2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　５ 月 ３１ 日現在

機関番号：６３９０３

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：１６Ｋ０５８５８

研究課題名（和文）脂質膜を介した生体超分子構造形成機構の解析に資する固体NMR測定法開発と適用

研究課題名（英文）Novel Approach of Solid-State NMR to Reveal Molecular Mechanism of Supramolecular Structural Formation of Biomolecules Through Lipid Bilayers

研究代表者

西村　勝之（Nishimura, Katsuyuki）

分子科学研究所・物質分子科学研究領域・准教授

研究者番号：００３３４６３１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究では、脂質二重膜との相互作用により特定構造を取り、分子間で会合して複合体を形成し、その機能を発現する膜表在性タンパク質、および、脂質結合ペプチドの立体構造解析に有効な固体核磁気共鳴(NMR)分光法の開発を試みた。さらにこれら手法を用いて、脂質膜上で誘起されるアルツハイマー病の発症に深く関与すると考えられるアミロイドβ(1-40)の線維化前の会合中間体の立体構造の決定を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
アルツハイマー病は、多くの国民に直接関わる重要な疾患であるが、その発症機構の解明、および完治可能な治療薬の開発には至っていない。当該疾患の発症に深く関与することが示唆されているアミロイドβが形成する不溶性アミロイド線維形成の分子機構解明は、同疾患治療および予防の実現に必要不可欠な研究課題である。本研究は、この解明に大きく寄与することが期待され、学術的、社会的にもその意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：　We have explored to develop effective techniques of solid-state NMR for structural characterizations of peripheral membrane proteins and peptides which express their functions based on their supramolecular structures conformed by associations among them and interactions with lipid bilayers. On the other hand, amyloid-β has been considered to play crucial roles in the onset and developments of Alzheimer's disease through the fomation of insoluble amyloid fibrils. In this study, we have also explored structural characterization of oligomeric state amyloid-β(1-40) induced on model neuronal lipid membranes based on solid-state NMR.

研究分野：構造生命科学

キーワード：固体NMR　アミロイドβ　オリゴマー　脂質膜　構造解析

１．研究開始当初の背景

アミロイドβ(Aβ)ペプチドはアルツハイマー病の発症、および進展に大きな役割を果たす因子と考えられ、凝集して不溶性のアミロイド線維を形成する。近年、この線維化が神経細胞膜表面で促進されることが報告されている。このような脂質膜上で生じる会合状態では、相関時間の問題から溶液 NMR では信号が観測できない。一方、結晶調製は不可能であり、X 線結晶解析などによる解析もできない。このため、固体 NMR による解析が極めて有効である。研究代表者らはこれまで、一連の 2 次元固体 NMR による解析から、一般的なモデル中性脂質膜、1,2 dimyristoryl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC)上で誘起された Aβ40 会合中間体の立体構造の決定に成功している。

神経細胞膜上に形成させるラフトの構成分子である糖鎖脂質 GM1 は、Aβと特異的な結合能を有することが報告されており、GM1 含有脂質二重膜は最も単純化されたモデル細胞膜と言える。GM1 上に結合した Aβ単量体、および Aβ線維構造はすでに決定されており、このモデル膜上で誘起される Aβ会合中間体を補足し、その分子構造を決定することにより、神経細胞膜上で誘起される Aβの単量体から線維化までの分子機構の解明に極めて重要な知見を与えることが期待される。

しかし、これら脂質膜含有試料は試料中のペプチド濃度が低下することから、固体 NMR スペクトル感度が低下する。GM1 の極性頭部は体積が大きく DMPC のみの二重膜に比べ、相対的に試料中のペプチド含量がさらに大幅に低下する。このため、精密な構造解析には、多大な時間を必要とする。この状況を少しでも改善するため、信号帰属に必要な測定法における感度向上は極めて重要である。

２．研究の目的

神経細胞膜上で誘起される Aβ線維化における Aβと特異的結合能を有する GM1 の寄与を理解するため、モデル神経細胞膜として GM1 および DMPC からなるベシクル上で誘起された Aβ会合体を補足し、その分子構造を 2 次元固体 NMR による解析から決定することにより明らかにすることを試みた。また、この実現に必要な固体 NMR の高感度化を目的に新規測定法開発を試みた。また、生体分子以外の超分子材料の分子構造解析に資する解析手法の検討、および適用を試みた。

