

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870019

研究課題名（和文） 動的核分極法による高感度固体 NMR を用いた全長ベータ 2m アミロイド繊維の構造解析

研究課題名（英文） Structure Study of  $\beta 2m$  Amyloid Fibril using Dynamic Nuclear Polarization-Enhanced High-Sensitivity Solid-State NMR

研究代表者

松木 陽 (Matsuki Yoh)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：70551498

研究成果の概要（和文）：本研究では 1. 固体 NMR 測定の感度を動的核分極 (DNP) 法を使って 200 倍以上向上する条件を確立した。2. 希薄データサンプリング法を用いた高速、高感度測定で、従来観測できなかった信号を観測する事に成功した。3. 逆同位体標識法で、信号数の多い巨大構造体でも高分解能スペクトルが得られると示した。4.  $\beta 2m$  全残基の 60% 以上について信号を帰属する事に成功した。5. 線維中で  $\beta 2m$  分子間の接触位置を検出する測定に、選択性と感度とともに向上する新法を開発した。6. 線維中の  $\beta 2m$  が従来の予測に反して天然の折りたたみを大部分保持していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, (1) more than 200-fold sensitivity enhancement was established for solid-state NMR spectroscopy using Dynamic Nuclear Polarization (DNP). (2) Application of the sparse data sampling technique enabled to detect conventionally unobservable signals. (3) A use of reserve isotope labeling technique resolved many previously unseen signals. (4) A new scheme to detect the molecular interfaces within a fibril was developed for high-selectivity and sensitivity. (5)  $\beta 2m$  was suggested to largely retain its native fold in the fibril, contrary to the widespread belief that amyloid fibril formation generally requires native proteins to adopt a fibril-specific fold.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物学

キーワード：アミロイド繊維、固体 NMR、動的核分極、希薄サンプリング

## 1. 研究開始当初の背景

正常時は水溶性のタンパク質が何らかの原因で不溶化、重合して繊維状の巨大構造体、アミロイド繊維を形成して細胞内に蓄積する現象が、アルツハイマー病、クロイツフェルトヤコブ病、長期透析患者に見られるアミ

ロイドーシス病ほか 30 種以上の疾病の原因に関係することは近年よく知られてきている。これらの繊維を形成するタンパク質は、元々は細胞表在性受容体 APP や、細胞死の制御に関わる HET、組織適応性抗原  $\beta 2$  ミクログロブリン ( $\beta 2m$ ) と、活動の場もアミノ酸

配列も様々であるのに電子顕微鏡による観察によると、一様によく似た枝分かれない直線的な繊維構造体を作る。また X 線繊維回折によるといずれも  $\beta$  ストランドを繊維伸長軸に直角に配向した「クロス  $\beta$  構造」をとるらしい。したがってアミノ酸配列に起因する分子内の折りたたみではなく分子間の作用に基づく、アミロイド繊維特有の超分子構造構築の一般原理があるように見える。これを解明することは関連する多くの疾病の根絶に向けた第一歩になる。そこで近年世界中の研究者が総力を挙げて多くの知見を明らかにしてきたが繊維形成の分子メカニズムの全容は依然明らかになっていない。

主な原因は研究法の欠如にある。原子分解能の構造解析のために X 線結晶回折法は良質の単結晶を要求するがアミロイドは繊維であり、解析できない。4~7 残基の繊維形成能をもつペプチド(蛋白質の断片)が作る結晶の研究では、得られる結晶構造と繊維構造体における分子構造の関連性は推測に頼る以外ない。また溶液 NMR 法ではアミロイド繊維は有効分子量が数百万を越えることもしばしばで、いわゆる「分子量限界」のために解析が不可能である。

