

## 153. 神経変性疾患の脳内異常タンパク質凝集体形成機構解明

森本 大智

京都大学 大学院工学研究科 分子工学専攻 生体分子機能化学講座

Key words : ユビキチン, タンパク質凝集, 構造不安定化, アミロイド, 線維

### 緒言

高齢化社会の最も深刻な問題は、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患患者の増加である。長年、発症機構解明のため国内外で研究が行われているが不明な点が多く残されている。その中でも最大の不思議は、これらの疾患で共通して確認される脳内の封入体（異常タンパク質凝集体）の形成である。注目すべき点は、これらの封入体の多くがユビキチンを含むことである<sup>1)</sup>。ユビキチンはタンパク質に鎖状に結合し、機能や寿命を制御する翻訳後修飾因子の一つである。極めて物理的・化学的に非常に安定なタンパク質であり、細胞内で凝集体を形成することは長年謎であった。

我々のグループは、ユビキチンがポリマー（ポリユビキチン鎖）を形成することで、構造不安定化が誘導され、アミロイド線維を形成することを発見した<sup>2)</sup>。加えて、細胞内においてポリユビキチン鎖の線維状凝集体は、選択的オートファジーにより分解されることも見出した<sup>2)</sup>。これらの知見は、元来独立した生命現象であった「脳内封入体形成」と「ユビキチン化」を直接的に繋げる概念である。実際、老化やストレスに伴うオートファジー活性低下は細胞内ユビキチン陽性凝集体の蓄積を招き、神経細胞においては形成された凝集体が適切に処理されなければ神経変性を引き起こす。本研究では、核磁気共鳴法を用いて、ユビキチン化に伴う構造不安定化機構ならびに線維形成機序の解明を目指した。

### 方法、結果および考察

#### 1. ユビキチン化による基質タンパク質の構造不安定化の解明

ユビキチン（8.6 kDa）は、リン酸基（97 Da）やアセチル基（43 Da）などの他の翻訳後修飾因子に比べ、分子量が極めて大きい。従って、ユビキチン化は基質タンパク質の分子形状や分子運動などの物理化学的性質に影響を与える可能性がある。実際、近年の分子動力学（MD）シミュレーションの研究で、ユビキチン化は基質タンパク質の構造安定性を低下させると報告されている<sup>3)</sup>。本研究では、実験的にユビキチン化の構造安定性への影響を検証した。

基質タンパク質として、FK506-binding protein (FKBP12) と fatty acid binding protein 4 (FABP4) を選び、トリプトファン蛍光測定により熱力学的安定性を調べたところ、モノユビキチン化により構造不安定化することが分かった (Fig. 1)。興味深いことに、ポリユビキチン化により構造不安定化は増強された (Fig. 1a)。また、構造不安定性の程度は、ユビキチン化サイトの二次構造に依存性があることも分かった。 $\beta$  構造を形成している部位のユビキチン化は比較的大きな構造不安定化を引き起こし、 $\alpha$  ヘリックスを形成している部位のユビキチン化は構造安定性に殆ど影響がなかった (Fig. 1b)。