３．研究の方法

本研究では、全ての固体 NMR 測定は、分子科学研究所機器センター所有 Bruker 社製 Avance600 分光器、および 2.5mm ^{1}H/^{13}C/^{15}N 3 重共鳴 magic angle spinning(MAS)プローブ、JEOL 社製 ECA920 MHz 分光器、および 4.0 mm ^{1}H-^{13}C 2 重共鳴 MAS プローブ、および当グループ所有の Bruker 社製 Avance400 III HD 分光器、および 2.5mm ^{1}H-X 2 重共鳴 MAS プローブを用いて行った。測定法の検討には、複数の参照試料を用いた。解析対象の試料は、複数の共同研究者より提供を受けた。中心的な解析対象である Aβは、^{13}C、^{15}N 安定同位体全標識、アミノ酸種選択的安定同位体標識した Aβ(1-40)等を用い、プロテオリポソームを調製し、解析を行った。また、これ以外に、複数原子間距離情報の同時取得の検討のため、^{13}C 安定同位体全標識 Ala トリペプチドを用いた。さらに、超分子構造例として、新規に化学合成された超分子複合体、合成高分子の解析を行った。詳細は以下の各項目で述べる。

(1) GM1、および DMPC からなるベシクルを調製し、^{13}C、^{15}N 安定同位体全標識 Aβ(1-40)、スピンラベルを C 末端に導入した 5%非標識 Aβ(1-40)と ^{13}C、^{15}N 安定同位体全標識 Aβ(1-40)を 95%混合した試料、およびアミノ酸種特異的に安定同位体標識した複数の試料を各々調製したプロテオリポソームを超遠心により遠心沈降させ、直ちに凍結乾燥することにより、脂質膜表面に結合した Aβ会合体を補足した。

固体 NMR の測定は、dipolar assisted rotational resonance(DARR)法を用いて、5-400 ms までの混合時間を変化させ、^{13}C 同種核間相関固体 NMR スペクトルを得た。また、^{13}C-^{15}N 異種核相関固体 NMR で NCA、NCO スペクトルを得た。スピンラベルした試料でも同様な測定を行った。

(2) ^{13}C、^{15}N 安定同位体全標識試料において、連鎖信号帰属に必要な ^{15}N-^{13}C 異種核 2 次元相関 NMR の根幹をなす Double Cross Polarization(DCP)法の改良を行うため、最も単純化されたモデルペプチドとして、^{13}C、^{15}N 安定同位体全標識 N-acetyl-Val、および GB1 微結晶試料を各々、化学合成、生合成により調製し、参照試料として用いた。これらの試料を用いて、既存の測定法、さらに改良型測定法の問題点を実験的に検証し、理論的検証によりこれら測定法の性能低下を誘起する因子の検討を行い、新規測定法の開発を試みた。

(3) 磁気双極子相互作用に基づく 2 次元同種核相関 NMR 法の一つ、DARR から得られる同種核相関スペクトルに、proton driven spin diffusion(PDSD)で用いられている解析手法を適用し、同時に複数の精密原子間距離情報が取得可能か否か検討を行った。絹モデルペプチドの解析に用いた構造が既知の ^{13}C 安定同位体全標識したアラニントリペプチド結晶試料を用いた。

(4) 高度な周期的構造を有する合成超分子の例として、新規多成分 covalent organic

frameworks(COF)の構造解析を行った。COFは、分子ユニットから周期的構造を形成する結晶性多孔質ポリマー群である。通常、1つの節と1つのリンカーからなる2成分[1+1]凝縮系を用いて合成される。本研究では、1つの節と2つ、または3つのリンカーユニットを用いる多成分[1+2]、[1+3]凝縮系を用いて調製された新規COF分子に関して、固体NMRによる分子構造解析を行った。

また、局所構造分布が存在する合成超分子の例として、半導体材料の洗浄ガスとして入手容易な環状フッ素化合物、オクタフルオロシクロペンテン(OFCP)を出発原料とするモノマー開発とその高分子化により合成された新規透明樹脂の化学組成の同定と分子構造、および状態解析を目的に固体NMRによる構造解析を行った。

