

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：63903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05552

研究課題名(和文) 超分子構造の分子間配座解析に資する固体NMR解析法開発とその適用

研究課題名(英文) Novel solid-state NMR approach for characterizations of intermolecular arrangements in supramolecules

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超分子構造の分子間配座解析に資する固体核磁気共鳴(NMR)分光法の解析手法を開発し、当該手法をアミロイドタンパク質会合体の構造解析に適用した。アルツハイマー病発症に深い関与が示唆されるアミロイド(1-40)がモデル神経細胞膜上で誘起する会合体の精密分子構造、および分子間配座決定に成功した。これら実験事実に基づき、神経細胞膜上での同アミロイド線維形成分子機構モデル構築に成功した。

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、多くの国民が直接関わる可能性の高い重大な疾患であるが、その発症分子機構は未だに解明されておらず、完治可能な治療薬の開発にも至っていない。当該疾患の発症、発展に深く関与することが示唆されているアミロイドが形成するアミロイド線維形成の分子機構解明は、同疾患の有効な治療薬開発、および予防に必要不可欠な課題である。本研究は神経細胞膜上で特定脂質との相互作用に基づき形成されるアミロイド線維形成の解明を目指して行ってきた研究であり、本研究結果は、これらの課題解決に対して、極めて重要な分子基盤を与えることが強く期待される。

研究成果の概要(英文)：We explored to develop effective analysis approaches of solid-state NMR for precise determinations of molecular structures with their molecular packing in supramolecules. Those approaches were applied to a structural determination of oligomeric state amyloid- (1-40) induced on model neuronal cell membranes, in which has been considered to play crucial roles in the onset and developments of Alzheimer's disease. Consequently, we have successfully determined precise molecular structure of amyloid- (1-40) and their intermolecular packing in their oligomers. Based on those experimental evidences, we have also successfully developed model molecular process for amyloid fibril formation of amyloid- (1-40) catalyzed on the surface of neuronal cell membranes.

研究分野：固体NMR

キーワード：アミロイド 分子間配座 解析法 構造解析 固体NMR Amyloid

1. 研究開始当初の背景

生体には同種、異種分子からなる複雑な分子複合体を形成する生体分子が多数存在する。多くの神経変性疾患では、傷害を受ける神経に異常タンパク質が凝集、沈着していることが報告されている。この凝集体は、本来可溶性のアミロイドタンパク質が会合して形成された不溶性アミロイド線維が主成分であり、共通の分子機構による発症が想定されている。同タンパク質の一つ、アミロイド β (A β)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形成されたアミロイド線維は、水溶液中で形成された同線維とは分子構造が異なることが報告されている。特に線維形成の前段階となる会合状態(オリゴマー)は強い細胞毒性を有することが報告されている。しかし、脂質膜上で形成されるオリゴマーは、相関時間が長くなるため溶液 NMR では信号が観測できない。更に結晶調製も不可能な為、X 線結晶解析もできない。この為、固体 NMR による構造解析が極めて有効である。申請者らはこれまで、固体 NMR による解析から、一般的なモデル中性脂質膜、1,2 dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC)上で誘起された A β (1-40)オリゴマーの立体構造の決定に成功している(引用文献①)。同分子は、N 末端側は特定構造を持たず、C 末端側が平行 β シート構造を形成して分子間で会合する構造を示した。

一方、糖鎖脂質 GM1 は神経細胞膜上に多数存在し、A β と特異的な結合能を有することが報告されており、DMPC/GM1 混合脂質膜中で GM1 はラフト様のクラスターを形成することが報告されている。DMPC のような中性脂質に GM1 を含有する脂質二重膜は最も単純化されたモデル神経細胞膜と言える。GM1 上に結合した A β 単量体、および A β 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 A β 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 A β 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。

2. 研究の目的

神経細胞膜上で誘起される A β 線維の形成分子機構を解明することを目的として、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 A β 会合体を補足し、その分子構造を 2 次元固体 NMR による解析から詳細な分子構造決定を試みた。必要な 2 次元相関固体 NMR の解析から分子内、分子間相関信号を分離し、距離情報を取得することを試みた。さらに実験的に得られたこれらの情報を抑制条件として、抑制条件付き分子動力学計算から詳細な分子構造、および分子間配座を決定することを試みた。得られた分子構造、および分子配座から、GM1 含有脂質膜上で誘起されるオリゴマーのアミロイド線維形成分子機構モデルの構築を試みた。

