

令和 2 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19196

研究課題名（和文）Rheo-NMRによるアミロイド線維化機構の解明と新規Rheo-NMR装置の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of amyloid fibrillation using Rheo-NMR and development of a new Rheo-NMR instrument

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Rheo-NMRとは、NMR管内のサンプルに剪断流しながらNMR測定が行える装置のことである。我々は高感度極低温プローブと併用できる新しいRheo-NMR装置を開発した。同装置では、NMR管に外径3mmのガラス棒を挿入し、NMR管だけを回転させることによって剪断流を発生させる。しかし、この装置ではNMR管とガラス棒の中心を正確に合わせるのが非常に困難であった。本研究では、ガラス棒の位置を正確にNMR管の中心に合わせられる治具を制作し、これを使用した新型のRheo-NMR装置を開発した。この装置を用いると、以前の装置では難しかったタンパク質のアミロイド線維化の再現性が良くとれるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が急速に進む日本では、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患が大きな社会問題となっている。神経変性疾患はタンパク質のアミロイド線維化と関連していると言われていたが、その機構は良く分かっていない。その理由の1つに、タンパク質のアミロイド線維化過程をリアルタイムかつ原子分解能で解析できるツールがなかったからである。しかし、Rheo-NMRはまさにそのような解析ができる。本研究では、簡便にNMRに設置できる新型のRheo-NMR装置を開発した。アミロイド線維化の再現性も高い。ゆえに、本研究で開発したRheo-NMRは神経変性疾患の新しい治療薬の開発に貢献することなどが期待される。

研究成果の概要（英文）：Rheo-NMR is a device that allows NMR measurements to be made while shearing a sample in an NMR tube. We have developed a new Rheo-NMR system that can be used with a high-sensitivity cryogenic probe. In this system, a glass rod with an outer diameter of 3 mm is inserted into the NMR tube, and shear flow is generated by rotating only the NMR tube. However, it was very difficult to accurately align the center of the NMR tube and the glass rod with this system. In this study, we have developed a new type of Rheo-NMR system using a jig that can accurately align the glass rod to the center of the NMR tube. With this system, the reproducibility of protein amyloid fibrillation, which was difficult to achieve with the previous system, has been improved.

研究分野：生物物理学

キーワード：Rheo-NMR タンパク質 アミロイド線維

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化が深刻化する現代社会では、加齢に伴い発症率が高くなるアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は大きな社会問題となっている。いずれの疾患でも病変所見で、疾患特有のタンパク質が異常に凝集した封入体が脳内に確認されている。この凝集体は、タンパク質が重積したアミロイド線維と呼ばれる構造体で疾患との関連性が強く示唆されている。アミロイド線維とそれを構成するタンパク質単体の構造と物性は良く研究されているが、線維形成メカニズムは未だ謎に包まれている。とくに線維化中間状態の構造は不明である。現在のアミロイド線維研究では、まさにこの線維形成メカニズムの解明が大きな課題の1つとされている。

注目すべきは、アミロイド線維が攪拌による流体力学 (Rheology) 的な力によって形成される点である。細胞内では、粘性が高く混み合った空間をタンパク質が流動するため、試験管内の希薄溶液とは比較にならない大きな力がかかる。このことから線維形成における力の影響を調べることは重要な研究課題と言える。しかし、力を受けて線維になろうとしているタンパク質の情報は、そもそも最適な解析手段が存在しないため、極めて乏しいのが現状である。ここにおいて、申請者らは、もともと液晶やポリマーの粘弾性を解析する目的で開発された Rheo-NMR に着目した。Rheo-NMR は、NMR 管の中に細いガラス管を挿入し、そのガラス管または NMR 管を回転させることにより、攪拌しながら NMR 測定を行う装置および手法のことを指す。この Rheo-NMR を用いれば攪拌状態のタンパク質の構造情報を原子分解能で得られることが期待される。しかし、既存の Rheo-NMR 装置の仕様は単純なポリマーの解析には十分であるが、タンパク質の解析には、感度、分解能、測定の柔軟性が足りない。そのため、申請者らは、最近、当研究室の高感度クライオプローブ付き 600 MHz NMR を改造して Rheo-NMR 装置を自作した (図 1)。この装置では 3 mm φ のガラス棒をアルミ棒で固定し、5 mm φ の NMR 管を乾燥空気中で回転させることで攪拌する。この Rheo-NMR 装置は現在、世界で最も高分解能かつ高感度なものである。また、従来の NMR 測定が全て実施できる柔軟性の高いものでもある。