なかでも(断片ではなく)全長のタンパク質が作るアミロイド繊維の構造決定は最重要課題である。天然型と繊維形成型のタンパク質はアミノ酸配列が同一であるから、事の発端はその折りたたみ方か集合様式の変化にある。通常水溶性タンパク質は疎水的なアミノ酸側鎖を内側に折りたたむことで水溶液中の構造を安定化するが、一般に  $\beta$  シート間の疎水的相互作用で安定化して重合体を形成すると考えられるアミロイド繊維は、その重合開始時に疎水性基を外側に向けることが要求される。この 5 年で繊維形成能を持つペプチドの研究が進んだが、断片である以上、この繊維形成の初期条件を自動的に満たしており、繊維形成は容易に開始、促進される。したがって天然正常型、全長タンパク質がある時どういう理由で、どのような立体構造変化を通して疎水性基を外に向け繊維形成型に移行するのかという最大の疑問に答えられない。つまり断片の研究は研究黎明期の取っ掛かりとしては重要な手段であったが、繊維形成型への移行の分子メカニズムを知るための手法としては重大な欠陥がある。アミロイド繊維の構造研究を、関係する疾病の阻

害や制御に向けた応用につなげ、直接医療の現場にその知見を還元するには、この問題に真正面から向き合う必要がある。

## 2. 研究の目的

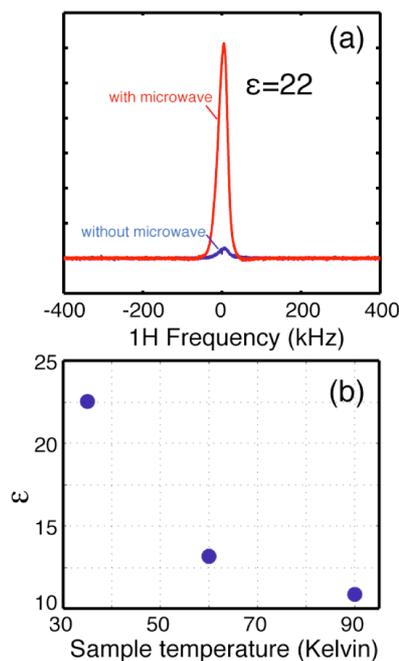
ここに本研究では固体 NMR 法を使い、未だ成功例の無い、全長  $\beta 2m$  (99 残基) が作るアミロイド繊維中における  $\beta 2m$  の立体構造決定に焦点を定め、構造安定化の原理と天然型からの移行の分子メカニズムを解明することを目指す。

固体 NMR 法は不溶性、非結晶性の巨大分子の原子分解能の構造解析を行える現在唯一の手段で、アミロイド繊維の構造研究に有効として注目され世界的なトレンドになったが、ここでも解析対象になったのは 22~70 残基の中程度の長さの繊維形成可能な蛋白質断片であった。断片でない全長蛋白質が作る線維の研究を妨げている最大の隘路は残基数が増えるにつれて顕著になるスペクトルの混雑と低感度で、本研究では、これに次の三つの鍵になる技術を持って立ち向かうように計画した。すなわち(1)動的核分極(DNP)法、(2)希薄データサンプリング法、(3)同位体「逆」標識法である。

## 3. 研究の方法

本研究では固体 NMR 法の高感度化を目指した動的核分極(DNP)法の利用は大きな目玉でもあり、挑戦でもある。期待した成果までが望めない可能性にも鑑みて、研究手法としては DNP を使わない従来の最新固体 NMR 測定技術、近年開発されつつある希薄データサンプリング法、同位体「逆」標識法も併用して、これを十分カバーできるように計画してある。

(1)動的核分極(DNP)法は極低温、高磁場において、高輝度、高周波数のマイクロ波の照射を通して、巨大な電子スピン分極を核に移動、固体 NMR スペクトルの観測感度を従来法、常温に比べて 1,000 倍のオーダで増強できる画期的な手法で、感度に苦しむ  $\beta 2m$  のような大分子系の解析では大きな助けになる。より広範囲な試料形態に有効な形でプロトコルを整備、測定条件を確立できると広くインパクトがある。本研究では特に、高い外部磁場条件、すなわち大分子系の解析にかかせないスペクトルの高分解能条件で効率が悪くなる DNP の問題点に着目、改善を試みる。低分子量のモデル分子で可能なパラメータを網羅的に探索する事から始め、順次繊維試



(図 1) グルコースの  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (a) と DNP による信号増強率の試料温度依存性 (b)。DNP による 30K での信号増強率は 22 倍以上。30K でボルツマン分極は室温 300K の約 10 倍あり、従来の室温固体 NMR に比べ 200 倍以上の感度向上を達成した。

