

令和元年6月20日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13730

研究課題名(和文)新しい中性子小角散乱測定法によるアミロイド線維中の蛋白質の構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of proteins in amyloid fibrils using a new method of small-angle neutron scattering

研究代表者

藤原 悟 (FUJIWARA, Satoru)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員(定常)

研究者番号：10354888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は新しい中性子小角散乱の測定法を開発し、通常の測定では解析できない、不規則構造中の個々の蛋白質の構造解析を行うことを目的としている。そのために、様々な難病発症と関係する蛋白質の線維状異常凝集体(アミロイド線維)、特にパーキンソン病発症に関係する蛋白質  $\alpha$ -シヌクレインのアミロイド線維について、これまで困難であった線維中の  $\alpha$ -シヌクレインの構造解析を行った。この方法による実験から得られた散乱曲線のふるまいが理論と一致したことを確認し、この方法の実用性を実証した。得られた線維の解析の結果、 $\alpha$ -シヌクレインは線維中でも伸びた構造を取ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、中性子小角散乱の新しい測定法を開発する。この方法により小角散乱曲線を歪める粒子間干渉効果を分離して個々の蛋白質の散乱曲線を解析することができる。この方法により初めてアミロイド線維のような配列の乱れた蛋白質凝集体中の個々の蛋白質の構造解析が可能となる。このように、この新しい測定法により、これまで解析することができなかった様々な不規則構造系の構造解析が可能となり、中性子小角散乱の有用性がさらに大きく広がるとともに、不規則構造系の研究の大きな進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a new method of small-angle neutron scattering (SANS) for analyzing the structure of individual proteins with eliminating the effects of the inter-protein interferences. This enables one to analyze the structure of proteins within disordered aggregates. Using this method, we analyzed the structure of the protein,  $\alpha$ -synuclein (aSyn), within amyloid fibrils. This system is important because formation of amyloid fibrils of aSyn is closely related to the pathogenesis of Parkinson's disease. This new method employs deuterated proteins, so we deuterated aSyn, and verified that this deuterated protein has similar characteristics to the usual hydrogenated proteins. We carried out the SANS measurements on amyloid fibrils of aSyn using the new method. Comparison of the observed SANS curves with the theory indicated the feasibility of this method. Analysis of the curves obtained suggested that in the fibrils, aSyn adopts extended structures.

研究分野：生物物理学、量子ビーム科学

キーワード：中性子小角散乱 重水素化蛋白質 アミロイド線維 シヌクレイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 小角散乱法は、近年の解析法の発展とも相まって、溶液中の蛋白質の構造解析の手法として重要となっている。しかしながら小角散乱は基本的に単分散の希薄溶液を仮定するため、解析の際、散乱曲線を歪める粒子間干渉効果の除去が問題となる。通常は、試料濃度シリーズの測定による濃度ゼロへの外挿により除去しているが、粒子間干渉が強い不規則凝集体構造等に対しては、干渉効果を解析的に記述する一般式が存在しないため、干渉効果を除去して蛋白質構造を解析することができない。

(2) アミロイド線維は、蛋白質の線維状異常凝集体であり、パーキンソン病やアルツハイマー病など種々の疾病発症と密接に関連している。疾病発症機構解明には、関連蛋白質のアミロイド線維形成機構解明が重要であるが、そのためには、線維中の蛋白質の構造解析を行わなければならない。アミロイド線維は、線維中の蛋白質の配列の大きな乱れや粒子間干渉のため、結晶解析や繊維回折、電子顕微鏡、また通常の小角散乱や溶液 NMR が適用できず、固体 NMR も、2 次構造の同定あるいはコア領域の解析に留まっているため、個々の蛋白質の全体構造は明らかとなっていない。

(3) 粒子間干渉を除去しうる中性子小角散乱法が、いくつか提案されている(Hoppe, *J. Mol. Biol.* 1973; Pavlov & Serdyuk, *J. Appl. Cryst.* 1987; Fujiwara & Mendelson, *J. Appl. Cryst.* 1994)が、いずれも特殊な方法であり、実用化されたとは言えない。一般的な適用が可能な測定法の開発が必要である。研究代表者は、こうした方法を検討する中で、重水素化蛋白質を用いて粒子間干渉効果を除去しうる、簡便な、新しい中性子小角散乱測定法に思い至った。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は、重水素化蛋白質を利用して、粒子間干渉を除去した形で個々の蛋白質の構造解析を可能とする新しい中性子小角散乱測定法を提案し、アミロイド線維中の蛋白質の構造解析に適用することにより、その方法を確立することを目的とする。