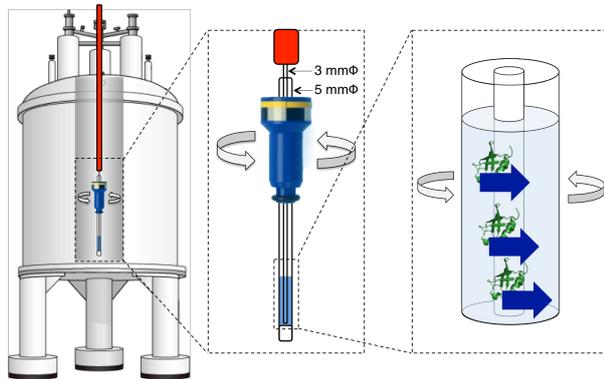


図 1. 自作した Rheo-NMR 装置

2. 研究の目的

本研究は、Rheo-NMR によるアミロイド線維化メカニズムの先駆的研究であるため、まずはこの装置を使って、どのような測定が線維化メカニズムを解明する上で鍵となるデータを与えるか、と言ったことから調べる必要がある。また、この装置は組み上がったばかりであるため、装置の安定性や取り回しなどが完璧ではない。そこで、これらの状況を踏まえて、本研究では、自作した Rheo-NMR 装置を用いて、パーキンソン病の原因タンパク質である α シヌクレイン (α Syn)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因タンパク質である superoxide dismutase-1 (SOD1)、当研究室で線維化することを見出したポリユビキチン (Morimoto, *Nat Commun* 2015) の 3 つのタンパク質の線維化メカニズムの解明に挑んだ。また、Rheo-NMR 装置の最適化を行うとともに、より高精度にタンパク質溶液を攪拌できる Rheo-NMR 装置 2 号機を製作することを目的とした。

3. 研究の方法

①アミロイド線維化メカニズムの解明

α Syn、SOD1、ポリユビキチンのいずれでも、どれくらいの速度で攪拌すれば、どれくらいの速度で線維化するのが不明であった。そのため、まずは様々な攪拌速度で NMR スペクトルを連続測定し、線維化過程をモニタリングすることで、最適な攪拌速度を決めた。また、アミロイド線維の形成は、一般に、立体構造がほどけることが前提条件となっている。そこで、攪拌によって誘起されるタンパク質の立体構造とダイナミクスの変化を解析し、線維化のホットスポットとなる構造安定性の低い領域を探索した。

②Rheo-NMR 2 号機の製作

現在の Rheo-NMR 1 号機は、乾燥空気中で NMR 管を回転しているが、中に挿入したガラス棒の中心を NMR 管の中心に揃えるのが極めて難しく、30 Hz を超えると回転が不安定化する。また、タンパク質のアミロイド線維化速度に再現性があまりなかったが、これもガラス棒と NMR 管の中心がずれていたためと考えられた。そこで、回転をより安定させ、さらにアミロイド線維化の再現性を向上させる目的で、より回転の中心が揃った Rheo-NMR 2 号機を製作することにした。具体的には、NMR の試料管導入口とほぼ同じサイズの治具を製作し、それにガラス棒を固定した装置を開発することにした。

