

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0075

研究課題名（和文）Rheo-NMRによる乱流の速度イメージング

研究課題名（英文）Velocity imaging of turbulence flow using Rheo-NMR

研究代表者

菅瀬 謙治（Sugase, Kenji）

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00300822

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：Rheo-NMRはNMR管内にガラス棒を挿入し、そのガラス棒を回転させることで流れを発生させながらNMR測定ができる装置である。本研究ではガラス棒の回転軸をずらすことでNMR管内にどのような流れが発生するのか、さらには回転軸をずらした状態で高感度・高分解能NMR測定ができる新しいRheo-NMR装置を製作することを目的として研究を行った。共同研究先のドイツのポリマー研究所において水の流れをイメージングした結果、ガラス棒とは逆方向に回転する流れが部分的に生じることが分かった。また、新しいRheo-NMR装置については、NMR装置に装着してテストを行える段階まで開発が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内を含む自然界では溶液の流れが普遍的に存在し、そのような流れは様々な分子に多様な影響を及ぼす。例えば、流れはリゾチームやアスピリンの結晶化を促進する。このような現象はよく知られたものであるが、なぜそうなるのかはよく分かっていない。そもそも流れの中の分子を原子レベルで解析できるのはRheo-NMRだけである。ただし、従来のRheo-NMRは回転軸がNMR管の中心に来るように設計され、流れの向きが揃った層流だけを発生させる。一方、本研究では回転軸をずらした際に生じる乱流に着目し、その性質の一端を明らかにした。本研究結果は、流れという非平衡系に関する学問を進展させるものである。

研究成果の概要（英文）：Rheo-NMR is an NMR system in which a glass rod is inserted into an NMR tube and rotated to generate a flow while performing NMR measurements. In this study, we investigated the flow generated in the NMR tube by shifting the axis of rotation of the glass rod, and furthermore, we aimed to fabricate a new Rheo-NMR system that can perform high-sensitivity, high-resolution NMR measurements while the axis of rotation is shifted. The results of water flow imaging at the Polymer Research Institute in Germany, with which we are collaborating, show that a flow partially rotating in the opposite direction to that of the glass rod is generated. The development of the new Rheo-NMR system has progressed to the stage where it can be tested by attaching it to an NMR system.

研究分野：生物物理学

キーワード：Rheo-NMR 速度イメージング off-center Couette cell 乱流 タンパク質凝集

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クモ糸タンパク質や神経変性疾患に関するタンパク質は、物質の流動による力で線維化する。生体内や工業プロセスなどの様々な場面でタンパク質は物質の流動による影響を受けるが、原子レベルでは何が起きているかがよく分かっていない。そもそも、物質の流動の影響を原子レベルで解析できる手段が存在しない。このような状況の中、報告者はタンパク質の線維化を研究するツールとして Rheo-NMR に着目した。Rheo-NMR は、剪断流(速度勾配のある層流)をかけながら NMR 測定を行える装置で、主にポリマーの粘弾性などを研究する目的で開発された¹。原理的にはタンパク質にも適用可能であるが、報告者が興味を持った3年前の日本には Rheo-NMR 装置が存在しなかった。そのため、Rheo-NMR を所有する The Leibniz Institute of Polymer Research Dresden(ドイツ)の Ulrich Scheler(本研究の共同研究者)を訪問して、Rheo-NMR がタンパク質の解析に有効か否かを図った。その結果、剪断流の速さに依存して NMR スペクトルが変化し、Rheo-NMR がタンパク質の解析に有効であることが強く示唆された。しかし、Scheler の Rheo-NMR は、ポリマー用であるためタンパク質の解析には感度が十分ではなかった。そこで、報告者は当研究室の高感度極低温プローブ付き NMR をベースにして高感度 Rheo-NMR 装置を製作した(図1)。この装置では、NMR 管にガラス棒を挿入し、NMR 管だけを回転することで剪断流を発生させる。同装置を用いると、例えば、剪断流によりユビキチンの構造の硬さが局所的に変化することが分かった²。

