹、上平美弥²

Amyloid fibrillation mechanism in the presence of inhibitor and lipid bilayers as revealed by
solid-state NMR spectroscopy

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, ²Institute of
Multidisciplinary Research, Tohoku University
Akira Naito¹, Hikari Itoh¹, Izumi Yamane¹, Tomoki Abe¹, Izuru Kawamura¹ and
Miya Kamihira²

Human calcitonin(hCT) is known as an amyloid forming peptide by taking two step reaction mechanism such as homogeneous association to form nucleus (k_1) and autocatalytic elongation of the fibrils (k_2). In this study, three types of fibril inhibition mechanisms for hCT were investigated. First, F16L and F19L-hCTs were prepared and the fibrillation kinetics were examined. It turned out that the k_2 was significantly reduced in this mutants.. Second, charged amino acid such as Asp can also inhibit the fibril formation of hCT. In this case, k_1 was significantly reduced, while k_2 was not reduced. Third, polyphenol compound crucmin completely inhibited the fibril formation. We have also examined the inhibition of fibril formation of glucagon in the presence of lipid bilayers. In this case k_2 was decreased, while k_1 was increased, indicating that lipids were affected to form amyloid fibril.

【序論】 ヒトカルシトニン(hCT)はすい臓で分泌され、カルシウムの代謝調節に関わるペプチドホルモンである。hCT は水溶液中で容易にアミロイド線維を形成することが知られており、甲状腺で骨髄腫を誘発することが知られている。hCT の線維形成についてはこれまで固体 NMR を用いてその線維形成機構について研究した結果、hCT は核形成過程と線維成長過程の2段階自己触媒反応機構で線維化することが明らかになった¹⁻⁴。さらに、hCT の中央部では α -helix 構造が β -sheet 構造に転移することが分かった。グルカゴンはすい臓で分泌されるペプチドホルモンであり、肝臓でグリコーゲンの分解を促進して、血糖値を上昇させる作用をもつ。グルカゴンは酸性水溶液によく溶解し、アミロイド様線維形成をすることが知られている。このグルカゴンの線維も β -sheet 構造を多く含み、細胞毒性をもつことが知られている。

キーワード：固体 NMR、アミロイド線維、アミロイド線維阻害、アミロイド線維形成速度、脂質膜

ないとう あきら、いとう ひかり、やまね いずみ、あべ ともき、かわむら い
ずる、かみひら みや

本研究では、hCT の線維形成阻害機構を解明する目的で、変異体形成による線維化阻害と添加剤による線維化阻害について反応速度解析から線維化阻害機構の解明を試みた。さらに、生体内での線維形成機構を解明するため、リン脂質二重膜存在下での線維形成機構についても固体 NMR を用いて明らかにする試みを行った。

【実験方法】 ^{13}C 同位体標識したヒトカルシトニンとグルカゴンは固相法によりペプチド合成機を用いて調製した。合成したヒトカルシトニンは脱保護、空気酸化後、逆相 HPLC により精製した。精製したヒトカルシトニンは 20mM リン酸緩衝液 (pH7.4) および 15mM 酢酸水溶液 (pH3.3) に溶解して、線維形成の経時変化を測定した。グルカゴンについてはカルシトニンと同様に合成および精製を行った。精製試料は酢酸水溶液に溶かし、さらに DHPC:DMPC=1:3 モル比で生成したバイセル膜をグルカゴンに対して 5 倍モル量添加してから線維形成の経時変化を測定した。

固体 NMR 測定はモノマーに対しては 90 度励起パルスに引き続いて高出力デカップリングパルス下で信号検出をする DD-MAS 法を用いて測定した。線維に関しては CP-MAS 法を用いて測定した。測定では DD-MAS と CP-MAS の実験を交互に変化させて同じ試料についてモノマーと線維の信号を分離して測定を行った。

【結果と考察】

ヒトカルシトニン変異体の線維形成の経時変化

Fig. 1 にヒトカルシトニン変異体 (F19L-hCT) の線維成長の経時変化を示している。この線維成長の強度変化をプロットしたところ、一定の遅延時間の後に線維が成長していく様子が観測された。この結果、カルシトニン変異体の線維形成機構は 2 段階自己触媒反応として解析できることが判明した。この反応機構で速度定数を解析した結果、核形成速度定数 (k_1) および線維成長 (k_2) 速度定数を決定して

Table 1 にまとめた。この値を WT-hCT と比較したところ、核形成速度 k_1 はあまり変化しなかったのに対して、線維成長速度 k_2 は格段に遅くなることが判明した。以前の研究からヒトカルシトニンは逆平行 β -sheet 構造を形成することを明らかにした³。この結果、F16 と F19 のフェニルアラニンの芳香環が π - π 相互