4. 研究成果

①アミロイド線維化メカニズムの解明

SOD1 の場合、10 Hz で攪拌した場合は、全くアミロイド線維化しなかったが、20 Hz 以上の

攪拌ではアミロイド線維化した。当初、アミロイド線維化すると化学シフトが変化するとともに線維化中間状態のシグナルが現れたが、化学シフトの変化は後にアミロイド線維化とともに溶液の pH が下がることに起因することが分かった。この pH が下がる問題は、バッファの濃度を上げることによって解決した。なおアミロイド線維化は、SOD1 モノマーのシグナルの減少によって観測したが、アミロイド線維の NMR シグナルは、その分子量が大きすぎるため観測できなかった。線維化中間状態については、バッファの濃度を上げた場合でも観測できたが、そのシグナルは全て ¹H のランダムコイルの化学シフト領域に現れた。ただし、観測できるシグナルの数は限られていた。そのため、線維化中間状態は NMR では、分子量が大きすぎるため観測が困難なオリゴマーであるが、その一部がほどけていて運動性が高いことが示唆される。

α Syn は、元々、アミロイド線維化しにくいことが知られているが、Rheo-NMR では 30 Hz の回転攪拌によってアミロイド線維化することが確認できた。SOD1 のときと同様に、モノマーのシグナルが減衰し、小数の新しいシグナルが出現することを観察した。興味深いことに、SOD1 ではモノマーのシグナル減少の時間経過は、指数関数様であったが、 α Syn ではシグモイド関数様であった (図 2a)。速度論的なモデルにフィットしたところ、アミロイド線維化の一次核形成速度が残基によってばらつきがあるが (図 2b)、二次核形成速度は残基によらずほぼ一定であることが分かった (図 2c)。また、緑茶に多く含まれるエピガロカテキンガレート (EGCG) は、アミロイド線維化を抑制し、毒性のないオリゴマー形成を誘導することが知られているが、EGCG を添加した状態で同様な Rheo-NMR 実験を行ったら、今度は指数関数用のシグナル強度の変化が観測された (図 2a)。しかも、シグナル強度が 0 になるまで減衰しなかった。現在、このプロファイルの速度論的な解析を進めている。

また、ポリユビキチンの場合も、SOD1 と同様に指数関数様にモノマーのシグナルが減少した。SOD1 とポリユビキチンの両者とも、元々、特定の立体構造 (ポリユビキチンではユニットとしての立体構造) をもつため、この立体構造が剪断流によってほどける過程が律速段階で、その過程が指数関数様に進行するものと考えられる。

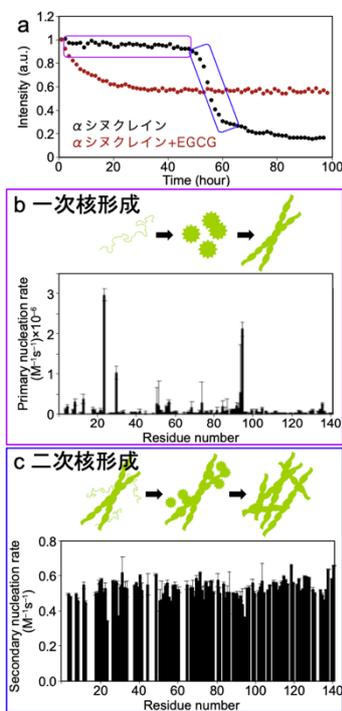


図2 α シヌクレインのアミロイド線維化

②Rheo-NMR 2号機の製作

当初は、モーター駆動式の Rheo-NMR 装置の開発を計画したが、装置設計を委託したエアプロと検討した結果、ガラス棒と NMR 管の中心を徹底的に合わせることによって、サンプルの回転を安定化させる方向に転換した。開発過程において、NMR 磁石の中心を通る試料管導入口は、入り口部よりも NMR 測定時の位置 (磁石の中心) の方がわずかに広いことが判明した。逆であれば磁石の中心部の内径に合わせてガラス棒を固定する治具 (ガラス棒ホルダー) を製作すれば良いが、入り口の方がわずかに狭いため、入り口の内径に合わせて磁石の中心部では隙間が生じる。そのため、入り口は通るが中心部で隙間が生じないように、Oリングをガラス棒ホルダーに付けることにした。Oリングを設置する位置、Oリングを固定するための溝の深さ、Oリングの素材などを検討し、最終的に試料管導入口の入り口はギリギリ通り、中心部でちょうど固定されるガラス棒ホルダーを製作することに成功した (図 3)。