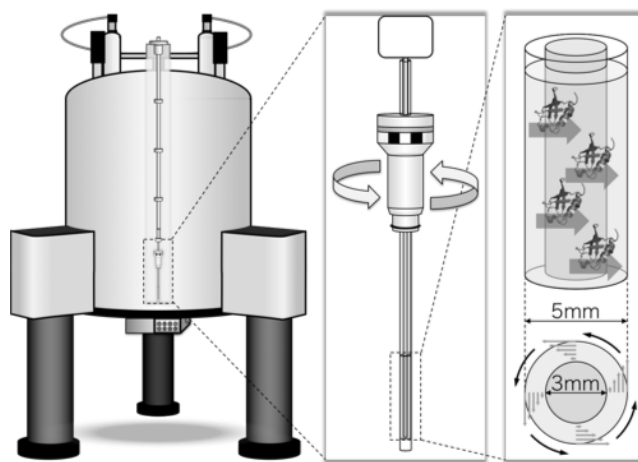


図1 開発したRheo-NMR装置

このように興味深い結果が得られ始めたが、開発した Rheo-NMR 装置では速い回転で振動が生じ、感度が下がる問題があった。そこで、モーターで回転する Rheo-NMR 二号機の製作に取り組んだ。この開発において、まず Rheo-NMR 二号機のドライブシャフトを省略した回転攪拌装置(コエットセル)を製作した。このコエットセルを用いてタンパク質の線維化をテストしたところ不可解な結果が得られた。それは、これまで Rheo-NMR で容易に線維化したタンパク質がコエットセルでは全く線維化しないというものである。コエットセルでは極めて完璧に近い層流(方向が揃った流れ)からなる剪断流を発生できる。完璧な層流とは、ガラス棒と NMR 管の中心が完璧に合った状態で発生する流れである。興味深いことに、この回転中心をずらすとタンパク質が線維化した。この条件では乱流が発生しているため、タンパク質が線維化するには乱流が必要であることが分かった。血流や原形質流動などの生体内の流れを想像すると、それらには間違いなく乱流が混じっているはずである。しかし、乱流の場合、物質の流動を記述するナビエ・ストークス方程式を解析的に解けないため論理的な解析が何も進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、ガラス棒と NMR 管の中心をずらすことにより生じる乱流に焦点を絞った。中心が完璧に合えば層流だけになり、ズレが大きくなると乱流の割合が高くなる。乱流の理論的な解

析については、共同研究者の Scheler は、イメージング機能の付いた Rheo-NMR 装置を所有しており、NMR 管内の水の流れの速度分布を三次元的にイメージングできるため、本研究では、直接、実験的に NMR 管の各位置でどのような速度の流れ(乱流のプロファイル)があるのかを観測することにした。速度分布が分かれば、NMR 管内の各位置でタンパク質に及ぼす力が見積もれる。

一方、申請者らの Rheo-NMR 装置は、剪断流によるタンパク質の構造変化の解析などができる。すでに同装置を用いてタンパク質の線維化機構の解明に取り組んでいる。しかし、ガラス棒と NMR 管の中心を系統的にずらす機能がないため、本研究ではそのような機能を持った新しい Rheo-NMR 装置を開発し、乱流中におけるタンパク質の振る舞いを実際に観測し、Scheler の成果と融合することにより、乱流がタンパク質に及ぼす影響の全体像を描写することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 乱流の速度イメージング

Scheler の Rheo-NMR 装置を用いて水の流れの速度イメージングを行った。10 mm の NMR 管内に 5mm の PEEK 棒を挿入し、PEEK を回転させるセットアップで流れのイメージングを行った。なお、PEEK 棒の中心は、NMR 管の中心に合わせた状態とずらした状態で実験を行った。

(2) 新型 Rheo-NMR 装置の開発

現行の Rheo-NMR 装置では NMR 管内にガラス棒を挿入し、窒素ガスによって NMR 管だけを回転させる形式であったが、新型 Rheo-NMR 装置ではモーターを NMR 磁石の上部に置き、ガラス棒だけを回転させる形式とした。また、NMR 管とガラス棒を 1 つの治具に固定し、ドライブシャフトを通してモーターの回転をガラス棒に伝える設計とした。