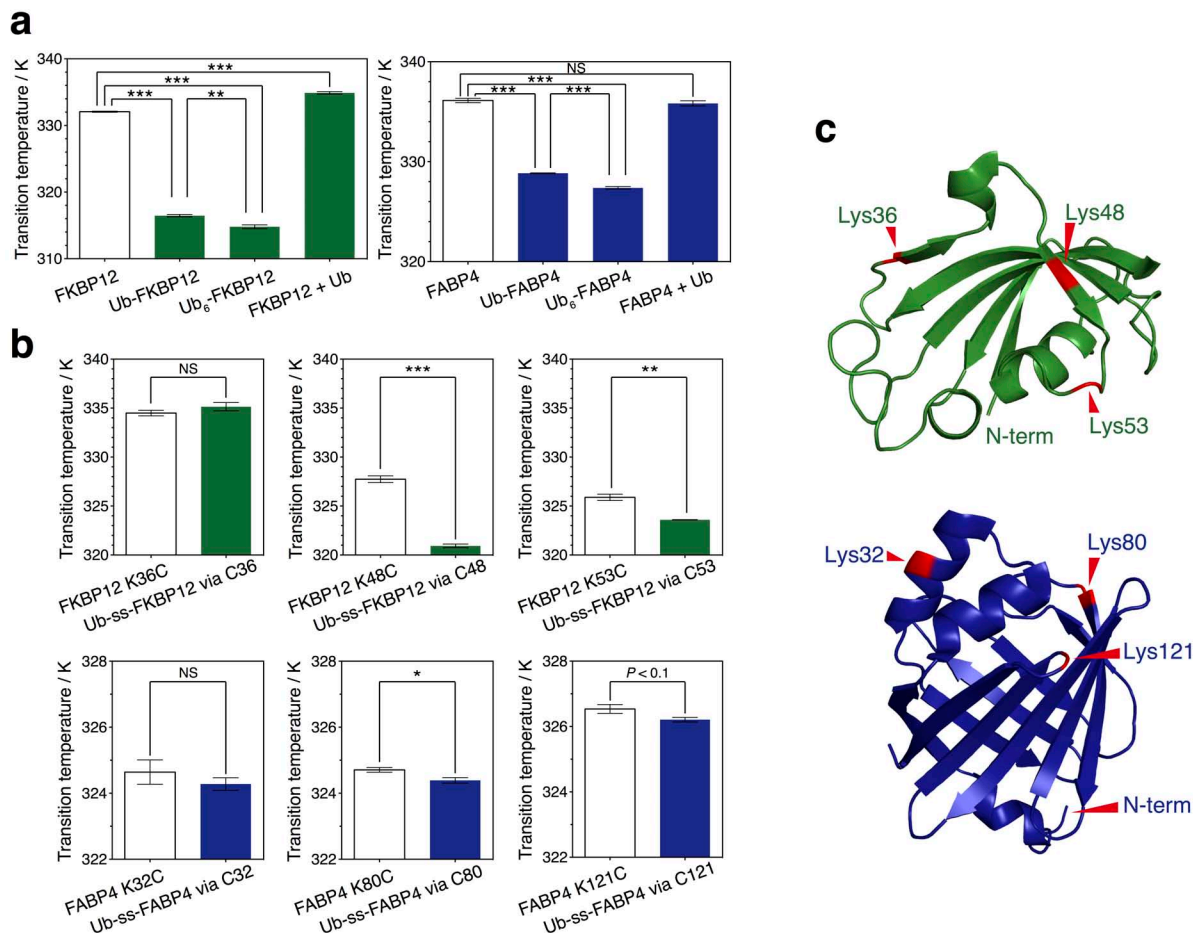


Fig. 1. Fold destabilization of FKBP12 and FABP4 induced by (poly-)ubiquitylation

a) Comparative analysis of the thermal denaturation transition for N-terminal (poly-)ubiquitylated FKBP12 (left) and FABP4 (right). b) Comparative analysis of thermal denaturation transitions for chemically ubiquitylated FKBP12 (upper) and FABP4 (lower). ss indicates the disulfide bridge. All values represent the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard error of the mean. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , and \* $P < 0.05$  (Student's  $t$  test). NS indicates no statistical significance:  $P > 0.1$ . c) Ubiquitylation sites of FKBP12 (upper) and FABP4 (lower) examined in this study.

次に、ユビキチン化による構造不安定化のメカニズムを解明すべく、核磁気共鳴法により、立体構造ならびにダイナミクスを調べた。ユビキチン化によって、基質タンパク質の主鎖の化学シフト変化に顕著な差異は観察出来なかったが、<sup>15</sup>N  $R_2$  分散実験により、ユビキチン化により基質タンパク質におけるマイクロ秒からミリ秒における主鎖の構造揺らぎが引き起こることが分かった (Fig. 2)。これらの結果より、ユビキチン化は基質タンパク質の静的構造に大きな影響を及ぼさない一方で、マイクロ秒からミリ秒の範囲のダイナミクスを変化させ、熱力学的不安化をもたらすと示唆された。