次の問題は、このガラス棒ホルダーにガラス棒を固定する際における、ガラス棒の外径の公差であった。公差が大きいと、ガラス棒ホルダーに開ける穴を大きめにしておく必要があった。しかし、そうするとガラス棒の外径が小さいものではガタが生じ、その結果、ガラス棒と NMR 管の中心がズレることが分かった。そこで、ガラス棒の外径の公差が最も小さいもの (10 μ m 以下) を入手し、ガラス棒ホルダーに開ける穴を極力小さくするようにした。この結果、極めて正確にガラス棒と NMR 管の中心があうようになった。

このガラス棒ホルダーにはポリマー製の柔軟なリンカーを接続した (図 3)。元々、この部分はアルミ棒であったため、Rheo-NMR 装置を NMR に挿入する際に天井高を気にする必要があった。しかし、しなやかに曲がるポリマー製のリンカーに変更することで天井高を気にする必要がなくなった。さらに、上部に高さ調節機構のついたステンレス製のハンドルを設置した (図 3)。Rheo-NMR 測定において、ガラス棒の底と NMR 管の底の隙間が極力小さくする必要がある。言い換えると、Rheo-NMR 装置全体の長さを調整する必要がある。今回、このハンドルを設置することによって、その長さの調整が非常に容易になった。

開発したこの Rheo-NMR 装置は、特許を出願し、エアプロから販売されることになった。

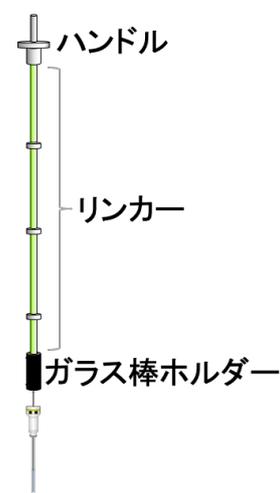


図3 Rheo-NMR2号機

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwakawa N., Morimoto D., Walinda E., Kawata Y., Shirakawa M., Sugase K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Real-time observation of the interaction between thioflavin T and an amyloid protein by using high-sensitivity Rheo-NMR.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 E2271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms18112271.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto D., Walinda E., Iwakawa N., Nishizawa M., Kawata Y., Yamamoto A., Shirakawa M., Scheler U., Sugase K.	4. 巻 89
2. 論文標題 High-sensitivity Rheo-NMR spectroscopy for protein studies.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anal. Chem.	6. 最初と最後の頁 7286-7290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.7b01816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 64-68
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 608-612
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Kenji Sugase, Daichi Morimoto, Walinda Erik, Naoto Iwakawa, Akihiko Yamamoto, Ulrich Scheler
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 21st EUROMAR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sugase
2. 発表標題 High-Sensitivity Rheo-NMR Spectroscopy for Protein Studies
3. 学会等名 EUROMAR 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅瀬謙治
2. 発表標題 高感度Rheo-NMRによるタンパク質線維化のその場解析
3. 学会等名 日本表面真空学会 2018年9月研究例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugase K
2. 発表標題 High-sensitivity Rheo-NMR spectroscopy for protein studies.
3. 学会等名 ISMAR 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sugase K
2. 発表標題 High-sensitivity Rheo-NMR spectroscopy for protein studies.
3. 学会等名 JGP-Chem Kyoto-Bordeaux Faculty & Student Research Workshop on Chiral Nanostructures for Photonic Applications（招待講演） （国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-111013	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Research Highlights
http://www.moleng.kyoto-u.ac.jp/~moleng_01/research.html

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