(5) 2分子の超分子複合体例として、以下のようならせん構造複合体の構造解析を試みた。立体構造の制御された合成高分子であるシンジオタクチックポリメタクリル酸メチル(st-PMMA)は、トルエン溶液を高温加熱後、室温へ冷却することにより、ラセン構造を形成しゲル化する。さらに、本スキームにおいてフラーレン(C_{60})を共融解させることにより、st-PMMAの形成するらせん空孔内にC_{60}が包摂された錯体を形成することを見いだしている。本研究では、C_{60}をキャリアーとして用い、st-PMMAらせんの内部空孔内へのらせんペプチド鎖の包摂を試み、調製された試料のらせん複合体形成の正否について、固体NMRを用いて分子状態解析に基づく検証を試みた。

４．研究成果

(1)糖脂質含有二重膜表面で誘起されるアミロイドβ会合状態の固体NMRを用いた構造解析

一連の^{13}C同種核、^{13}C-^{15}N異種核相関NMRスペクトルの解析から、観測されたほぼ全ての信号の帰属に成功し、これらの信号は、Val^{12}からVal^{40}残基であることが判明した。また、これら帰属に基づき得られた^{13}C、^{15}N化学シフト値を用いてTALOS-Nで二次構造解析を行ったところ、2-3のβシート構造がランダムコイルにより繋がれた構造を有することが判明した。既報のGM1含有ミセル上で誘起された単量体、およびDMPC二重膜上で誘起されたオリゴマーの双方との比較から、C末端側のβシートはGM1有無とは無関係に誘起されており、中央残基付近のβシートは、GM1含有試料でのみ誘起されることが判明した。すなわち、C末端側のβシートは、脂質膜とAβ(1-40)との疎水性相互作用により誘起され、中央残基付近のβシートは、GM1とAβ(1-40)との特異的な相互作用により誘起された構造であると結論が得られた。ここまでの解析により、GM1との相互作用がAβ(1-40)の特異的βシート構造誘起に関与することが判明した。

さらに、長い混合時間100-400 msでのDARRスペクトルの解析から、遠距離の相関信号を特定した。さらに、スピン標識試料のparamagnetic relaxation enhancement(PRE)の解析からC末端の常磁性中心がSer^{26}残基の近隣に存在することが判明した。これらの一連の解析から、GM1含有脂質膜上で誘起されたAβ(1-40)オリゴマーの分子間配座の決定のための有効な情報を得ることに成功した。今後、得られたデータから精密な分子間配座決定を完了し、論文投稿を行う予定である。本研究成果は、細胞膜上で誘起されるアミロイド線維の分子機構の解明に重要な知見を与えることが強く期待される。

(2) ^{13}C-^{15}N異種核相関NMR法のための効率的固体交差分極法の開発

連鎖信号帰属に必須である^{15}N-^{13}C異種核2次元相関NMRのスペクトル感度、および信頼性は、^{15}N-^{13}C分極移動法に依存している。同分極移動を担うDCP法の特性は、既報の研究から、^{13}C、^{15}N核各々の化学シフト異方性、搬送周波数セッティング、^{1}Hデカップリング強度等の複数の因子に依存することが判明している。化学シフト異方性は磁場強度に比例し、同相互作用に起因するスピニングサイドバンド(SSB)の抑制のため、高磁場では高速MASの使用が必須となる。一方、^{15}N-^{13}C核間交差分極中の^{1}Hデカップリング強度は、^{13}C、^{15}N核のラジオ波の3倍以上が好ましいが、^{1}H-^{13}C-^{15}N 3重共鳴プローブでは、構造上の制約から適用可能な^{1}Hデカップリング強度上限は100 kHz程度であり、^{13}Cおよび^{15}N核に適用可能なラジオ波強度に上限が存在する。