神経変性疾患におけるユビキチン陽性封入体はユビキチン化タンパク質を多く含んでいることから、本研究で検証したユビキチン化による直接的な構造不安定化に関する知見は、細胞内タンパク質凝集体形成の理解の一助となる。これらの結果は2016年12月に Scientific Reports 誌に報告した<sup>4)</sup>。

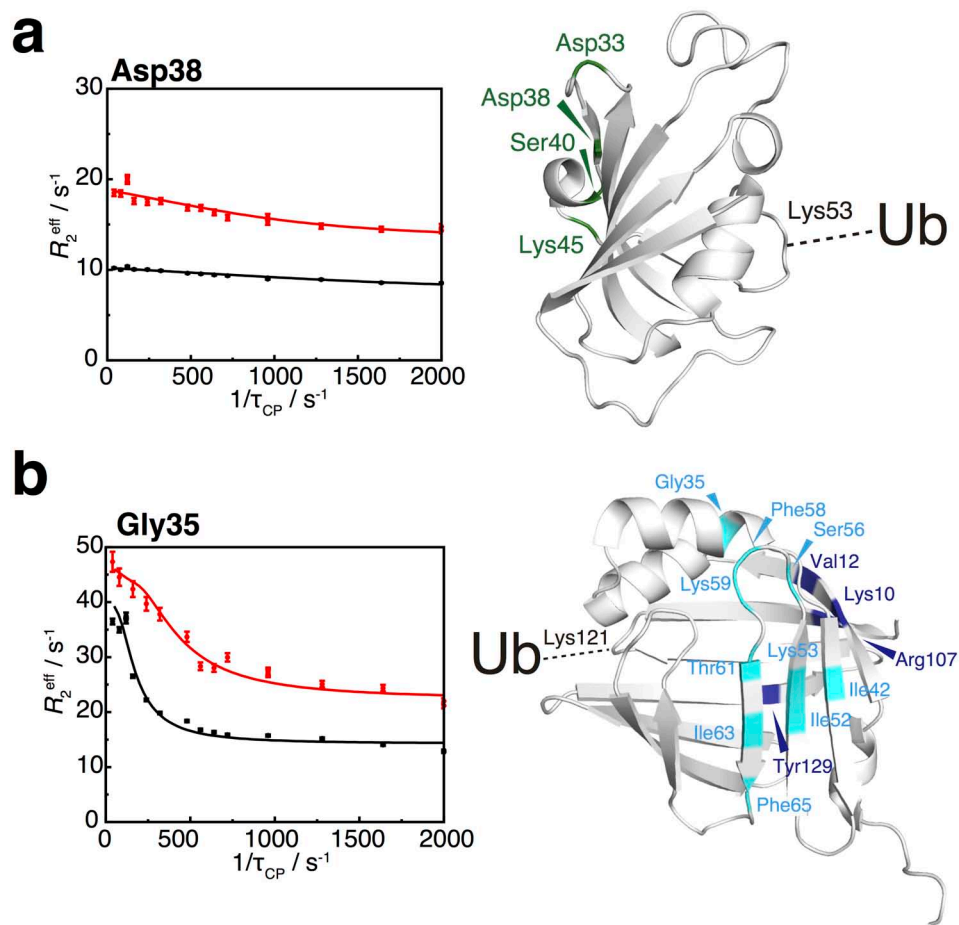


Fig. 2. Relaxation dispersion analysis for ubiquitylated proteins  
 $^{15}\text{N}$  relaxation dispersion profiles for unmodified (black) and chemically ubiquitylated (red) FKBP12 (a) and FABP4 (b).

## 2. 線維反応中間体解析による構造学的線維形成機構解明

一般的なアミロイド線維は酸変性で作製され、形成には長時間を要することが多い。一方、ポリユビキチンは熱変性により短時間でアミロイド線維を形成する<sup>2)</sup>。従って、線維の高次構造情報を取得するために有用な反応中間体の検出が困難である。そこで、本研究ではモノユビキチンは線維化しないという性質を利用した反応中間体作製方法を考案した (Fig. 3)。まず、ジスルフィド結合を介したダイユビキチンを作製し、これを熱変性により線維形成させた。その後、還元処理によって、線維中のジスルフィド結合を開裂させ、徐々に線維を破壊させた。線維は分子間相互作用により形成されるため、生成物として単量体以外に反応中間体が得られた。