料の測定に用いるよう計画した。

(2) 溶液 NMR のタンパク質構造決定における成功にはっきり示されるように、混雑する信号は高次の多次元スペクトル空間に分離するのが得策である。しかし実験で取り込むべきデータ点は次元の増加とともに指数関数的に増えるので、高次元測定では現実問題として実験時間がかかりすぎる、いわゆる「測定時間バリア」の問題がある。例えば 3 次元分解測定で十分なデジタル分解能を得ようとする、取り込むべきデータは NMR の自由誘導減衰 (FID) の数にして 1 万以上になる。これでは感度が限界に近い大分子系の固体 NMR では、データ点をそろえる事ばかりに時間を取られ、各 FID について積算回数を増やせず、感度が上げられない問題があった。そこで従来求められるデータ点のうち、ごく一部だけを実際に観測し、抜けた部分は数学的処理で補って実験時間を短縮する、希薄サンプリング法を応用する。元々ノイズの多いデータで、抜け落ちたデータ点を定量性を保

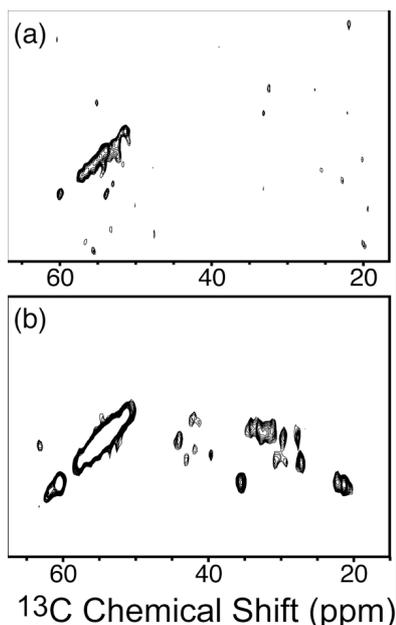
持し復活するのは従来難しかったが、研究代表者(松木)が最近開発した SIFT 法がこの点に特に有効である。これにより感度と分解能を両立するよう条件を選び、 $\beta 2\text{m}$  のより詳細な解析を目指す。

(3)  $\beta 2\text{m}$  は残基数も多く、全体に  $\beta$  シートリッチな蛋白質で、信号が似た位置に現れる傾向があり、スペクトルの混雑が信号の帰属を妨げる。これは、上記多次元分解測定法の他に、狙ったアミノ酸残基だけに同位体標識を導入しない「逆」ラベル法で、観測される信号数を高い制御の下に間引く事でも、軽減できるはずである。逆標識法は、狙ったアミノ酸に少数の標識を導入した一連の試料を作る、従来の標識法より作成する試料数が少なく効率が良い。本研究では、この逆標識法を多次元分解法と併用して可能な限り信号を分解する事を試みる。

#### 4. 研究成果

本研究には上記 (1)-(3) の鍵になる基盤技術の他に、研究を推進する中で初めて重要性を認識して新たに導入した (4) モンテカルロシミュレーションによる信号帰属プログラムを含む。また、線維中での  $\beta 2\text{m}$  分子間の近接部位を検知する従来の NHHC 測定法に、感度が低い系で特に問題になる、ある種の欠陥がある事を発見したので、それを克服するための新手法 (5) [ $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ] 二重同位体標識法を用いた高感度、高選択的、分子間接触検知法も開発した。以下、手法ごとに成果をまとめ、項目 (6) に現時点でわかった事をまとめる。

(1) 高磁場、極低温条件における最適 DNP 条件を、マトリクス中のプロトン濃度、NMR の外部磁場強度、マイクロ波強度、試料温度の適値をそれぞれ独立に探索した。外部磁場は現在世界最高の 600MHz (H 周波数) で、分解能に有利であるが、DNP 効率はより汎用の 400MHz DNP-NMR の 2/3 以下に落ちることが知られている。本研究では特に試料温度を従来行われなかった蒸発液体ヘリウム (20K) を用いて 30K 程度まで下げる事で電子の緩和を極力抑え、DNP 効率を取り戻す事に挑戦した。狙い通り、DNP の感度向上率は低温ほど劇的に伸び(図 1)、固体 NMR の測定感度を従来法、室温測定との 200 倍以上に増強する条件を確立した。試料の状態は見たいものを液状のグラスマトリクスに溶かした後凍結するだけなので、広範囲の試料系に応用できる。固体 NMR



