

タンパク質のアミロイド線維形成抑制と
細胞毒性中間体の構造特性に関する研究

2017年 1月

亀田 啓

略号

α -Syn : α -Synuclein, α シヌクレイン

DTT : Dithiothreitol, ジチオスレイトール

Thio-T : Thioflavin-T, チオフラビン T

TEM : Transmission Electron Microscope, 透過型電子顕微鏡

MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, 3-(4, 5-ジメチルチアゾル-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシルフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム内分子塩

DiBAC₄(3) : Bis(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol, sodium salt, ビス-(1,3-ジブチルバルビツール酸)トリメチンオキシノール

OD₆₀₀ : Optical Density at 600 nm, 600 nm における光学密度

VMA : *Vaccinium Myrtillus* Anthocyanoside

Cya : cyanidin, シアニジン

Cya-3-gal : cyanidin 3-galactoside, シアニジン 3-ガラクトシド

Del : delphinidin, デルフィニジン

Del 3-gal : delphinidin 3-galactoside, デルフィニジン 3-ガラクトシド

WT : Wild type, 天然型

AFM: Atomic Force Microscope, 原子間力顕微鏡

Gdn-HCl: guanidine hydrochloride, グアニジン塩酸塩

DTNB: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)

CF: charge free

Tris: 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol Hydrochloride , 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸塩

MPCCD: multi-port charge coupled device

XFEL: X-ray free electron laser

CXDI: Coherent X-ray diffraction imaginer

目次

第 1 章序論

Page No.

1-1. はじめに	1
1-2. 神経変性疾患に関わるタンパク質	2
1-3. アミロイド線維	3
1-4. GroES	5
1-5. α シヌクレイン	6
1-6. アミロイド線維の毒性	8
1-7. アミロイド線維の凝集抑制物質	10
1-8. タンパク質の構造解析	11
1-9. X線自由電子レーザーによるタンパク質の構造解析	11
1-10. 壽一号	14
1-11. 壽一号で得られた回折パターンの解析	16
1-12. 本研究の目的及び構成	17

第 2 章 GroES アミロイド線維と毒性評価

2-1. 緒言	19
2-2. 材料と方法	20
2-2-1. GroES の培養と精製	20
2-2-2. GroES を用いた細胞毒性	23
2-2-3. TEM を用いたアミロイド線維の観察	29
2-3. 結果	30
2-3-1. GroES アミロイド線維形成中間体, 成熟線維が持つ細胞に対する毒性評価	20
2-2-2. ビルベリー由来ポリフェノールによる GroES アミロイド線維中間体の毒性の抑制	35
2-4. 考察	44

第 3 章 α シヌクレインアミロイド線維の毒性と形成機構

3-1. 緒言	48
3-2. 材料と方法	49
3-2-1. 培養と精製	48
3-2-2. α -SynY136TAT 変異体プラスミドの作成	52
3-2-3. α Syn の Cys 定量	55
3-2-4. α -Syn アミロイド線維形成中間体, 成熟線維が持つ細胞に対する毒性の評価	56
3-2-5. TEM を用いたアミロイド線維の観察	57
3-3. 結果	59
3-2-1. α -Syn の Cys 定量	59
3-2-2. α -Syn アミロイド線維形成中間体, 成熟線維が持つ細胞に対する毒性評価	64
3-4. 考察	67

第 4 章 アミロイド線維形成中間体の XFEL-CXDI による 構造解析

4-1. 緒言	69
4-2. 材料と方法	70
4-2-1. タンパク質の精製	70
4-2-2. タンパク質のアミロイド線維形成	70
4-2-3. XFEL-CXDI 用 Si ₃ N ₄ 膜の Poly-L-Lysine 処理	70
4-2-4. XFEL-CXDI 用のサンプル調製	70
4-2-5. XFEL-CXDI 実験	72
4-3. 結果	74
4-3-1. GroES, α -Syn 毒性分子種の CXDI	74
4-3-2. 毒性分子種の構造的特性	79
4-3-3. 毒性構造物の粒子径の分布	82
4-4. 考察	84

5. 総合考察

5-1. GroES アミロイド線維と毒性評価	87
5-2. α シヌクレインアミロイド線維の毒性と形成機構	87
5-3. アミロイド線維形成中間体の XFEL-CXDI による構造解析	88

謝辞	90
----	----

引用文献	91
------	----

第 1 章 序論

1-1. はじめに

タンパク質とは 20 個のアミノ酸からなっている生体高分子であり、生体内の様々な場所に存在している。タンパク質のはたらきは様々であり、体に必要な物質を合成する反応などを触媒する酵素として用いられるほか、筋肉繊維や細胞骨格として用いられている。酵素としてのタンパク質は非常に有能であり、体温程度の比較的穏やかな条件で化学反応を効率よく触媒している。体の水分を除く成分の割合は、タンパク質が一番大きく、水を含めた体の組成では 20%はタンパク質が占める。アミノ酸は側鎖が、酸性のもの、塩基性のもの、電荷を持たずに極性のもの、非極性のものがあり、これらはペプチド結合によりつながっている。40 個程度から 20000 個以上のアミノ酸が結合して構成され、これらの立体構造は 1 次構造より予想される(1)。また、その折りたたまれる速度はアミノ酸の種類に依存すると考えられている(2)。タンパク質は自発的にフォールディングする場合もあるが(3)、分子シャペロンと呼ばれるフォールディングを介助するタンパク質により機能的な立体構造が形成される(4,5)。

タンパク質は、個々にそのタンパク質自体のはたらきに重要な活性部位が存在する。この部位になんらかの変異が生じると、多くの場合失活してしまうが GFP のように有用な活性を示すこともある(6)。タンパク質の中には天然構造を形成しないタンパク質も存在し、天然変性タンパク質と呼ばれている(7)。部分的に特定の構造を形成しないタンパク質もあり、これらのタンパク質は他のタンパク質と結合することにより、機能的な構造を示すことがある(8)。これらのタンパク質が正しく立体構造が形成されない場合や変性してしまった場合は、シャペロンの介助によりアンフォールドされ、プロテアーゼにより分解される(9-11)。こういったタンパク質はこれらの機構は生命活動を維持するためには必須であり、機能不全や異常な蓄積は様々な疾患の原因となっている(12,13)。また、癌細胞のバイオマーカーとして機能するタンパク質も存在し、今後の治療や早期発見等の技術に期待されている(14)。このようにタンパク質の機能や構造を解析することは、タンパク質の科学的見地だけでなく、疾患の原因究明や治療に役立つことから非常に有用である。

1-2. 神経変性疾患に関わるタンパク質

ミスフォールドしたタンパク質が体の様々な神経組織に蓄積することで凝集体を形成する場合がある。蓄積した凝集体は神経組織に損傷を与え機能を奪い、これにより人体の機能に損傷を与えるのが神経変性疾患である(15,16)。神経変性疾患は致死性で有効な治療法が未だに発見されていない。これらの病気は主に加齢により罹患する孤発性の病気であるが、家族性のものも存在する(17,18)。

アルツハイマー病 (AD) は神経変性疾患の中でも特に患者数が多く、症状は認知症等の記憶障害が伴う(19)。認知症は World Alzheimer Report 2015 によると現在 4600 万人にもなり、今後さらに増加していくと考えられている(20)。AD は $A\beta$ と呼ばれるタンパク質ペプチドが蓄積し、凝集することが原因である(21)。 $A\beta$ はアミロイド β 前駆体タンパク質 (APP) が β -セクレターゼと γ -セクレターゼにより切断されたものである(22)。APP は膜タンパク質で、神経の保護やシナプスの可塑性に関わっている(23)。 $A\beta$ のように特定のタンパク質が異常に蓄積することはタンパク質の恒常性を崩壊させる原因となり、様々な疾患に関係している(24)。家族性と孤発性との大きな違いは発症する時期である(25)。65 歳以上で AD を発症する孤発性と違い、65 歳未満で発症する若年性 AD の一部は家族性である(26)。

神経変性疾患は人のみではなく他の哺乳類にも見られる。代表的なものでは牛海綿状脳症 (BSE) やスクレイピー病といったいわゆるプリオン病であり、いずれも牛や羊の病気である(27)。プリオン病は人ではクールー病やクロイツフェルトヤコブ病 (CJD) として知られている。症状としては神経組織が失われて海綿状になり、認知症が発生し、運動神経の制御ができなくなり死に至る(28)。プリオン病の原因タンパク質はプリオンと呼ばれる膜タンパク質である。これらの疾患は人と動物とで感染することがわかっている(29,30)。プリオン病に感染した動物を餌料として食べた場合に感染し、人の場合は特定の地域に存在する儀式的な食人行為が原因で感染する(31)。プリオン病も家族性があることが知られており、CJD の場合は $\sim 10\%$ が家族性であるという報告がある(31)。家族性プリオン病も原因であるプリオンを構成するアミノ酸残基に変異が見られる(32)。以下の表に主な神経変性疾患とその原因タンパク質の情報を記載した。

表 1-1. 主な神経変性疾患と原因タンパク質の名称, ポリペプチド残基の数, 構造(33)より転載

Disease	Aggregating protein or peptide	Polypeptide length (number of residues)	Structure of protein or peptide
Neurodegenerative diseases			
Alzheimer's disease	Amyloid- β peptide	37-43	Intrinsically disordered
Spongiform encephalopathies	Prion protein or its fragments	230	Intrinsically disordered and α -helical
Parkinson's disease	α -synuclein	140	Intrinsically disordered
Amyotrophic lateral sclerosis	Superoxide dismutase 1	153	β -sheet and Ig-like
Huntington's disease	Huntingtin fragments	Variable	Mostly intrinsically disordered
Familial amyloidotic polyneuropathy	Transthyretin mutants	127	β -sheet
Non-neuropathic systemic amyloidosis			
Amyloid light chain (AL) amyloidosis	Immunoglobulin (Ig) light chains or its fragments	~90	β -sheet and Ig-like
Amyloid A (AA) amyloidosis	Serum amyloid A1 protein fragments	76-104	α -helical and unknown fold
Senile systemic amyloidosis	Wild-type transthyretin	127	β -sheet
Haemodialysis-related amyloidosis	β_2 -microglobulin	99	β -sheet and Ig-like
Lysozyme amyloidosis	Lysozyme mutants	130	α -helical and β -sheet
Non-neuropathic localized amyloidosis			
Apolipoprotein A1 (Apo A-1) amyloidosis	Apo A-1 fragments	80-93	Intrinsically disordered
Type II diabetes	Amylin	37	Intrinsically disordered
Injection-localized amyloidosis	Insulin	21 and 30	α -helical and insulin-like

1-3. アミロイド線維

神経変性疾患の原因タンパク質は脳をはじめとする神経組織に蓄積する。その際にアミロイド線維と呼ばれる特殊な構造を形成する。アミロイド線維は1854年に Rudolph Virchow により初めて発見された(34)。アミロイド線維はもともとグリコーゲンからなるデンプン由来のものであると考えられており, 名前の由来も「デンプン様の」という言葉から来ている(35)。その後, アミロイド線維はアミロイドーシスと呼ばれる疾患の原因として知られるようになった(36)。アミロイドーシスとはアミロイド線維が腎臓, 腸管, 皮膚, 心臓等に沈着して起こる疾患である(37)。1981年にスクレイピー病に感染したマウスとハムスターの脳内でアミロイド線維を発見し, 神経変性疾患との関係が示唆された。1983年には Stanley B. Priner らがその線維がプリオン由来であることを突き止めた(38)。アミロイド線維の主な特徴は β シートに富み, 枝分かれのない直径 7-10 nm の繊維状の構造物である (図 1-1. A)。また, Congo Red を用いて染色し偏光顕微鏡で観察すると緑色に見える(39)。また, 蛍光色素 Thioflavin-T による染色で蛍光を発する(40)。

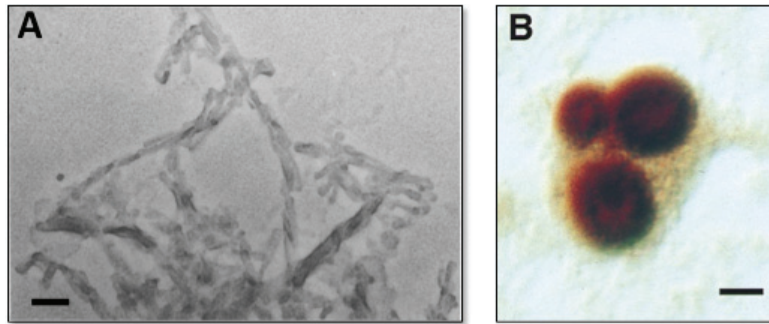


図 1-1. アミロイド線維と細胞質封入体

A.アミロイド線維(38)より改変。

スケールバーは 100 nm。

B.脳内アミロイド線維の封入体(41)より改変。

スケールバーは 10 μm。

天然状態のタンパク質がアミロイド線維になるにはいくつかのプロセスがある。始めにアミロイド線維が伸長するための核を形成する（核形成期）。核が形成されるとそれらにモノマータンパク質が結合することでアミロイド線維が伸長する（伸長期）。同時にある程度伸長した線維が断片化し、断片化した末端部分にもモノマータンパク質が結合する。伸長が進むとそれ以上モノマーが重合することがなくなり、成熟したアミロイド線維が形成される（定常期）(33)。これらの段階は、蛍光色素 thioflavin-T によりモニタリングすることで図 1-2. のようなシグモイド曲線ができる。

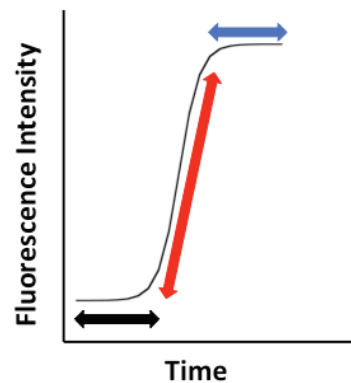


図 1-2. アミロイド線維に見られる 3 段階の形成機構

黒：核形成期 赤：伸長期 青：定常期

1-4. GroES

GroES は *E. coli* 由来のシャペロニン GroEL のコシャペロニンである。分子量 10 kDa のタンパク質で、通常は七量体で縦 30 Å、横 75 Å のリングを形成している。七量体の円筒状の構造が 2 つ重なってできている GroEL に結合することで内側の円筒状の空間に蓋をする。形成された円筒の大きさは縦 146 Å 横 137 Å で、15 K から 50 KDa の大きさの基質タンパク質を取り込むことができる(42) (図 3. 参照)。シャペロニンは原核生物やミトコンドリア、葉緑体に存在する分子シャペロンの総称である(43)。GroES のようなグループ I 型シャペロニンと、古細菌、真核生物のサイトゾルに存在するグループ II 型シャペロニンが存在する。ヒトにもミトコンドリア由来 Hsp60 がホモログとして存在する。分子シャペロンは Hsp とは Heat shock protein の略でこのグループに属するタンパク質は温度等のストレス条件下で大量に発現することがわかっている。

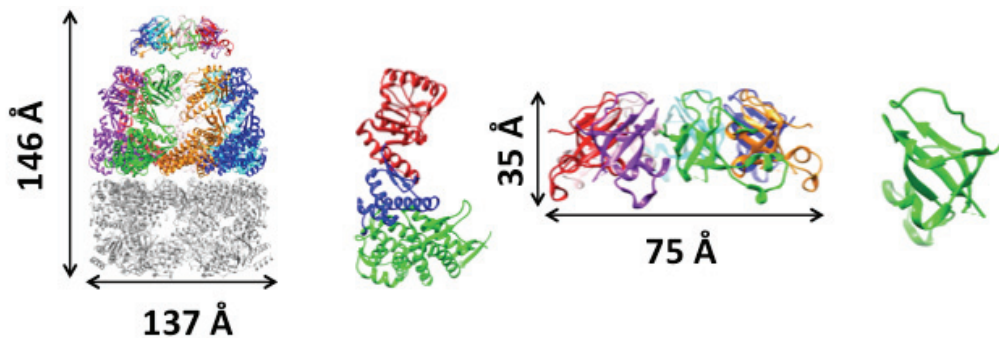


図 1-3. GroEL/GroES の立体構造(44)より引用

左から GroEL-GroES 複合体、

GroEL モノマー

GroES ヘプタマー

GroES モノマー

GroEL は細胞内の全タンパク質の 10-15%を基質とし、そのフォールディングを ATP 依存的に補助している。GroEL が GroES と共にタンパク質のフォールディングを補助する機構にはいくつかの段階がある。リボソームにより翻訳されたポリペプチ

ド鎖は始めに DnaK 等の Hsp70 シャペロンにより部分的なフォールディングを受ける。その後、GroEL が部分的にフォールディングされたポリペプチド鎖やミスフォールドして Hsp100 等の分子シャペロンにアンフォールドされたタンパク質の露出した疎水的な部分に結合する。同時に ATP の結合もこの時に起こる。GroEL は結合したポリペプチドを ATP と GroES が結合することで自身の円筒状の空間に落としこむ。この時に ATP は加水分解されて ADP になる。落とし込まれたポリペプチド鎖は細胞内のプロテアーゼや他のポリペプチド鎖との相互作用が無くなり、フォールディングが促される。GroEL と GroES が形成する空間に面するアミノ酸残基は疎水的であり、タンパク質のフォールディングを促すことがわかっている。

当研究室の日暮研究によると、GroES はグアニジン塩酸塩の存在下でアミロイド線維が形成されることがわかっており(45)、GroES アミロイド線維も他のアミロイド線維と同様の特徴を示す。GroES のアミロイド線維形成は病気とは関係ないが、非病原性のタンパク質がアミロイド線維を形成することはこれまでも多く報告されている(46)。このようなタンパク質はアミロイド線維を形成するメカニズムを研究する上でのモデルタンパク質として有用である。

1-5. α シヌクレイン

α シヌクレイン (α -Syn) はパーキンソン病疾患患者の脳に見られるレビー小体の主要な成分である。 α -Syn はシビレエイのシナプスで発見され、マウス、ヒトでは脳から発見された(40)。生体内の機能は不明のタンパク質であるが(47)、シナプス小胞の維持と再生に関与していることが示唆されている(48)。本来は二次構造をもたない天然変性タンパク質 (Natively unfolded protein) である。水に溶けた状態での主な構造はランダムコイルを形成しており、140 アミノ酸残基からなる。 α -Syn は主に脳に分布しているが、わずかながらも体の様々な組織にも存在する。 α -Syn の N 末端領域 (1-60) は中性 pH において正に帯電し(49)、細胞膜と関係のある α ヘリックスから形成された KTKEGV の 6 つの残基からなる不完全な 7 回の繰り返しがある。この配列はアミロイド線維形成と深く関わっているという報告もあり、こういった一定の繰り返し配列はハンチントン病に代表されるポリググタミン病と深く関わっているのかもしれない(50,51)。 α -Syn の N 末端は両親媒性を示し、脂質と結合する際にランダムコイル

構造が α ヘリックスに変わるにより脂質膜と結合していることが示唆されている (図 4.a 参照) (52)。中央にある Non amyloid β component (NAC) 領域 (61-95) は疎水的な領域である。この領域は凝集の際何らかの役割を果たしていると思われる(53)。C 末端領域 (96-140) は酸性アミノ酸が豊富である。生体内の pH では可溶性で、低い pH において容易に構造に影響が出てしまうことが示唆されている(54,55)。全体として、電荷のあるアミノ酸残基は不均一に分布している。 α -Syn の総電荷は生体内 pH7.4 で-9 と偏っている (49)。(図 1-4b, 表 2 参照) α -Syn の pI は 4.67 で pH3 以下になると、C 末端領域は総電荷が負から正に変化する。このことから、 α -Syn アミロイド線維形成が pH に大きく依存すると考えられる(49)。

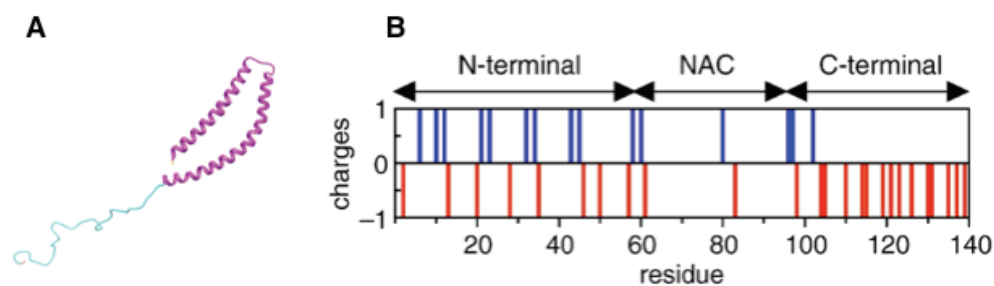


図 1-4. α -Syn の構造と各領域が持つ電荷

- A. 膜と結合した時の α -Syn の立体構造。マゼンダの α ヘリックスの先にある黄色い部分が N 末端で、シアンで表された構造の先にある赤い部分が C 末端 (52)より引用。
- B. α -Syn が持つ電荷を帯びたアミノ酸残基の分布(49)より改変。
pH7.4 において青色が正の電荷を持ち、赤色が負の電荷を持つ。

表 1-2 . α -Syn の各領域における電荷の分布(49)

pH	N			NAC			C		
	Net	Total	%	Net	Total	%	Net	Total	%
Neutral	+ 4	18	30.0	- 1	3	8.6	- 12	18	40.0
Low	+ 11	11	18.3	+ 1	1	2.9	+ 3	3	6.7

α -Syn と生理的な条件の pH と低い pH における全体と各領域 (N 末端領域, NAC 領域, C 末端領域) の総電荷 (Net), 各領域全体における電荷をもつアミノ酸残基の数, 及び総電荷の領域全体の電荷をもつアミノ酸残基に対する百分率(53)

家族性パーキンソン病では, 原因タンパク質である α -Syn に点変異体が見ついている。家族性パーキンソン病を患うあるイタリアの家系からは 53 番目のアラニン (Ala) がスレオニン (Thr) に点変異している α -Syn (A53T) が見つかった(56)。他の家系からも今までに 30 番目の Ala が Pro に変異した A30P, 46 番目の Glu が Lys に変異した E46K などが見ついている(18,57)。これらの変異体は野生型の α -Syn と異なるリン脂質への親和性が示唆されている(58)。 α -Syn は線維を形成する際に凝集する。 α -Syn をはじめとするアミロイド線維になりうるタンパク質も自然状態の構造はアミノ酸配列に依存的である。しかし, アミロイド線維になるとその構造は β シートに変化する。可溶性の α -Syn はオリゴマー化を経て, 安定した成熟したアミロイド線維になる。家族性パーキンソン病の変異体のうち A53T は *in vitro* において線維形成を加速させることが報告されている (59)。 α -Syn アミロイド線維は細胞に様々な影響を与える。たとえば, 酸化的リン酸化に深く関与する複合体 I の活性が *in vitro* の実験で低下していることが報告されており, これはパーキンソン病患者にも見られる影響である (60)。タンパク質のフォールディングに深く関与する Hsp70 システムを α -Synオリゴマーが抑制するという報告がある (61)。これより細胞内の恒常性を崩すことが細胞死を導くものと考えられる。

1-6. アミロイド線維の毒性

アミロイド線維の形成と関連した細胞死のメカニズムは未だよく分かっていない。 α -Syn は細胞膜の脂質と相互作用することで毒性を与えていると考えられている。断片化したアミロイド線維が細胞の毒性を誘発するということも示唆されていたが(62), 最近では成熟した線維よりも線維形成過程のオリゴマーが細胞に対して強い毒性を持っていることが示唆されており, 人工的に線維形成を早くした α -Syn ン変異体が細胞に対する毒性を軽減することも報告されている(61)。酵母では, 人工的に作製した細胞に対する毒性がない α -Syn は膜への親和性が低いことが報告されている(63)。また, 線維形成というメカニズムそのものが細胞に対して毒性を与えていることも示唆している報告もある(図 1-5. 参照)(64)。

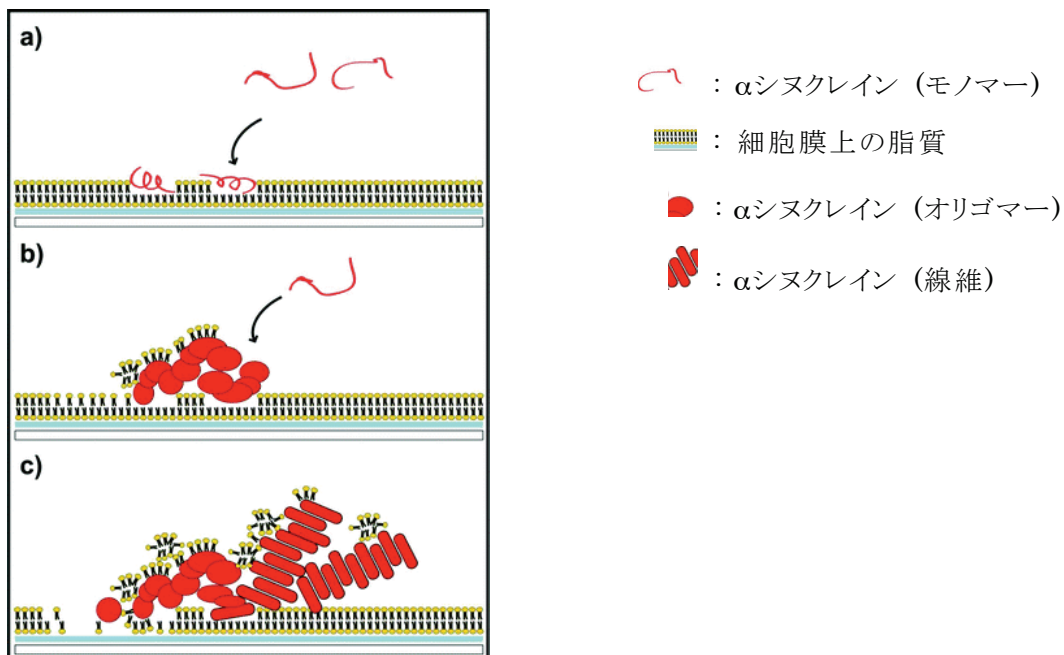


図 1-5. 提唱されている細胞崩壊メカニズム(64)より改変

- モノマー状態の α シヌクレインが膜に吸着する。
- α -Syn モノマーの凝集体が膜を薄くし, 成長している凝集体の周りに脂質が抽出される。
- 成熟した線維が形成されたとき, 膜の完全性は失われ, 細胞死の原因となる。

アミロイド線維はプリオンタンパク質に代表されるように伝染する。細胞内の多くのタンパク質が存在する混み込んだ環境が、アミロイド線維形成をさらに促進させ毒性も喚起するといことも考えられる(65)。また、タンパク質以外の微粒子がアミロイド線維の形成を促しているという報告もある。プリオンは特定の領域が毒性に関与している可能性も示唆されている(66)。毒性のあると考えられる分子種の構造も多様な報告があり、異なる毒性機構が考えられている(67)。また、アミロイド線維と細胞死調節因子との関係性を指摘する報告もある。細胞死の調節因子 Bcl-xL はミセルや細胞内に存在する線維との親和性がある。アミロイド線維は伝染性があるために天然の線維もアミロイド線維化され、Bcl-xL が蓄積し結果的に細胞死を引き起こすとも考えられている(68)。

1-7. アミロイド線維の凝集抑制物質

アミロイド線維の形成を抑制する物質はいくつか報告されている。 α -Syn の場合代表的なのはポリフェノール、カテキン、ニコチンなどがある。しかし、ニコチンは体に有害であり致死量を摂取しないと効果は現れない。ポリフェノール、カテキンと言った身近な物質が α -Syn のアミロイド線維の形成を抑制している(69)。ポリフェノールとカテキンの構造の共通点はともに六員環の構造をもっていることである。また、六員環構造内に隣接したいくつかのヒドロキシル基を持っているということが α -Syn のアミロイド線維の形成を抑制しているのではないかと考えられている(69)。

アミロイド線維の抑制効果を示す物質についての研究は盛んで、新規の抑制効果を示す物質はこれからも多く見つかると思われる。また、今まであまり研究されていなかったきのこの食品についても抑制効果を示す物質があるのではないかとと思われる。