3. 研究の方法

全ての固体 NMR 測定は、分子科学研究所機器センターBruker 社製 Avance600 分光器、および 2.5mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 3 重共鳴 magic angle spinning(MAS)プローブを用いて行った。A β は、大量発現系により調製、精製された ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体全標識 A β (1-40)、および安定同位体非標識 A β (1-40)を用いた。GM1/DMPC からなる small unilamella vesicle (SUV)を調製し、適切な濃度の A β 水溶液を添加して、プロテオリポソームを調製した。超遠心分離器を用いて遠心沈降させ、上清を除去して脂質膜非結合 A β を分離した、沈降 SUV を回収して直ちに凍結乾燥させることにより同脂質膜上で形成されたオリゴマーを捕捉した。測定中の線維形成を避けるため、同試料は水和せずに乾燥状態で固体 NMR 測定を行った。

固体 NMR 測定は、dipolar assisted rotational resonance (DARR)法を用いて、10-400 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。さらに、分子内、分子間相関信号を区別するため、 ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体全標識 A β (1-40)を 70%、非標識 A β (1-40)を 30% 混合して調製した試料に関しても同様に一連の固体 NMR 測定を行った。

(1) DARR 法では、複数の混合時間で得られたスペクトルの相関信号強度変化に理論曲線をフィッティングする解析から、正確な原子間距離を同時に複数決定する解析法を過去に報告している(引用文献②)。しかし、本研究の様な低感度試料で多くの混合時間でのスペクトルを測定することは困難であり、溶液 NMR の NOESY スペクトルの解析のように、相関信号をおおまかな原子間距離領域に分別する解析法が必要である。このような解析手法は研究者毎に検討され、一律の手法が確立されていない。これは DARR スペクトルが測定に用いる磁場強度と MAS 測度に依存して変化することが理由の一つである。

本研究では、上記の測定で得られた一連の DARR- ^{13}C 同種核間相関固体 NMR の測定から、分子内、分子間長距離相関信号を区別する解析法を検討した。さらに、数点の異なる混合時間のスペ

クトルのみから、原子間距離領域を分別する解析法を検討した。

(2) β シート構造を前提とした分子間配座を定量的に決定するための磁気双極子相互作用の解析に基づく ^{13}C - ^{15}N 精密原子間距離測定法を用いた解析法の検討を行った。本解析では特定部位特異的安定同位体標識試料を用いても常に多スピン系になる。試料のスピン系を解析可能な少数スピン系へ減少させるための特定配座を仮定した効率的同位体標識法の検討を行った。

(3) 以前の研究成果報告書で報告しているように筆者らは一連の ^{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、化学シフト値の解析から得られた二次構造では、 $A\beta$ (1-40) の N 末端側は構造を持たず、中央、および C 末端側で β ストランド構造を示していた。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 Ser26 残基の近隣に存在することが判明している。

本研究では、上記情報に加え本研究で行った固体 NMR 測定から実験的に得られた距離情報、さらに化学シフト値の解析から得られた二面角情報 27 セットを抑制条件として抑制条件付き分子動力学計算を行った。さらに生化学実験により $A\beta$ (1-40) のオリゴマー中での膜面に対する相対配座に関する定性的情報を取得した。

4. 研究成果

(1) ^{13}C 同種核間相関固体 NMR 測定における分子間、分子内距離相関信号の分離法、および原子間距離領域情報取得法の開発

解析対象の $A\beta$ (1-40) オリゴマーの DARR- ^{13}C 同種核間相関固体 NMR スペクトルで直接検討を行った。まず、400ms の混合時間に関して、 ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体全標識 $A\beta$ (1-40) 100% で調製した試料、および ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体全標識 $A\beta$ (1-40) を 70%、非標識 $A\beta$ (1-40) を 30% 混合して調製した試料のスペクトルを比較することにより、相対的に強度減少した相関信号を分子間長距離相関信号として分子内長距離相関信号からの区別に成功した。