以上を前提に、高磁場で有効なDCP法の開発を試みた。通常のDCP法で、搬送周波数のオフセット依存性、ラジオ波強度変化の依存性、^{1}Hデカップリング強度の依存性などの複数の因子に関してテストを行い、これら因子への高い依存性、さらに交差分極効率が理論値より著しく低いことを実験的に確認した。この改善のため、一方の核種へ適用するラジオ波強度をスイープするRAMP-CP法を適用し、最適傾斜値を実験的に導出した。本改善によりDCP法に対して1.5倍程感度が改善された。さらに、改良型DCP法であるi-DCP法に関して同様にテストを行った。当該論文と同一条件である600 MHz NMR (14.1T)で用いられている低速MAS条件である6kHzより高速な、12kHzの条件下では、論文の報告結果とは異なり、通常のDCPと同程度の分極効率しか得られないことが判明した。この理由について平均ハミルトニアン理論を用いて、オフセットの高次項の寄与について計算を行い、適用するラジオ波強度とMAS周波数の依存性を明らかにした。さらに、同依存性を除去するi-DCPの改良型を検討した。

(3) ^{13}C安定同位体全標識試料における^{13}C同種核相関固体NMRの解析に基づく定量的原子間距

離情報の同時取得

固体NMRでは、孤立スピン対の磁気双極子相互作用に基づく磁化の時間発展の解析から、分子構造解析に極めて重要な精密原子間距離情報を取得することが可能である。しかし、生体分子の系統的構造解析で一般的に用いられる安定同位体全標識試料は、多スピン系である。固体NMR では、多スピン系の磁気双極子相互作用に基づく磁化の時間発展を精密に解析するのは困難であり、溶液NMRのNOESYのような確立された手法は存在しない。

本研究では、^{13}C安定同位体全標識した生体分子において、磁気双極子相互作用に基づく２次元同種核相関NMR法の一つ、DARR法から得られる同種核相関スペクトルに、proton driven spin diffusion(PDSD)で用いられている解析手法を適用し、同時に複数の精密原子間距離情報が取得可能か否か検討を行った。X 線結晶構造解析により、逆平行βシート構造が報告されているトリアラニンペプチドの^{13}C安定同位体全標識をモデル試料として、10から400 msまでの複数の混合時間に対して測定したDARRスペクトルを測定した。各スペクトルでの双極子結合サイト間の対角ピークで規格化した交差ピーク強度を混合時間に対してプロットし、最適曲線をフィッティングして、実験的に求めたゼロ量子曲線形状関数を考慮した場合とそうで無い場合の双方に関して原子間距離を求めた。得られた原子間距離は、ゼロ量子曲線形状関数を考慮しなくてもX線結晶解析の結果と1-6Åの範囲で平均偏差0.244Åで一致することが判明した。本研究成果は同手法を用いた固体NMR同時複数距離情報取得のための解析において、距離の精度、確度に関するリファレンスデータとなることが期待される。

(4) 新規多成分COF分子および環状フルオロアルキル骨格を有する含フッ素透明性樹脂の固体NMRを用いた構造解析

新規に調製された、１つの節と２つのリンカーからなる３成分[1+3]COF分子、および、１つの節と３つのリンカーからなる４成分[1+3]COF分子の各々に関して、^{13}C-CPMAS、およびこれらにpolarization inversionを組み合わせた^{13}C-CPPIなどの各種スペクトル編集測定法を適用して炭素種を同定し、化学シフト値に基づき ^{13}C 信号の定性的帰属を達成した。これにより当該分子が目的とした分子状態にあることの検証に成功した。また、本研究は、高い評価を受け、論文は著名な雑誌に受理された。

OFCPを出発原料として合成された含フッ素ポリカーボネート、およびその原料となる３種の試料各々に関して、固体NMR測定を行った。強力な^{19}F–^{13}C異種核間磁気双極子相互作用に起因する^{13}C信号広幅化を抑制するため、高速MASによる当該相互作用の時間平均化を試みた。^{19}F核と直接化学結合している^{13}C核周辺は^{1}H核が存在せず、分極移動が生じ難く、かつ^{19}F–^{13}C異種核間磁気双極子相互作用により広幅化して、信号が消失していることが判明した。dipolar dephasing 等の手法を組み合わせた各種スペクトル編集測定を行い、炭素種を同定し、化学シフト値に基づき観測されたほぼ全ての ^{13}C 信号について定性的帰属を達成した。これらの一連の固体NMRの解析から、目的とした含フッ素樹脂の合成に成功していることが判明した。本研究は、高速MASにより、特殊な^{1}H–^{19}F–^{13}C三重共鳴プローブを用いることなく、含フッ素材料の構造解析の可能性を示すことができた。