(2) 試料として、パーキンソン病発症と密接に関連する蛋白質 $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ Syn)を用いる。 $\alpha$ Syn のアミロイド線維形成がパーキンソン病発症と密接に関係するといわれており、発症機構解明の上で、線維形成機構の研究は重要である。その線維形成機構解明の手掛かりとして、線維中の $\alpha$ Syn の構造情報が重要である。本研究では、この新しい方法による $\alpha$ Syn のアミロイド線維の中性子小角散乱測定を行い、線維中の $\alpha$ Syn の全体構造を解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究で提案する新しい測定法は、目的とする蛋白質を重水素化し、その重水素化蛋白質と通常の蛋白質とを様々な量比で混合した混合系の中性子小角散乱を行い、得られた曲線を混合比の関数として統一的に解析することで、粒子間干渉効果と個々の蛋白質からの散乱を分離するという方法である。この方法の基盤となっているのは、重水素化蛋白質の性質が、通常の蛋白質と同様で、混合系を調製したとき、ランダムに混ざり合うということである。

(2) 従って、本研究遂行には、(a)  $\alpha$ Syn の重水素化を行い、(b) 重水素化 $\alpha$ Syn が通常の軽水素を持つ $\alpha$ Syn と同様の性質であることを確認し、その上で (c) 重水素化 $\alpha$ Syn と通常の $\alpha$ Syn の混合系を調製し、その混合系のアミロイド線維についての中性子小角散乱実験を行う、という段階が必要である。

(3) (a)については、研究代表者の研究室で確立した蛋白質重水素化の手法を用いて、 $\alpha$ Syn の重水素化を行った。(b) については、重水素化 $\alpha$ Syn 及び通常の $\alpha$ Syn のそれぞれについて X 線小角散乱実験 (X 線は重水素と水素を区別しない) を実施し、同様の散乱曲線が得られるかどうか

かを調べることで、同様の性質を持つことを確認した。X線小角散乱実験は、あいちシンクロトロン光センターの小角散乱装置 BL8S3 を用いて実施した。(c)の中性子小角散乱実験は、J-PARCセンターの小角散乱装置 BL15 TAIKAN を用いて実施した。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究提案の新しい中性子小角散乱測定法を実施するためには、蛋白質重水素化が必須である。そこで、まず蛋白質重水素化をルーチンで行えるように実験室を整備し、研究対象である $\alpha$ Synの重水素化を行った。重水素化は研究代表者の実験室で確立した方法(重水中で光独立栄養条件下で培養した緑藻から得られた重水素化緑藻ペプトンを栄養源として、大腸菌を重水中で培養し、蛋白質を発現させることで重水素化を行う)を用いて、重水素化 $\alpha$ Synを得た。質量分析により、98%重水素化が達成されたことが確認された。

(2) 得られた重水素化 $\alpha$ Synが通常の $\alpha$ Synと同様の構造を持つかどうかを確認するために、X線小角散乱実験を実施した。単量体状態及びアミロイド線維状態の $\alpha$ Synそれぞれについて測定を行った。図1に、通常の $\alpha$ Syn (H-Syn)と重水素化 $\alpha$ Syn (D-Syn)のKratkyプロットを示す。それぞれの散乱曲線はよく一致しており、D-Synは、H-Synと同様の構造を取っていることを示している。

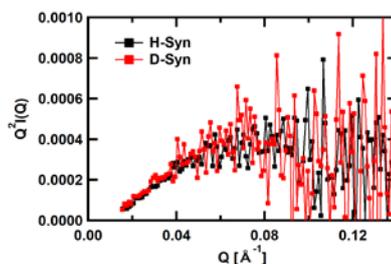


図1. 重水素化 $\alpha$ Syn (H-Syn)と通常の $\alpha$ Syn (D-Syn)のX線小角散乱曲線のKratky ( $Q \cdot Q^2 I(Q)$ )プロット

(3) さらにD-Synのアミロイド線維形成の時間経過をH-synの場合と比較し、同様の時間経過でアミロイド線維が形成されることを確認した。また、D-Synのアミロイド線維の小角散乱測定から、D-Synのアミロイド線維もH-Synのアミロイド線維と同様の構造を持つことを確認した。これらの結果から、D-SynはH-Synと同様の性質を持つことが確認された。従って、H-SynとD-Synの混合系においてアミロイド線維を形成させる場合でも、H-Synの線維とD-Synの線維が分離して形成されることはないと考えてよい。このことは本研究の新しい測定法が実験可能であることを示している。