例として、フラボボノイドの一種であるバイカレンは強力に α -Syn のアミロイド線維の形成を抑制することが報告されている。バイカレンの構造は六員環構造を持ち、その六員環構造に 3 つのヒドロキシル基が存在している。反応機構としては、バイカレンが酸化する際に現れるキノンと α -Syn とが付加化合物を形成することにより、アミロイド線維形成を抑制していることが示唆されており、特に重要なアミノ酸残基として Lys, Met, Tyr 等が挙げられる。これらのアミノ酸残基が、バイカレンとシッフ塩基や共有結合を形成して付加物を形成していると考えられる

(69)。バイカレンをはじめとするフラボノイドはポリフェノール同様に抗酸化作用を示すことで有名である。また、アルコールの酸化的代謝に関係するピロロキノリンキノン (PQQ) も濃度依存的に α シヌクレインのアミロイド線維形成を抑制している。PQQ には六員環構造が見られ、その中にヒドロキシル基は存在しない代わりにカルボキシル基が存在している(70)。これらの抑制物質はアミロイド線維を抑制するとともに細胞に対する毒性も軽減している(71)。

また、アミロイド線維構造に基づいた非天然アミノ酸ペプチドを用いたアミロイド線維形成抑制物質が作られている(72)。

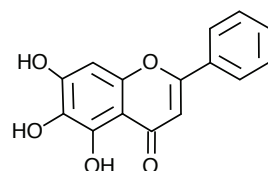


図 1-6. バイカレンの構造

1-8. タンパク質の構造解析

タンパク質の構造は、その生理的機能を知る上で非常に有用で、近年は疾患に関係のあるタンパク質を直接ターゲットにする研究が盛んに行われている。タンパク質の構造解析に広く用いられている手法の一つとして X 線結晶構造解析がある。X 線結晶構造解析はタンパク質の結晶を調製し、それに X 線を照射し投影された回折像からタンパク質の構造を取得する手法である。X 線結晶構造解析は、良質な大きい結晶を得ることができれば分解能が良く詳細なタンパク質の構造を得ることができるが、結晶化が非常に困難な場合が多く、天然変性タンパク質や生理的機能を発揮する時にしか構造形成しないタンパク質は結晶化がさらに困難である。こういった問題から、核磁気共鳴スペクトル測定 (NMR) やクライオ電子顕微鏡、コンピューターによるシミュレーションといった他の方法と組み合わせてタンパク質の構造解析が行われる。

1-9. X線自由電子レーザーによるタンパク質の構造解析

X線自由電子レーザー数マイクロからサブマイクロの大きさの非結晶性粒子の構造解析を可能にするために開発された。波長が0.225 nmの5.5 keVという大きなエネルギーを持つX線を試料に照射することで回折像を取得し、照射された試料は原子レベルで破壊される。原子レベルで破壊されるほど透過力が非常に強いため、表面構造だけでなく内部構造も知ることができる。線源のある施設がSPring-8にあることから、SPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser (SACLA) と呼ばれている (図 1-7. A 参照)。また、SACLA を用いて回折像を得るために壽一号と呼ばれる検出器 (図 1-7. B)、得られた回折から元の粒子の構造を予測するために四天王というソフトウェアが開発された。

A



B



C

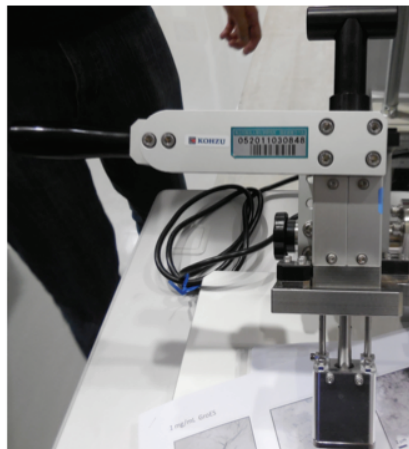


図 1-7. SPring-8 と SACLA と散乱検出装置

A. SPring-8 と SACLA

B. 壽一号と MPCCD-CCD センサー

① 壽一号

② MPCCD-Octal

③ MPCCD-Dual

C. 風林火山

1-10. 壽一号

壽一号は大きく3つの部分に分かれている(73,74)。一つ目はゴニオメーターにより制御されている極低温試料ステージがある真空チャンバーで、液体窒素により極低温に保たれ、チャンバー内は 10^{-3} Pa に保たれている。この状態にすることで、XFEL から得られる回折パターンに現れる寄生散乱等の解析の障害になるものを取り除くことができる。位相の揃った、焦点のあった強力な X 線を試料に照射することは、高分解能の回折像を取得するためにはとても重要なことで、これらを可能にするために線源側ではXFELを2段階の焦点調整システムを用いて高硬度 X 線パルスを発生させている(75) (図 1-8. A 参照)。焦点調整システムには、それぞれ鉛直方向と水平方向に特殊な鏡が配置され、硬度を減少させずに焦点を調整することができる。一方、回折像を取得するための装置側では韋駄天と呼ばれる制御プログラムにより極低温試料ステージの正確な位置が制御されている (図 1-8. B 参照) (76)。2 つめには水和した状態で凍結しているサンプルを極低温状態のポットに移動させるためのデバイスである。液体エタンにより瞬間凍結した試料は液体窒素内で保存し、壽一号に風林火山 (図 1-7. C 参照) と呼ばれる専用のデバイスを用いて充填される。出来る限りの氷や水のコンタミネーションを防ぎつつ真空状態にした後、風林火山の試料を守っていたカバーが開く。極低温ポットへのバルブを開けた後、カバーされていた部分に爪のついた移動棒が現れてサンプルを風林火山から極低温ポットに移動させ、専用のホルダーにセットされる。役目を終えた移動棒は待機位置に戻った後、高い真空状態保つために極低温ポットへのバルブが閉じられる。3 つめにチャンバーと充填デバイスが乗ったアライメントテーブルである。これは試料の正確な位置情報を決定する時に用いられる、XFEL の焦点と試料の位置を合わせる時や試料に XFEL を照射する時に試料を移動させる時に用いられる。これら 3 つの部分からなる壽一号により XFEL-CXDI は行われる。

1-11. 壽一号で得られた回折パターンの解析

壽一号で得られた回折パターンは G-四天王と呼ばれるソフトウェアを用いて解析される。四天王は 4 つのサブプログラムがあり、多聞、持国、広目、増長といい、この順にそれぞれのプログラムが連続して行われる(76)。

多聞サブプログラムは 3 つのステップを通して未処理のデータを処理する。最初に合計 10 の CCD センサーから得られた回折パターンを再構成する。そこから XFEL が照射されていない時に CCD センサーに検出される散乱を引くことで純粋な試料からの回折パターンのみを得る。最後に以降のサブプログラムで解析するに値する回折パターンを選別し抽出する。持国サブプログラムは 2 つの MPCCD センサーが記録した回折パターンの XFEL の位置を算出する。これは、次の処理にとって非常に重要な操作である。広目サブプログラムは MPCCD-Octal から得られた回折パターンと MPCCD-Dual で得られた回折パターンを組み合わせる。

増長サブプログラムは組み合わされた回折パターンから特殊なアルゴリズムを用いて位相回復を行っている。位相回復は阿修羅と呼ばれるスキームを用いて行っている(77)。阿修羅スキームは 2 段階の処理により最尤電子密度マップを得る。第一段階は Hybrid- Input- Output (HIO) 位相回復により 1000 通りの初期電子密度を算出し、これを主要成分分析による多変量解析で Support 形状を決定する。第二段階は Oversampling Smoothness (OSS) 解析により尤もらしい形状について 1000 通りの電子密度を求め(図 1-8.)、この電子密度に対してさらに多変量解析を行って尤もらしい電子密度の平均、有効分解能を決定する。これらの処理を行うことで、逆空間で表されていた回折パターンは実空間の電子密度マップとして位相回復される。

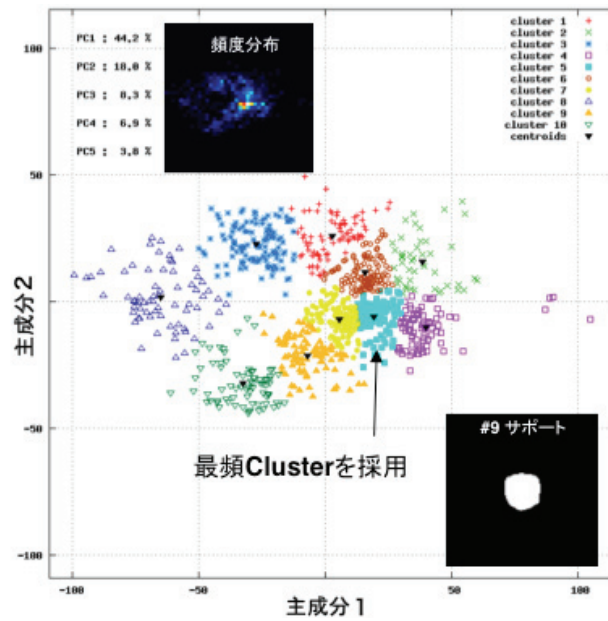


図 1-9. OSS 位相回復電子密度に対する多変量解析（主成分分析）結果

各色のついた点の集団が予想された Cluster であり、各々の Cluster にそれぞれの電子密度マップがある。

1-12. 本研究の目的及び構成

本研究の目的は非病原性タンパク質で高次の天然構造を持つ GroES と、パーキンソン病の原因タンパク質で天然構造を持たない α -Syn の 2 種類のタンパク質がアミロイド線維を形成する際にどのような分子種が細胞に対して毒性を示すのかを調査し、透過型電子顕微鏡 (TEM) や、XFEL-CXDI 実験により構造を明らかにすることである。さらに、2 種類の性質の異なるタンパク質がアミロイド線維形成する際の毒性分子種の共通点の有無を明らかにすることである。

本学位論文は 5 つの章により形成されている。

第 1 章 [序論] は本研究の背景に当たる神経変性疾患の原因タンパク質とそれらが構成するアミロイド線維に関する近年の研究を紹介した。加えて、これらの構造的特性を同定するための新しい手法である XFEL-CXDI についても紹介した。

第 2 章 [GroES アミロイド線維と毒性評価] では GroES のアミロイド線維形成をする際の細胞に対する毒性の評価を評価した。加えて、ビルベリー由来のポリフェノールによるアミロイド線維形成抑制能の評価を試みた。

第 3 章 [α シヌクレインアミロイド線維の毒性と形成機構] では α -Syn がアミロイド線維を形成する際の細胞に対する毒性を評価し、変異導入によるアミロイド線維の形成機構の解明を試みた。

第 4 章 [アミロイド線維形成中間体の CXDI による構造解析] では SACLA による GroES と α -Syn の XFEL-CXDI 構造解析を試み、その構造的共通性を議論した。

第 5 章 [総合考察] では第 2-4 章でもたらされた結果について総合的に考察し、アミロイド線維形成中間体の構造的特性について議論した。加えて、XFEL-CXDI の有用性についても議論した。

第 2 章 GroES アミロイド線維と毒性評価

2-1. 緒言

分子シャペロンはタンパク質のフォールディングを補助するタンパク質で、大腸菌をはじめとした多くの生物に存在するタンパク質である。その中でも *E. coli* 由来のシャペロンである GroEL はコシャペロン GroES と共に ATP 依存的にタンパク質のフォールディングを補助する。その機構は GroEL が 7 量体のリング状のサブユニットが 2 つ背中合わせに合わさることにより 14 量体になり、7 量体構造の GroES が結合することにより生まれる空間に基質タンパク質を隔離してフォールディングを補助する。GroEL/GroES はヒトではミトコンドリアに Hsp60・Hsp10 と呼ばれるホモログタンパク質がある。

神経変性疾患は現在不治の病として知られておりその治療法の開発が急がれている。これまでに神経変性疾患はアミロイド線維と呼ばれる特殊な構造をしたタンパク質がその原因であることがわかってきている。アミロイド線維は β シートに富んだ構造をしており、患者の患部に細胞質封入体として存在している。近年、アミロイド線維は病気の原因になるタンパク質だけでなく、病気とは関係のないと考えられてきたタンパク質も特殊な条件下でアミロイド線維を形成することがわかってきた。本研究室でも GroES が塩酸グアニジン (Gdn-HCl) を用いてタンパク質の立体構造を破壊することによりアミロイド線維を形成することを発見した。

第2章では、非病原性のタンパク質である GroES が Gdn-HCl 変性条件下でアミロイド線維を形成する際、A β のような病気の原因であるタンパク質と同様に細胞に対して毒性があるのかを調査した。毒性があった場合、その毒性分子種は成熟した GroES アミロイド線維なのか、それとも GroES アミロイド線維形成中間体にあるのかを明らかにした。さらに、毒性評価実験の際に採取したタンパク質の一部を用いてTEM観察を行い毒性分子種の構造を明らかにした。同時に野生型ブルーベリーであるビルベリー由来のポリフェノールを豊富に含む抽出液 VAM を用いて GroES アミロイド線維の形成抑制能の有無を調査した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 培養と精製

[1] BLR (DE3) / pET ES の形質転換

1. コンピテントセル BLR (DE3) 200 μL にプラスミド pET ES を 100 ng 添加して氷中で 30 min インキュベートした。
2. 42°C, 45 sec でヒートショックした後, 2 min 氷中で再びインキュベートした。
3. 解凍した SOC 培地 800 μL に BLR (DE3) 200 μL を添加して 37°C で 1 hr 回復培養を行った。
4. クリーンベンチ内で LB 培地に終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように 50mg/mL の Ampicillin を添加し, BLR (DE3) と塗布して 37°C, over night でインキュベートした。

SOC 培地

2% (w/v) Bacto Tryptone
0.5% (w/v) Bacto Yeast Extract
10 mM NaCl
2.5 mM KCl

LB 培地

1% (w/v) Bacto Tryptone
0.5% (w/v) Bacto Yesast Extract
1% (w/v) NaCl
1.5% (w/v) Agar (寒天培地)

[2] BLR(DE3)/pETES の培養

1. LB/Amp 寒天培地に形成した BLR(DE3)/pET ES コロニーの一つを無作為に 5 mL の LB/Amp 液体培地に添加した。
2. 37°C, 160 min^{-1} で LB/Amp 液体培地の OD_{600} が 0.6 になるまで振とう培養した。
3. OD_{600} が 0.6 に到達した時に菌体懸濁液を 300 mL の LB/Amp 液体培地に 1/100 量添加した。残りの菌体懸濁液は 1.5 ml を発現確認のために KUBOTA3780 centrihug と AF-2724A ローターを用いて 6800 $\times g$ で集菌した。
4. INNOVA 44 SHAKER で 37°C, 120 rpm で OD_{600} が 0.6 に到達すまで培養した。
5. クリーンベンチ内で 1 MIPTG を終濃度 1 mM になるように LB/Amp 菌体懸濁液に添

加した。

6. INNOVA 44 SHAKER で 37°C, 120 rpm で over night で培養した。
7. KUBOTA 6500 centrifuge と AG-5006 ローターを用いて 8000 rpm, 4°C, 20 min で集菌した。集菌前の菌体懸濁液 1.5 mL を発現確認のため KUBOTA3780 centrihugue と AF-2724A ローターを用いて 6800 ×g で集菌した。

[3] GroES の精製

1. 菌体 18.8g を 10 倍量の菌体破碎 buffer に懸濁させ (常温), 完全に懸濁したら 1/1000 倍量の 100 mM PMSF と塩化リゾチームを添加して 1 hr 攪拌させた。

菌体破碎 buffer

50 mM Tris-HCl pH 7.5 at 4°C

2 mM EDTA

2mM DTT

100 mM NaCl

0.1 mM PMSF

2. 氷中で, Sonics Vibra Cell Processor VCX-130 を用いて Pulser 1, Amplitude 20, Timer 5×4 で超音波破碎機を用いて菌体破碎した。
3. KUBOTA 6500 centrifuge と AG-508CA ローターを用いて 12000 rpm, 4°C, 20 min で遠心分離をして, 上清を回収した。
4. 菌体破碎 buffer に 5% (w/v) Streptomycin を添加して除核酸 buffer を調整した。その後, 菌体破碎 buffer と同量の除核酸 buffer をペリスタポンプで 1 mL/min の流速で菌体破碎後の上清に攪拌しながら添加した。添加後, 30 min 攪拌した。
5. KUBOTA 6500 centrifuge と AG-508CA ローターを用いて 14000 rpm, 4°C, 20 min で遠心分離をして, 上清を回収した。
6. Bradford 法で HITACHI U-2900 Spectrophotomater を用いてタンパク質量を

した(78)。

7. 除核酸処理後の溶液を 2 mg/mL になるまで菌体破碎 buffwe を用いて希釈した。
8. 希釈したタンパク質溶液が 70°Cになるまで三角フラスコの中に入れて熱水の中に浸した。70°Cに到達後、そのまま70~75°Cの温度を 15 min 熱処理を行い、その後素早く液温を 4°Cにして 30min 氷中でインキュベートした。
9. KUBOTA 6500 centrifuge と AG-508CA ローターを用いて 14000 rpm, 4°C, 40 min 遠心分離をして、その後上清を回収した。
10. 上清を millipore Millex LH フィルターを用いて濾過して正確に体積を計測した。
11. 上清に氷中で硫酸アンモニウムの終濃度が 55% (w/v) になるように少しずつ添加し、その後 30 min 氷中で攪拌し続けた。
11. KUBOTA 6500 centrifuge と AG-508CA ローターを用いて 14000 rpm, 4°C, 40 min 遠心分離をして、上清を回収した。
12. 2 つの透析 buffer3 L を使って低温室で 2 回透析 (2 hr, over night) した。

透析 buffer
50 mM Tris-HCl pH7.5 at 4°C
2 mM EDTA
2 mM DTT

透析 buffer
50 mM Tris-HCl pH7.5 at
4°C
2 mM EDTA

13. 透析した溶液を KUBOTA 6500 centrifuge AG-508CA ローターを用いて 14000 rpm, 4°C, 40 min で遠心分離した後、millipore Millex LG フィルターろ過を行って Bradford 法により蛋白定量を行った。
14. AKTA FPLC system により陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。

AKTA 用 buffer
50 mM Tris-HCl pH7.5 at 4°C
2 mM EDTA
2 mM DTT
1 M NaCl (塩ありの場合)

15. 陰イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラムより、ピークの確認できた Fraction を 15%SDS-PAGE した。
16. 狭雑タンパク質の少ない Fraction を回収し、2 つの凍結乾燥用 buffer 3 L を使って低温温室で 2 回透析 (2 hr, over night) した。

凍結乾燥用透析 buffer-1
5 mM NH_2HCO_3

凍結乾燥用透析 buffer-2
1 mM NH_2HCO_3

17. 透析したものを millipore Millex LG フィルターでろ過をおこなった後、EYELA FREEZE DRYER FD-1000 を用いて凍結乾燥して翌日重量を計り、4°C で保存した。

2-2-2. GroES を用いた細胞毒性

[1] マウス由来 Neuro-2a の培養

1. CRYO ONE DR-10A REFRIGERATORS から Neuro-2a を水中へ移し、軽く蓋を緩めてからまた締めた。
2. 37°C の恒温槽で素早く溶解させる。
3. クリーンベンチ内で Neuro-2a 細胞を 50 mL 遠沈管に移し、MEM を 6 mL 遠沈管に入れた。

MEM (+)
89% (v/v) MEM
0.1 mM Non Rssential Amino Acid
1 mM Sodium pyruvate
1% (v/v) Penicillin Streptomycin
10% (v/v) FBS

MEM (-)
89% (v/v) MEM
0.1 mM Non Rssential Amino Acid
1 mM Sodium pyruvate
1% (v/v) Penicillin Streptomycin

4. HITACHI himac CR-20 centrifuge と R20A2 ローターで 2000 rpm, 4°C, 5 min 遠心分離を行った。
5. 上清を取り除き, MEM (+) を 6 mL 使って沈殿した細胞を緩やかに懸濁した。
7. 細胞培養用のディッシュに 6 mL 移した後, ASTEC APC-30D/CL-30 CO₂ Incubator で 37°C, 5%CO₂ で 90%コンフルエントになるまで培養した。
8. その間, 培地が黄色くなり始めたら MEM (+) を取り除き 3 mL の PBS で 2 回洗ったのち, 新しい MEM (+) を 6 mL 添加して再び培養した。
10. 90%コンフルエントになったら, 培地を取り除き 5 mL の PBS で 2 回洗ったのち trypsinEDTA 5 mL ディッシュに接着している細胞を剥離させた。
11. 3 mL の MEM (+) で反応を停止させて HITACHI himac CR-20 centrifuge HITACHI himac CR-20 centrifuge と R20A2 ローターで 2000 rpm, 4°C, 5 min で 遠心分離を行った。

12. 上清を取り除き 6 mL の MEM (+) で再び懸濁した。
13. 48 well プレートに 500 μ L ずつ MEM(+)を添加して、その中に \sim 30 μ L の細胞懸濁液を添加して ASTEC APC-30D/CL-30 CO₂ Incubator で 37°C, 5%CO₂ で 90%コンフルエントになるまで培養した。
14. 48well プレートの MEM (+) を取り除き, 250 μ L の PBS で各 well を 2 回洗浄した。
15. 500 μ L の MEM (-) を各 well に添加して 24 hr 培養した。

[5] GroES アミロイド線維形成中間体, 成熟線維を持つ細胞に対する毒性評価

毒性を評価するために Neuro-2a 細胞を用い, 毒性評価は以下の 2 つの方法で行った。

(1) MTS assay

テトラゾリウム塩である MTS が細胞内で還元されることにより 490 nm に吸収があるホルマザンに変化する現象を利用した細胞毒性の評価法である (図 2-1. A)。

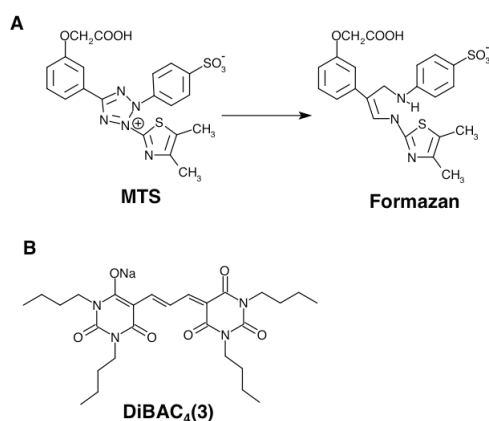


図 2-1. 細胞毒性と膜電位を測定するために用いた色素の構造式

A. MTS の構造式

B. DiBAC₄(3) の構造式

操作

アミロイド線維形成は総体積 2 mL で行った。

1. GroES 凍結乾燥物を適量測り取り, アミロイド線維形成 buffer 1 mL で溶解させ, KUBOTA 3780 centrifuge と AF-2724A を用いて 14000 rpm, 4°C, 5 min で遠心分離を行い, 上清を回収した。

アミロイド線維形成 buffer 50 mM Sodium Phosphate pH7.4 0.9 M Gdn-HCl

Thioflavin-T (Thio-T) buffer 50 mM Sodium Phosphate pH7.4 25 mM Thio-T
--

2. 上清を一部採取して, Bradford 法でタンパク質の濃度を測定した。
3. VMA, Cya, Cya-3-gal, Del, Del-3-gal を適量測り, アミロイド線維形成 buffer に溶解させた。Cya, Cya-3-Glc, Del, Del-3-Glc は塩化物を用いた。

Anthocyanins	VMA	Cya	Cya-3-Glc	Del	Del-3-Glc
Molecular Weightt	450	322.7	484.84	338.7	500.84

4. GroES 濃度が 1 mg/mL (96.3 μ M) になるようアミロイド形成溶液を試験管に調整した。
VMA, Cya, Cya-3-Glc, Del, Del-Glc を添加するときは GroES の 0.5, 1, 2, 5, 10 倍モル等添加した。添加物とともに線維形成したサンプルはアルミホイルを用いて遮光した。
これらのサンプルは 37°C, 90 min で振とうしてアミロイド線維形成を行った。
5. Thio-T buffer を 2 mL フラクシオンに採取し遮光した。

6. Thio-T buffer 中のサンプルの終濃度が 0.0075 mg/mL になるように振とうしているサンプルの一部を各々の時間に添加した。その後, 30 sec ボルテックスして再び遮光した。
7. F-4500 Fluorescence Spectrophotometer で以下の条件で蛍光強度を測定した。

表 2-1. Thioflavin-T 蛍光測定 の条件

S/測定条件設定	I/光度計条件
データモード: 蛍光	励起側スリット: 5 nm
時間単位: sec	蛍光側スリット: 5 nm
励起波長: 440 nm	ホルトマン電圧 (V): 700
蛍光波長: 480 nm	レスポンス (sec): 0.1
初期待ち時間: 0	シャッター制御: ON

8. 細胞添加用に 200 μ L タンパク質溶液を採取し, Hitachi Koki CS150GXL Micro Ultracentrifuge と S140AT ローターとを用いて 57000 rpm (174000 \times g), 4°C, 1 hr で超遠心分離した。
9. 超遠心分離後の上清を PD SpinTrap G-25 に 100 mL/column ずつ添加し, KUBOTA 3400 centrifuge で 800 \times g, 2min, 常温で脱塩した。
10. 残った沈殿は細胞毒性評価 buffer 200 μ L に再懸濁して Hitachi Koki CS150GXL Micro Ultracentrifuge と S140AT ローターとを用いて 57000 rpm (174000 \times g), 4°C, 1 hr で超遠心分離した。除去して, 200 mL の細胞毒性評価 buffer に再懸濁させた。
11. 脱塩したサンプルと再懸濁させたサンプルを Bradford 法で濃度を定量した。その後 以下のように細胞に添加した。

表 2-2. サンプルの添加量

サンプル	添加量
50 mM Sodium Phosphate buffer	50 μ L
1 mM Melittin	5 μ L
脱塩後上清	10 μ g
アミロイド線維	10 μ g

12. 37°C, 5%CO₂ の条件下で 24 hr インキュベートした。
13. 各 well に 1/5 量 (v/v) の MTS を細胞に添加して 2 hr 培養した。
14. 10% SDS (w/v) 溶液を用いて MTS の反応を停止させ、測定用 48 well プレートに細胞に添加した MTS 溶液を移した。
15. Molecular Devices SpectraMax M2 プレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定した。
16. 細胞毒性評価用 buffer を添加した well の溶液の吸光度を生存率 100%, 1 mM Melittin を添加した well の溶液の吸光度を生存率 0%とし、各々の時間にサンプルを添加した well の溶液の吸光度からその時間の細胞生存率を算出した。

(2) DiBAC₄ (3) assay

細胞が刺激により脱分極することで細胞中へ色素が取り込まれる (図 2-1. B)。細胞内へ入った色素は細胞内タンパク質や細胞内膜へ結合する。結合することにより蛍光強度の増加が観察できる。これらをプレートリーダー等により測定し、膜電位の変化をモニターすることにより細胞膜への影響を評価する方法である。

操作

アミロイド線維形成は総体積 2 mL で行った。操作 1-10 までは同用の操作を行った。

1. 5 μ M の DiBAC₄ (3) を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4 (DiBAC₄ (3) buffer) で 200 μ L で細胞を 2 回洗浄した。

2. 脱塩した GroES サンプルと超遠心分離した沈殿を 5×DiBAC4 (3) buffer と 50 mM Sodium phosphate buffer とを用いて 0.5 mg/mL になるように調整した。
3. 180 μ L 細胞に添加して 37°C, 5%CO₂ のインキュベーターで 30 min インキュベートした。
2. GroES サンプルは 10 μ g 分のタンパク質を well に添加し, 1 mM melittin は 5 μ L 添加したのち, 37°C, 5%CO₂ のインキュベーターで 5 min インキュベートした。
3. Molecular Devices Spectra Max M2 プレートリーダーを用いて 37°C, 励起波長 495 nm, 蛍光波長 517 nm で測定した。