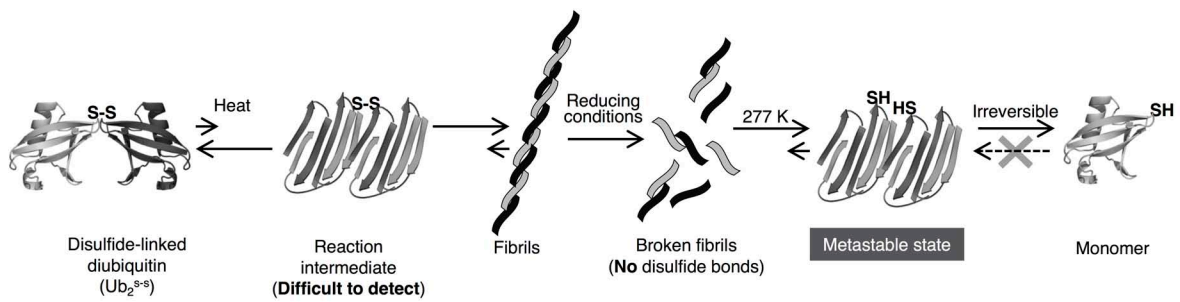


Fig. 3. Scheme for production of soluble fibril-derived molecules

It is difficult to observe reaction intermediates of polyubiquitin fibrils because the fibrils are formed by heat denaturation. Since "monomeric" ubiquitin forms no fibril, the fibrils of disulfide-conjugated diubiquitin ( $Ub_2^{S-S}$ ) can be broken by cleaving disulfide bonds. Soluble fibril-derived molecules have been detected in solution containing broken fibrils at low temperature.

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  二次元 NMR スペクトルを測定すると、反応中間体は特徴的なピークパターンを示しており、線維特有の構造情報を有することが示唆された (Fig. 4)。

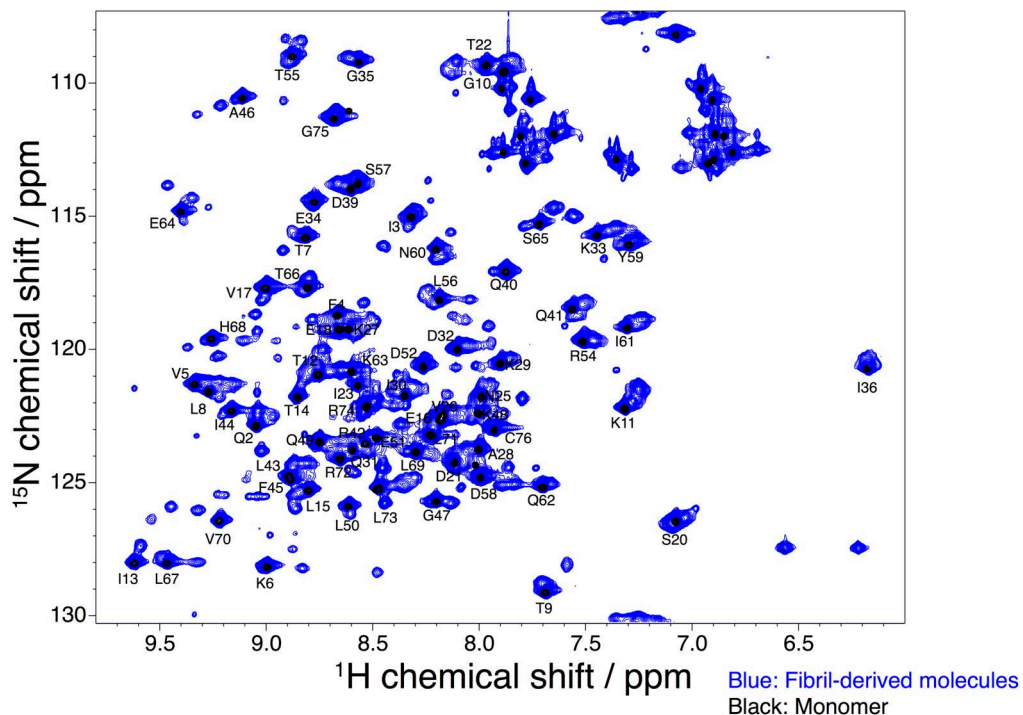


Fig. 4. NMR signals of metastable states of polyubiquitin fibrils

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of monomeric (black) and fibril-derived metastable ubiquitin (blue).

