

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780108

研究課題名(和文) アミロイド の毒性発現に係わるメチオニンラジカルの硫黄 33 固体 NMR による研究

研究課題名(英文)  $^{33}\text{S}$  solid-state NMR analysis of methionine radical inducing cytotoxicity of amyloid-beta protein

研究代表者

増田 裕一 (MASUDA, YUICHI)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90617755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)： $^{33}\text{S}$ 標識したメチオニンとシステインを $^{33}\text{S}$ 硫黄単体から有機合成した。さらに、アルツハイマー病因ペプチドであるアミロイド の35番目のメチオニン残基の硫黄原子を $^{33}\text{S}$ で標識した。合成した $^{33}\text{S}$ 標識メチオニンの $^{33}\text{S}$ 固体の核磁気共鳴(NMR)シグナルを初めて観測した。また、メチオニンスルホキシドの $^{33}\text{S}$ 溶液NMRシグナルを高感度・高分解能で観測することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We labeled sulfur atoms of methionine, cysteine and amyloid-beta with  $^{33}\text{S}$  by organic synthesis. We detected  $^{33}\text{S}$  NMR signals of methionine in solid-state and methionine sulfoxide in solution.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

キーワード：有機化学 アミロイド 固体NMR 硫黄 ラジカル

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病 (AD) の原因物質である 42 残基のアミロイド β (Aβ42) の神経細胞毒性発現機構の一つとして、ラジカル産生による酸化ストレスが指摘されている。Aβ42 の 35 番目のメチオニン残基 (Met-35) の硫黄原子が酸化されてできる硫黄ラジカルカチオンは非常に強い毒性を示すことから、その形成機構ならびに毒性発現機構の解明が強く望まれている。

(2) Aβ42 凝集体における Met-35 の硫黄原子の状態を NMR により直接解析することにより、ラジカル化の詳細なメカニズムが明らかになると考えられる。しかしながら、硫黄の同位体の中で NMR 信号が観測可能な核スピンの <sup>33</sup>S は、天然存在比が 0.76%、感度が <sup>13</sup>C の 10 分の 1、スピン量子数 3/2 の四極子核なので、明瞭な固体 NMR スペクトルを得ることは困難であり、高感度かつ高分解能な <sup>33</sup>S NMR 法の開発が希求されている。

2. 研究の目的

(1) <sup>33</sup>S 標識したメチオニンを有機合成し、Met-35 を <sup>33</sup>S 標識した Aβ42 凝集体サンプルを調製する。

(2) クライオコイル MAS プロブを用いることにより、生体試料の超高感度・高分解能 <sup>33</sup>S 固体 NMR 法を開発する。

(3) Aβ42 凝集体における Met-35 の硫黄原子の状態を <sup>33</sup>S NMR により精密に解析し、硫黄原子のラジカル化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) <sup>33</sup>S NMR シグナルを増幅する目的で、Aβ42 の Met-35 の硫黄原子の <sup>33</sup>S 標識を行った。有機化合物を <sup>33</sup>S 標識した研究例はないため、購入可能な <sup>33</sup>S 単体からの L-メチオニン合成法を確立した。

(2) 合成した <sup>33</sup>S 標識 L-メチオニンを用いて Aβ42 を合成した。ペプチド合成には、連携研究者の村上一馬准教授 (京大院農) の研究室が所有する連続フロー型合成機を用いた。得られた Aβ42 ペプチドから線維状の凝集体であるフィブリルを調製した。

(3) <sup>33</sup>S 固体 NMR の測定では、まず <sup>33</sup>S 標識 L-メチオニンなどのアミノ酸をモデル化合物として用い、測定条件の最適化を行った。次に、Met-35 を <sup>33</sup>S 標識した Aβ42 凝集体の <sup>33</sup>S NMR スペクトルを測定する。<sup>33</sup>S 固体 NMR の測定は、連携研究者の竹腰清乃理教授が所有する固体 NMR 装置を用いて行った。

4. 研究成果

(1) <sup>33</sup>S 標識した L-メチオニンの合成は、図 1 に示すスキームにより行った。ヒドラジン存

在下において硫黄単体と水酸化ナトリウムを反応させると、安定な二硫化物イオンが生成する。これを、側鎖がヨウ素化されたアミノ酸誘導体と求核置換反応させてジスルフィドとすることにより、<sup>33</sup>S を導入した。ジスルフィドを開裂させた後、チオールをメチル化することにより、<sup>33</sup>S 標識したメチオニンの合成を達成した。