[6]有意差検定

F検定 : MTSまたはDiBAC4-assayのデータに対して, 0 hrの細胞生存率のデータを基準として行った。0.05未満は不等分散, 0.05以上は等分散とした。

T検定 : 0 hrの細胞生存率のデータを基準としてとして行った。値が0.05未満は有意差ありとした。

3-2-3. TEM を用いたアミロイド線維の観察

1. 各時間のアミロイド線維形成溶液またはアミロイド線維懸濁液を一部採取し, MQ 水で 10 倍希釈した。
2. 日新 EM コロジオン膜貼付メッシュ (400 メッシュ) に希釈したサンプルを滴下して 1 min 室温でインキュベートした。
3. ろ紙等で膜上の水分を除去し, 5 μ L の MQ を用いて洗浄を行った。
4. 2%ウラニル酢酸 5 μ L を滴下して室温で 30 sec インキュベートした後, ろ紙を用いて余分な 2%ウラニル酢酸を除去した。
5. 室温でサンプルを滴下した面が乾燥するまで静置した。
6. JEOL-100CX にサンプルマウント後, 観察を行った。

2-3. 結果

2-3-1. GroES アミロイド線維形成中間体, 成熟線維が持つ細胞に対する毒性評価

GroES は核形成期, 伸長期, 定常期を経てアミロイド線維を形成しており (図 2-1. A), これは他の神経変性疾患に関わるタンパク質がアミロイド線維になる経過と同じだった。同時に行っていた培養細胞 Neuro-2a に対する毒性評価において, 最も毒性のある分子種は図 2-2. A より 48 hr に形成されていることが分かった。48 hr での Thio-T の蛍光強度から, この分子種は成熟したアミロイド線維ではなく伸長期に存在する中間体であることが分かった。毒性のあるアミロイド線維形成中間体の性質として, 超遠心分離による沈殿した分画の毒性が低い一方で, 上清分画がより強いことから毒性のあるアミロイド線維中間体は可溶性であることがわかる (図 2-2. B)。さらに Neuro-2a に添加するアミロイド線維形成中間体の濃度を増加させた結果, 濃度依存的で, 半致死量 ($I_{48 \text{ hr}}$) は $0.6 \mu\text{M}$ であった (図 2-2. C)。

成熟したアミロイド線維に毒性がないことが明らかとなったが, アミロイド線維の断片化が細胞毒性を強化するという報告がある(62)。この現象を調査するため, 人工的に成熟したアミロイド線維を超音波処理により断片化し毒性評価を行った。その結果, 成熟したアミロイド線維と比較しても細胞に対する毒性は変わらなかった (図 2-2. D)。岩佐らにより GroES はアミロイド線維を形成するときに Asn51-Gly51 における転位が重要であることが指摘された。これを受けて(79), N51A 変異体の核形成への影響と細胞に対する毒性も調査した。その結果, 変異体 N51A は GroES WT と同様のアミロイド線維形成中間体が多く存在する 144 hr に最も細胞に対する毒性が見られた (図 2-2. E)。

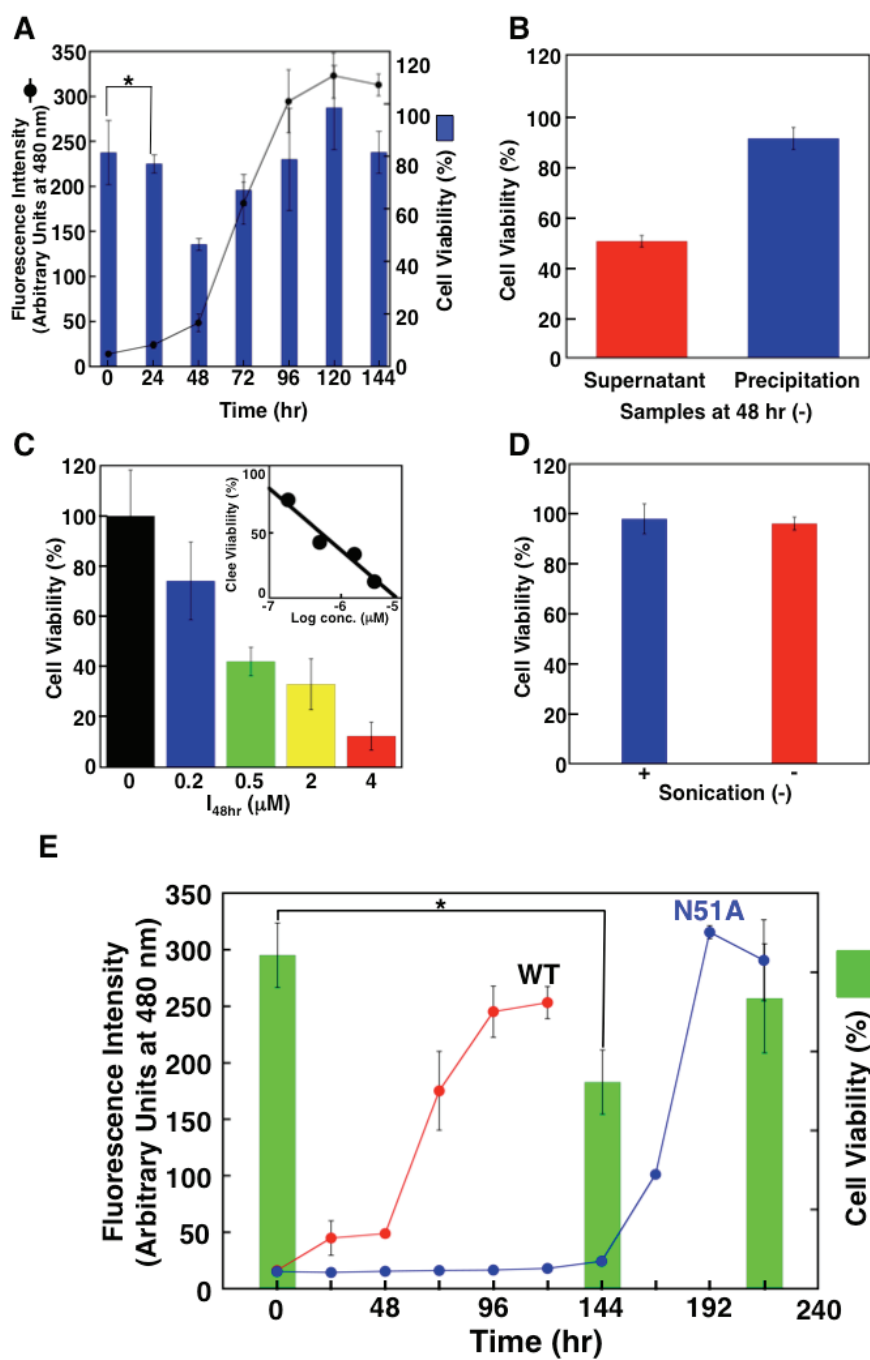


図 2-2. GroES のアミロイド線維形成が細胞に与える影響

A. GroES のアミロイド線維形成と細胞に対する毒性, * $p < 0.05$

B. 48 hr における可溶性分画と不溶性分画の毒性

C. アミロイド線維形成中間体が持つ毒性の濃度依存性

D. 断片化されたアミロイド線維の毒性

E. N51A のアミロイド線維形成と細胞に対する毒性, * $p < 0.05$

GroES がアミロイド線維を形成する様子を時間帯ごとに TEM で観察し、その構造的特性を調査した (図 2-3.)。その結果、毒性分子種が存在する 48 hr においてアモルファス状の構造物を形成していることが明らかとなった (図 2-3. B)。さらに、伸長期に分類される 72 hr では既にアミロイド線維様の構造物が形成されている様子が観察され(図 2-3. C)、定常期に分類される 144 hr では典型的なアミロイド線維が観察された (図 2-3. D)。アミロイド線維形成中間体の毒性分子種は 48 hr に存在し超遠心分離により上清に分離されることから、超遠心後の GroES アミロイド線維形成中間体を TEM 観察した。その結果、最も毒性のある分子種と考えられる構造物は 44-88 nm の粒子状の構造物が観察できるが、沈殿はアモルファス状の構造物が観察できた。(図 2-3. E, F)。

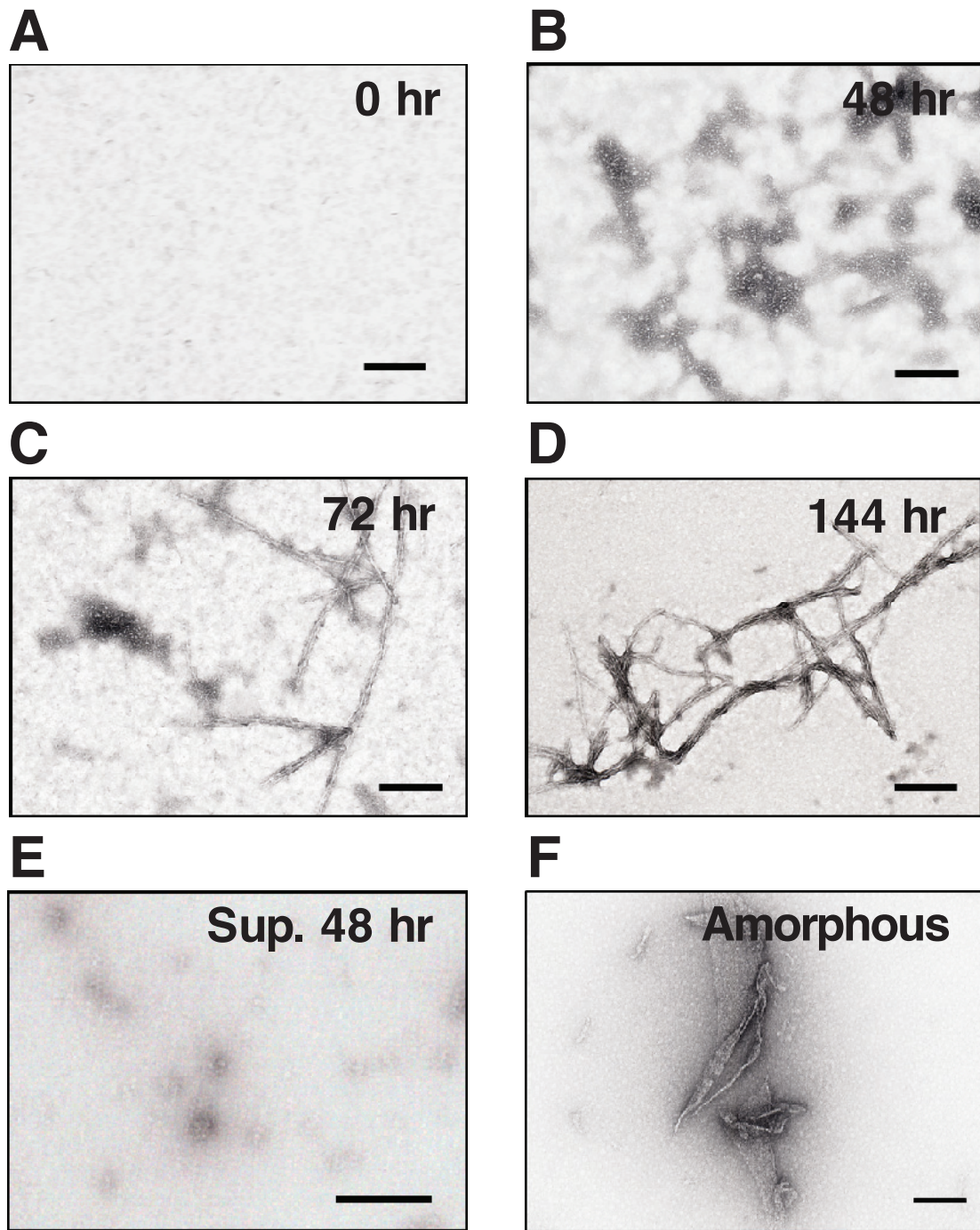


図 2-3. 各時間帯の GroES の TEM 画像

A-D. 0-144 hr で観察された GroES の TEM 画像

スケールバーは 200 nm

E. 48 hr で形成された超遠心分離の上清分画で観察された GroES

F. 48 hr で形成された超遠心分離の沈殿分画で観察された GroES

次に、GroESのアミロイド繊維化が細胞に与える影響をイオンが膜を通過するとき
 に生じる膜電位を細胞膜の電位差を感知して蛍光を発する蛍光色素 DiBAC₄ (3) を用
 いて蛍光強度の変化を検出することで調査した。その結果、毒性が強い分子種が存在
 する時間帯において蛍光強度の増加が見られた。この色素は与えられた刺激により脱
 分極した細胞に取り込まれることにより細胞内のタンパク質や内膜に結合して蛍光を
 発する。従って、GroESアミロイド線維中間体は細胞膜の脱分極を促す効果がある、あ
 るいは細胞膜が損傷することで培地中の色素が細胞内に流入したことが示唆された
 (図 2-4.)。

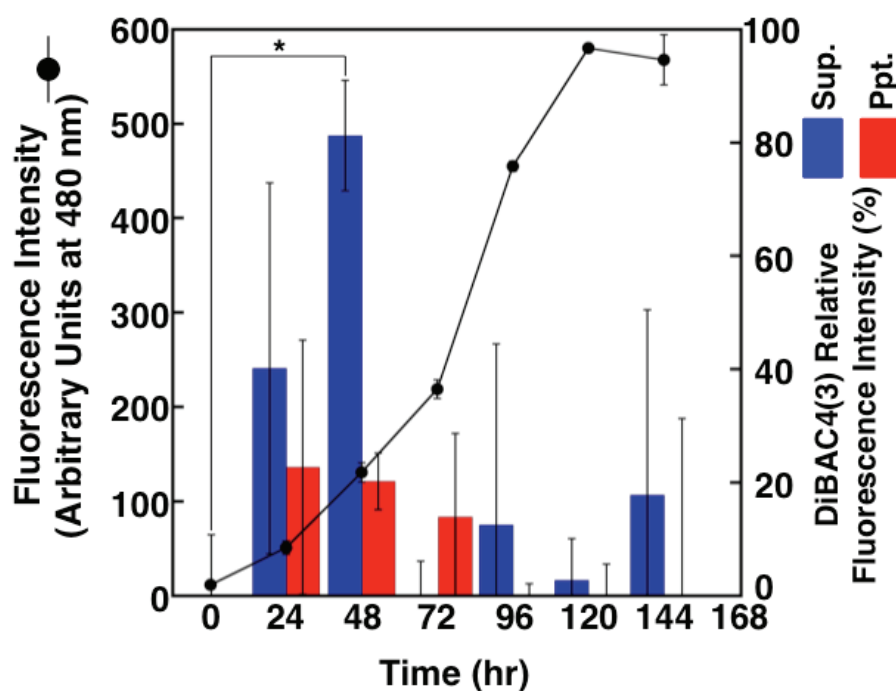


図 2-4. GroES のアミロイド繊維化することによる細胞膜への影響

振とうして形成した GroES アミロイド線維を超速心分離により上清と沈殿にわけ
 て DiBAC₄ (3)を用いて細胞膜への影響を評価した。 *p<0.05

2-3-2. ビルベリー由来ポリフェノールによる GroES アミロイド線維中間体が持つ毒性の抑制

近年の研究で、ポリフェノール類はアミロイド線維形成中間体が持つ毒性を抑制することがわかっている(80)。ビルベリーは多くのポリフェノールを含有している果実であり、アミロイド線維の形成を抑制することが期待できる(81,82) (図 2-5.)。今回はビルベリー由来エキス VMA を GroES タンパク質溶液に添加することでアミロイド線維形成抑制能を調査した。

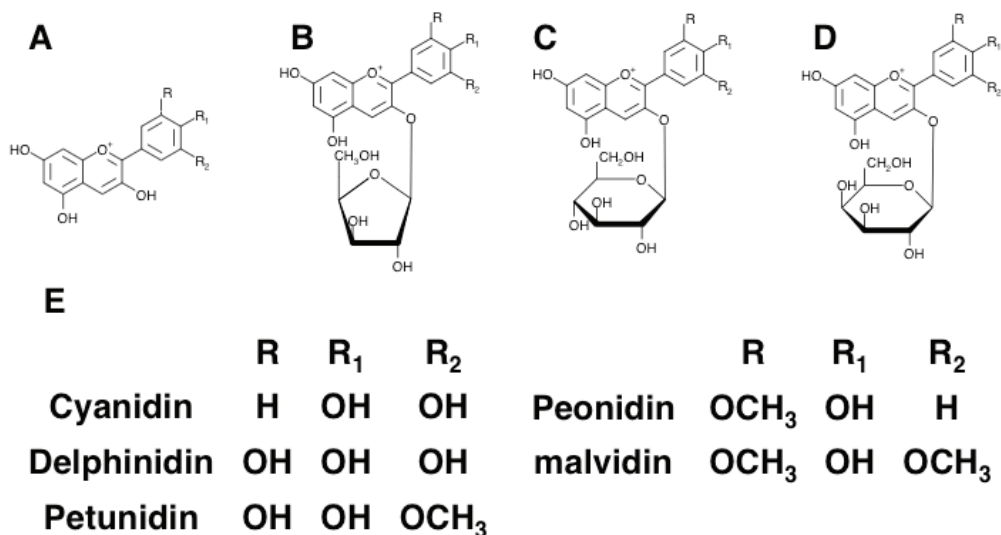


図 2-5. VMA に特に含まれる代表的なポリフェノール

- A. アントシアニジン類の基本骨格
- B-D. それぞれアラビノース, グルコース, ガラクトース配糖体
- E. 官能基の種類に応じたアントシアニジン

GroES タンパク質溶液に 0-3.6 モル等量の VMA を添加して、アミロイド線維の形成抑制を調査したところ GroES のアミロイド線維化を濃度依存的に抑制した(図 2-6.A)。低濃度 (0-0.7 モル等量)の VMA を添加した時に,VMA の添加量の増加に応じて蛍光強度の増加する時間が遅延した。これは VMA が核形成を遅らせる効果があることを示している。同時に、蛍光強度の増加速度は VMA 非存在下より 0.7 モル等量の方が緩やかになっていることから、アミロイド線維の伸長反応についても効果があることが示唆された。VMA を添加することにより蛍光強度の増加が全くなかった GroES の形状を TEM により観察したところ、VMA を添加していない GroES では典型的なアミロイド線維が形成されていたのに対して VMA を添加した GroES は線維状ではない可溶性の凝集体が観察できた (図 2-6.B, C)。更に、TEM で観察された構造物は細胞に対して毒性があるのかという疑問が生じたので、VMA 存在下での GroES アミロイド線維形成が与える細胞毒性の調査を試みた。調査する前に VMA のみでの細胞毒性を調べると、生存率は何も添加していない時と変化なかった(図 2-6. D)。これを受けて、GroES アミロイド線維形成中間体で確認されている細胞に対する毒性を調査した。その結果、毒性を示すアミロイド線維形成中間体が存在する時間帯においても細胞生存率は 0 hr と変わらなかった (図 2-5. E)。以上のことから、VMA に含まれるポリフェノールは GroES アミロイド線維形成を抑制するだけでなく中間体の毒性も阻害することが分かった。また、3.6 等量の VMA の TEM 観察より VMA に含まれるポリフェノールは GroES がアミロイド線維を形成せず、毒性のない構造物を形成する経路に導くことが示唆された。

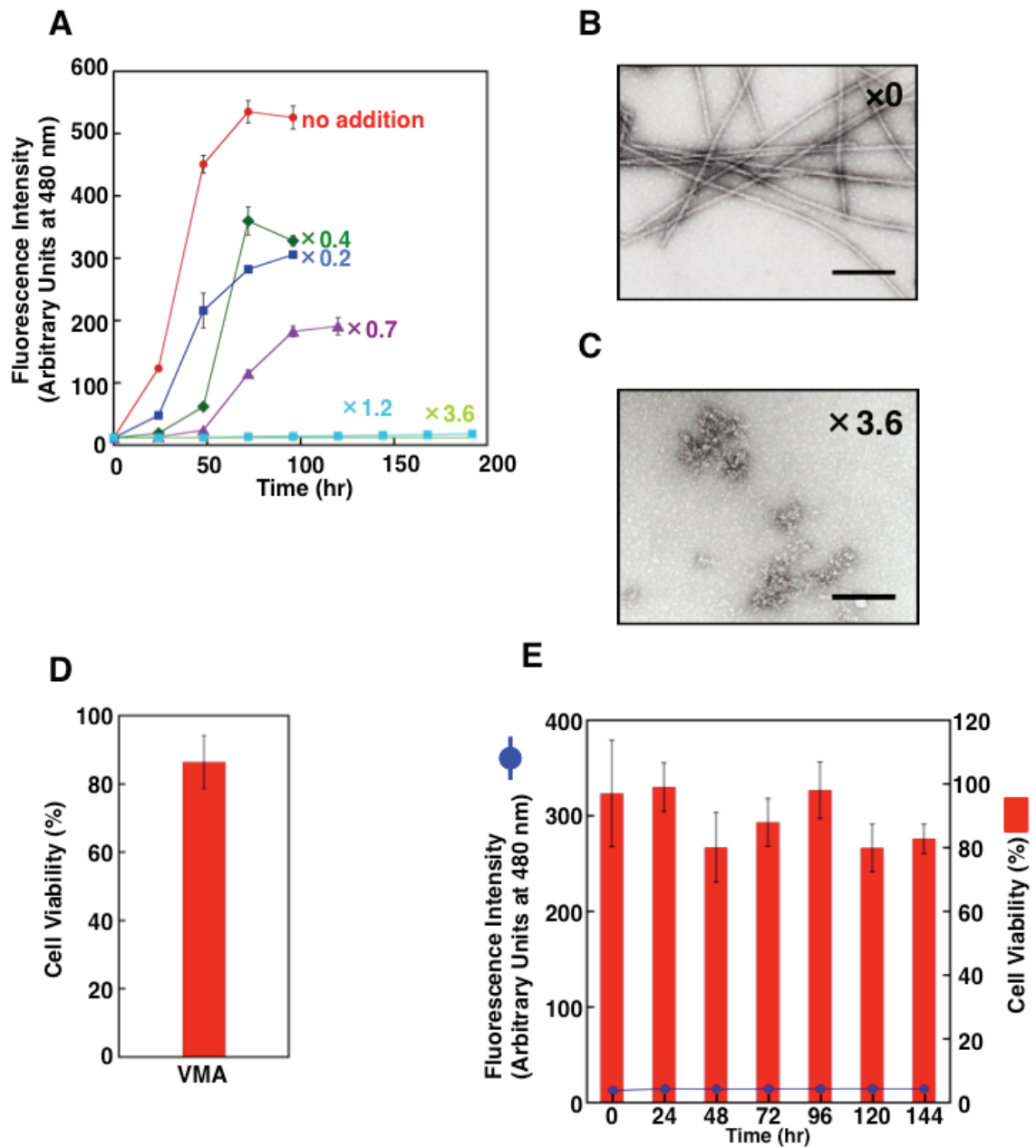


図 2-6. VMA が GroES のアミロイド線維形成と細胞に与える影響

A. VMA の濃度依存的な GroES アミロイド線維形成の抑制

B. VMA 非存在下における GroES の形状

C. VMA 存在下における GroES の形状

D. VMA が持つ細胞毒性

E. VMA 存在下での GroES アミロイド線維の形成細胞に与える影響

VMAに含まれるポリフェノールのなかで、シアニジン (Cya), デルフィニジン (Del) やその配糖体は特に多く含まれている(83)。Del とその配糖体は VMA に含まれるアントシアニジンの約 36%を占めている(83)。そこで Del を用いて GroES アミロイド繊維形成が抑制されるかを調査した。Del を GroES0.7-10 モル等量添加したところ、VMA と同様に濃度依存的に GroES アミロイド線維形成を抑制した (図 2-7. A)。0.5 と 1 等量では核形成時間を遅延させ、2 等量以降は完全にアミロイド線維形成を抑制した。同時に各添加濃度における GroES 構造物を TEM により観察したところ 0.5 等量の Del を添加し、蛍光強度が上昇したサンプルはアミロイド線維が観察されたが、10 等量添加したサンプルではアミロイド線維様の構造物は観察できなかった (図 2-7.B-D)。同様に Del のガラクトース配糖体と Cya とそのガラクトース配糖体を GroES に添加することでアミロイド線維形成が抑制されるか調査したところ、Cya, Del 3-gal, Cya 3-gal いずれも濃度依存的に最終的な蛍光強度が低かった。抑制能は VMA > アントシアニジン > アントシアニンの順で高かったことから、糖構造よりもアントシアニジン骨格がアミロイド線維形成抑制に関与していることが示唆された。VMA の抑制能が最も高かったことから、VMA に含まれるポリフェノール類の相乗効果が示唆される。アントシアニジンよりアントシアニンの抑制効果が低い原因として考えられるのは、糖構造がタンパク質との相互作用を立体的に阻害していることが考えられる。VMA が最も抑制能が高いのは、ポリフェノール類の相乗効果の他に VMA に含まれるポアアリフェノール以外の低分子化合物の影響も示唆される。Del 3-gal を 10 等量添加した GroES が形成する構造物は Del を 10 等量添加した GroES が形成する構造物と類似していることが TEM により観察できた (図 2-7. B)。

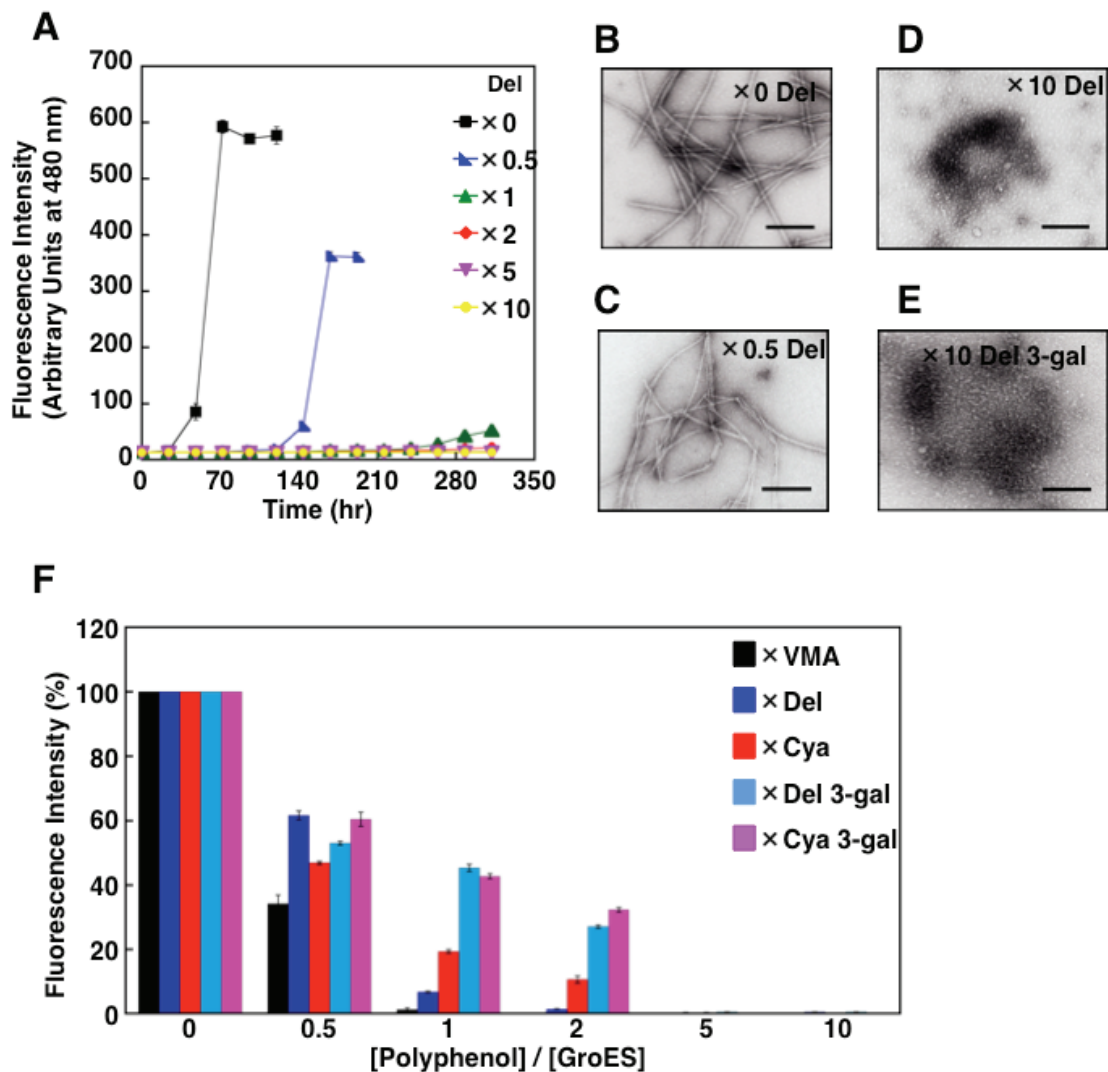


図 2-7. VMA に含まれるポリフェノールが GroES アミロイド線維形成に与える影響

A. 各々の濃度の Del を添加した際の GroES アミロイド線維形成実験

B-E. Del とその配糖体を GroES に添加してアミロイド線維形成実験を行うことで形成された構造物

F. VMA, Del, Cya とその配糖体を添加した GroES アミロイド線維形成実験の最終蛍光強度

図 2-6. より, VMA は GroES のアミロイド線維形成を抑制する働きがあることが分かったが, 核形成や成熟したアミロイド線維には効果があるのかを調べた。その方法として毒性の強い分子種が多く存在する 48 hr, 核形成後の伸長反応が活発に行われている 96 hr, アミロイド線維の伸長が停止した 120 hr の 3 時間帯に VMA を GroES の 3.6 等量添加することで Thio-T 蛍光強度の変化を観察した。その結果, 48 hr, 96 hr では VMA を添加した後の蛍光強度増加は確認されず, 更に 120 hr で VMA を GroES アミロイド線維に添加したサンプルでは蛍光強度の著しい減少がみられた (図 2-8. A)。蛍光強度の減少を視覚的に観察するため, 120 hr に VMA を添加した GroES サンプルと, 120 hr で何も添加しなかったサンプルを AFM で観察した結果, 図 2-8. A の時点ではアミロイド線維が観察されたが, VMA を添加し 48 hr 経過したサンプルを観察するとアミロイド線維様の構造物は観察されなかった (図 2-8. B, C)。これは, VMA がアミロイド線維を分解したことを示唆している。