また、反応中間体は熱力学的に準安定状態にあることが分かり、不可逆的に単量体に変化することを観察した。溶液 NMR スペクトルを連続的に測定することにより、様々な温度条件下における反応速度定数を決定し、アレニウスプロットを作成することで中間体から単量体に移行する反応の活性化エネルギーを求め、熱力学的特性を定量化した (Fig. 5)。

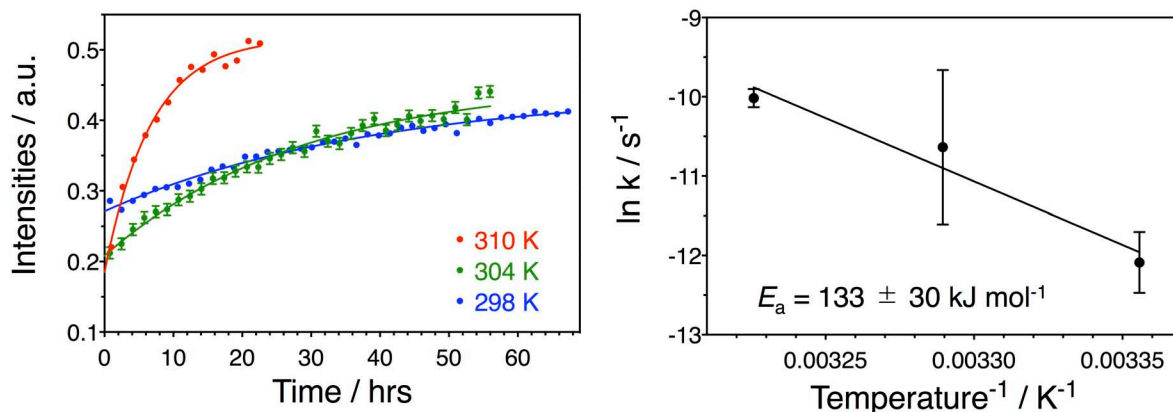


Fig. 5. Estimation of activation energy by real-time NMR spectroscopy

Left) Intensity increase of the monomer-derived peak of L67 at several temperatures. Data were fitted to the exponential equation  $I = I_A - I_0 \exp(-k_{\text{ex}} t)$ , in which  $I$  is signal intensity, and  $k_{\text{ex}}$  is a reaction rate constant. Right) Arrhenius plot of the reaction rate constants.

現在、三次元 NMR 測定ならびに核オーバーハウザー効果の観測により、反応中間体の立体構造情報取得に取り組んでおり、今後、得られた熱力学的特性とともポリユビキチン線維を構造学的に議論する予定である。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院工学研究科の白川昌宏教授、菅瀬謙治准教授ならびに同大学医学研究科 Erik Walinda 助教である。本稿を終えるにあたり、ご支援を頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

### 文献

- 1) Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*. 1987;235(4796):1641-4. PubMed PMID: 3029875.
- 2) Morimoto D, Walinda E, Fukada H, Sou YS, Kageyama S, Hoshino M, et al. The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. *Nat Commun*. 2015;6:6116. doi: 10.1038/ncomms7116. PubMed PMID: 25600778; PubMed Central PMCID: PMC4309437.
- 3) Hagai T, Levy Y. Ubiquitin not only serves as a tag but also assists degradation by inducing protein unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(5):2001-6. doi: 10.1073/pnas.0912335107. PubMed PMID: 20080694; PubMed Central PMCID: PMC436630.
- 4) Morimoto D, Walinda E, Fukada H, Sugase K, Shirakawa M. Ubiquitylation Directly Induces Fold Destabilization of Proteins. *Sci Rep*. 2016;6:39453. doi: 10.1038/srep39453. PubMed PMID: 27991582; PubMed Central PMCID: PMC45172356.