さらに混合時間が 100ms 以内のスペクトルが既知の 5 Å 以内の短距離相関信号を示したことから、100ms までの混合時間で初めて観測された相関信号を 5 Å 以内の短距離相関信号として区別した。次に 200-400ms の混合時間で初めて観測された相関信号を長距離信号として、5 Å \pm 2.5 Å と定めて区別した。200ms 以上の混合時間では、複数の相関信号が重複して複雑なスペクトルが観測される。客観性の高い信号解析を目指して、信号が分離している等区別が明瞭な信号のみの情報を取得した。14 の分子内短距離情報、10 の同長距離情報、13 の分子間短距離情報、12 の同長距離情報の取得に成功した。

(2) β シート構造を前提とした分子間配座を定量的に決定するための解析法の検討

rotational echo double resonance (REDOR) 法は MAS 下で ^{13}C 、 ^{15}N などの希薄異種核間の磁気双極子相互作用を復活させることにより精密原子間距離測定を行う手法であり、アミロイド線維の分子間配座解析などに用いられている。本測定法は、特定部位を特異的に ^{13}C および ^{15}N 安定同位体標識した試料を用いることを前提としている。周波数選択的パルスを用いたスピン選択性を可能にする派生版が存在するが、同一化学シフト値を示す信号は原理的に区別ができない。このため、分子間距離測定を行う場合、常にこの問題が存在する。

まず一般的な同一平面上に連続的に単一分子が平行、逆平行 β シート構造各々の場合を仮定して検討を行った。平行 β シート構造の場合、どのような同位体標識パターンを用いても常に分子内原子間距離が分子間原子間距離より短くなり、完全な 4 スピン系解析が必要になることが判明した。筆者はこれまでの研究で REDOR の多スピン系解析では、原子間距離情報に加え、原子間距離ベクトル間の相対角情報が必要であることを報告している(引用文献③)。このため、最も単純な構造を仮定しても同配座では、REDOR のスピンドYNAMIX 解析には、分子間配座情報が必要であり、構造決定を目的とした正確な原子間距離測定は不可能であることが判明した。一方、逆平行 β シートの場合は、特定条件下では、近似的 3 スピン系の解析が可能であることが判明した。既報の論文の多くでは、これら距離測定は平行 β シート構造の解析に適用されているが、多スピン系を考慮した解析は行われていない。この場合、誤った原子間距離を導出している可能性が示唆される。

(3) G1 含有脂質二重膜表面で誘起されるアミロイド β オリゴマーの固体 NMR を用いた構造決定と相対配座決定

初期構造の検討では、固体 NMR 測定から実験的に得られた構造情報、および距離情報を満たす $A\beta$ (1-40) オリゴマーの分子間配座は、中央 β ストランド、および C 末端側 β ストランドが各々異なる隣接 $A\beta$ (1-40) と逆平行 β シートを形成する分子配座のみであることが判明した。さらに可能な配座は 2 種類存在し、その内の一つが有効な配座であった。その有効な初期構造を用いて

末端効果を抑制するため、隣接する 8 分子に関して上記初期構造から分子動力学計算を行った。得られた分子構造では中央 β ストランド、および C 末端側 β ストランドが各々異なる隣接 $A\beta$ (1-40) と複数の分子間水素結合により逆平行 β シートを形成していることが判明した。

さらに共同研究者による TEM 測定から、本研究で用いた試料ではアミロイド線維は形成されていないことが証明され、解析した構造はオリゴマーであることが実験的に証明された。さらにチオフラビン T の蛍光測定に基づく線維形成経過解析から、本研究で用いた脂質膜存在下では、水中より線維化速度が増加することが判明した。さらに $A\beta$ (1-40) モノクローマ抗体を用いた Dot blot 解析から、オリゴマーの C 末端側は脂質膜面に存在するが、中央 β ストランド構造は溶媒に露出していること、更に $A\beta$ 線維の活性末端(成長点)にのみ結合する抗体が本試料にも強く結合することが判明した。