(図2) 3次元残基内 NCaCx 相関スペクトルの2次元スライスの一つ。従来法(a)と希薄サンプリング法(b)で得たもの。希薄サンプリングによって、各 FID の積算が劇的に増やせ、感度が向上した。

の高感度化は $\beta 2m$ 線維のような巨大分子構造体の解析には大きな助けになる。

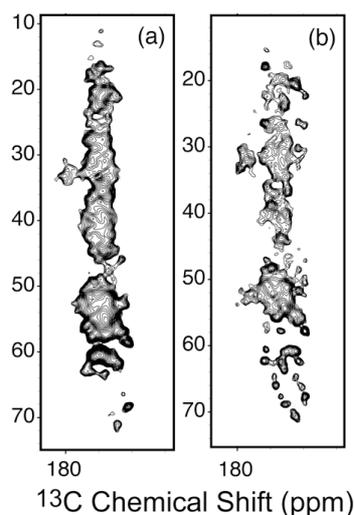
しかしながら、分解能向上のために必要な高速の試料回転を、この極低温条件では成功させられなかった。低温のヘリウムガスは粘度が低く、試料管を高速回転するのに必要な十分なモーメントが得るのに相当な高圧が必要で、現地点でデューワーの改良まで済ませている。技術的な問題は克服されつつあり、もう数度の試行で成功できると考えている。高感度と高分解能を両立した固体 NMR 法のアミロイド繊維の構造解析への初めての応用例として発表したい。

(2) 希薄サンプリング法により $\beta 2m$ 線維の多次元分解測定を高速、高感度に行う事に成功した。これで残基内、残基間相関スペクトルの分解能は大きく向上、より多くの信号を見分けられるようになった。特に3次元分解法では従来は感度が不十分で解析に耐えるスペクトルが得られなかったが、希薄サンプリング法で初めて多くの信号がはっきり現れた(図2)。

(3)  $\beta 2m$ 線維は $^{13}C$ ,  $^{15}N$ 均一標識体に加え、狙ったアミノ酸だけに標識が入っていない

逆標識体も作成、信号量を制御した。実際に標識が狙ったものだけに限られている事も線維形成前の単量体 $\beta 2m$ の溶液 NMR スペクトルで確かめた。残基内相関スペクトル上の信号数は完全標識体の約2/3に抑えられ、重なり合って見えなかった信号の一つ一つが分離し始めた(図3)。これにより手作業でも全残基の60%程度帰属することができた。ただし信号の重なり合いは予想以上のもので、信号の重なり合いを完全には解消できなかった。

(4) 残基数の多い $\beta 2m$ では上記、多次元分解スペクトルと逆標識試料を駆使しても、多くの信号が完全には分離できなかった。信号が重なると、信号の発生源をどの残基のどの炭素によるものか突き止める、いわゆる信号帰属の作業は曖昧になり、恣意的な判断に支配され始める。信号を蛋白質の一次構造上にたどって行く過程で、信号が重なるところで多くの同等の可能性を持った分岐が発生し、同様に正確らしい帰属の組み合わせが爆発的に発生するからである。この様に大分子の解析では、一人の人間が全ての帰属可能性を把握してたどって行くのが不可能な領域に近づくはずであるが、従来は解析者が、その能力と良心に従って最ももっともらしい帰属のセットを報告するのが常であった。本研究ではここに、より客観的な判断基準を導入する必要があると考えた。ここで利用するのは昨年 NIH の Tycko らが発表したモンテカルロシミュレーションを使った自動信号帰属プ



(図3) 2次元 NCaCx スペクトルの一部。完全標識試料(a)と逆標識試料(b)で得たもの。

ログラム(Hu et al., JMR 2010)で、これは元々、解析者の利便性と解析のスピードアップを目的として作られたものであるが、得られる帰属セットを客観的な評価関数でスコア付けする機能がある。これを利用し、本研究ではシミュレーションの大々的な繰り返しで得られる広大な帰属可能性空間の探索で膨大な帰属可能性を効率よく調べあげ、そのうちスコアが上位の帰属セットを、統計的、客観的な信憑性と共に報告する手法を初めて提案する。予備的な計算を始めたところで、このまま進め上記の手動帰属で得たセットとの比較を含めて発表したい。大分子系の解析で帰属が恣意的になりやすい問題点に正面から対峙し、新たな対処法を示す、画期的な成果になると考えている。