(5)　人工らせん高分子–らせんペプチド複合体の固体NMRによる構造解析

らせん構造の形成が期待されるAib含有ペプチドを有するC_{60}誘導体とst-PMMAをトルエン溶液中で高温加熱後、室温へ冷却することにより、ペプチドC_{60}誘導体がst-PMMAらせん内部空孔に包摂された分子複合体の調製を試みた。st-PMMA、ペプチド-C_{60}誘導体、およびそれらの複合体試料の１次元^{13}C-CPMAS固体NMRスペクトル、および接触時間60 μsの^{1}H–^{13}C ２次元固体異種核相関NMRスペクトルの解析から、^{1}Hおよび^{13}C信号帰属を行った。^{13}C-CPMAS固体NMRのスペクトルの比較から、ペプチド-C_{60}誘導体のst-PMMAのらせん空孔への包摂を示唆するC_{60}由来の^{13}C信号の変化が観測された。さらに、複合体試料の接触時間２ msの^{1}H–^{13}C ２次元固体異種核相関NMRスペクトルにおいて、st-PMMAのメチレン、メトキシ基由来の^{1}HとC_{60}由来の^{13}Cの間で 4Åを上限とする ^{1}H–^{13}C 分子間相関信号を観測した。本結果から、複合体中で、st-PMMAとペプチド-C_{60} 誘導体分子が近接して存在しているが判明した。さらに、分子配座の関係からペプチド-C_{60}誘導体が、st-PMMAらせんの内部空孔に包摂された状態でのみ、このような相関信号が観測しうることが判明した。以上の解析から、同分子複合体は目的とした包摂状態にあることを検証に成功した。本研究は、重要な成果として高い評価を受け、論文が受理された雑誌の表紙を飾った。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　4　件）

① S. Kataoka, H. Fukumoto, T. Kawasaki-Takasuka, T. Yamazaki, K. Nishimura, T. Agou, T. Kubota、Effective Synthesis and Their Copolymerization of Fluorine-Containing Phenanthrene with Hydroxyl Group、Journal Fluorine Chemistry、査読有、Vol.218、2019、

pp.84-89
DOI: 10.1016/j.jfluchem.2018.11.017

② A. Naito, K. Okushita, K. Nishimura, G. S. Boutis, A. Aoki, T. Asakura、Quantitative Analysis of Solid-State Homonuclear Correlation Spectra of Antiparallel β-sheet Alanine Tetramer、Journal of Physical Chemistry B、査読有、Vol.122、2018、pp.2715-2724
DOI: 10.1021./acs.jpcb.7b11126

③ N. Ousaka, F. Mamiya, Y. Iwata, K. Nishimura, E. Yashima、"Helix-in-Helix" Superstructure Formation through Encapslation of Fullerene-Bound Helical Peptides within a Helical Poly(methyl methacrylate) Cavity、Angewante. Chemie. International Edition、査読有、Vol.56、2017、pp.791-795
DOI:10:1002/anie.201611349

④ N. Huang, L. Zhai, D. E. Coupry, M. A. Addicoat, K. Okushita, K. Nishimura, T. Heine, D. Jiang, "Multiple-component covalent organic frameworks", Nature communications, 査読有、Vol.7、2016、pp12325(1-12)
DOI:10.1038/ncomms12325

〔学会発表〕(計 3 件)
① 矢木 真穂、西村 勝之、加藤 晃一、"固体NMRによるGM1ガングリオシド膜上におけるアミロイドβの構造解析"、日本薬学会第139回年会、2019

② 矢木 真穂、加藤 晃一、西村 勝之、"固体NMRを用いたガングリオシド膜上におけるアミロイドβの構造解析"、第57回NMR討論会、2018

③ M. Yagi-Utsumi, K. Nishimura, K. Kato, "NMR Characterization of Conformational Transition of Amyloid-β Promoted in Membrane Environments"、27th International Conference of Magnetic Resonance in Biological Systems、2016

〔図書〕(計 1 件)
① K. Nishimura、M. Tanio、S. Tuzi、"Structure and Dynamics of Membrane Bound Proteins"、Modern Magnetic Resonance、Springer International Publishing、 2016、
DOI:10.1007/978-3-319-28275-6_62-1

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。