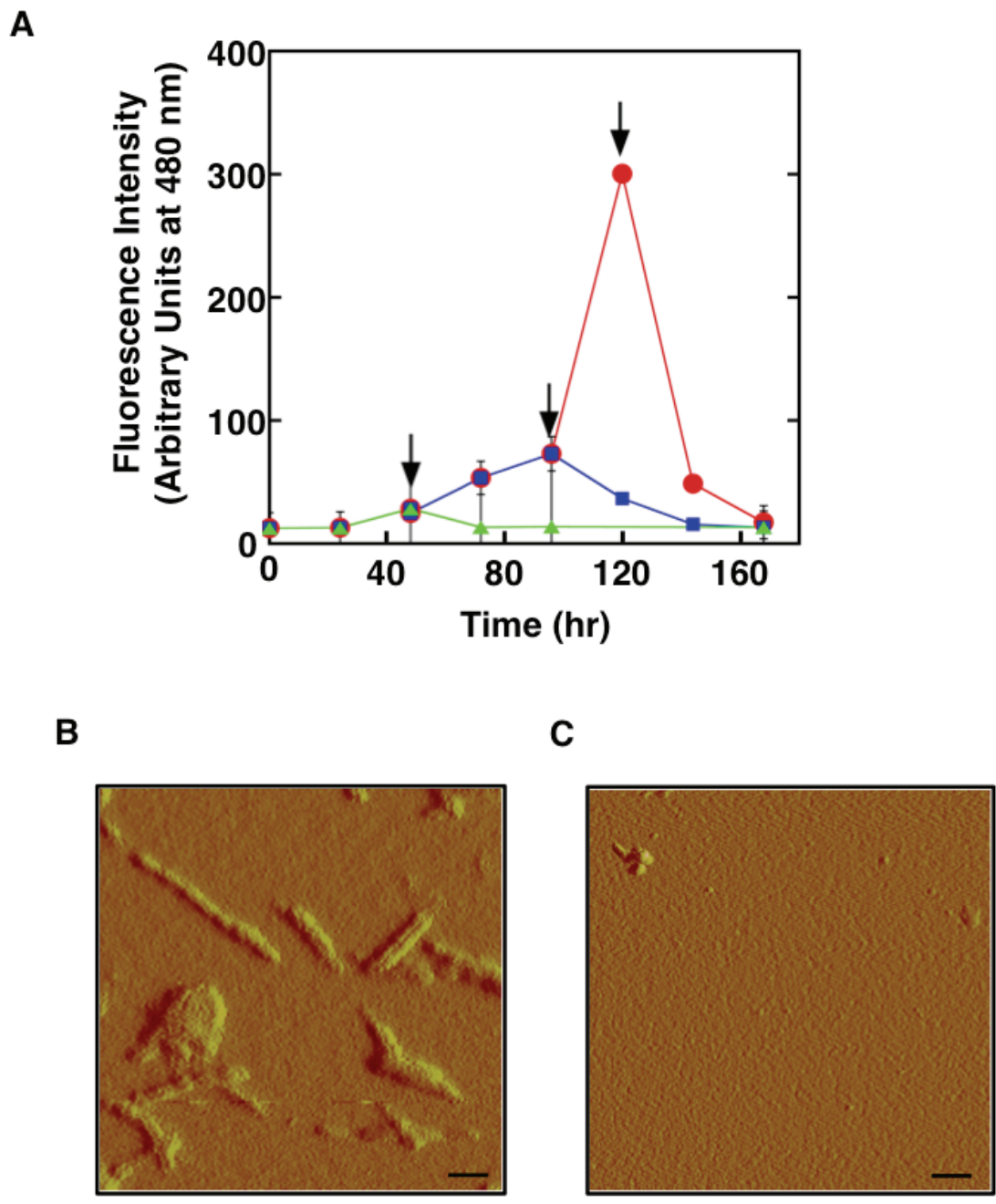


図 2-8. VMA による GroES アミロイド線維の分解

A. VMA を途中添加したときの GroES アミロイド線維形成への影響

▲ 48 hr で添加 ■ 96 hr で添加 ● 120 hr で添加

矢印が添加した時間を表す

B. VMA 添加前後の AFM で観察された GroES。スケールバーは 200 nm

C. VMA 添加 48 hr 後の AFM で観察された GroES。スケールバーは 200 nm

また、もっとも毒性の強いアミロイド線形成中間体、分解されたアミロイド線維に VMA を添加することで細胞への影響を調査した。48 hr で VMA を添加していないサンプル (I_{48hr}) の生存率が 35%であったのに対して、添加しサンプル (I_{48hr} + VMA) は 93%で (図 2-9. A), DiBAC₄ (3) による相対蛍光強度も 80%から 35%程度に減少している (図 2-9. B)。すなわち、VMA は毒性分子種である GroES アミロイド線維形成中間体に直接作用してそれらは無毒化していることが示唆される。

VMA がどのようにして GroES のアミロイド線維を分解し、どのように無毒化するかを調べるために、GroES と VMA との相互作用を調査した。48 hr の間 VMA を添加してインキュベーションした GroES は可溶性の毒性があるアミロイド線維形成中間体を形成しなかった。このサンプルを脱塩した後にその吸収を測定することで VMA のみのサンプルと比較した。その結果、350 から 600 nm の領域で緩やかな吸光度の増加が検出された (図 2-9, C)。この領域はアントシアニンが持つ強い吸収帯と一致する。従って、この緩やかな吸収の増加は GroES が凝集体になったことが原因の散乱であることが示唆された。しかし、24 hr に渡り VMA の吸光度を測定したところ VMA の吸光度は経時的に変化していくことがわかった (図 2-9. 挿入図)。この現象は長期のインキュベーションで VMA 中のポリフェノールが酸化することに関係していると考えられた。VMA 中のポリフェノールを 24 hr 空気酸化させた後の吸収スペクトルと GroES と VMA とを 48 hr 共にインキュベートしたサンプルの吸収スペクトルを比較するととても類似していることが分かった。従って、VMA は GroES と強固に結合することでアミロイド線維の形成を阻害し、凝集化した GroES も分解することが示唆された。また、I_{48hr} と VMA を共に 24 hr インキュベーションした時の吸収スペクトルも VMA を 24 hr 空気酸化させた時の吸収スペクトルと類似していた。これらのことから、VMA 中のポリフェノールはアンフォールド状態、可溶性のオリゴマー状態、アミロイド線維化した状態の GroES と積極的に相互作用することが証明された。そして、VMA 中のポリフェノールと結合した GroES は可溶性の無毒な凝集体に変化することが示唆された (図 2-6. C, 図 2-7. D, E)。

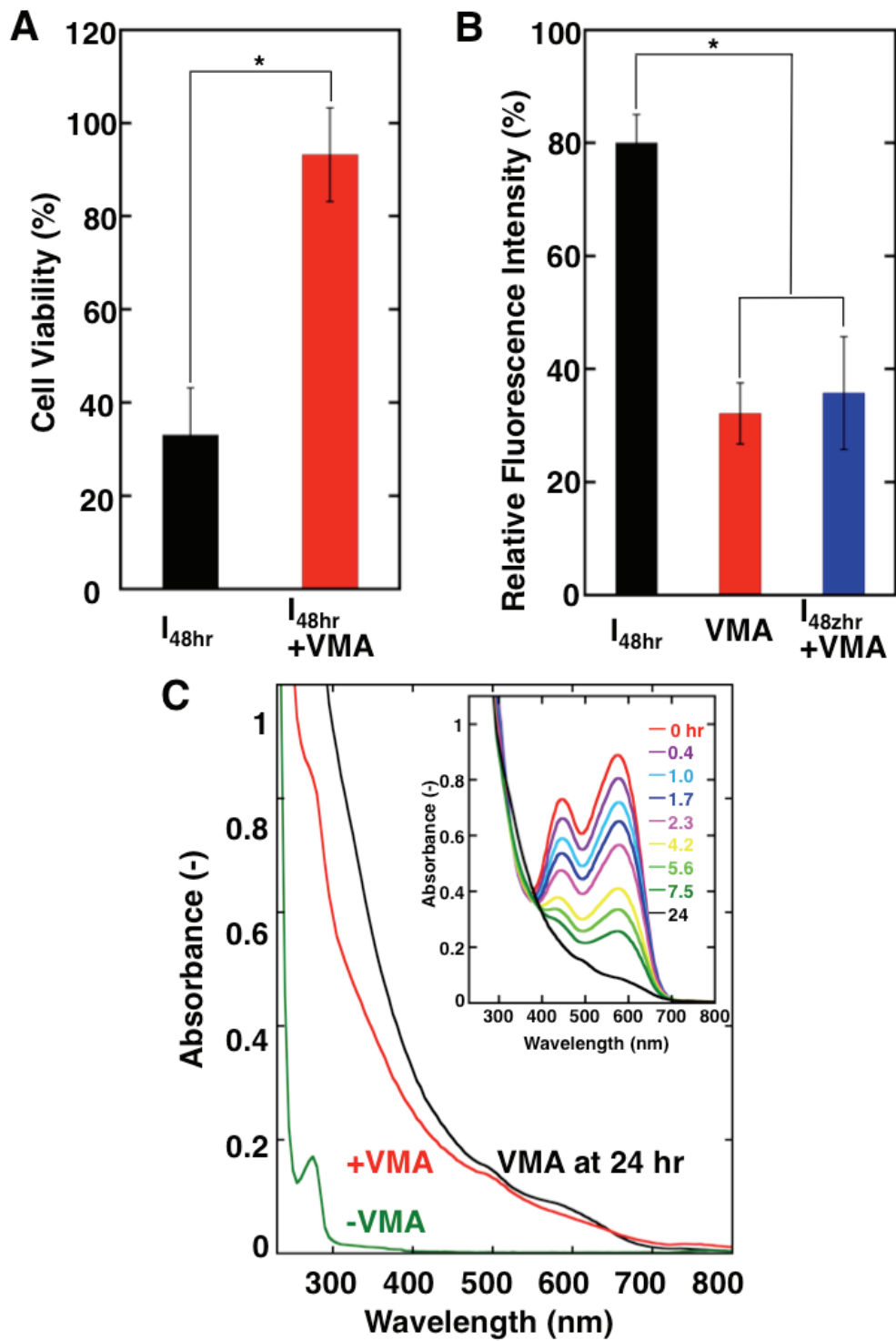


図 2-9. 途中添加した VMA が GroES アミロイド線維形成中間体に与える影響

- A. 48 hr で VMA を添加した時の細胞毒性
- B. 48 hr で VMA を添加した時の細胞膜の状態
- C. VMA と GroES の経時的な相互作用

2-4. 考察

神経変性疾患と天然変性タンパク質や変性状態のタンパク質がアミロイド線維を形成することは密接に関係している。World Alzheimer Report 2015によると、アルツハイマー病を中心とした認知症で2015年にかかったコストは8000億円以上にものぼり(20)。これらの関係性の解明は医療分野のみならず社会の分野にとっても大きな利益になる。本研究において、アミロイド線維形成中間体は成熟したアミロイド線維よりも細胞の損傷において重要な役割があることが分かった。これは牛フォスファチジルイノシトール 3 キナーゼの SH3 ドメイン (PI-SH₃) や *E.coli* HypF タンパク質の N 末端 (HypF-N) といったタンパク質にも共通していた。PI-SH₃ や Hyp-N は GroES のように病原性ではないが神経変性疾患の原因タンパク質が形成するようなアミロイド線維を形成する(46,85)。PI-SH₃ が持つ細胞毒性は速い速度で形成され、4-200 nm の粒子状の凝集体として観察されており、HypF-N の場合は、線維状でも粒子状でもない線維になりきれしていない、プロトフィブリル状の凝集が細胞に対して高い毒性を示す。これらのことから、特定のタンパク質凝集がアミロイド線維化する能力があり細胞に損傷を与えることは共通した現象で、疾患に関係するタンパク質のみがアミロイド線維化する能力があるわけではないことが示唆された(86-90)。これはタンパク質がアミロイド線維化し、毒性のある構造を形成するのはタンパク質自身の一般的な性質であるということが言える(91,92)。

本研究ではマウス培養細胞 Neuro-2a を用いて GroES の凝集体がもたらす細胞毒性を評価した。MTS による細胞毒性評価では GroES がアミロイド線維を形成する途中に存在する分子種 (アミロイド線維形成中間体) が細胞に対して強い毒性を持っていることが証明された (図 2-1. A) が、伸長反応の終了した成熟したアミロイド線維は細胞に対してはあまり毒性がないことが証明された。さらに、成熟したアミロイド線維を超音波により断片化したものも細胞に対して毒性を示すことがなかった (図 2-2. D)。アミロイド線維形成中間体は線維状ではなくアミロイド線維が形成される初期段階の反応により形成されることが分かり(2-3. B, E), DiBAC₄ (3) による膜電位測定実験の結果、GroES アミロイド線維形成中間体は細胞膜上で相互作用し、細胞膜の電位を不安定にすることが分かった。毒性の強い分子種である I_{48hr} は

SDS-PAGE を用いた実験では界面活性剤で溶解する分画ではなく、可溶性の細胞質分画にあることが分かった (data not shown)。I_{48hr} が細胞内に浸透するのは成熟したアミロイド線維にはない細胞膜と非特異的に結合する疎水的な表面によるものであると考えられる。この表面は、アミロイド線維形成の初期段階に存在し、線維が伸長する際に隠れてしまうと考えられる(93,94)。また、十分に成熟したアミロイド線維は実際には定性的に「アミロイド線維はプロテアーゼ耐性を持つ、溶媒がアクセスしにくい線維核と呼ばれる配列領域が存在する」という考えと反対の特徴を持つ(95,96)。これらの結果は様々な凝集を形成するタンパク質が元来持つ構造的な性質を評価することが重要であるということが示唆される。

アミロイド線維形成とそれに伴う毒性を抑制する方法にはアミロイド線維を形成するタンパク質と直接相互作用する低分子化合物の使用が挙げられる(97)。ビルベリーに豊富に含まれるポリフェノールは、緑茶由来のエピガロカテキン 3-ガレート (EGCG) と類似した構造を持っている(80)。EGCG は α -Syn, A β , ハンチンチンといった天然変性タンパク質やモデルペプチドである κ -カゼインのアミロイド線維形成を抑制する働きを持つことが知られている(98-100)。本研究では VMA とそれに含まれる 2 種類のアントシアニンとアントシアニンを用いてアミロイド線維形成実験を行った。アントシアニンは GroES アミロイド線維の形成を強く抑制し、アントシアニンでも同様の結果を得ることができることから、GroES アミロイド線維形成の抑制に重要なのはアントシアニン骨格であることを示唆している。吸光度測定実験より、VMA は GroES と強固に結合していることが明らかとなっているが、¹H-¹⁵N HSQC NMR を用いた実験においては信頼のあるデータを取得することができなかった。原因として考えられるのは、GroES のアミロイド線維形成に用いられる buffer 中の Gdn-HCl が考えられる。Gdn-HCl は強力なカオトロピック剤として働くため、GroES と VMA の相互作用を比較する NMR 測定の時間スケールにおいて支配的になってしまうためである。

VMA が GroES アミロイド線維を分解する効果があることは最も驚くべきことである。現在、当研究室で確認されているのは GroES アミロイド線維においてだけであるが、他のタンパク質が形成するアミロイド線維に関しても VMA は抑制能を持つため、分解能も同様に考えられる。途中で添加した VMA も GroES アミロイド線維形成中間体 I_{48hr} がもたらす毒性を無効化したことがわかった。毒性の無効化は VMA が I_{48hr} を分解するためであると考えられる。VMA に含

まれるポリフェノールが GroES に結合することはわかったが、詳細な機構は未だ不明である。しかし、低分子化合物によるアミロイド線維の不安定化が起こることの報告がある(84)。不安定化したアミロイド線維はポリフェノール類との相互作用を受けやすくなり、その結果としてアミロイド線維の規則正しい β シート構造が壊れてしまうことが考えられる。

VMA 存在下で形成されたポリフェノールは可溶性で細胞に対しての毒性はない。カテキンやエピカテキンをラットに経口投与すると血漿に変質せず存在し、O-メチル化や 5-O- β -グリコシド結合した状態の代謝産物としても存在することが報告されている(101)。加えて、エピカテキングルクロナイドと 3-O-メチルエピカテキングルクロナイドは経口摂取した後のラットの脳組織から検出された(102)。アントシアニンはラットとヒトではグリコシドとして素早く吸収され、経口投与後は変質せずにグリコシドの状態で血漿中に存在する(103-107)。これらの実験は、アントシアニンがラットにおいて 15 日間アントシアニンを含む食事をさせると血液脳関門を通過することを示しており(108)、この現象は 1 回ラットに経口投与することでも示されている(109)。Del 3-glc と Cya 3-gal はヒトの強化級羽州モデルである豚の脳内でも観察されており(110)、これはアントシアニンが直接脳に影響を与えることを表している(111)。これらの結果はアントシアニンが様々な神経変性疾患の患部に浸透する力があり、神経変性疾患に関係がある天然変性タンパク質でのポリフェノールの作用を利用した治療が実現可能であることを示している。これと関連して、パーキンソン病に関連する天然変性タンパク質である α -Syn についての研究は前進したと言える。

本研究ではコシャペロニンである GroES がアミロイド線維を形成するときに存在する凝集体は神経細胞に対して毒性を持ち、VMA に含まれるポリフェノールは毒性のある GroES アミロイド線維の形成を抑制し、同時に毒性分子種の毒性を抑制するだけでなく、毒性を持った分子種に添加することでその分子を分解して毒性をなくし、成熟した線維についてもそれらを分解する能力があることを証明した。アミロイド線維が形成される際に存在する分子種は細胞内の疾患進行に関係があるか不明瞭な少量のタンパク質を凝集させて細胞機能に損傷を与える可能性がある。本研究の結果はビルベリーに含まれるポリフェノールは様々な神経変性疾患に関わるタンパク質のアミロイド繊維化を制御することが示され、これらの疾患の治療薬となる

可能性を示唆している。低分子化合物とアミロイド線維になりうるタンパク質の特別な領域で起こる分子の相互作用を理解することはアミロイド線維形成の普遍的な機構へのさらなる理解につながる。非病原性と病原性の両方のタンパク質においてアミロイド線維形成と初期の段階で存在する毒性中間体の関係を明らかにすることはアミロイド線維の形成を制御することと同様に神経変性疾患の予防と治療に極めて重要である。

第3章 α シヌクレインのアミロイド線維形成とその過程で見られる細胞毒性

3-1. 緒言

第2章では非病原性タンパク質 GroES が形成するアミロイド線維とその毒性について議論した。その中で、GroES はアミロイド線維形成中間体に特に毒性があることがわかった。次に、GroES とは全く異なった性質を持つタンパク質のアミロイド線維形成について議論する。

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで患者数の多い神経変性疾患である。その原因タンパク質と考えられているのが α -Syn である。家族性のパーキンソン病患者には A53T, A30P 等のアミノ酸配列に変異がある α -Syn の存在が知られている。 α -Syn 脳内に局在している高次の立体構造を持たない天然変性タンパク質である。また、どのような機能があるかがいまだによくわかっていないが、近年の研究で脂質との相互作用が示唆されている。2006 年、Masuda らが α -Syn を大腸菌内で発現させると一定の確率で 136 番目のアミノ酸である Trp が Cys に置き換わることが報告されている。

第3章はまずこの問題を解決するために点変異導入により 136 番目のアミノ酸をコードする塩基に変異を加えた。また、変異を加える前と後の 2 種類タンパク質の質量分析を行い変異を加えたものが単一の分子量であるかを確認した。次に 2 種類の α -Syn を用いてアミロイド線維形成実験を行い、同時に細胞に対する毒性も評価することで、少量の α -SynY136C がアミロイド線維形成と細胞毒性への影響を精査した。また、毒性のある分子種を TEM により観察することで構造的特性を調査した。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 培養と精製

[1] BLR (DE3) / pET SNCA の形質転換

1. BLR (DE3) コンピテントセル 200 mL に, pET SNCA プラスミドを 100 ng 加えて氷中で 30 min インキュベートした。
2. 42°C, 45 sec Heat Shock をした後に氷中で 2 min インキュベートした。
3. SOC 培地を 800 mL , BLR(DE3)/pET SNCA を 200 mL を 15 mL コーニング管に移して振とう機で 1 hr 振とう培養した。
4. LB 寒天培地に BLR(DE3)/pET SNCA の培養液を 100 mL, 200 mL 塗布した。
5. 37°Cの EYELA SOFT INCUBATEOR SLI-450N で 10 hr 静地培養した。

SOC 培地

2% (w/v) Bacto TryPtone
0.5% (w/v) Bacto Yeast Extract
10 mM NaCl
2.5 mM MgCl

LB/Amp 培地

1% (w/v) Bacto Tryptone
0.5% (w/v) Bacto Yeast Extract
1% (w/v) NaCl
1.5% (w/v) Agar (寒天培地)
50 µg/mL Ampicillin

[2] BLR (DE3) / pETSNA の培養

1. 37°Cで 10 hr 培養した寒天培地の BLR (DE3) /pET SNCA のコロニーを無作為に滅菌した爪楊枝でつついた。
2. 爪楊枝を試験管の壁に当たらないように液体培地に入れて, 37°Cで OD₆₀₀=0.6 程度になるまで振とう培養した。
4. 1 L のバツフル付きフラスコに LB 液体培地を 300 mL 入れてアンピシリンを培地の体積の 1/1000 量になるように入れた。
5. プレ培養で培養した菌体を培地の体積の 1/1000 量加え, innova 4430 で 37°C,

120 rpm で 16 hr 振とう培養した。

6. KUBOTA 6500 centrifuge と AG-5006 ローターを用いて 8000 rpm, 4°C, 20 min で集菌した (5.1 g) した。

[3] α -Syn の精製

1. 5.1 g の集菌した菌体 BLR(DE3)/pET SNCA を 10 倍量の菌体破碎 buffer に懸濁した後に、塩化リゾチームを 1/1000 倍量加えて菌体懸濁液に粘性がでるまで攪拌した。

菌体破碎 buffer	除核酸 buffer
50 mM Tris-HCl pH7.5	50 mM Tris-HCl pH7.5
1 mM EDTA	1 mM EDTA
0.1 mM DTT	0.1 mM DTT
0.1 mMPMSF	0.1 mMPMSF
	5% (w/v) Streptomycin Sulfate

2. 氷中で Sonics Vibra Cell Processor VCX-130 を用いて超音波破碎を以下の三回に分けて行った。
 - 1 回目 : Amplitude 60, Timer 10, Pulser 1
 - 2 回目 : Amplitude 50, Timer 10, Pulser 1
 - 3 回目 : Amplitude 40, Timer 10, Pulser 1
3. KUBOTA 6500 Centrifuge と AG-508CA ローターを用いて 10000 rpm, 4°C, 20 min で遠心分離した。
4. 遠心分離した上清を等量の除核酸 buffer を徐々に加えていった (終濃度 2.5%)。その後 30 min 攪拌し, KUBOTA 6500 Centrifuge と AG-508CA ローターを用いて 10000 rpm, 4°C, 20 min 遠心分離した。
5. 上清を三角フラスコに入れて 100°C の熱水につけ, フラスコ内の溶液の温度が 80°C

になってから、80℃から 85℃の間になるように、15 min 熱処理を行った。その後、4℃に冷ました。

6. KUBOTA 6500 Centrifuge と AG-508CA ローターを用いて 1400 rpm, 4℃, 30 min 遠心分離した。
7. 上清を 0.22 mm の滅菌フィルターでろ過してメスシリンダーで量り (96 mL), その体積 (L) の 472 倍量の硫酸アンモニウム (45.3 g) を、ゆっくりと加えた。硫酸アンモニウムを入れ終わったら、30 min 攪拌して KUBOTA 6500 Centrifuge と AG-508CA ローターを用いて 10000 rpm, 4℃, 30 min 遠心分離した。
8. 沈殿を低温室で4℃にしていた透析用 buffer 30 mL にとかして、透析を 2 hr 透析用 buffer 2 L で行って、その後 over night で透析を行った。

透析 buffer 50 mM Tris-HCl pH7.5 0.1 mM DTT

9. 透析した溶液を KUBOTA 6200 と AG-508CA ローターを用いて 10000 rpm, 4℃, 20 min で遠心分離し、上清を 0.22mm のフィルターでろ過した。
10. フィルター滅菌した上清を AKTA FPLC System により、陰イオンクロマトグラフィーカラム (Resource Q) を用いて、Gradient を 0-1 M NaCl に変化させて溶出させた。

AKTA 用塩なし buffer 50 mM Tris-HCl pH7.5 1 mM DTT
--

AKTA 用塩あり buffer 50 mM Tris-HCl pH7.5 1 mM DTT 1 M NaCl
--

11. ピークが出た部分を SDS-PAGE にアプライして、aSyn のバンドだけが確認されるフラクションを回収し、凍結乾燥用 buffer-1 に 2 hr 透析し、その後凍結乾燥用 buffer-2 で over night 透析した。

凍結乾燥用透析 buffer-1

5 mM NH₄HCO₃

凍結乾燥用透析 buffer-2

1 mM NH₄CO₃

12. 溶液を回収して, KUBOTA 6200 と AG-508CA ローターを用いて
10000 rpm, 4°C, 20min 遠心分離して,
その上清を凍結乾燥させた。凍結乾燥したサンプルは 4°C で保存した。