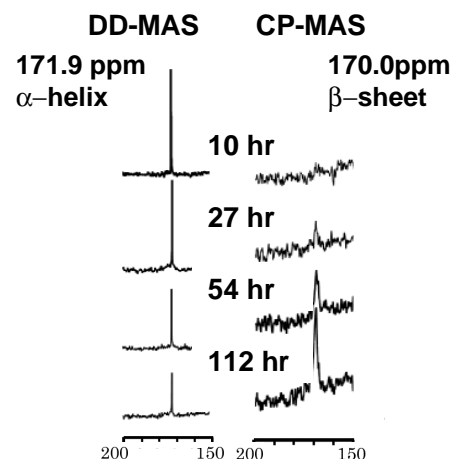


Fig.1. ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{10}\text{-F19L-hCT}$ in the time course of fibril formation.

Table 1. Kinetics parameters for fibril formation of WT-hCT, F19L-hCT and F16L-hCT

	pH 7.4		pH3.3	
	k_1 (s^{-1})	k_2 ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	k_1 (s^{-1})	k_2 ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
WT-hCT	2.79×10^{-6}	2.29	3.28×10^{-6}	2.04×10^{-3}
F19L-hCT	7.41×10^{-9}	2.90×10^{-2}	1.27×10^{-6}	1.58×10^{-3}
F16L-hCT	1.52×10^{-6}	1.03×10^{-2}	1.85×10^{-6}	6.14×10^{-4}

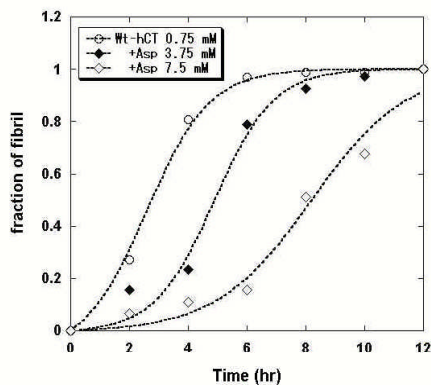


Fig. 2. Time course of fibril formation of hCT in addition of Asp

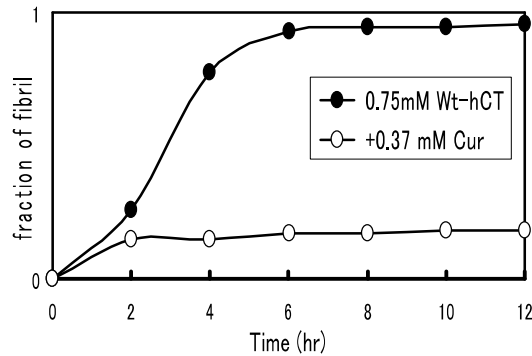


Fig. 4. Time course of fibril formation of hCT in addition of curcumin

作用により線維形成を安定化することを明らかにしたが、線維成長が遅くなったことから芳香環の相互作用の存在を支持する結果となった。

阻害剤によるヒトカルシトニンの線維形成阻害機構

Fig. 2 にヒトカルシトニンに電荷をもつアミノ酸 Asp を添加したときの線維形成の経時変化を示す。2 段階自己触媒反応速度解析から核形成速度定数と線維成長速度定数を決定し Table 2 にまとめた。この結果、Asp の濃度を高くすると核形成速度が遅くなり、線維成長速度定数はほぼ一定であることが観測された。この結果は、

Table 2. Kinetics parameters for hCT in the presence of Asp

	k_1 (s^{-1})	k_2 ($s^{-1}M^{-1}$)
Asp 0 mM	$2.33(\pm 0.90) \times 10^{-5}$	$0.300(\pm 0.042)$
Asp 3.75 mM	$2.17(\pm 2.09) \times 10^{-6}$	$0.363(\pm 0.70)$
Asp 7.50 mM	$1.08(\pm 0.99) \times 10^{-6}$	$0.227(\pm 0.041)$

電荷を持つアミノ酸はヒトカルシトニンと溶液中で弱い相互作用をもち、ヒトカルシトニン同士が会合するのを阻害するため、核形成速度が遅くなったと考察した。一方、阻害剤としてポリフェノールのクルクミンを添加した場合、カルシトニンに対して 0.5 モル量を添加しただけでも、線維形成はほとんど起こらなかった(Fig. 4)。この結果からクルクミンがヒトカルシトニンと強い相互作用で結合してカルシトニン同士の会合が抑制されるため、線維形成が強く阻害されたものと考察した。