4. 研究成果

(1) 乱流の速度イメージング

回転中心をずらした際にどのようなイメージングができるのか、またどのような問題が発生するのかについて調査を行った。その結果、回転中心をずらすと間隙が狭い方では速く水が移動するのに対して、間隙が広い方では、興味深いことに、回転軸(ガラス棒)の回転方向とは逆向きに水が流れることが分かった(図 2)。なお、この速度イメージングのプロファイルは計算流体力学法によっても再現できることを確認している。

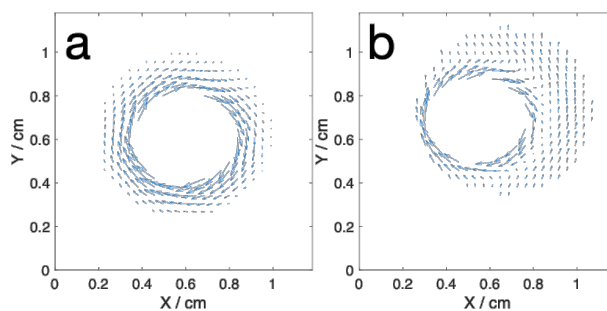


図2 Rheo-NMRによる流れの速度イメージング
(a)回転軸が中心にあるとき。(b)回転軸がずれているとき。

(2) 新型 Rheo-NMR 装置の開発

開発中の Rheo-NMR 装置はサンプル部・モーター部・ドライブシャフトから構成される(図 3a)。図 3b に示すオレンジ色の筒状のものは、Bruker 社の NMR 磁石の中心に挿入されているアッパースタックシムと呼ばれる部品である。Bruker 社の NMR 磁石では、磁石の大きさが異なってもアッパースタックシムの長さが変わるだけである。そのため、図 3b 上部の黒色モーターとの接点部分のアッパースタックシムの形状は、大きさの異なる NMR 磁石でも変わらない。まずはこのアッパースタックシムの上部にモーターを接続する治具を作製した。図 3b 上部を見ると、この治具から黒い突起が 1 つ、それよりも小さい銀色の突起が 2 つ出ているが、これらは乾燥空

気のチューブをアップスタックシムに接続するための部品である。今回の治具の製作ではこの突起を利用して、治具の位置を固定できるようにした。

次に、NMR 管と NMR 管の中に挿入する外径 3mm のガラス棒を固定する治具であるサンプル部を製作した (図 3c) この治具の開発では、NMR 管とガラス棒の中心が正確に揃えることが課題であったが、10 μM 以下の精度で治具を製作することによって、この課題を解決できた。

さらにドライブシャフトを開発した。図 3c の銀色の部分がドライブシャフトである。この銀色の部分は実際には筒状になって

おり、その中にはモーターの回転を伝達するアルミ棒とそれを支える非磁性のボールベアリングが挿入されている。このボールベアリングはドイツから取り寄せたものが良い性能を示すことが分かった。

さらにモーターの回転をガラス棒に伝えるドライブシャフトを製作した。モーターに接続し、回転させると、当初、かなりの振動が発生し、最高速度である 4000 rpm では正常に回転しなかったが、ドライブシャフトとモーターの接続にゴムチューブを用いることによって振動が低減し、4000 rpm でも安定して回転するようになった。