3-2-3. α -SynY136TAT 変異体プラスミドの作成

作成したプライマー

sense 鎖 : TATCAAGACTATGAACCTGAAGCCTA

anti-sense 鎖 : AGGTTTCATAGTCTTGATACCCTTCCTCA

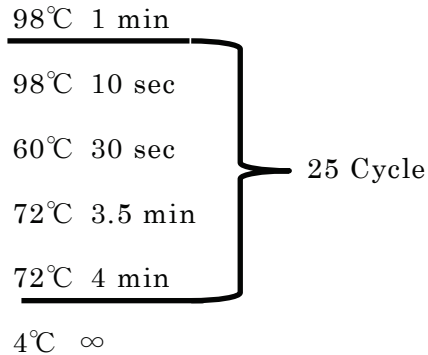
1. 粉末のプライマーに 100 mM になるように TE buffer を添加した。

2. 以下の組成と反応サイクルで PCR した。

反応組成

Milli-Q 水	: 37.55 mL
10X Pyrobest buffer	: 5 mL
dNTP mix	: 4 mL
鋳型プラスミド (pEt SNCA 25 ng 分)	: 0.7 mL
プライマー (+)	: 1.25 mL
プライマー (-)	: 1.25 mL
Pyrobest DNA Polymerase	: 0.25 mL
<hr/>	
	計 50 mL

PCR 組成



3. PCR 後，氷中で PCR 産物と同じ量の滅菌 Milli-Q 水を加えた (50 mL)。
4. PCR 産物と滅菌 Milli-Q 水との混合物と等量のフェノールクロロホルムを加え (100 mL)，数回ボルテックスをした。
5. 15000 rpm, 5 min, Room Temperature で遠心分離した後，下層のフェノールクロロホルムと中心の層のタンパク質を取らないように上部の水層を 90 mL 取った。
6. 取った溶液の 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (9 mL) を添加し，さらにその 2.5 倍の 90%エタノール (247.5 mL) を加えた。
7. -85°Cで 15min インキュベートした後，15000 rpm, 15 min, 4°Cで遠心分離した後，上清を取り除いた。
8. 上清と等量の 70%エタノール (346.5 mL) を加え，15000 rpm, 10 min, 4°C遠心分離して上清を完全に取り除いた。
9. 上清を取り除いた後完全に沈殿が乾くまで室温で放置した。
10. 完全に乾かした沈殿に 44.5 mL の滅菌 Milli-Q 水を加え，氷中に移した。
11. 以下の組成で 2 hr, 37°C, で *Dpn1* 処理を行った。

PCR 産物	44.5 mL
10xT buffer	5 mL
<i>Dpn</i> I	0.5 μL
計	50 mL

12. 残ったサンプルは再度フェノールクロロホルム処理，エタノール沈殿，*Dpn* I 処理を行った。
13. 2 回目の *Dpn* I 処理を施した後の PCR 産物を再々度フェノールクロロホルム処理，エタノール沈殿をし，風乾した PCR 産物を 13 mL の滅菌 Milli-Q 水に溶かした。溶かした PCR 産物を Nano-Vue で濃度を決定した。30 ng/mL だった。そのうちの 1 mL を 1%アガロース S で電気泳動した。
14. これをプラスミドとして XL1-Blue に形質転換し，生えたコロニーを 10 個シングルコロニー植菌して OD₆₀₀ が 1.0 以上になった時に菌体をプラスミド単離した。
15. このプラスミドが目的のプラスミドであるか確認するために Nano-Vue で濃度を測定した後に *Eco*RI より 2 hr, 37°C で制限酵素処理後 1%アガロース S で電気泳動した。

制限酵素処理の組成

Milli-Q 水	6.83 μ L
10XT buffer	1 μ L
プラスミド (50 ng)	1.67 μ L
<i>Eco</i> RI	0.5 μ L

計 10 μ L

16. このうち濃度の高いもの (①, ③, ④, ⑤, ⑦, ⑧, ⑨) をシーケンスに出すために PCR した。
17. PCR 産物に 30 mL 滅菌 Milli-Q 水を添加した後，60 mL のイソプロパノールを添加し，軽くボルテックスした。
18. 15 min, Room Temperature で遮光してインキュベートし，15000 rpm, 20 min, Room Temperature で遠心分離した後，上清を取り除いた。
19. 取り除いた上清と同量の 70%エタノール (100 mL) を加えて 15000 rpm, 15 min, Room Temperature で遠心分離した後に上清を取り除き，沈殿が完全に乾くまで

遮光して Room Temperature で放置した。

20. 完全に乾いたら、-85°Cで保存した。

21. 解析に出す直前に 25 mL Milli-Q 水に溶かしてボルテックスし、スピンドウンしたものを遮光し解析に出した。

3-2-3. α -Syn の CyS 定量

1. α -SnY136TAC と Y136TAT の凍結乾燥物を適量測り取り、1 mL の 50 mM リン酸 buffer pH7.5 に溶解させた。
2. KUBOTA 3780 centrifuge と AF-2724A を用いて 14000 rpm, 4°C, 5 min で遠心分離を行い、上清を回収した。
3. 3 mL で 0.9 mg/mL の α -Syn が含まれるように 50 mM リン酸 buffer pH7.5 で体積を調製した。
4. さらに 2 mL リン酸 buffer pH7.5 と 5 mL の Milli-Q 水で総体積を 10 mL になるように調製した (各 α -シヌクレインの濃度は 18.6 mM)。
5. 66 mL の DTNB buffer を α -シヌクレインが含まれる buffer に添加した。
6. 遮光して 2 hr 常温でインキュベートした。
7. JASCO V-630 Bio Spectrophotometer で以下の条件で測定した。

表 3-1.Cys 定量の条件

測定波長	検出モード	繰り返し回数 (times)	繰り返し間隔 (sec)
412 nm	Absorbance	3	0

3-2-4. α -Syn アミロイド線維形成中間体, 成熟線維が持つ細胞に対する毒性の評価

アミロイド線維形成は総体積 2 mL で行った。

PBS buffer
137 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM Na ₂ HPO ₄
1.8 mM KH ₂ PO ₄

1. α -SynWT 凍結乾燥物を適量測り取り, アミロイド線維形成 buffer 1 mL で溶解させ, KUBOTA 3780 centrifuge と AF-2724A を用いて 14000 rpm, 4°C, 5 min で遠心分離を行い, 上清を回収した。
2. 上清を一部採取して, 280 nm の Trp 吸光度 ($\epsilon = 0.354$) でタンパク質の濃度を HITACHI U-2900 Spectrophotometer を用いて測定した。
4. α -Syn 濃度が 1 mg/mL (69.2 μ M) になるようアミロイド線維形成溶液を試験管に調製し, 37°C, 160 min で振とうしてアミロイド線維形成を行った。
5. Thio-T buffer を 2 mL フラクシオンに採取した。
6. Thio-T buffer 中のサンプルの終濃度が 0.0075 mg/mL になるように振とうしているサンプルの一部を各々の時間に採取し添加した。その後, 30 sec ボルテックスして遮光した。
7. F-4500 Fluorescence Spectrophotometer で表 3-2. の条件で蛍光強度を測定した。
8. 振とうしているサンプル 180 μ L 採取して, 表 3-3. のように細胞に添加した。
9. 37°C, 5%CO₂ の条件下で 24 hr インキュベートした。
10. 各 well に 1/5 量 (v/v) の MTS を細胞に添加して 2 hr 培養した。
11. 10% SDS (w/v) 溶液を 1/4 量 (v/v) 添加して MTS の反応を停止させ, 測定用 48 well プレート細胞に添加した MTS 溶液を移した。
12. Molecular Devices SpectraMax M2 プレートのリーダーで 490 nm の吸光度を測定

した。

13. 細胞毒性評価用 buffer を添加した well の溶液の吸光度を生存率 100%, 1 mM Melittin を添加した well の溶液の吸光度を生存率 0%とし、各々の時間にサンプルを添加した well の溶液の吸光度からその時間の細胞生存率を算出した。

表 3-5. Thioflavin-T 蛍光測定 の条件

S/測定条件設定	I/光度計条件
データモード: 蛍光	励起側スリット: 5 nm
時間単位: sec	蛍光側スリット: 5 nm
励起波長: 440 nm	ホルトマン電圧 (V) : 700
蛍光波長: 480 nm	レスポンス (sec) : 0.1
初期待ち時間: 0	シャッター制御: ON

表 3-6. MTS Assay のサンプルの添加量

サンプル	添加量
50 mM Sodium Phosphate buffer	50 mL
1 mM Melittin	5 mL
アミロイド線維懸濁液	50 mL

3-2-5. TEM を用いたアミロイド線維の観察

1. 各時間のアミロイド線維形成溶液またはアミロイド線維懸濁液を一部採取し、MQ 水で 10 倍希釈した。
2. 日新 EM コロジオン膜貼付メッシュ (400 メッシュ) に希釈したサンプルを 10 μ L 滴下して 1 min 室温でインキュベートした。
3. ろ紙等で膜上の水分を除去し、5 μ L の MQ を用いて洗浄を行った。
4. 2%ウラニル酢酸 5 μ L を滴下して室温で 30 sec インキュベートした後、ろ紙を用い

て余分な 2%ウラニル酢酸を除去した。

5. 室温でサンプルを滴下した面が乾燥するまで静置した。

6. JEOL-100CX にサンプルマウント後、観察を行った。

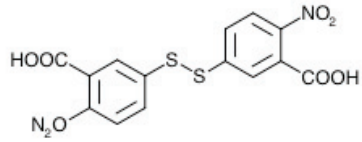
3-2. 結果

3-2-1. α -Syn の Cys 定量

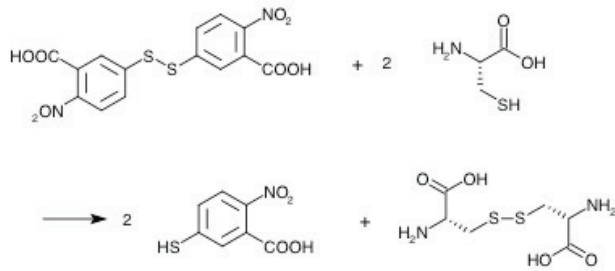
本研究室では α -Synを組み替え大腸菌 *E. coli*に大量発現させることで得ている。Masudaらは *E. coli*が α -Synの136番目のTyrを翻訳するときまれにCysに読み違えてしまうことがあることを報告した(112)。今回、この読み違いが本研究室で用いている α -Synにも当てはまるのかを調査した。

Cysを定量する手法として、DTNBによる比色検定を行った(図3-1. A)。この方法はDTNBがタンパク質や化学物質にSH基が存在するとDTNB内のS-S結合が開裂し、412 nmの吸収を持つ安定なチオールである2-メルカプト2-2-ニトロ安息香酸が生成されることを利用した方法である(図3-1. B)(113)。図3-1. Cより、 α -SynY136TATに比べて α -SynY136TACは412 nmの吸光度が高く、 α -SynY136-TACがCys残基を持っている α -Syn(α SynY136C)と持っていない α -Synが存在していることを示唆していた。Cys残基が存在する割合は1MのSH基が存在するときに光路長10 mmにおいて412 nmの吸光度 ϵ は 1.55×10^4 であることから算出できる。この場合、 $\epsilon=0.084$ だったので5.4 μ M存在しており、測定したタンパク質溶液の濃度は18.7 μ Mであるので29%がCysを持つ α -Synということになる。

A



B



C

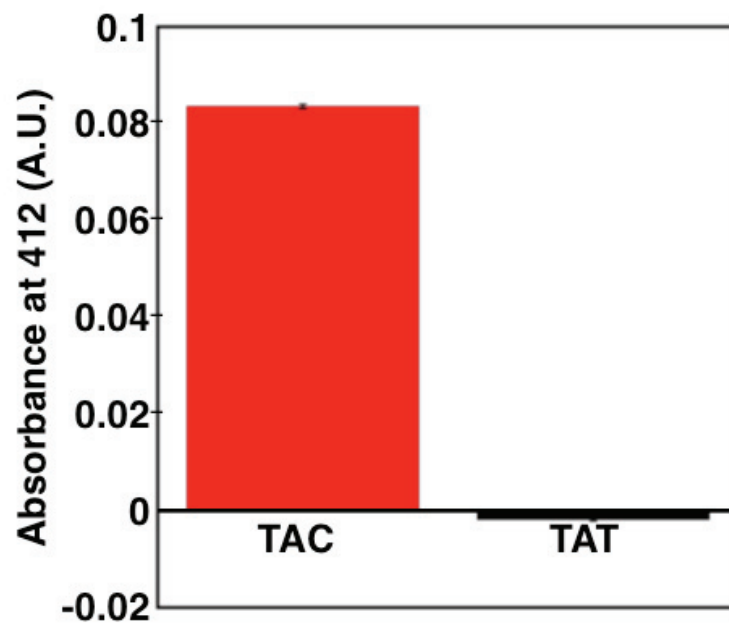


図 3-1. α -Syn の DTNB を用いた比色検定

A. DTNB の構造式

B. DTNB が Cys と反応してチオールを生成するときの予想される化学反応

C. DTNB を用いた 412 nm の比色検定

精製過程において α -SynY136TAC の存在は陰イオン交換クロマトグラフィーにおいても確認することができた (図 3-2)。 α -SynTAC, α -SynTAT の 2 つのクロマトグラムはいずれも 40 mL 付近から 280 nm の吸光度が上昇し始めた。TAT の場合は 38 mL 付近から吸光度が上昇して 41 mL 付近から緩やかに吸光度が低下した。一方で TAC は 41 mL 後半から一度緩やかに吸光度が低下したが, 43 mL 後半から再び上昇に転じて 45 mL 付近でまた緩やかに吸光度が低下した。これらのクロマトグラムの結果を重ね合わせると 38-41 mL のピークが α -SynY136TAT で 43-45 mL 付近のピークが α -SynY136TAC であると考えられた。

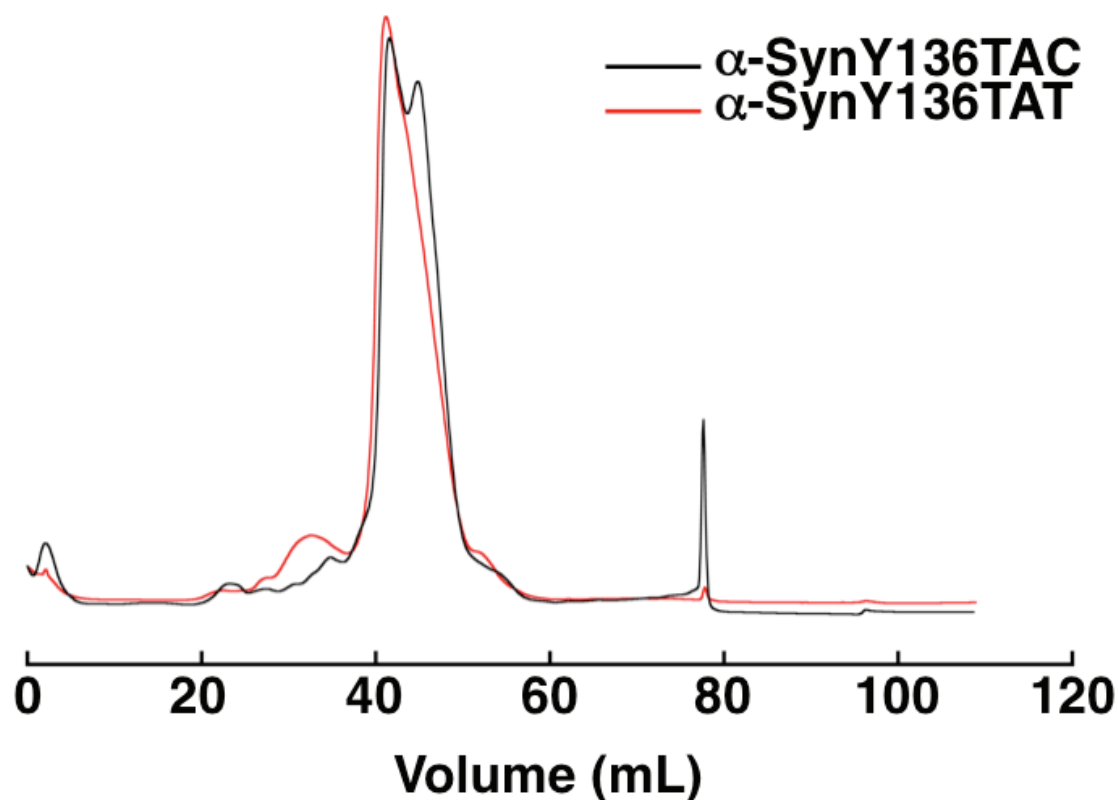


図 3-2. α -SynY136-TAC と Y136-TAT の陰イオン交換クロマトグラフィー

α -SynY136TAC と α -SynY136TAT の陰イオン交換クロマトグラムの重ね合わせ

しかし、この2種類のタンパク質の分子量の差異を15%SDS-PAGEにおいて確認することはできなかつた。これは精製しているいずれの時期でも確認できなかつた（図3-3）。その原因として考えられるのは2つの α -Synの分子量差が非常に小さいことが挙げられる。 α -Syn136Cは分子量が14339であり、 α -Syn136Yは分子量が14459である。

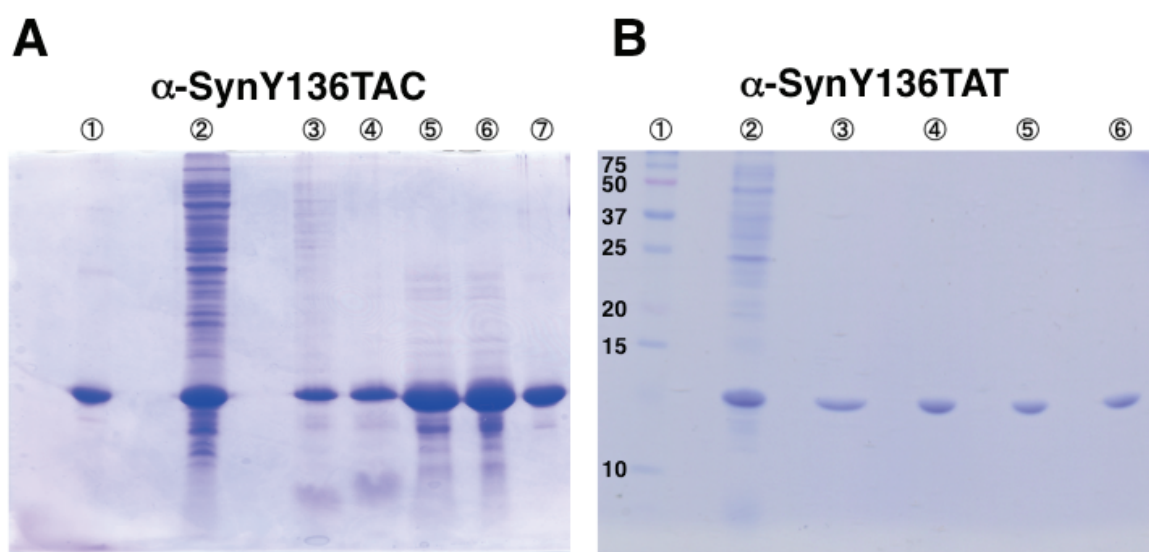


図 3-3. α -SynY136TATと α -SynY136TATの15%SDS-PAGE

A. α -SynY136TACの15%SDS-PAGE

- ① α -Syn マーカー ②菌体破碎後 ③除核酸後 ④熱処理後
- ⑤硫酸沈殿後透析溶液 ⑥陰イオンクロマトグラフィー後 ⑥凍結乾燥前

B. α -SynY136TATの15%SDS-PAGE

- ①分子量マーカー (kDa) ②菌体破碎後 ③熱処理後
- ④陰イオン交換クロマトグラフィー後 ⑤ゲルろ過クロマトグラフィー後
- ⑥ α -Syn マーカー

この差異を検出できる手法として質量分析を用いた。質量分析の結果、 α -SynY136TAC は左側に肩を持つピークが検出された (図 3-4. A)。一方、 α -SynY136TAT はほぼ左右対称なピークが検出された。両者を重ね合わせると、 α -SynY136TAC の右側が α -SynY136TAT と考えられた (図 3-5. C)。2 種類の α -Syn の分離は陰イオン交換クロマトグラフィーでは困難である。しかし、136 番目の Tyr をコードするコドンが TAT である α -Syn プラスミドベクターを用いた場合、既存の精製方法で純度の高い α -Syn を得ることができると分かった (図 3-3)。

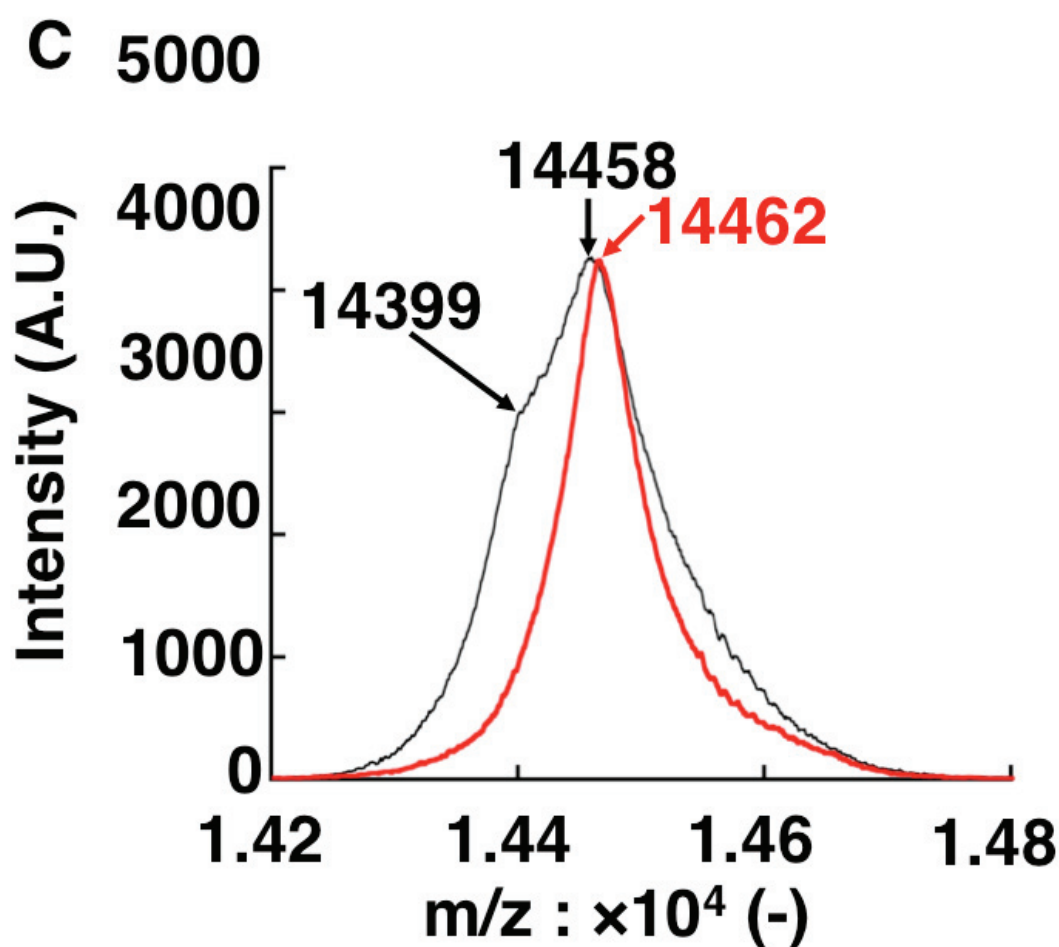


図 3-4. 2 種類の α -Syn の MS

A. α -SynY136TAC と α -SynY136TAT の MS の重ね合わせ

黒線 : α -SynY136TA 赤線 : α -SynY136TAT

矢印 : 各々で検出されたピーク位置

3-2-3. α -Syn アミロイド線維形成中間体, 成熟線維が持つ細胞に対する

毒性評価

これまで, α -Syn のアミロイド線維形成は 25 mM Tris-HCl が含まれる緩衝液でおこなってきた。Tris を含む緩衝液はこれまで多くの生化学的な実験にグッドバッファーとして用いられてきた。しかし, Tris を含む緩衝液では細胞に対して毒性を持つことが知られている。そのため, Tris-HCl を細胞に対する毒性の評価に用いることができない。したがって, 生理的な条件に近い PBS buffer でアミロイド線維形成を行い, 同時に細胞に対する毒性評価も行った。その結果, PBS buffer で形成される α -Syn アミロイド線維は図 3-5. A で見られるようなシグモイド型の線維形成をすることが分かった。さらに, 同時に行った毒性実験でも, α -Syn はマウス神経芽腫細胞 Neuro-2a への毒性を示した。最も毒性の強かった分子種は, Thio-T の蛍光強度が急激に上昇する前の 36 hr であった。この現象は GroES に於いても確認できたことから, 中間体の構造になんらかの共通点があるのではないかと示唆できた。

GroES との構造の共通性を観察するため, TEM を用いて各時間帯の α -Syn アミロイド線維形成中間体と成熟した線維を観察した (図 3-5. B)。その結果, 36-44 hr の α -Syn アミロイド線維形成中間体では 50-200nm のアモルファス状の構造物が観察できた。これは GroES でも観察された。しかしながら, TEM の特性上内面の構造観察することができなかった。また, PBSbuffer を用いた細胞毒性実験は α -SynY136TAC で行った。前述の通り, α -SynY136TAC には約 29%の α -SynY136C が含まれており完全な α -SynWT ではなかった。したがって, α -SynY136TAT を用いたアミロイド線維形成実験を行った。図 3-6. A より, α -SynY136TAT はアミロイド線維を形成しタイムスケールもほぼ α -SynY136TAC と差異はなかった。

さらに, α -SynY136TAT の細胞に対する毒性を評価した。その結果, α -SynY136TAT は α -SynY136TAC 同様細胞に対する毒性があることが分かった (図 3-6. B)。

毒性評価の時, アミロイド線維形成の時間が非常に遅延しているのは, 形成時に用いた緩衝液を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液に変更したことによる影響が示唆された。大幅に遅れたアミロイド線維形成であるが, 細胞に対する毒性を最も強く示す分子種があると考えられる時間帯は Thio-T の蛍光強度が上昇する前の時間帯であった。