(4) 蛋白質試料の妥当性が確認されたので、実際に、様々な割合で混合したH-SynとD-Synの混合溶液でアミロイド線維を形成させ、それらの試料についての中性子小角散乱実験を実施した。混合比(D-Syn / H-Syn) 0% (H-Syn溶液), 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 100% (D-Syn溶液)の溶液のそれぞれについて、中性子小角散乱測定を行った。図2に、それぞれの散乱曲線(散乱ベクトルの絶対値 $Q (= 4\pi\sin\theta/\lambda)$ , 但し $2\theta$ は散乱角、 $\lambda$ は入射中性子の波長)の関数となる)を示す。混合比に応じて散乱曲線が変化することがわかる。

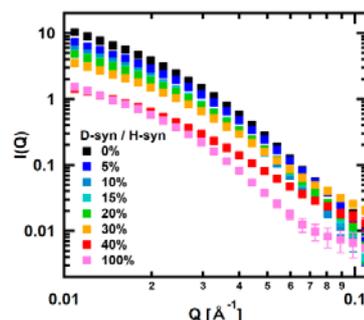


図2. 様々な混合比のH-Syn/D-Syn混合溶液の中性子小角散乱曲線

(5) これらの散乱曲線を混合比の関数として記述し、その理論式を各 $Q$ においてフィッティングすることで、 $\alpha$ Syn単量体の構造情報を抽出することができる。図3に、そのフィットの例を示す。混合比の小さいところで、実験データが理論式でよくフィットできることがわかる。混合比が大きいくところでの理論式からのずれは、D-Synの量が多くなるために、重水素化蛋白質はランダムに分布するという基

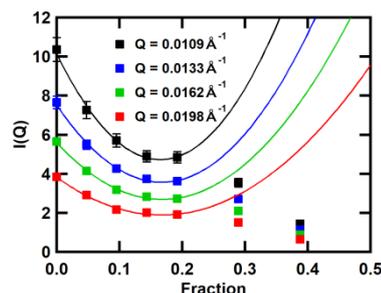


図3.混合比の関数としての散乱曲線への理論式のフィット

本的仮定が成立しなくなるためと考えられる。溶液中で $\alpha$ Syn 単量体は伸びた構造を取っている (Fujiwara et al. J. Mol. Biol., in press) が、これらのフィットの結果から、アミロイド線維中においても、溶液中と同様の構造を取っていることが示唆された。これは、線維中のクロス $\beta$ 構造で $\alpha$ Syn 同士が直接会合している領域以外の領域には、蛋白質間に多くの空間が存在し、多くの水和水が存在することを示唆する。線維中の $\alpha$ Syn のダイナミクスを考えるうえで重要な情報である。このように、アミロイド線維のような乱れた巨大凝集体中でも単量体の構造情報の抽出が可能であり、本研究提案の新しい中性子小角散乱測定法の有用性が示された。本方法は中性子小角散乱の可能性をさらに大きく広げる成果である。現在、本方法についての投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① S. Fujiwara, F. Kono, T. Matsuo, Y. Sugimoto, T. Matsumoto, A. Narita, and K. Shibata, "Dynamic Properties of Human  $\alpha$ -Synuclein Related to Propensity to Amyloid Fibril Formation." (2019) J. Mol. Biol. in press (DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.047) (査読あり)
- ② S. Fujiwara, "Dynamic aspects of amyloid fibrils of  $\alpha$ -synuclein related to the pathogenesis of Parkinson's disease." (2017) J. Alzheimer's Dis. Parkinsonism, 7, 310-313. (DOI : 10.4172/2161-0460.1000310) (査読あり)

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 藤原悟、松尾龍人、杉本泰伸「Structural analysis of human  $\alpha$ -synuclein within amyloid fibrils by small-angle scattering」第 57 回日本生物物理学会年会、2019 年
- ② 河野史明、松尾龍人、高田慎一、杉本泰伸、藤原悟「小角散乱によるヒト $\alpha$ -シヌクレインのアミロイド線維の構造解析」日本中性子科学会第 18 回年会、2018 年
- ③ 藤原悟「Protein deuteration for neutron scattering」Meeting on Deuteration Labeled Compound for Neutron Science (招待講演) 2018 年
- ④ 藤原悟「Protein deuteration using algal peptone for neutron scattering」J-PARC workshop "Deuterated materials enhancing neutron science for structure function applications" (招待講演) 2018 年
- ⑤ 河野史明、松尾龍人、高田慎一、杉本泰伸、藤原悟「Structural characterization of amyloid fibrils of human  $\alpha$ -synuclein by small-angle scattering」第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年
- ⑥ 河野史明、松尾龍人、富永大輝、柴田薫、荒木克哉、望月秀樹、藤原悟「Relationship between the dynamics of human  $\alpha$ -synuclein and its propensity to form amyloid fibrils」第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：松尾龍人

ローマ字氏名：(MATSUO, tatsuhito)

研究協力者氏名：河野史明

ローマ字氏名：(KONO, fumiaki)