なお、以上の研究活動の成果として、10 報の雑誌論文と 3 回の学会発表を行い、1 件の産業財産権を申請した。以下にその詳細を記す。

雑誌論文

- 1) Nishizawa M., Walinda E., Morimoto D., Kohn B., Scheler U., Shirakawa M., Sugase K., "Effects of weak non-specific interactions with ATP on proteins." *J. Am. Chem. Soc.* **143**(31), 11982–11993 (2021). 査読あり, DOI: 10.1021/jacs.0c13118
- 2) Iwakawa N., Morimoto D., Walinda E., Shirakawa M., Sugase K., "Multiple-state monitoring of SOD1 amyloid formation at single-residue resolution by Rheo-NMR spectroscopy." *J. Am. Chem. Soc.* **143**(28), 10604–10613 (2021). 査読あり, DOI: 10.1021/jacs.1c02974
- 3) Morimoto D., Osugi M., Mahana Y., Walinda E., Shirakawa M., Sugase K., "Backbone resonance assignments of the A2 domain of mouse von Willebrand factor." *Biomol. NMR Assign.* **15**(2), 427–431 (2021). 査読あり, DOI: 10.1007/s12104-021-10041-8
- 4) Sorada T., Morimoto D., Walinda E., Sugase K., "Molecular recognition and deubiquitination of cyclic K48-linked ubiquitin chains by OTUB1." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **562**, 94–99 (2021). 査読あり, DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.05.031
- 5) Walinda E., Morimoto D., Sorada T., Iwai K., Sugase K., "Expression, solubility monitoring, and purification of the co-folded LUBAC LTM domain by structure-guided tandem folding in autoinducing cultures." *Protein Expr. Purif.* **187**, 105953 (2021). 査読あり, DOI: 10.1016/j.pep.2021.105953
- 6) Iwakawa N., Morimoto D., Walinda E., Leeb S., Shirakawa M., Danielsson J., Sugase K., "Transient diffusive interactions with a protein crowder affect aggregation processes of superoxide dismutase 1 β -barrel." *J. Phys. Chem. B* **125**(10), 2521–2532 (2021). 査読あり, DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c11162
- 7) 森本大智, 菅瀬謙治, "第6章 第2節 Rheo-NMR による生体高分子の動的構造解析." *NM*

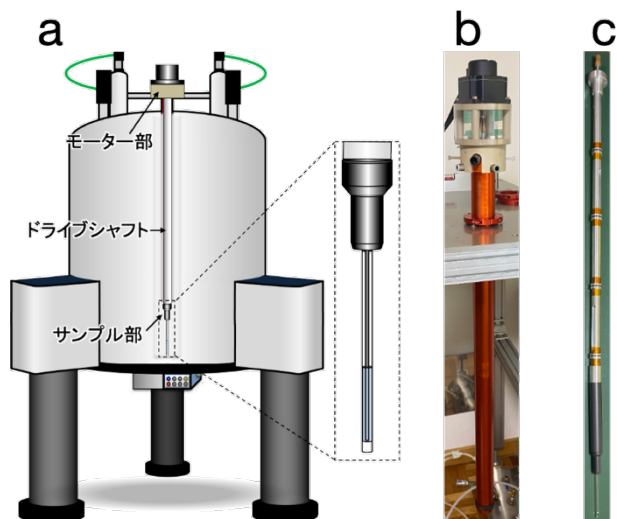


図3 開発中の新型Rheo-NMR装置
(a)完成予定図 (b) NMR磁石の外で組み上げたRheo-NMR装置 (c) モーター部を外し、ドライブシャフトとサンプル部だけを接続

Rによる有機材料分析とデータ解釈 事例集, 技術情報協会, 518–525 (2021).

- 8) Walinda E., Morimoto D., Shirakawa M., Scheler U., Sugase K., “Visualizing protein motion in Couette flow by all-atom molecular dynamics.” *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* **1864**(2), 129383 (2020). 査読あり, DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.06.006
- 9) 森本大智, 菅瀬謙治, “生体分子レオロジー-NMRの開発と応用.” *日本核磁気共鳴学会機関誌* **10**, 64–68 (2019). 査読あり
- 10) 森本大智, 菅瀬謙治, “高感度 Rheo-NMR によるアミロイド線維化過程のその場観察.” *細胞* **51**, 608–612 (2019).

学会発表

- 1) Kenji Sugase, In situ Monitoring of Amyloid Fibril Formation Processes Using Rheo-NMR, 8th APNMR, 2019
- 2) Daichi Morimoto, Amyloid formation of poly-ubiquitin chains investigated by biological rheo-NMR spectroscopy, EUROMAR 2019, 2019
- 3) Walinda Erik, Molecular fluid dynamics description of Rheo-NMR, EUROMAR 2019, 2019