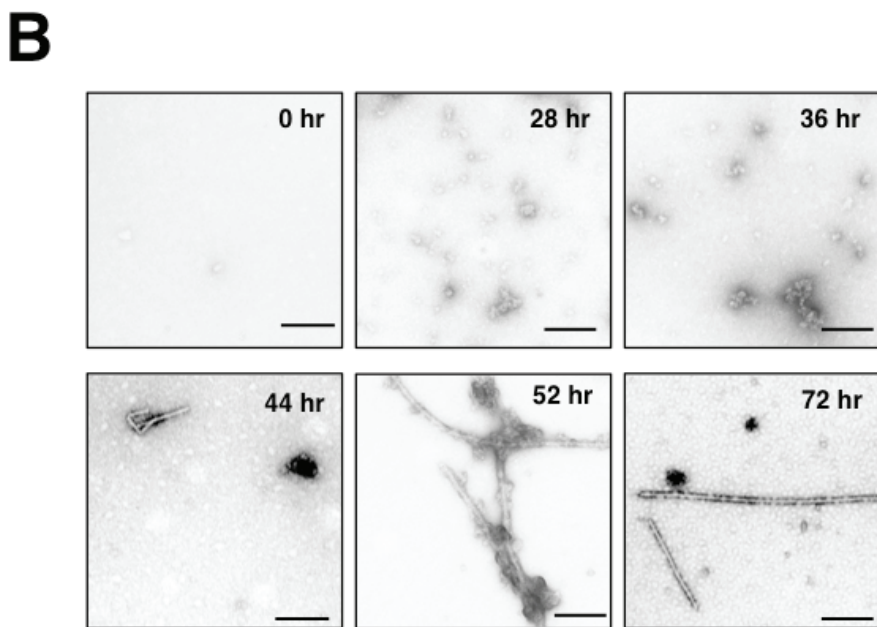
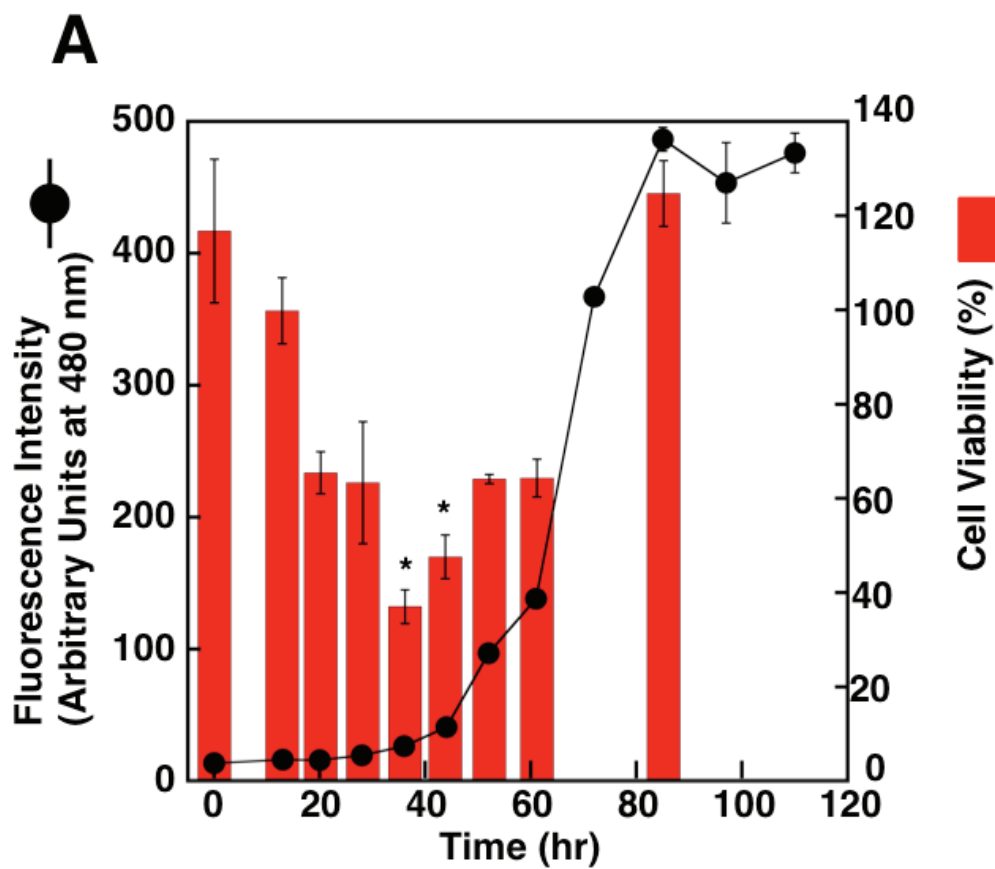


図 3-5. α -Syn が線維形成することでマウス培養細胞 Neuro-2a に与える毒性

A. α -SynY136TAC による細胞毒性実験

B. TEM による α -Syn の観察, スケールバーは 200 nm

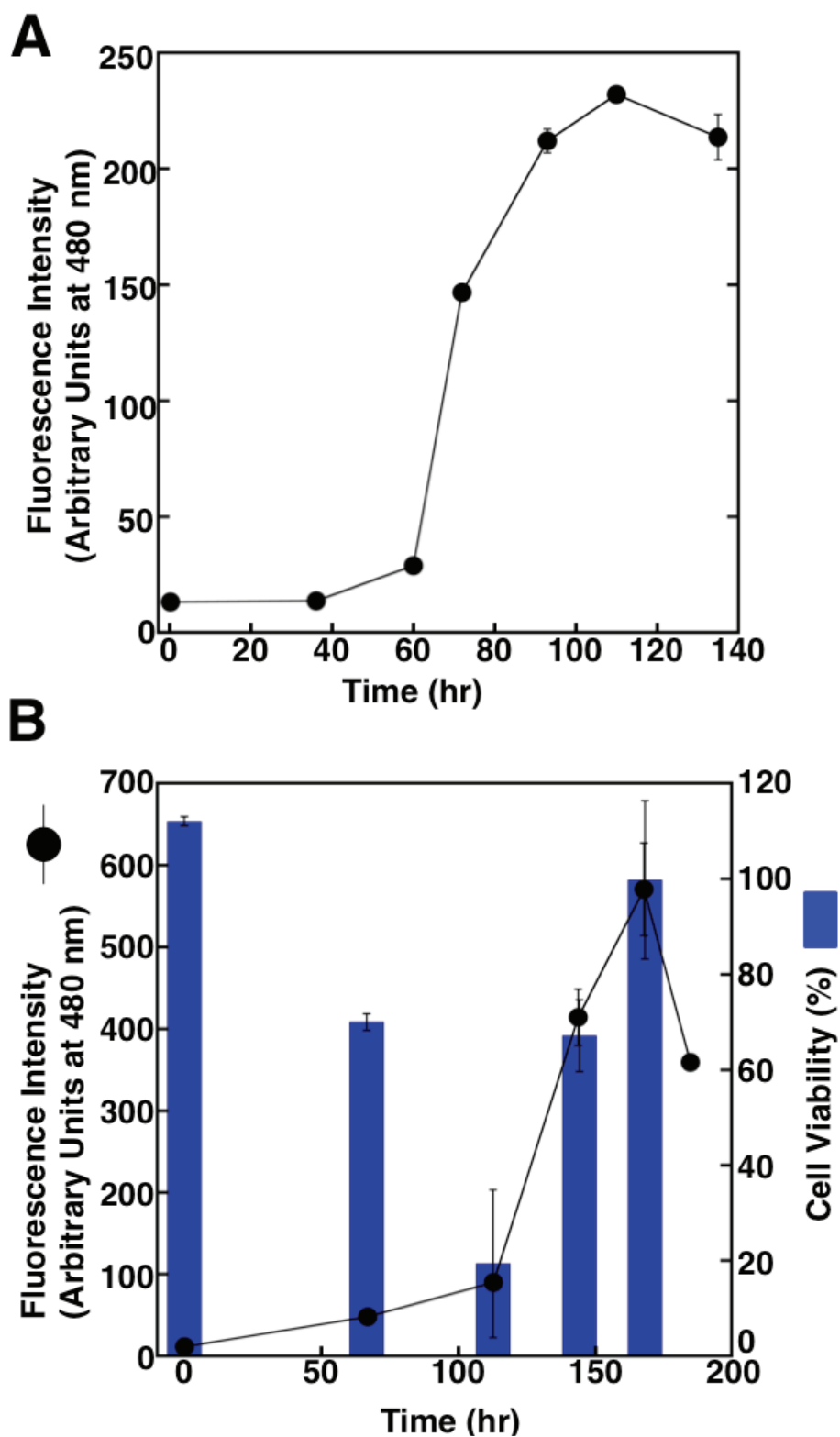


図 3-6. α -SynY136TAT のアミロイド線維形成とその毒性

A. α -SynY136TAT によるアミロイド線維形成

B. α -SynY136TAT による細胞毒性実験

3-4. 考察

ヒトと大腸菌は異なる種であるが、アミノ酸をコードしているコドンは共通である。また、アミノ酸をコードしているコドンは TAT と TAC が同じアミノ酸 Tyr であるように、一つのアミノ酸に対して複数のコドンが用意されている。しかしながら、ヒトと大腸菌は同一のコドンの使用頻度が異なっている。大腸菌は 1000 個の Tyr をコードしているコドンのうち TAT は 16.8 個なのに対し、ヒトでは TAT は 12.2 個である。また TAC は 1000 個中大腸菌では 14.6 個、ヒトでは 15.3 個である。Masuda らによれば、ヒト由来の α -Syn をそのまま大腸菌にクローニングし、大量発現させると一定の確率で TAC が Cys に読み間違えが起こる(112)。これを受けて、Cys が混ざった α -Syn を取り除く変異体を行い不純物のない α -Syn をてにいれることに成功した。 α -SynY136TAT と α -SynY136TAC は線維形成に与える影響は小さいとの報告がある(112)。しかし、井澤らは 119-140 番目のアミノ酸の電荷がない α -Syn の 136 番目の Tyr を Ala に置換するとアミロイド線維が形成されないことを報告した(79)。さらに、pH3.0 にした時に C 末端は、フレキシビリティは制限されると同時に NAC 領域との相互作用が増加することが分かっている(49)。pH3.0 の C 末端と 119-140 番目のアミノ酸の電荷がない時の C 末端は電荷的に同じであり、NAC 領域は α -Syn のアミロイド線維形成に重要である(96)。ことから α -Syn の 136 番目の Tyr は、アミロイド線維形成時に核となった NAC 領域が C 末端と相互作用する時に大きな役割、例えば NAC 領域にある芳香族アミノ酸とのスタッキング等を担っていることが示唆された(114)。

α -Syn は GroES と同様にマウス神経芽腫 Neuro-2a に毒性を示した。最も毒性の強い分子種も Thio-T の蛍光強度が上昇し始める前で共通していた。パーキンソン病患者の脳内に存在する Lewy 小体からは α -Syn 成熟したアミロイド線維だけでなく、断片化した α -Syn アミロイド線維も見つかっている(115)。これらのことから、断片化した α -Syn アミロイド線維毒性を持つか、また全長の α -Syn 同様にアミロイド線維形成中間体に毒性を持つことが示唆される。*in vitro* の実験においても、アミロイド線維形成中間体がどのように細胞に対して毒性を示すかはまだ明らかではないが、エネルギー的に不安定であることも一つとして考えられる(64)。

α -Syn は脂質膜とよく相互作用することが知られており、不安定化した α -Syn が細胞膜に結

合することで膜の恒常性が失われることから細胞死を誘発することが考えられる(116)。

in vitro の実験より, α -Syn アミロイド線維形成中間体が最も強い毒性を持つことから, パーキンソン病患者の脳内に見られる沈着物はすでに毒性を失っていることが示唆される。高分子量の毒性のある $A\beta$ がアルツハイマー病患者の脳内から発見されているが, 特殊な例であると考えられ(117), 毒性のある段階 α -Syn の検出法は, パーキンソン病のはじめとした神経変性疾患の治療に役立つことが考えられる。

パーキンソン病との関連が指摘されているタンパク質で, 決まった構造を形成しない α -Syn は今回の実験ではアミロイド線維を形成する過程の中間体が細胞に対して強い毒性を持つ。さらに, 非病原性の分子シャペロンであり, 高次の立体構造を形成する GroES も今回の実験で行われたような特殊な条件下ではアミロイド線維を形成する過程の中間体が細胞に対して強い毒性を持つ。つまり, これらの 2 つの全く異なる性質のタンパク質がアミロイド線維を形成する際, 核形成後期から初期の伸長期という限定した時期に細胞に対して最も強い毒性があることが分かった。つまり, 毒性は特定の構造的特性に起因すると考えられる。しかし, TEM を用いて観察された α -Syn と GroES のアミロイド線維形成中間体が持つ共通した構造的特性はアモルファス様の凝集物という点だけである。新たな構造解析の結果, 共通の構造的特性が発見することができれば $A\beta$ やプリオンといった他の神経変性疾患原因タンパク質の毒性種構造の一助になるかもしれない。

第 4 章 アミロイド線維形成中間体の XFEL-CXDI による 構造解析

4-1. 緒言

第 2 章, 第 3 章より GroES と α -Syn はアミロイド線維が形成される途中の中間体が細胞に対する毒性が特に強いことが分かった。いずれの毒性中間体も 50-200 nm のアモルファス様の凝集体が TEM により観察された。しかしながら, それ以上の構造特性は観察法の特性上できなかつた。

SPring-8 にある SACLA は X 線自由電子レーザー (XFEL) を発生させることでレンズを介することなく μm からサブ μm の非結晶性の粒子の構造解析を行う目的で開発された。通常の X 線結晶構造解析では X 線を照射してもサンプルは壊れないが, 非常に強力な X 線であるため一度照射するとサンプルは原子レベルまで破壊される, いわゆる 'diffraction before destruction' と呼ばれる測定法である。加えて, 非常に透過力が強いために内部の構造も解析することができる。近年, 中迫らが XFEL を照射したサンプルから得られた回折を検出する装置として壽一号を開発した(73)。また, 関口らにより得られた回折パターンから位相回復することで試料の構造を電子密度マップとして得る四天王と呼ばれるソフトウェアが開発された(76)。しかし, この装置はまだ発展途上であり様々な実験対象を必要としている。そこで結晶化が困難である毒性分子種であるアミロイド線維形成中間体を研究対象にして SACLA における XFEL-CXDI 実験による最新のアプローチからアミロイド線維形成中間体の構造解析を試みた。同時に, XFEL-CXDI 実験が非結晶性粒子に対する構造解析の手法となりうるかを議論した。さらに 2 種類の異なるタンパク質のアミロイド線維形成過程における毒性分子種の共通の構造的特性について調査した。共通の構造的特性を明らかにすることはアミロイド線維が細胞にもたらす毒性機構の普遍性を明らかにするかもしれない。

4-2. 材料と方法

4-2-1. タンパク質の精製

GroES, α -Syn 共に 2 章, 3 章を参考にして精製した。

4-2-2. タンパク質のアミロイド線維形成

GroES, α -Syn 共に 2 章, 3 章を参考にしてアミロイド線維形成を行った。

4-2-3. XFEL-CXDI 用 Si_3N_4 膜の Poly-L-Lysine 処理

1. Norcada 社製の Si_3N_4 膜上に 1 mg/mL Poly-L-lysine 水溶液を 5 μL 滴下した。
2. 30 min ゴミが落ちてこないようにして室温で放置した。
3. ろ紙で余分な Poly-L-Lysine を吸い取って 5 μl の Milli-Q 水で洗浄した。
4. Si_3N_4 膜が乾くまでデシケーターにて保存した。

4-2-4. XFEL-CXDI 用のサンプル調製 (図 4-1. 参照)

1. 1 mg/mL のサンプル 10 μL を Si_3N_4 膜上に滴下した。
2. 1 min 常温で放置して, ろ紙で水分を吸い取った。
3. Milli-Q 水を 5 μL 滴下し, ろ紙で水分を少し吸い取った。
4. メインチャンバーに移してパソコンで余分な水分がなくなるまでろ紙で水分を吸い取った。
5. 水分が少し残った状態で素早くサンプルをピンセットボックスごとサンプル投下装置にセットした。
6. ピンセットボックスをピンセットから分離後素早く液体エタン中に投下した。
7. XFEL-CXDI 実験に使用するまで液体窒素中に保存した。

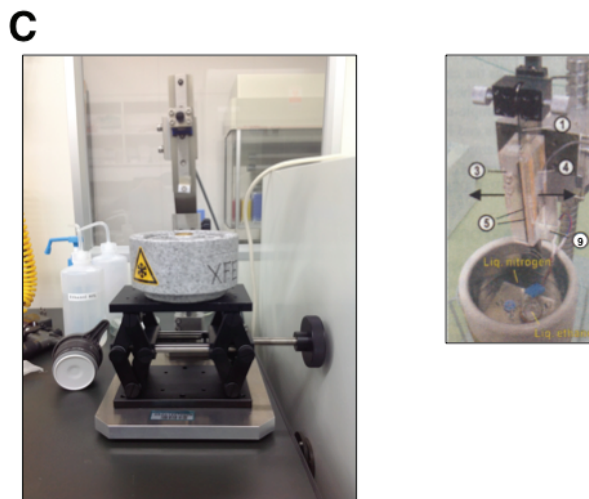
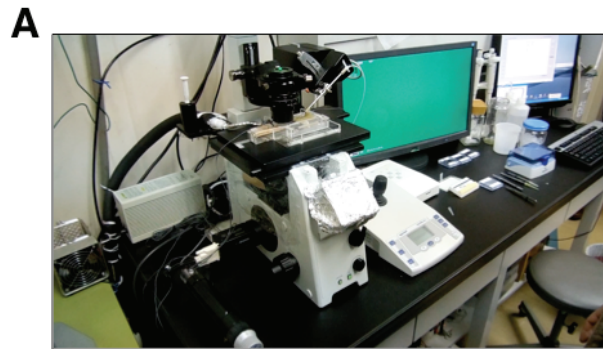


図 4-1. サンプル調整に用いた凍結装置

A. 顕微鏡と試料台に設置されているメインチャンバー

B. 湿度管理ピンセットボックスとセットされているピンセット, Si_3N_4 膜

C. ピンセットを液体エタンに投下する装置

①ピンセット ②ピンセットで固定化された試料の載った膜 ③ピンセットボックス下部

④ピンセットボックス上部 ⑤2つのピンセットボックスをつなぐ磁石 ⑥高湿度空気の流入口

⑦湿度を保つためのスポンジ ⑧湿度温度センサー

⑨メインチャンバーよりピンセットボックスを外した時に湿度を失わないようにするためのカバー

4-2-5. XFEL-CXDI 実験 (図 4-2. 参照)

1. 液体窒素中に保存していたサンプルを液体窒素中でサンプルホルダーに充填した。
2. サンプルホルダーを液体窒素中で風林火山に充填し、カバーをした。
4. 液体窒素から素早く風林火山を壽一号のチャンバーに充填後、チャンバーを真空状態にした。真空になった後、風林火山のカバーを開いた。
5. クライオポットがある試料ステージへのバルブを開けたのち、移動棒によりサンプルホルダーを試料ステージのクライオポットにセットした。
3. 壽一号に取り付けられたカメラによりサンプルの中心をさがし、韋駄天による位置制御をおこなった。
4. X 線自由電子レーザーを照射する位置を決定後、必要に応じて減衰板を挿入した。
5. 寄生散乱を除去したのち XFEL を照射した。
3. MPCCD-Octal と MPCCD-Dual により検出された回折パターンを SITENNO により位相回復を行った。

A



B



C

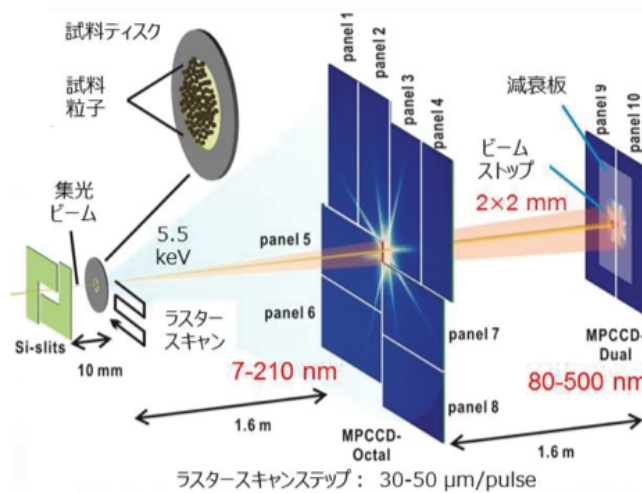


図 4-2. 放射光施設内の壽一号と回折像を検出するディテクター

- A. サンプルホルダーとそれを充填する装置風林火山
- B. 壽一号とその検出器
- C. 測定のおおまかな流れ。

4-3. 結果

4-3-1. GroES, α -Syn 毒性分子種の CXDI

図 4-3 と図 4-4. は, GroES と α -Syn の毒性分子種に XFEL を照射することにより得られた回折パターンを SITENNO により合成, 位相回復を行った最尤電子密度図である。

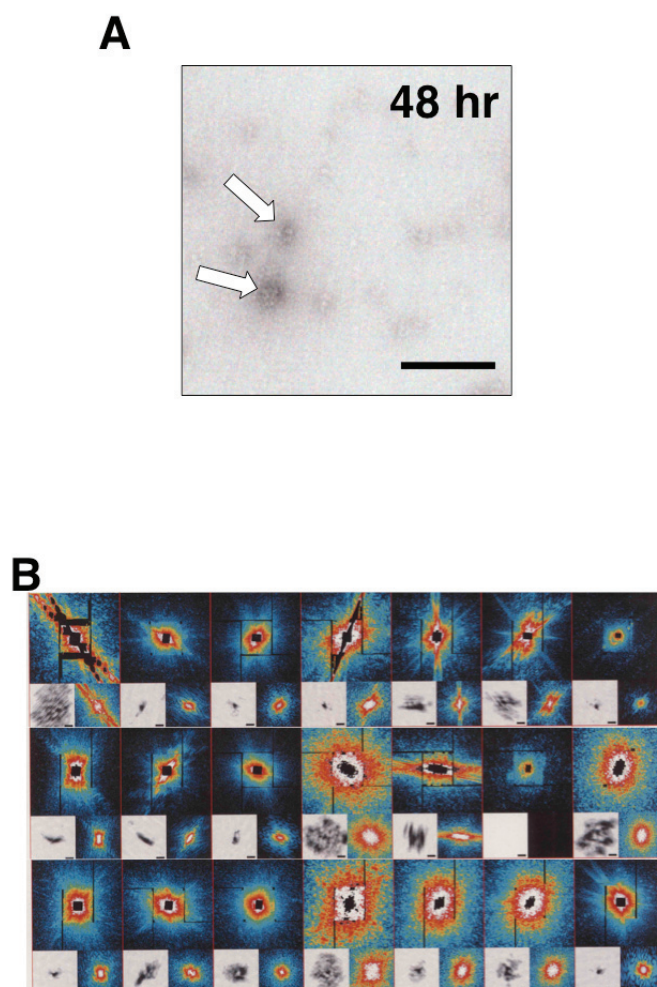


図 4-3. GroES 毒性分子種の TEM と XEEL-CXDI から得られた回折パターン

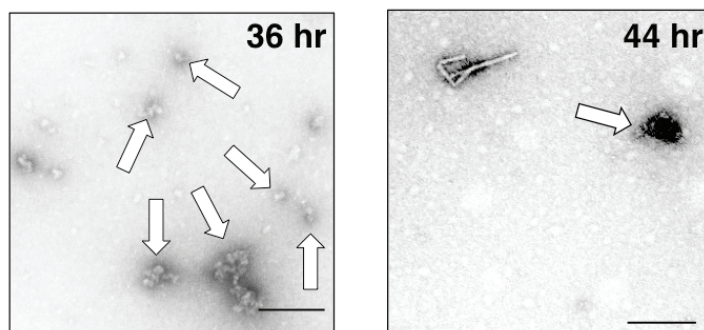
A. GroES の毒性分子種の TEM (矢印)

スケールバーは 200 nm

B. GroES 毒性分子種の回折パターン

スケールバーは 300 nm

A



B

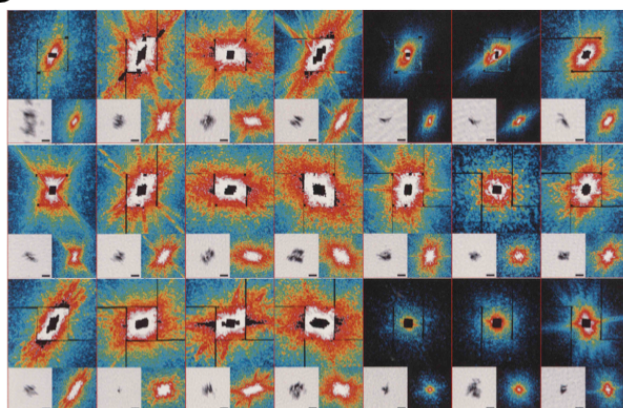


図 4-4. α -Syn 毒性分子種の TEM と XEEL-CXDI から得られた回折パターン

A. α -Syn 毒性分子種の TEM (矢印)

スケールバーは 200 nm

B. α -Syn 毒性分子種の回折パターン

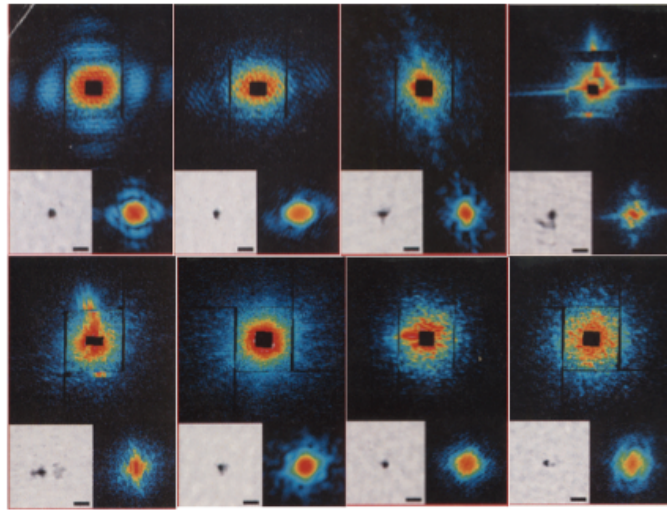
スケールバーは 300 nm

これらの中から、TEM で観察されたような構造物を探しその結果、図 4-4.に示すような回折パターンを得ることができた。これらの回折パターンから得られた構造物は構造特性を評価するにはサイズが小さすぎたため位相回復した最尤電子密度の像がもう少し大きいグループで共通の構造特性を調査することにした。その結果、図 4-5. に示される様な回折パターンを得ることができた。これらの構造物は 2 つのグループに分けることができた。1 つ目のグループは

図 4-5. A に示されるようなグロービュール様の斑点が観察されるグループで、これらの形態に分類される場合のほとんどは回折パターンの分解能は $20 \mu\text{m}^{-1}$ に限られている。回折パターンは逆空間であるが、電子密度マップは実空間であり、逆空間の S の値が大きいところまで回折パターンが得られていれば実空間において分解能の良い電子密度マップを得ることができる。この場合、実空間に変換すると 50 nm の分解能で、位相回復した最尤電子密度地図や直接の回折パターンから推測されるこの構造物の大きさは $300\text{-}1000 \text{ nm}$ になる。

2 つ目のグループは小角領域に斑点が観察され、一定周期で縞が現れるグループである (図 4-5. B)。周期は分解能が 33 nm^{-1} のところまで広がっており、これは実空間において 30 nm の分解能である。このグループにおいて小角領域の斑点の回折パターンはグロービュール様の斑点の回折パターンと同じくらいの大きさであること示唆され、実際の回折パターンの最尤電子密度の寸法はグロービュール様の寸法と両立できた。今回の XFEL-CEDI 実験で、これらの 2 つのグループの回折パターンの数に関しては一定周期で縞の回折パターンが現れるグループが GroES と α -Syn の毒性分子種から得られる回折パターンで量的に大半を占めており、あるサンプルの回折パターンにおいては、周期的な縞の回折パターンが得られるグループは斑点のみが得られる回折パターンのグループの約 2-3 倍程度得られた。