同様の合成法を用いることによって、タンパク質の主要構成アミノ酸であるシステインの <sup>33</sup>S 標識にも成功した (図 1)。さらに、<sup>33</sup>S 標識したシスチン、メチオニンスルホキシド、メチオニンスルホンも合成することができた。現在、含流生体分子として重要なタウリンの合成も行っている。

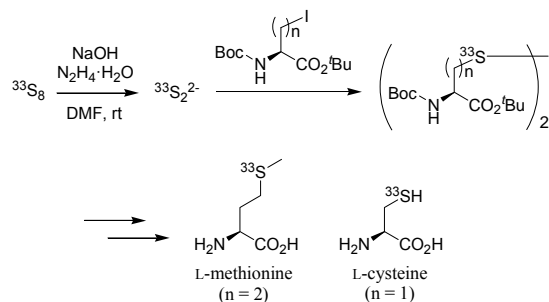


図 1 <sup>33</sup>S 標識したメチオニンとシステインの合成

(2) <sup>33</sup>S 標識メチオニンを用いて Aβ42 の固相ペプチド合成を行った。ポリエチレングリコールをスペーサ - としたポリスチレン樹脂を固相担体とし、HATU を活性化剤として用いた Fmoc 法を連続フロー型合成機で行うことにより、Aβ42 を高収率で合成した。得られた Aβ42 の粗ペプチドを HPLC により高純度に精製した。リン酸緩衝液中、37 °C でインキュベーションすることにより、線維状の凝集体であるフィブリルを調製した。

(3) 合成した <sup>33</sup>S 標識メチオニンを用いて <sup>33</sup>S 固体 NMR スペクトルを測定した。<sup>33</sup>S NMR の感度を向上させるため、<sup>1</sup>H の大きい磁化を <sup>33</sup>S に移す偏極移動法を用いた。その結果、感度が非常に悪いながらも、メチオニンの <sup>33</sup>S 固体 NMR シグナルを検出することに初めて成功した (図 2)。

ラジオ波の照射パワーや繰り返し時間などの測定条件の検討、クライオコイル MAS プロブの導入を行ったが、感度と分解能を向上させることができなかった。また、その原因として、<sup>33</sup>S の四極子相互作用が非常に強いことが考えられたため、本相互作用の強度をシミュレーションした。その結果、5 MHz 程度と予想より遥かに強いことが判明し、これがピークが極めて広がる原因であることが示唆された。

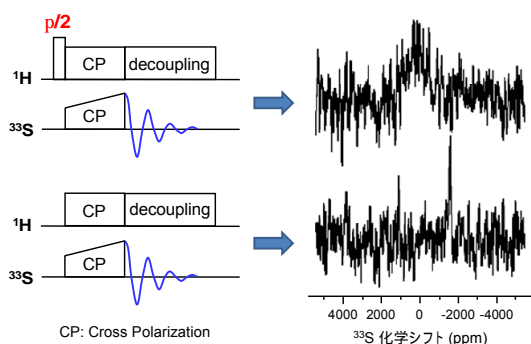


図2  $^{33}\text{S}$  標識メチオニンの  $^{33}\text{S}$  固体 NMR (上図) とバックグラウンド (下図)

(4) そこで、分子運動により線幅が細くなる溶液 NMR を用いた研究を行うことにした。まず、モデル化合物として四極子相互作用が比較的弱いメチオニンスルホキシドの  $^{33}\text{S}$  標識体を化学合成し、 $^{33}\text{S}$  溶液 NMR を測定した。その結果、200 Hz 程度の細い線幅の NMR シグナルを高感度で得ることに成功した(図3)。今後は、 $^{33}\text{S}$  標識メチオニン、続いて  $^{33}\text{S}$  標識 A $\beta$ 42 の溶液 NMR 測定を行う予定である。

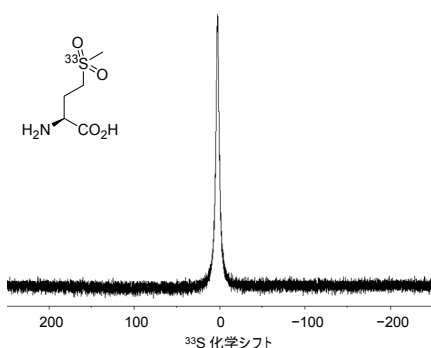


図3  $^{33}\text{S}$  標識メチオニンスルホキシドの  $^{33}\text{S}$  溶液 NMR スペクトル

(5) 本研究では、メチオニンやシステインなどの含硫アミノ酸を  $^{33}\text{S}$  硫黄単体から合成し、 $^{33}\text{S}$  NMR を高感度かつ高分解能で観測した。生体分子の  $^{33}\text{S}$  NMR を高感度で観測した例は、本研究が初めてのものである。今後は、含硫生体分子として知られているタウリンの  $^{33}\text{S}$  標識を行っており、これらのアミノ酸の合成法と  $^{33}\text{S}$  NMR 研究を論文としてまとめる予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- 1) Shen, M., Liu, Q., Trébosc, J., Lafon, O., Masuda, Y., Takegoshi, K., Amoureux, J. P.,