以上の一連の解析から、以下に示す新規分子機構の結論を得た。GM1 含有脂質膜上で $A\beta$ (1-40) は GM1 クラスターに特異的に結合することによりオリゴマーを形成する。 $A\beta$ (1-40) 中央 β シート構造は GM1 極性頭部と同程度の位置に存在する。同オリゴマー中の $A\beta$ (1-40) の中央 β シート構造は GM1 クラスター中に溶媒に露出されたアミロイド線維成長点と類似の特異的疎水表面を作り出し、これが神経細胞膜表面で $A\beta$ 線維成長のための特異的触媒表面を形成していると考えられる。

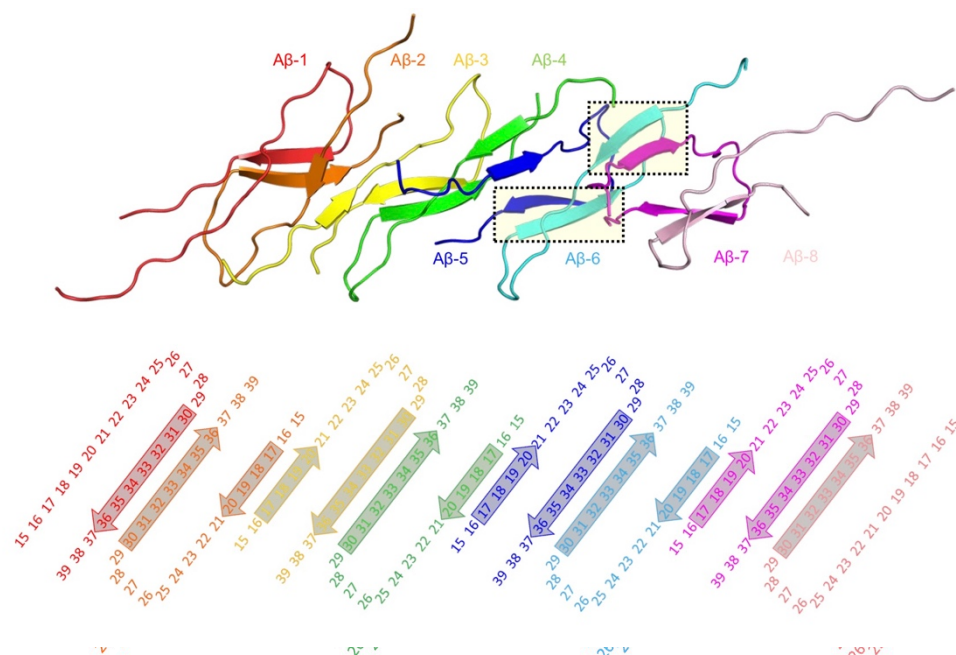


図 1 本研究で決定した $A\beta$ (1-40) オリゴマーの分子構造と隣接 8 分子の分子間配座

<参考文献>

- ① M. Yagi, K. Kato, K. Nishimura, Membrane-Induced Dichotomous Conformation of Amyloid β with the Disordered N-Terminal Segment Followed by the Stable C-Terminal β Structure, PLOS ONE, e0146405, 2016, 1-11
- 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, 122, 2018, 2715-2724
- ③ K. Nishimura, A. Naito, S. Tuzi, H. Saito, Analysis of dipolar dephasing pattern in I-Sn Multispin System for Obtaining the Information of Molecular Packing and its Application to Crystalline N-acetyl-Pro-Gly-Phe by REDOR Solid State NMR, J. Phys. Chem., 103, 1999, 8398-8404

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 K. Nishimura, M. Tanio	4. 巻 105
2. 論文標題 Functional and structural characterization of membrane-binding proteins using NMR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annual Reports in NMR spectroscopy	6. 最初と最後の頁 47-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.arnmr.2021.06.001	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢木真穂、西村勝之、加藤晃一
2. 発表標題 カングリオシド膜上におけるアミロイド の固体NMR解析
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西村 勝之	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 10
3. 書名 固体NMRによる膜タンパク質の構造解析」/ 創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------