産業財産権

名称:剪断流を発生させる器具

発明者:菅瀬謙治、森本大智、保科好秀

権利者:京都大学

種類:特許

番号:特許願 2019-111013 号

出願年:令和 1 年

国内外の別:国内

<引用文献>

- ① Nakatani et al., *Macromolecules* **23**(10), 2686-2692 (1990).
- ② Morimoto et al., *Anal. Chem.* **89**(14), 7286-7290 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoto Iwakawa, Daichi Morimoto, Erik Walinda, Sarah Leeb, Masahiro Shirakawa, Jens Danielsson, and Kenji Sugase	4. 巻 125
2. 論文標題 Transient Diffusive Interactions with a Protein Crowder Affect Aggregation Processes of Superoxide Dismutase 1 Barrel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 2521-2532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c11162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Walinda, E., Morimoto, D., Shirakawa, M., Scheler, U. and Sugase, K.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Visualizing protein motion in Couette flow by all-atom molecular dynamics.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.	6. 最初と最後の頁 129383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 森本 大智、菅瀬 謙治	4. 巻 10
2. 論文標題 生体分子レオロジーNMRの開発と応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本核磁気共鳴学会機関誌	6. 最初と最後の頁 64-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森本 大智、菅瀬 謙治	4. 巻 685
2. 論文標題 高感度Rheo-NMRによるアミロイド線維化過程のその場観察	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 32-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Daichi, Osugi Masanori, Mahana Yutaka, Walinda Erik, Shirakawa Masahiro, Sugase Kenji	4. 巻 15
2. 論文標題 Backbone resonance assignments of the A2 domain of mouse von Willebrand factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecular NMR Assignments	6. 最初と最後の頁 427 ~ 431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12104-021-10041-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sorada Tomoki, Morimoto Daichi, Walinda Erik, Sugase Kenji	4. 巻 562
2. 論文標題 Molecular recognition and deubiquitination of cyclic K48-linked ubiquitin chains by OTUB1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 94 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishizawa Mayu, Walinda Erik, Morimoto Daichi, Kohn Benjamin, Scheler Ulrich, Shirakawa Masahiro, Sugase Kenji	4. 巻 143
2. 論文標題 Effects of Weak Nonspecific Interactions with ATP on Proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 11982 ~ 11993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c13118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwakawa Naoto, Morimoto Daichi, Walinda Erik, Shirakawa Masahiro, Sugase Kenji	4. 巻 143
2. 論文標題 Multiple-State Monitoring of SOD1 Amyloid Formation at Single-Residue Resolution by Rheo-NMR Spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 10604 ~ 10613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c02974	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Walinda Erik, Morimoto Daichi, Sorada Tomoki, Iwai Kazuhiro, Sugase Kenji	4. 巻 187
2. 論文標題 Expression, solubility monitoring, and purification of the co-folded LUBAC LTM domain by structure-guided tandem folding in autoinducing cultures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 105953 ~ 105953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2021.105953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kenji Sugase
2. 発表標題 In situ Monitoring of Amyloid Fibril Formation Processes Using Rheo-NMR
3. 学会等名 8th APNMR (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daichi Morimoto
2. 発表標題 Amyloid formation of poly-ubiquitin chains investigated by biological rheo-NMR spectroscopy
3. 学会等名 EUROMAR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Walinda Erik
2. 発表標題 Molecular fluid dynamics description of Rheo-NMR
3. 学会等名 EUROMAR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森本大智、菅瀬謙治	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 676
3. 書名 第6章 第2節 Rheo-NMRによる生体高分子の動的構造解析.” NMRによる有機材料分析とデータ解釈事例集	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 剪断流を発生させる器具	発明者 菅瀬謙治、森本大智、保科好秀	権利者 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許願2019-111013号	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Publication http://www.moleng.kyoto-u.ac.jp/~moleng_01/publications.html Research Highlights http://www.moleng.kyoto-u.ac.jp/~moleng_01/research.html 高分解能で見るアミロイド線維形成 - アルツハイマー病やALSなどの発症機構理解のための新たな研究手法 - https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-07-09-2 凝集抑制剤としてのATPの機能を解明 - ATPが神経変性疾患の発症を抑制する - https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-08-03
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森本 大智 (Morimoto Daichi) (40746616)	京都大学・工学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	Walinda Erik (Walinda Erik) (80782391)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------