Hu, B., \* Chen, Q.: Exploring various modulation-sideband recoupling conditions of SHA+ sequence at fast MAS. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2013**, 55–56, 42–47. [査読あり]

DOI: 10.1016/j.ssnmr.2013.07.001

- 2) Sato, M., Murakami, K., Uno, M., Nakagawa, Y., Katayama, S., Akagi, K., Masuda, Y., Takegoshi, K., Irie, K.\*: Site-specific inhibitory mechanism for amyloid- $\beta$ 42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the Lys residues. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 23212–23224. [査読あり]  
DOI: 10.1074/jbc.M113.464222.

- 3) Doi, T., Masuda, Y.,\* Irie, K., Akagi, K., Monobe, Y., Imazawa, T., Takegoshi, K.: Solid-state NMR analysis of the  $\beta$ -strand orientation of the protofibrils of amyloid  $\beta$ -protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 428, 458–462. [査読あり]  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.096

- 4) Hu, B.,\* Trébosc, J., Lafon, O., Chen, Q., Masuda, Y., Takegoshi, K., Amoureux, J. P.\*: Very-long-distance correlations in proteins revealed by solid-state NMR spectroscopy. *ChemPhysChem* **2012**, 13, 3585–3588. [査読あり]  
DOI: 10.1002/cphc.201200548

[学会発表](計6件)

- 1) 増田裕一, 松尾真嗣, 水野敬, 野田泰斗, 竹腰清乃理, 土井隆行: タンパク質の高感度  $^{33}\text{S}$ -NMR 解析に向けた  $^{33}\text{S}$  標識アミノ酸の合成. 日本薬学会第 133 年会, 講演番号 29N-am09 (横浜) 2013 年 3 月 29 日 [口頭発表, 査読あり]

- 2) 増田裕一, 松尾真嗣, 水野敬, 野田泰斗, 竹腰清乃理, 土井隆行:  $^{33}\text{S}$  標識によるタンパク質の高感度  $^{33}\text{S}$ -NMR 解析に向けて. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 講演番号 4C26a03 (仙台) 2013 年 3 月 27 日 [口頭発表, 査読なし]

- 3) Masuda, Y., Fukuchi, M., Yatagawa, T., Tada, M., Takeda, K., Irie, K., Akagi, K., Monobe, Y., Imazawa, Y., Takegoshi, K.: Solid-state NMR analysis of interaction sites of curcumin and amyloid  $\beta$ -protein fibrils. IKCOC-12, Program Number OP-21 (Kyoto) November 14, 2012 [口頭発表, 査読あり]

- 4) Sato, M., Murakami, K., Ikubo, H., Uno, M., Nakagawa, Y., Katayama, S., Akagi, K., Masuda, Y., Takegoshi, K., Irie, K.: Specific Inhibitory Mechanism of Aggregation of 42-mer Amyloid- $\beta$  Peptide by Flavonoids. IKCOC-12, Poster Number PA-140 (Kyoto)

November 13, 2012 [ポスター発表, 査読あり]

- 5) 松尾真嗣, 水野敬, 野田泰斗, 増田裕一, 竹腰清乃理: Cryocoil MAS プローブによる固体有機物の  $^{33}\text{S}$  NMR 測定にむけて, 第 51 回 NMR 討論会, 講演番号 P-81 (愛知) 2012 年 11 月 10 日 [ポスター発表, 査読なし]
- 6) 村上一馬, 佐藤瑞穂, 井久保遥子, 宇野真弓, 中川 優, 片山寿美枝, 赤木謙一, 増田裕一, 竹腰清乃理, 入江一浩: カテコール系フラボノイド類によるアミロイド  $\beta$  の凝集抑制機構. 第 54 回天然有機化合物討論会, 講演番号 17 (東京) 2012 年 9 月 19 日 [口頭発表, 査読あり]

〔図書〕(計 1 件)

木曾良明 編, 村上一馬, 増田裕一, 入江一浩著: 遺伝子医学 MOOK 「最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用」2012 年 3 月 31 日発行、第 21 巻、211-216 頁

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~hannou/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 裕一 (MASUDA, YUICHI)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：90617755

### (2) 研究分担者

なし ( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

竹腰 清乃理 (TAKEGOSHI, KIYONORI)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：10206964

村上 一馬 (MURAKAMI, KAZUMA)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：80571281