(5) 繊維形成の機構を調べる上で、関係する蛋白質の4次構造、すなわち線維中で $\beta 2m$ の各分子がどのように積み重なっているかを決定することは特別重要である。これは $^{13}C$ 標識体と $^{15}N$ 標識体の混合繊維において、近接する $^{13}C$ - $^{15}N$ 部位を検知するNHHC測定法が有用である。しかし、 $\beta 2m$ の様な大分子系で感度が十分でないとき、これに分子内での近接を示す信号が混入し区別がつかなくなる問題を、本研究を推進する中で認識し、実行はしばらく保留にした。その後2010年度半ば頃、従来 $^{15}N$ 標識を導入する分子に $^2H$ 標識も加え、 $[^{15}N, ^2H]$ 二重標識とすることで分子内信号を排除、全体の測定感度も向上できる一石二鳥の新技术を考案した。本報告書の作成時点で、試料調整とラジオ波パルスシーケンスのテストまで終了しており、早々に測定に移る予定である。

(6) まとめると、DNPによる高感度解析では技術的な問題点のいくつかを克服し、モデル分子を使った条件の確立、高感度化の実証まで済ませ、低感度に苦しむ大分子系の構造解析に対して有望だと示せた。反面、目標とした $\beta 2m$ への直接的な応用までは実現できなかった。一方で、 $\beta 2m$ の構造解析という目的においては、DNP以外の最新技術の応酬で一定の成果を得た。

希薄サンプリングと逆標識法で得た感度と分解能に加え、一部モンテカルロシミュレーションの結果を組み合わせ、全残基の60%以上にあたる、62残基についてバックボーンと $C\beta$ 信号の帰属を完了した。帰属がついた残基について化学シフト値から二次構造



(図4)  $\beta 2m$ の一次配列と化学シフト値から予測された $\beta$ ストランドの位置。天然単量体の溶液NMRで観測されたシフト値からの予測(黒)と線維の固体NMRで得たシフト値からの予測(赤)で、 $\beta$ シートは全体的に長めになるものの位置が大きく変わっていない。

の予測を行ったところ、一次配列上の $\beta$ ストランドの位置は、 $\beta 2m$ 単量体の天然フォールドのものと同じく**変わらず**、線維中でも天然の折りたたみが色濃く残されている事が示唆された。これは以前に報告されているFTIRのメインバンドの位置が $\beta 2m$ の天然フォールドと線維のもので大きく変わらない、というデータともよくあっている。これまでに報告されている多くの、アミロイド線維を形成する蛋白質では、線維中の構造が天然のフォールドをよく保持していた例はなく、全く新しい線維形成機構を示唆しているかもしれない。上記の項目(4)と(5)をよく詰め、分子内、分子間距離情報を精査、詳細な構造計算に移る予定である。

## 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1件)

1. Y. Matsuki, Hiroki Takahashi, Keisuke Ueda, Takatoshi Idehara, Isamu Ogawa, Mitsuru Toda, Hideo Akutsu and Toshimichi Fujiwara, Dynamic Nuclear Polarization Experiments at 14.1T for Solid-State NMR, Physical Chemistry Chemical Physics 22, 5799-5803 (2010)
2. 松木 陽, 動的核分極(DNP)法による超高感度固体核磁気共鳴(NMR)、低温センターより 149, 3-8, (2010)

[学会発表] (計2件)

1. Y. Matsuki, High Field, High Sensitivity Solid-State NMR by Dynamic Nuclear Polarization (DNP), Griffin-Herzfeld Seminar Series,

January 2011, Massachusetts Institute  
of Technology, Massachusetts, USA

2. 松木 陽、動的核分極 (DNP) 法による超高  
感度固体核磁気共鳴 (NMR)、第 48 回固体  
NMR・材料フォーラム (招待講演)、2010 年  
10 月、(独)物質・材料研究機構、つくば

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松木 陽 (Matsuki Yoh)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号 : 70551498