A



B

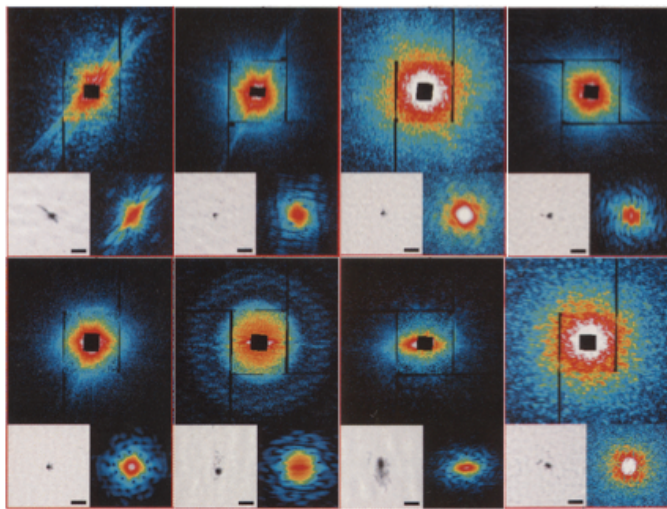


図 4-4. TEM の大きさと同じくらいと考えられた回折パターン

スケールバーは 300 nm

A. α -Syn の散乱パターン

B. GroES の散乱パターン

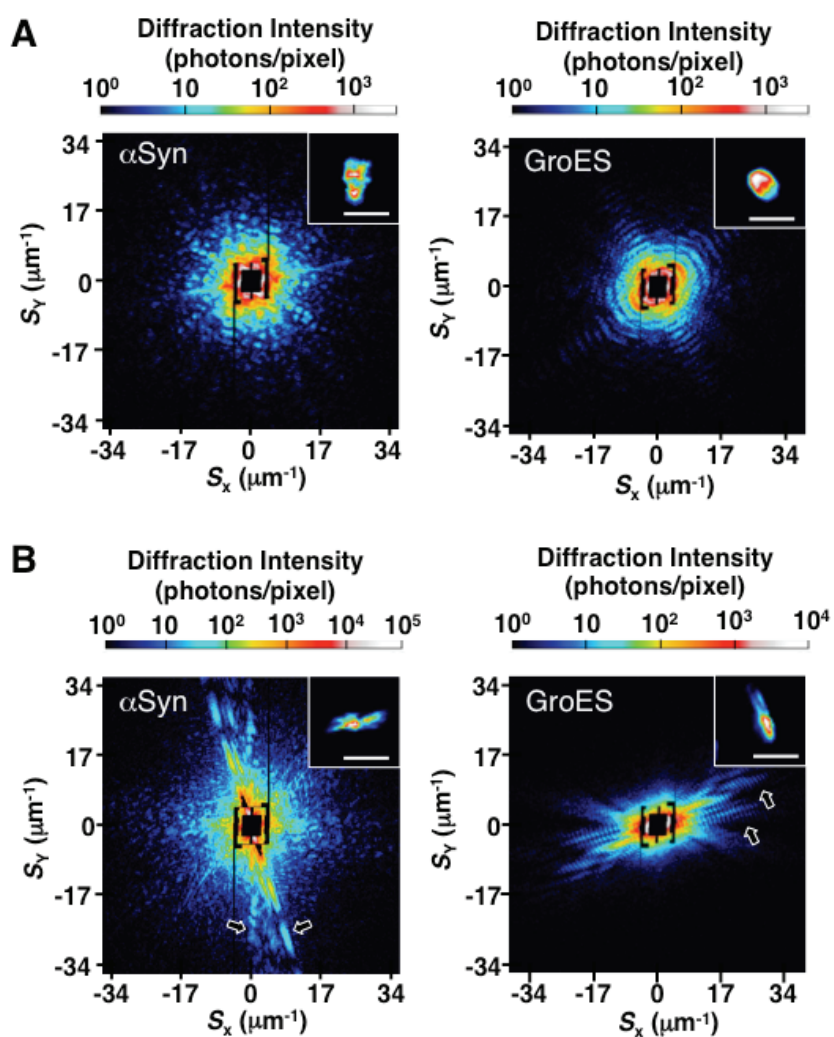


図 4-5. GroES と $\alpha\text{-Syn}$ の毒性分子種の2種類の典型的な回折パターン

A. グロビュール様の斑点が得られる回折パターン

B. 小角領域に斑点があり、さらに周期的な縞の回折パターン得られる回折パターン

矢印が周期的な縞の回折パターン

スケールバーは 700 nm。散乱の方向は $S = 2\sin\theta/\lambda$ で定義される。 2θ は散乱角度, λ は X 線の波長 0.225 nm である。S の逆数が分解能と実空間におけるサイズを表す。

4-3-2. 毒性分子種の構造的特性

次に、図 4-5. B で観察されたような小角領域に斑点があり、かつ周期的な縞の回折パターンが観察できるグループの構造的特性を詳しく調査した (図 4-6.)。小角領域の斑点の回折パターンより出ている周期的な縞のパターンは分解能が $33 \mu\text{m}^{-1}$ よりさらに拡張された $\sim 70 \mu\text{m}^{-1}$ まで伸びていることが確認できた (図 4-6. A)。これは実空間で言えば 14 nm の分解能であり、このような構造的特徴がこの回折パターンをするのかを理解するために、最尤電子密度マップを $17.5 \mu\text{m}^{-1}$ 以上の分解能で位相回復を試みた。その結果、電子密度マップは有効分解能 120 nm まで位相回復でき、図 4-6. B に示されるような縦 400 nm 、横 800 nm の長方形の形をした像を得ることができた。位相回復した像で最も特徴的なのは粒子の端面がほとんど平行に配置されていたことである。像回復された粒子の持つ端面は図 4-6. A で示したような特徴的な回折パターンにその原因があると考えられたので、様々に簡略化された図形に対して、imageJ を用いてどのような回折パターンが得られるかを調査した (図 4-7. A)。円は放射状に周期的な縞の回折パターンが得られたが、左右上下の回折強度が特に強かった。アモルファス様の形態をしたものからは円から得られた様な回折パターンが得られたが、周期的な縞のパターンに原点を通らない回折パターンが存在していた。長方形は左右上下に周期的な縞がある回折パターンが得られた。長方形の 2 面が凹凸のある形をしたものからは左右上下の周期的な縞の回折パターンに加え、縦方向に周期的な縞の回折パターンが加わった回折パターンを得た。2 つの長方形の違いは凹凸した長方形に凹凸の分複雑な面ができる。従って、縞のパターンは面、それも平行な配置にあることが関係していることが考えられ、周期性はその距離に関係していると考えた。図 4-7. B に示した一定距離離れたところに平行な端面があるような形からは図 4-6. C で観察される様な回折パターンを得ることができた。このような構造的特性は、TEM により染色した試料では染色剤が表面に付着するため観察することは困難である。一方、回折パターンは粒子と端面の寸法や平行性に関しては敏感に捉えることができる。

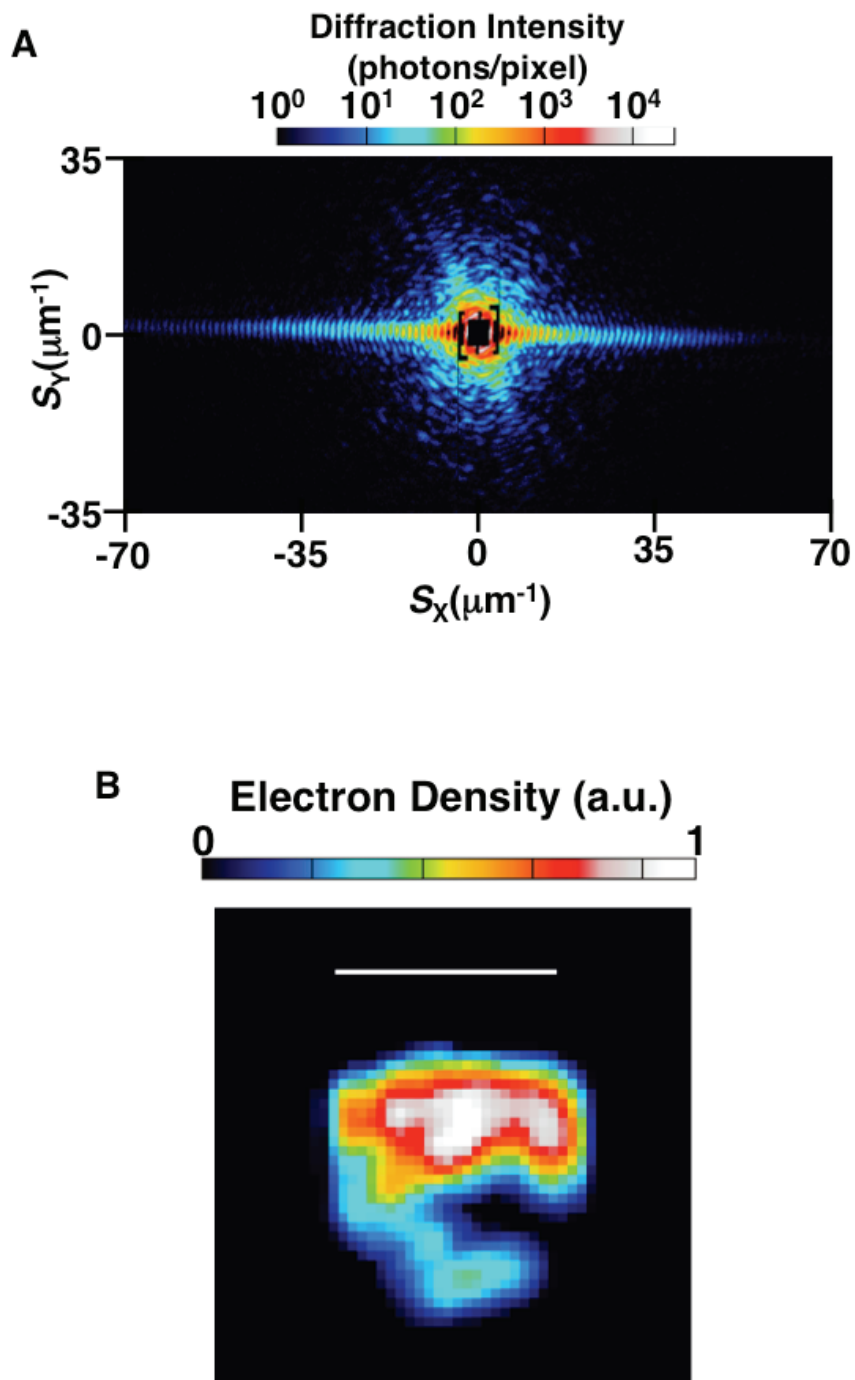
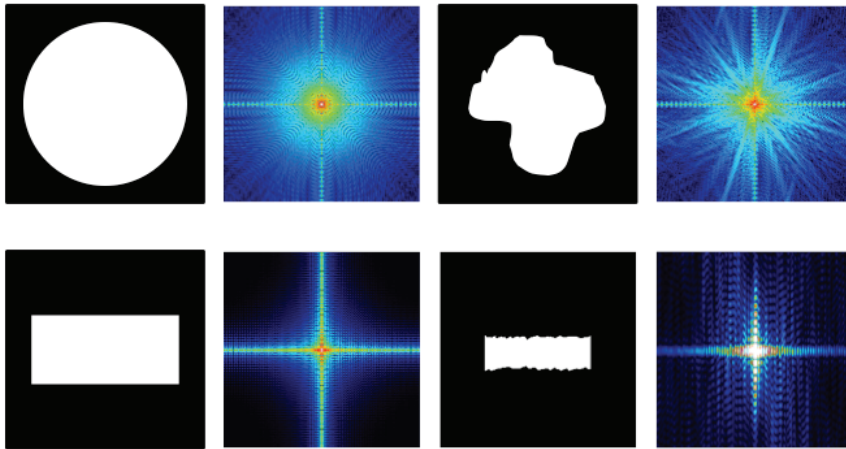


図 4-6. GroES 毒性分子種より得られた回折パターンと位相回復した像

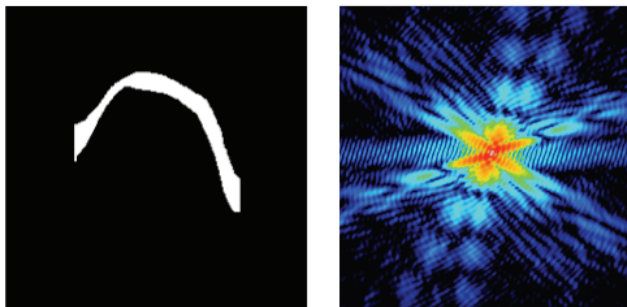
A. GroES 毒性分子種の回折パターン

B. 回折パターンより位相回復された電子密度マップ像

A



B



C

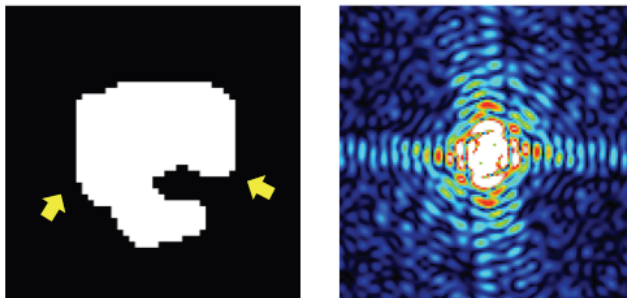


図 4-7. 周期的な縞の位相回復した像に対する帰属

A. 様々な図形の回折パターン

白黒のパネルが元の図形，カラーは回折パターン

B. 一定距離離れた端面が平行な端面のある形を持つ図形とその回折パターン

C. 実際の GroES 毒性分子種とその回折パターン

矢印が平行な端面

4-3-3. 毒性構造物の粒子径の分布

構造解析の結果、平行な端面を持つ毒性分子種は XFEL-CXDI 実験で見られる縞のパターンに起因することが示唆された。ある粒子において $2a$ の距離離れている一対の平行な端面の干渉を考慮した時、粒子からの回折強度は以下の式で近似できる。

$$I(s_x) = I_0 \left[\frac{\sin(2\pi S_x a)}{2\pi S_x a} \right]^2$$

この式を使うことにより、毒性分子種の大きさ、例えば端面から端面までの空間的配置が縞パターンの繰り返しのある周期から推定できる。

特徴的な α -Syn 毒性分子種の回折パターンをその周期的な縞のパターンにビームストップのある中心部から広角側に引いた直線上の回折強度を散乱が広がっている方向の距離 S に対してプロットしたグラフとともに示す。図 4-8. に示すように縞パターンのピークからピークまでの距離の周期から、毒性分子種の粒子が持つ端から端の距離を計算した結果、81 の α -Syn 毒性分子種の大きさの分布は 200 - 2000 nm であった。その中でも 500 - 1500 nm の領域に特に多くの毒性分子種があり、同様に、138 の GroES の毒性分子種について縞パターンの周期から、毒性分子種の端から端の距離を計算した。その結果、GroES 毒性分子種の大きさの分布は ~200 - 1500 nm であった。位相回復アルゴリズムによる構造分析は多くの回折パターンで困難であったが、粒子の大きさの分布は毒性分子種の大きさを表している。粒子径の広範囲にわたる分布は様々な大きさの毒性分子種が存在していることを示唆しているが、主な毒性分子種は 200 - 1000 nm の範囲内の大きさであることが示唆された。

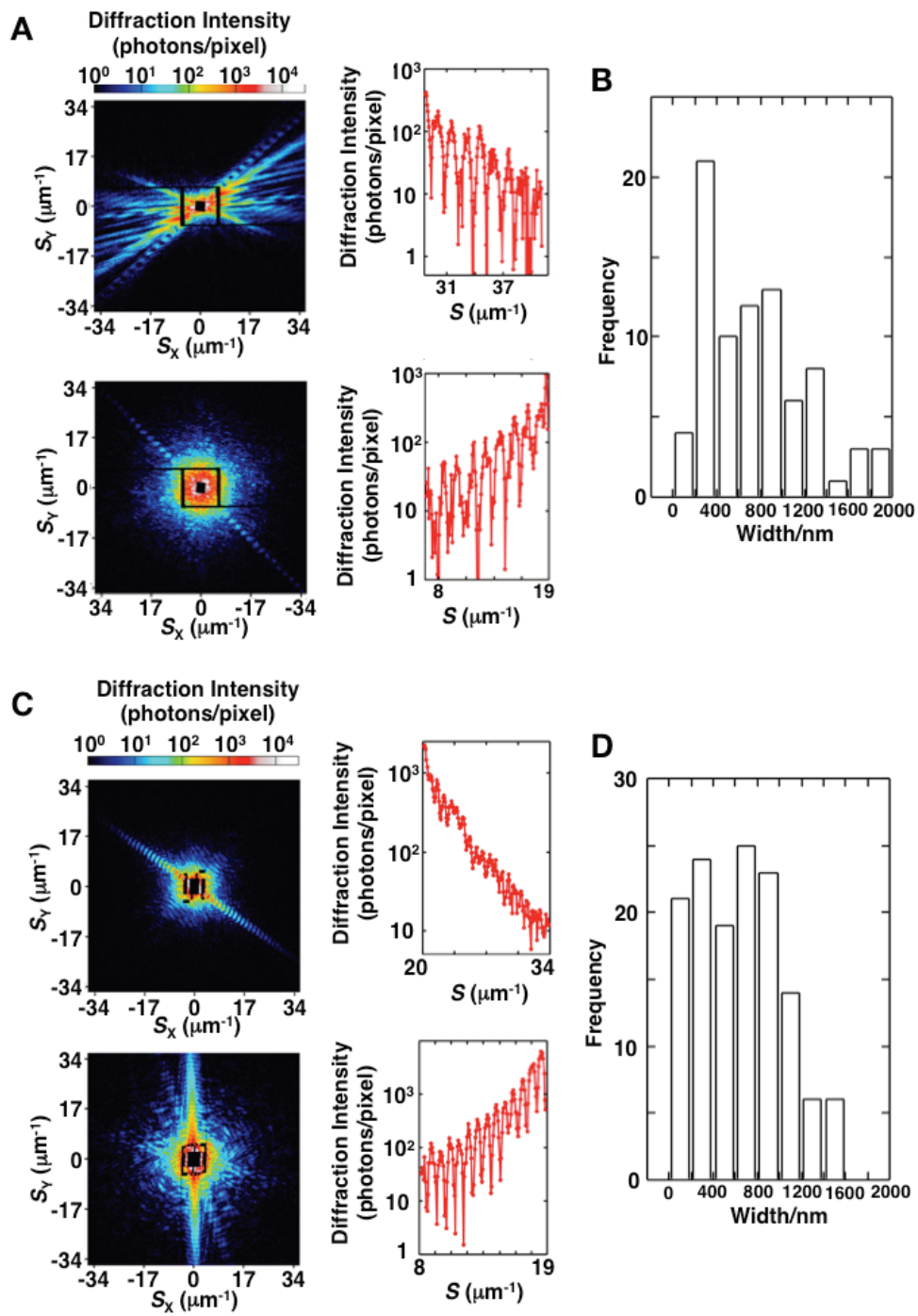


図 4-8. α -Syn, GroES 毒性分子種の回折パターン

A. α -Syn の回折パターンと広角側に伸びた縞の周期

B. GroES の回折パターンと広角側に伸びた縞の周期

C. α -Syn の回折パターンから位相回復された像のサイズ分布

D. GroES の回折パターンから位相回復された像のサイズ分布

4-4. 考察

α -SynとGroESはいずれもアミロイド線維形成中間体が毒性分子種である。本章ではこれらの毒性分子種の構造的な特徴をXFEL-CXDIにより解析した。XFEL-CXDI実験は近年新しく開発された実験手法であり、それを用いることでアミロイド線維形成中間体のような結晶化できない粒子の新たな構造的特徴を見いだすことが期待されている。

従来用いられてきた構造解析の手法の一つであるTEMによる解析では、 α -SynとGroESの毒性分子種の構造的な特性は50 – 200 nmの大きさのあるグロビュール様の凝集物であること示している(図4-3. A, 4-4. A)。しかし、詳細な構造的な特徴を明らかにすることは困難である。一方で、XFEL-CXDIを用いての解析は α -Syn, GroES毒性分子種はほとんど平行に配置された平坦で歪みのない端面が存在することが明らかになり、平行な端面の構造物における回折理論を元にしてこれらの毒性分子種の粒子の大きさの分布を決定すると、 α -Synの粒子の大きさは200から2000 nm, GroESの粒子の大きさは200から1500 nmと推測された。これより、2種類の全く異なる性質のタンパク質がアミロイド線維を形成する過程で生まれる分子種の粒子径は大まかには同じくらいであると言える。

ここで、XFEL-CXDI実験で推察された粒子の大きさ(200 – 1000 nm)とTEMで観察された粒子の大きさ(50-200 nm)とに差異が生じてくる。XFEL-CXDI実験で観察されたほとんど全ての粒子の大きさはTEMで観察された粒子の大きさの大体5倍以上の大きさであった。これらの差異はそれぞれの観察手法でサンプリングするときの偏りに起因すると考えられる。TEMはサイズの大きな粒子を観察することもできるが、より微小な分子種に注目して観察している。一方で、XFEL-CXDIは現行のシステムの技術的な限界がTEMで観察できる大きさの領域に達していない。例えば、平行な端面を持つ凝集物の干渉パターンはグロビュール様の凝集物の微弱な回折パターンよりもデータ処理プログラムにより簡単に見つけ出すことができる。そのために無作為に散布された試料から集められた数多くの回折パターンが2つのタイプ粒子についての質的にも量的にも満足いく議論をするために必要である。現在、TEMとXFELCXDIという2つの実験システムは相互に補完し合っているが、XFEL-CXDI法の十分なポテンシャルはまだ発揮しきれていない。今後の継続的な装置の技術革新が、XFEL-CXDI

のさらなるポテンシャルを引き出すことを期待したい。例えば、ごく最近では 30 Hz の XFEL パルス速度で回折パターンを収集できる回折装置が開発されている(74)。これらの装置を用いることで、アミロイド線維形成中間体と毒性の相互的な関係によりはっきりとした説明が見つくと期待される。

アミロイド線維は空間的に β シートで構成された構造をしていることが証明されており(118)、加えて β シートで構成された構造物の端面はアミロイド線維が伸長するときの起点になる。これに関連して、本研究で検出された毒性分子種の平行な端面はなぜアミロイド線維形成中間体が細胞に対して毒性を持つのかを理解する上で重要な手掛かりになることを示唆している。端面はおそらく毒性分子種が成熟したアミロイド線維を形成するために β シートが伸長する表面として働くと考えられる。この端面は反応性に富んでいると考えられ、アミロイド線維形成中間体同士だけでなく他の分子とも相互作用すると考えられる。その時、細胞が生存するために必要な代謝等の反応を触媒するタンパク質に毒性分子種の今回検出された端面が相互作用することで不活化されたなら、検出された端面は細胞に対して毒性を持つであろう。また、小さな分子種は必要なタンパク質がそれだけ少ない分、大きな分子種より多く存在する。従って、端面がそれだけ多く存在して見かけ上強い毒性を示すとも考えられる。この考えは将来的な実験で、アミロイド線維形成中間体が結合することにより不活化するタンパク質に XFEL を照射することで平行な端面の有無を確認することで証明されるだろう。また、毒性を抑制すると考えられている低分子化合物と相互作用させた状態で実験を行えば同様に証明できるだろう。低分子化合物はおそらく毒性分子種の端面を被い、他のタンパクとの相互作用する面を隠すことで伸長反応を防止し、細胞に無害な off pathway な構造物にさせると考えられる。

本研究では、TEM 観察が唯一のタンパク質凝集物の形態変化の情報をもたらした。XFEL-CXDI 実験は毒性分子種の回折パターンより毒性分子種の構造的特性を発見する鍵となる。XFEL-CXDI 実験は手順、解析ともにタンパク質の X 線結晶構造解析といった完済された手法に比べて未だ未成熟である。しかし、この実験手法は非結晶性の粒子や凝集中間体を溶液中で科学的なラベリングや染色をすることなくその詳細な構造を明らかにできるという点で、とても優れている。この実験において位相の揃った X 線は毒性分子種の平行な端面構造に寄与する縞パターンを観察するためには必須であった。図 4-6. B の有効分解能 120 nm

の電子密度マップでは御舟物の詳細な構造を議論することは難しい。もし、現行の XFEL パルスが 10 倍強力であったとしたら、回折パターンは凝集構造内部まで推察できるような分解能を有していたことだろう。しかし、位相回復された最尤電子密度マップの一組の平行な端面はアミロイド線維のバックボーンは β シート構造であるという事実から考えると興味深い。毒性分子種においてタンパク質のグロブユール集合体からの構造変化はそれらの β シート構造を通して配置変化が起こることが考えられる。 β シートが空間的に離れて配置されている時、凝集物に平行な端面ができる。この点はシンクロトロン X 線を用いた溶液 X 線散乱実験で凝集物のサンプルから得られる広角領域の回折パターンを観察することにより証明されると考えられる。今後の XFEL-CXDI の発展を期待したい。

第 5 章 総合考察

5-1. GroES アミロイド線維のポリフェノールによる抑制効果

GroES が最も細胞に対して毒性がある分子種はアミロイド線維形成中間体であることが分かった。これは、アミロイド線維が毒性を持つという議論と相反するものである(119)。また、これらのアミロイド線維をビルベリー由来のポリフェノールが抑制することが明らかとなった。これらのポリフェノール類はアミロイド線維を形成しようとしている分子種と結合することでタンパク質の安定化に寄与することでアミロイド繊維化を防いでいるという報告がある(69) (120) (121)。この観点では、安定化している中間体は毒性を示さないことが示唆される(121)。安定化の方法に関してはシッフ塩基の形成、酸化の防止等幾つかの報告があるが、未だにはっきりとしていない(69)。GroES の場合もアミノ酸側鎖の酸化防止や、シッフ塩基で安定化することによりアミロイド繊維化を防いでいることが示唆される。これらの機構を治療薬に応用することは神経変性疾患の治療にはとても大切である。しかしながら、ポリフェノールが脳血液関門を通過するのはごくわずかであり、少量でもその効果が発揮されるような強力な治療薬の開発が急がれる。そのためには、アミロイド線維形成が抑制される細かな機構の解明が必須である。さらなる抑制機構の解明のためには Cya-3-Glc と Del-3-Glc といった類似した構造であるが抑制能に差異が見られる化学物質に対して網羅的に解析を行うことが必要であろう。

5-2. α -Syn の毒性とアミロイド線維形成機構

136 番目の Tyr はアミロイド線維を形成する上で、核形成が完了した分子種から重合反応に移行するときに何らかの役割を担っていると考えられる。C 末端の Tyr が他の領域の芳香族アミノ酸とスタッキングすることにより線維形成を促すことも示唆される(122)。また、金属イオンと結合することでアミロイド線維形成が加速されるという報告があり、金属イオンが α -Syn の Glu や Asp に結合することでコンホメーション変化を起こすことが示唆されている(123)。

α -SynY136TAC は α -SynWT に α -SynY136C が混在していたがその影響は軽微であるが存在することが分かった (図 3-8.)。軽微であった理由として α -SynY136C の混在比率が 30% 弱であったことが挙げられる。しかし、以前の報告は軽微な影響もないということであった(112)。

この理由として考えられるのは Masuda らの定量では混在している α -SynY136C が 20%と 10%近くも低いことが挙げられる。これは培養の条件の違いからくるものであると考えられる。

α -Syn のアミロイド線維形成中間体は α -Syn の他の分子種に比べて細胞に対する毒性が強いことが分かった。これは、GroES の毒性分子種が存在する時期と同様であった。これは、アミロイド線維が形成されるという過程自体が毒性機構の一部であるという報告を支持するものである(64)。 α -Syn の場合は細胞膜に存在するリン脂質と相互作用することで細胞膜の曲率を変化させるという報告もあるため、膜自体との親和性は強いと考えられる(124)。他の神経変性疾患の原因タンパク質であるプリオンも、膜タンパク質であることから細胞膜と毒性分子種が相互作用する機構の解明が、毒性分子種の治療薬へ何らかの示唆を与えることが予想される。

5-3. アミロイド線維形成中間体の XFEL-CXDI による構造解析

図 5-1. は今回明らかになった α -Syn と GroES のアミロイド線維形成実験で形成する毒性分子種の特徴の要約である。モノマー状態の α -Syn が寄り集まることで 50 nm 程度の小さなダイマーから、比較的大きな 1000 nm 程度のオリゴマーを形成する。この時、TEM で観察するとアモルファス様の凝集物が確認できる。しかし、今回の XFEL-CXDI により、平行な端面が形成されていることが判明した。また、この時形成される分子種が一番細胞に対して毒性があるため、この平行な端面がアミロイド線維形成中間体の毒性と関係していることが示唆される。この平行な端面はアミロイド線維の伸長起点であり、反応性に富んでいる。この反応性に富んだ端面が細胞膜等に直接結合すること毒性を示すと考えられる。その後蛍光強度が増加するにつれて 1 つのプロトフィブリルに対して 2 箇所の伸長起点、すなわち細胞膜と相互作用する表面が存在しなくなる。タンパク質の量は *in vitro* の場合は変化しないため、より大きなプロトフィブリルが形成されるとその分細胞膜と相互作用する表面が減少し、結果的に毒性も減少し最終的に重合反応が停止すると考えられる。

α -Syn と GroES の毒性分子種の共通した構造的特性は、異種のタンパク質間で確認されているシーディング効果と深い関係があるものと思われる(125)。また、牛海綿型脳症に代表されるタンパク質の伝染性にも関連づけることができる(126)。アミロイド線維形成抑制物質が異なるタンパク質由来のアミロイド線維形成においても同様の効果を示すことは、共通した線維