脂質膜存在下でのグルカゴンの線維形成機構

Fig. 5 にグルカゴンにバイセル膜を添加した場合の線維形成の ^{13}C NMR スペクトルを示している。グルカゴンは水溶液中で線維形成すると N-末端部位と C-末端部は α -helix から β -sheet に転移することが観測された。それに対して、グルカゴン水溶液にバイセル膜を添加すると、C-末端は β -sheet が形成するのに対し N-末端は α -helix のままで β -sheet が形成されないことが判明した(Fig.6B,C)。さらに線維形成

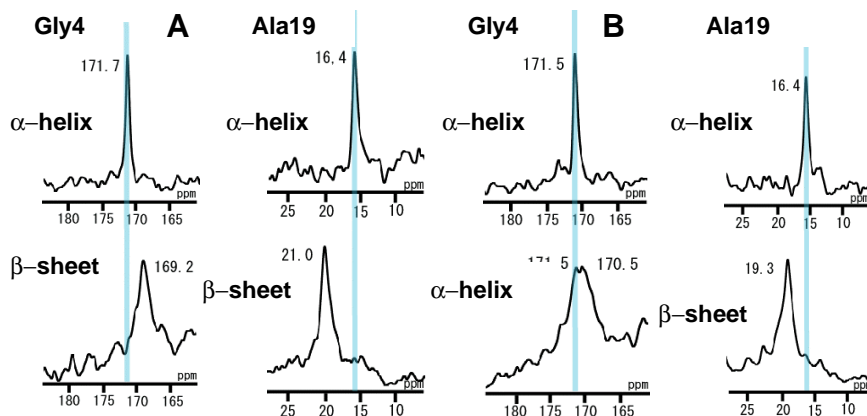


Fig. 5. ^{13}C NMR spectra of monomer(top) and fibril(bottom) of hCT. **A:** in the absence of lipids. **B:** in the presence of lipids.

た。グルカゴンは膜に対して親和性の高いことが分かっているので、膜に結合したグルカゴンは膜表面で濃縮される。このため、グルカゴン同士が会合を起しやすくなるために k_1 は速くなると考察できる。それに対して、線維にモノマーが結合することで、線維成長が起こると考えられるが、グルカゴンの場合、膜存在下の線維は膜がない場合に比べて N-末端が β -sheet になっていないため線維の安定性は膜存在下の線維の方が低いと考えることができる。このため、線維成長の速度は膜存在下の方が遅くなったと考察できる。

の経時変化をプロットしたグラフを Fig. 6A に示す。この結果から、 k_1, k_2 を決定して Table3 にまとめた。膜が存在しない場合と存在する場合を比較すると、 k_1 は膜が存在すると速くなるのに対し、 k_2 は膜が存在すると遅くなることが判明し

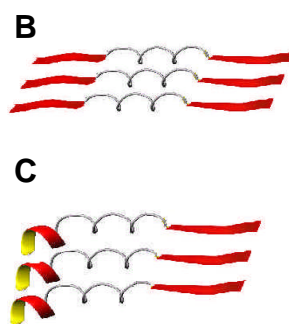
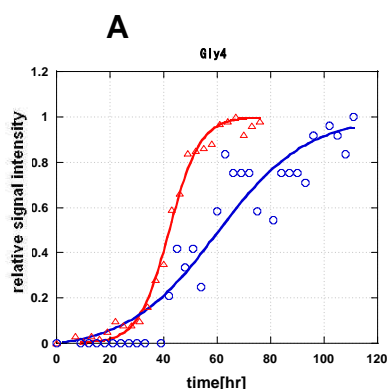


Fig.6. A: Time course of fibril formation of hCT in the presence () and absence (Δ) of bicelles. **B:** Fibril structure of glucagons. **C:** Fibril structure of glucagons in the presence of bicelles.

Table 3. Kinetics parameters for glucagons in the absence and presence of lipids

	k_1 (s^{-1})	k_2 ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
Glucagon	3.34×10^{-8}	1.70×10^{-2}
Glucagon + Bicelle	1.24×10^{-5}	3.98×10^{-5}

【文献】

1. M. Kamihira et al. Protein Sci. 9 (2000) 867-877.
2. M. Kamihira et al. J. Biol. Chem. 278, (2003) 2859-2865.
3. A. Naito et al. Magn. Reson. Chem. 42 (2004) 247-257.
4. A. Naito et al. Biochim. Biophys. Acta, 1768 (2007) 3145-3161.