伸長の機構を持っていることが示唆される。

今後の XFEL-CXDI に求めるのは、これらの毒性の分子構造の普遍性の証明である。そのためには、 α -Syn, GroES 以外のアミロイド線維を形成するタンパク質について同様の実験を行う必要がある。また、より多くの回折パターンを得ることで統計学的にも強固なデータを収集することも大切である。GroES の実験において、VMA はアミロイド線維に添加することにより分解する効果があることが分かった (図 2-8.)。もし、アミロイド線維形成中間体がもたらす細胞に対する毒性が平行な端面に由来するとしたら、分解されたアミロイド線維は毒性を示さなかったことから、端面の平行性が失われていることが予想される。アミロイド線維形成過程の毒性分子種の構造的特性の共通性は今後さらなる解析が必要になるであろう。その構造的特性を解析する装置として XFEL-CXDI 実験は今までになかった新たな知見を我々に与えてくれることであろう。

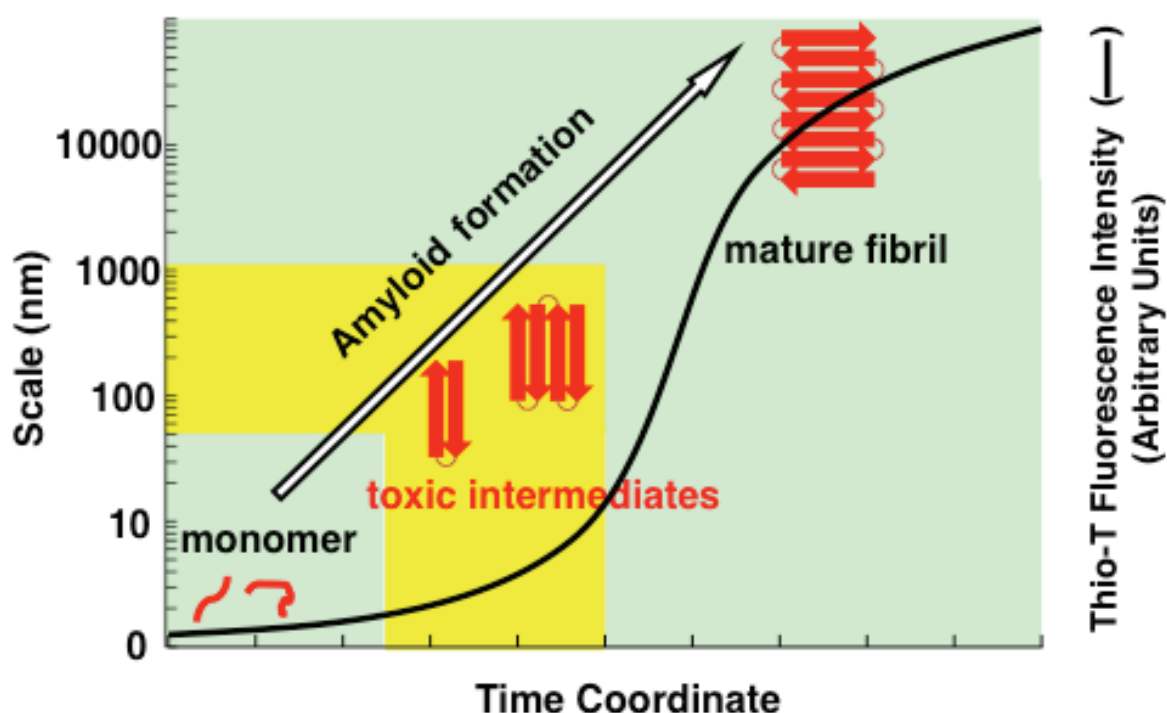


図 5-1. アミロイド線維形成と形成される分子の大きさ

黄色で強調された部分の分子種が特に毒性がある。

謝辞

本研究を進めるにあたり終始ご助言をいただきました河田康志教授，溝端知宏准教授に心より感謝いたします。また，実験補助をしていただいた福井直哉，李石をはじめ，タンパク質工
学研究室の先輩・後輩の皆様，病气療養中に支えていただいた家族に御礼申し上げます。

引用文献

1. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230
2. Huang, J. T., Xing, D. J., and Huang, W. (2012) Relationship between protein folding kinetics and amino acid properties. *Amino Acids* **43**, 567-572
3. Gietl, C., Seidei, C. and Svendsen, I. (1996) Plant glyoxysomal but not mitochondrial malate dehydrogenase can fold without chaperone assistance. *Biochimica et Biophysica Acta* **1274**, 48-58
4. Horwich, A. L., Farr, G. W., and Fenton, W. A. (2006) GroEL-GroES-mediated protein folding. *Chem Rev* **106**, 1917-1930
5. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2011) How Fast-Folding Proteins Fold. *Science* **334**, 517
6. Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**, 87-90
7. Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., , Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J. , Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., , Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C., , Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., , and Chiu, W., Garner, E. C. and Obradovic Z. . (2001) Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **19**, 26-59
8. Khan, S. H., Ling, J., and Kumar, R. (2011) TBP binding-induced folding of the glucocorticoid receptor AF1 domain facilitates its interaction with steroid receptor coactivator-1. *PLoS One* **6**, e21939
9. Zhang, X., Beuron, F., and Freemont, P. S. (2002) Machinery of protein folding and unfolding. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 231-238
10. Pulido, P., Llamas, E., Llorente, B., Ventura, S., Wright, L. P., and

- Rodriguez-Concepcion, M. (2016) Specific Hsp100 Chaperones Determine the Fate of the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway for Either Refolding or Degradation by the Stromal Clp Protease in Arabidopsis. *PLoS Genet* **12**, e1005824
11. Reeg, S., Jung, T., Castro, J. P., Davies, K. J., Henze, A., and Grune, T. (2016) The molecular chaperone Hsp70 promotes the proteolytic removal of oxidatively damaged proteins by the proteasome. *Free Radic Biol Med* **99**, 153-166
 12. Brini, M., and Carafoli, E. (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* **89**, 1341-1378
 13. Napolitano, G., Johnson, J. L., He, J., Rocca, C. J., Monfregola, J., Pestonjamas, K., Cherqui, S., and Catz, S. D. (2015) Impairment of chaperone-mediated autophagy leads to selective lysosomal degradation defects in the lysosomal storage disease cystinosis. *EMBO Mol Med* **7**, 158-174
 14. Schaal, K., Hirschfeld, M., Bronsert, P., Fußllgraf, H., Jäger, M., Herde, B., Nöthling, C., Mayer, S., Erbes, T., Stickeler, E. (2015) Alternative splicing of synuclein gamma in endometrial cancer: identification of a novel isoform. *Oncotarget* **6**, 22553–22563
 15. Forloni, G., Terreni, L., Bertani, I., Fogliarino, S., Invernizzi, R., Assini, A., Ribizzi, G., Negro, A., Calabrese, E., Volonte, M. A., Mariani, C., Franceschi, M., Tabaton, M., and Bertoli, A. (2002) Protein misfolding in Alzheimer's and Parkinson's disease: genetics and molecular mechanisms. *Neurobiol Aging* **23**, 957-976
 16. Sabado, J., Casanovas, A., Tarabal, O., Hereu, M., Piedrafita, L., Caldero, J., and Esquerda, J. E. (2014) Accumulation of misfolded SOD1 in dorsal root ganglion degenerating proprioceptive sensory neurons of transgenic mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int* **2014**, 852163

17. Kunst, C. B., Mezey, E., Brownstein, M. J., and Patterson, D. (1997) Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat Genet* **15**, 91-94
18. Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schols, L., and Riess, O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* **18**, 106-108
19. Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., and Damasio, A. R. (1990) Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology* **40**, 1721-1730
20. Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G. C., Wu, Y. T., and Prina, M. (2015) WorldAlzheimerReport2015.
21. Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356
22. Rajendran, L., Hoshino, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., and Simons, K. (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11172-11177
23. Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., and Abraham, W. C. (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* **70**, 1-32
24. Xia, K., Trasatti, H., Wymer, J. P., and Colon, W. (2016) Increased levels of hyper-stable protein aggregates in plasma of older adults. *Age (Dordr)* **38**, 56
25. Chartier-Harlin, M. C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., Hardy, J., and Mike, M. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the [beta]-amyloid precursor protein gene. *Nature* **353**, 844-846
26. Ma, Q. L., Teter, B., Ubeda, O. J., Morihara, T., Dhoot, D., Nyby, M. D., Tuck,

- M. L., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2007) Omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid increases SorLA/LR11, a sorting protein with reduced expression in sporadic Alzheimer's disease (AD): relevance to AD prevention. *J Neurosci* **27**, 14299-14307
27. Chandler, R. L. (1961) Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *The Lancet*
28. Verity, N. C., and Mallucci, G. R. (2011) Rescuing neurons in prion disease. *Biochem J* **433**, 19-29
29. Gajdusek, D. C., Gibbs, C.J., and Alpers, M. (1966) experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*
30. Gibbs, C. J. J., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., Alpers, M.P., Beck, E., Daniel, P.M. and Matthews, W.B. . (1968) Creutzfeldt-Jakob Disease (Spongiform Encephalopathy) : Transmission to the Chimpanzee.pdf. *science* **161**, 388-389
31. Prusiner, S. B. (1991) Molecular Biology of Prion Diseases. *Science* **252**, 1515-15221
32. Hsiao, K., Dlouhy, S. R., Farlow, M.R., Cass, C., Da Costa, M., Conneally, P. M., Hodes, M. E., Ghetti, B. and Prusiner, S.B. (1992) Mutant prion proteins in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nature Genetics*, 68-71
33. Knowles, T. P., Vendruscolo, M., and Dobson, C. M. (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 384-396
34. Sipe, J. D., and Cohen, A. S. (2000) Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* **130**, 88-98
35. Budd, G. (1879) Amyloid Degeneration. *Br Med J* **1**, 659
36. Cohen, A. S., and Wegelius, O. (1980) Classification of amyloid: 1979--1980. *Arthritis Rheum* **23**, 644-645

37. Maleszewski, J. J. (2015) Cardiac amyloidosis: pathology, nomenclature, and typing. *Cardiovascular Pathology* **24**, 343-350
38. Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., and Glenner, G. G. (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**, 349-358
39. Kisilevsky, R., and Young, I. D. (1994) Pathogenesis of amyloidosis. *Baillière's Clinical Rheumatology* **8**, 613-626
40. Jakes, R., Spillantini, M. G., and Goedert, M. (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* **345**, 27-32
41. Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6469-6473
42. Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-579
43. Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., and Ellis, R. J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**, 330-334
44. Clare, D. K., Bakkes, P. J., van Heerikhuizen, H., van der Vies, S. M., and Saibil, H. R. (2006) An expanded protein folding cage in the GroEL-gp31 complex. *J Mol Biol* **358**, 905-911
45. Higurashi, T., Yagi, H., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2005) Amyloid-like fibril formation of co-chaperonin GroES: nucleation and extension prefer different degrees of molecular compactness. *J Mol Biol* **351**, 1057-1069
46. Guijarro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D., and Dobson, C. M. (1998) Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**,

4224-4228

47. Maroteaux, L., Campanelli, J. T., and Scheller, R. H. (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* **8**, 2804-2815
48. Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H. B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., Hammer, R. E., Battaglia, G., German, D. C., Castillo, P. E., and Sudhof, T. C. (2004) Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14966-14971
49. Wu, K. P., Weinstock, D. S., Narayanan, C., Levy, R. M., and Baum, J. (2009) Structural reorganization of alpha-synuclein at low pH observed by NMR and REMD simulations. *J Mol Biol* **391**, 784-796
50. Dettmer, U., Newman, A. J., von Saucken, V. E., Bartels, T., and Selkoe, D. (2015) KTKEGV repeat motifs are key mediators of normal alpha-synuclein tetramerization: Their mutation causes excess monomers and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 9596-9601
51. Bartlett, D. M., Cruickshank, T. M., Hannan, A. J., Eastwood, P. R., Lazar, A. S., and Ziman, M. R. (2016) Neuroendocrine and neurotrophic signaling in Huntington's disease: Implications for pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Neurosci Biobehav Rev* **71**, 444-454
52. Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., and Nussbaum, R. L. (2005) Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J Biol Chem* **280**, 9595-9603
53. El-Agnaf, O. M., Bodles, A. M., Guthrie, D. J., Harriott, P., and Irvine, G. B. (1998) The N-terminal region of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is responsible for its tendency to assume beta-sheet and aggregate to form fibrils. *Eur J Biochem* **258**, 157-163
54. Kim, T. D., Paik, S. R. and Yang, C.H. (2002) Structural and Functional

- Implications of C-Terminal Regions of R-Synuclein. *Biochemistry* **41**, 13782-13790
55. Trexler, A. J., and Rhoades, E. (2010) Single molecule characterization of alpha-synuclein in aggregation-prone states. *Biophys J* **99**, 3048-3055
56. Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., and Nussbaum, R. L. (1997) Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* **276**, 2045
57. Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D. G., and de Yebenes, J. G. (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* **55**, 164-173
58. Bodner, C. R., Maltsev, A. S., Dobson, C. M., and Bax, A. (2010) Differential phospholipid binding of alpha-synuclein variants implicated in Parkinson's disease revealed by solution NMR spectroscopy. *Biochemistry* **49**, 862-871
59. Rochet, J. C., and Lansbury, P. T. J. (2000) Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 60-68
60. Pennington, K., Peng, J., Hung, C. C., Banks, R. E., and Robinson, P. A. (2010) Differential effects of wild-type and A53T mutant isoform of alpha-synuclein on the mitochondrial proteome of differentiated SH-SY5Y cells. *J Proteome Res* **9**, 2390-2401
61. Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F. H., and

- Riek, R. (2011) In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 4194-4199
62. Xue, W. F., Hellewell, A. L., Gosal, W. S., Homans, S. W., Hewitt, E. W., and Radford, S. E. (2009) Fibril fragmentation enhances amyloid cytotoxicity. *J Biol Chem* **284**, 34272-34282
63. Volles, M. J., and Lansbury, P. T. (2007) Relationships between the sequence of α -synuclein and its membrane affinity, fibrillization propensity, and yeast toxicity. *Journal of molecular biology* **366**, 1510-1522
64. Reynolds, N. P., Soragni, A., Rabe, M., Verdes, D., Liverani, E., Handschin, S., Riek, R., and Seeger, S. (2011) Mechanism of membrane interaction and disruption by alpha-synuclein. *J Am Chem Soc* **133**, 19366-19375
65. Zhou, Z., Fan, J. B., Zhu, H. L., Shewmaker, F., Yan, X., Chen, X., Chen, J., Xiao, G. F., Guo, L., and Liang, Y. (2009) Crowded cell-like environment accelerates the nucleation step of amyloidogenic protein misfolding. *J Biol Chem* **284**, 30148-30158
66. Westergard, L., Turnbaugh, J. A., and Harris, D. A. (2011) A nine amino acid domain is essential for mutant prion protein toxicity. *J Neurosci* **31**, 14005-14017
67. Kaye, R., Pensalfini, A., Margol, L., Sokolov, Y., Sarsoza, F., Head, E., Hall, J., and Glabe, C. (2009) Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J Biol Chem* **284**, 4230-4237
68. Chenal, A., Vendrely, C., Vitrac, H., Karst, J. C., Gonneaud, A., Blanchet, C. E., Pichard, S., Garcia, E., Salin, B., Catty, P., Gillet, D., Hussy, N., Marquette, C., Almunia, C., and Forge, V. (2012) Amyloid fibrils formed by the programmed cell death regulator Bcl-xL. *J Mol Biol* **415**, 584-599
69. Meng, X., Munishkina, L. A., Fink, A. L., and Uversky, V. N. (2009) Molecular

- mechanisms underlying the flavonoid-induced inhibition of alpha-synuclein fibrillation. *Biochemistry* **48**, 8206-8224
70. Kobayashi, M., Kim, J., Kobayashi, N., Han, S., Nakamura, C., Ikebukuro, K., and Sode, K. (2006) Pyrroloquinoline quinone (PQQ) prevents fibril formation of alpha-synuclein. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 1139-1144
71. Grelle, G., Otto, A., Lorenz, M., Frank, R. F., Wanker, E. E., and Bieschke, J. (2011) Black tea theaflavins inhibit formation of toxic amyloid-beta and alpha-synuclein fibrils. *Biochemistry* **50**, 10624-10636
72. Sievers, S. A., Karanicolas, J., Chang, H. W., Zhao, A., Jiang, L., Zirafi, O., Stevens, J. T., Munch, J., Baker, D., and Eisenberg, D. (2011) Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation. *Nature* **475**, 96-100
73. Nakasako, M., Takayama, Y., Oroguchi, T., Sekiguchi, Y., Kobayashi, A., Shirahama, K., Yamamoto, M., Hikima, T., Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., Kohmura, Y., Inubushi, Y., Takahashi, Y., Suzuki, A., Matsunaga, S., Inui, Y., Tono, K., Kameshima, T., Joti, Y., and Hoshi, T. (2013) KOTOBUKI-1 apparatus for cryogenic coherent X-ray diffraction imaging. *Rev Sci Instrum* **84**, 093705
74. Kobayashi, A., Sekiguchi, Y., Takayama, Y., Oroguchi, T., Shirahama, K., Torizuka, Y., Manoda, M., Nakasako, M., and Yamamoto, M. (2016) TAKASAGO-6 apparatus for cryogenic coherent X-ray diffraction imaging of biological non-crystalline particles using X-ray free electron laser at SACLA. *Rev Sci Instrum* **87**, 053109
75. Mimura, H., Yumoto, H., Matsuyama, S., Koyama, T., Tono, K., Inubushi, Y., Togashi, T., Sato, T., Kim, J., Fukui, R., Sano, Y., Yabashi, M., Ohashi, H., Ishikawa, T., and Yamauchi, K. (2014) Generation of 10(20) W cm(-2) hard X-ray laser pulses with two-stage reflective focusing system. *Nat Commun* **5**,

76. Sekiguchi, Y., Yamamoto, M., Oroguchi, T., Takayama, Y., Suzuki, S., and Nakasako, M. (2014) IDATEN and G-SITENNO: GUI-assisted software for coherent X-ray diffraction imaging experiments and data analyses at SACLA. *J Synchrotron Radiat* **21**, 1378-1383
77. Sekiguchi, Y., Oroguchi, T., and Nakasako, M. (2016) Classification and assessment of retrieved electron density maps in coherent X-ray diffraction imaging using multivariate analysis. *J Synchrotron Radiat* **23**, 312-323
78. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
79. Iwasa, H., Meshitsuka, S., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2011) Covalent structural changes in unfolded GroES that lead to amyloid fibril formation detected by NMR: insight into intrinsically disordered proteins. *J Biol Chem* **286**, 21796-21805
80. Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hisanaga, S., Goedert, M., and Hasegawa, M. (2006) Small Molecule Inhibitors of α -Synuclein Filament Assembly. *Biochemistry* **45**, 6085-6094
81. Faria, A., Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., de Freitas, V., and Mateus, N. (2005) Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *J Agric Food Chem* **53**, 6896-6902
82. Oszmianski, J., Wojdylo, A., Gorzelany, J., and Kapusta, I. (2011) Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/MS. *J Agric Food Chem* **59**, 12830-12835
83. Brader, L., Overgaard, A., Christensen, L. P., Jeppesen, P. B., and Hermansen, K. (2013) Polyphenol-rich bilberry ameliorates total cholesterol and

- LDL-cholesterol when implemented in the diet of Zucker diabetic fatty rats. *Rev Diabet Stud* **10**, 270-282
84. Baysal, I., Yabanoglu-Ciftci, S., Tunc-Sarisozen, Y., Ulubayram, K., and Ucar, G. (2013) Interaction of selegiline-loaded PLGA-b-PEG nanoparticles with beta-amyloid fibrils. *J Neural Transm (Vienna)* **120**, 903-910
85. Chiti, F., Bucciantini, M., Capanni, C., Taddei, N., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2001) Solution conditions can promote formation of either amyloid protofilaments or mature fibrils from the HypF N-terminal domain. *Protein Sci* **10**, 2541-2547
86. Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6448-6453
87. Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., and Lansbury, P. T., Jr. (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 571-576
88. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**, 507-511
89. Stefani, M., and Dobson, C. M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med (Berl)* **81**, 678-699
90. Stefani, M. (2010) Biochemical and biophysical features of both oligomer/fibril

- and cell membrane in amyloid cytotoxicity. *FEBS J* **277**, 4602-4613
91. Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3590-3594
 92. Bucciantini, M., Calloni, G., Chiti, F., Formigli, L., Nosi, D., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2004) Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *J Biol Chem* **279**, 31374-31382
 93. Cheon, M., Chang, I., Mohanty, S., Luheshi, L. M., Dobson, C. M., Vendruscolo, M., and Favrin, G. (2007) Structural reorganisation and potential toxicity of oligomeric species formed during the assembly of amyloid fibrils. *PLoS Comput Biol* **3**, 1727-1738
 94. Bolognesi, B., Kumita, J. R., Barros, T. P., Esbjorner, E. K., Luheshi, L. M., Crowther, D. C., Wilson, M. R., Dobson, C. M., Favrin, G., and Yerbury, J. J. (2010) ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS Chem Biol* **5**, 735-740
 95. Yagi, H., Sato, A., Yoshida, A., Hattori, Y., Hara, M., Shimamura, J., Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2008) Fibril formation of hsp10 homologue proteins and determination of fibril core regions: differences in fibril core regions dependent on subtle differences in amino acid sequence. *J Mol Biol* **377**, 1593-1606
 96. Yagi, H., Takeuchi, H., Ogawa, S., Ito, N., Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., Goto, Y., and Kawata, Y. (2010) Isolation of short peptide fragments from alpha-synuclein fibril core identifies a residue important for fibril nucleation: a possible implication for diagnostic applications. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 2077-2087
 97. Porat, Y., Abramowitz, A., and Gazit, E. (2006) Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a

- common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des* **67**, 27-37
98. Ehrnhoefer, D. E., Duennwald, M., Markovic, P., Wacker, J. L., Engemann, S., Roark, M., Legleiter, J., Marsh, J. L., Thompson, L. M., Lindquist, S., Muchowski, P. J., and Wanker, E. E. (2006) Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet* **15**, 2743-2751
 99. Ehrnhoefer, D. E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A., and Wanker, E. E. (2008) EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 558-566
 100. Hudson, S. A., Ecroyd, H., Dehle, F. C., Musgrave, I. F., and Carver, J. A. (2009) (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) maintains kappa-casein in its pre-fibrillar state without redirecting its aggregation pathway. *J Mol Biol* **392**, 689-700
 101. Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Muto, Y., Takizawa, T., and Terao, J. (2001) In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J Nutr* **131**, 2885-2891
 102. Abd El Mohsen, M. M., Kuhnle, G., Rechner, A. R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., and Rice-Evans, C. A. (2002) Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med* **33**, 1693-1702
 103. Tsuda, T., Horio, F., and Osawa, T. (1999) Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Lett* **449**, 179-182
 104. Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., and Someya, K. (1999) Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem* **47**,

- 1083-1091
105. Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M., Tominaga, S., Hirayama, M., and Tsuda, T. (2001) Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem* **49**, 1546-1551
 106. Cao, G., Muccitelli, H. U., Sanchez-Moreno, C., and Prior, R. L. (2001) Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr* **73**, 920-926
 107. Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Fraisse, D., Lamaison, J. L., and Remesy, C. (2002) Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. *J Nutr* **132**, 1249-1253
 108. Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. L., and Remesy, C. (2005) Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem* **53**, 3902-3908
 109. Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., and Mattivi, F. (2005) Fast access of some grape pigments to the brain. *J Agric Food Chem* **53**, 7029-7034
 110. Kalt, W., Blumberg, J. B., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Fillmore, S. A., Graf, B. A., O'Leary, J. M., and Milbury, P. E. (2008) Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J Agric Food Chem* **56**, 705-712
 111. Barros, D., Amaral, O. B., Izquierdo, I., Geracitano, L., do Carmo Bassols Raseira, M., Henriques, A. T., and Ramirez, M. R. (2006) Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **84**, 229-234
 112. Masuda, M., Dohmae, N., Nonaka, T., Oikawa, T., Hisanaga, S., Goedert, M., and Hasegawa, M. (2006) Cysteine misincorporation in bacterially expressed

- human alpha-synuclein. *FEBS Lett* **580**, 1775-1779
113. Jenke, D. R., and Brown, D. S. (1987) Determination of cysteine in pharmaceuticals via liquid chromatography with postcolumn derivatization. *Anal Chem* **59**, 1509-1512
 114. Mo, Y., Lei, J., Sun, Y., Zhang, Q., and Wei, G. (2016) Conformational Ensemble of hIAPP Dimer: Insight into the Molecular Mechanism by which a Green Tea Extract inhibits hIAPP Aggregation. *Sci Rep* **6**, 33076
 115. Li, W., West, N., Colla, E., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Marsh, L., Dawson, T. M., Jakala, P., Hartmann, T., Price, D. L., and Lee, M. K. (2005) Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2162-2167
 116. Ysselstein, D., Joshi, M., Mishra, V., Griggs, A. M., Asiago, J. M., McCabe, G. P., Stanciu, L. A., Post, C. I. B., and Rochet, J. C. (2015) Effects of impaired membrane interactions on α -synuclein aggregation and neurotoxicity. *Neurobiology of Disease* **79**, 150-163
 117. Noguchi, A., Matsumura, S., Dezawa, M., Tada, M., Yanazawa, M., Ito, A., Akioka, M., Kikuchi, S., Sato, M., Ideno, S., Noda, M., Fukunari, A., Muramatsu, S., Itokazu, Y., Sato, K., Takahashi, H., Teplow, D. B., Nabeshima, Y., Kakita, A., Imahori, K., and Hoshi, M. (2009) Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (A β) assembly from Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* **284**, 32895-32905
 118. Vendruscolo, M., Knowles, T. P., and Dobson, C. M. (2011) Protein solubility and protein homeostasis: a generic view of protein misfolding disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**
 119. Rodriguez, J. A., Ivanova, M. I., Sawaya, M. R., Cascio, D., Reyes, F. E., Shi, D., Sangwan, S., Guenther, E. L., Johnson, L. M., Zhang, M., Jiang, L., Arbing, M.

- A., Nannenga, B. L., Hattne, J., Whitelegge, J., Brewster, A. S., Messerschmidt, M., Boutet, S., Sauter, N. K., Gonen, T., and Eisenberg, D. S. (2015) Structure of the toxic core of alpha-synuclein from invisible crystals. *Nature* **525**, 486-490
120. Solomon, J. P., Bourgault, S., Powers, E. T., and Kelly, J. W. (2011) Heparin binds 8 kDa gelsolin cross-beta-sheet oligomers and accelerates amyloidogenesis by hastening fibril extension. *Biochemistry* **50**, 2486-2498
121. Lam, H. T., Graber, M. C., Gentry, K. A., and Bieschke, J. (2016) Stabilization of alpha-Synuclein Fibril Clusters Prevents Fragmentation and Reduces Seeding Activity and Toxicity. *Biochemistry* **55**, 675-685
122. Nors Perderson, M., Fodera, V., Horvath, I., van Maarschalkerweerd, A., Norgaard Toft, K., Weise, C., Almqvist, F., Wolf-Watz, M., Wittung-Stafshede, P., and Vestergaard, B. (2015) Direct Correlation Between Ligand-Induced alpha-Synuclein Oligomers and Amyloid-like Fibril Growth. *Sci Rep* **5**, 10422
123. Bai, J., Zhang, Z., Liu, M., and Li, C. (2015) alpha-synuclein-lanthanide metal ions interaction: binding sites, conformation and fibrillation. *BMC Biophys* **9**, 1
124. Braun, A. R., Sevcsik, E., Chin, P., Rhoades, E., Tristram-Nagle, S., and Sachs, J. N. (2012) alpha-Synuclein induces both positive mean curvature and negative Gaussian curvature in membranes. *J Am Chem Soc* **134**, 2613-2620
125. Zhang, M., Hu, R., Ren, B., Chen, H., Jiang, B., Ma, J., and Zheng, J. (2016) Molecular Understanding of Abeta-hIAPP Cross-Seeding Assemblies on Lipid Membranes. *ACS Chem Neurosci*
126. Choi, J. K., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Gambetti, P., and Surewicz, W. K. (2016) Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 13851-13856