

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26708017

研究課題名(和文) 高感度ラマン光学活性装置の開発とそれによるアミロイド線維天然化過程の構造解析

研究課題名(英文) Instrumentation of high-throughput Raman optical activity spectrometer and structural analysis of naturing amyloid fibril

研究代表者

山本 茂樹 (Yamamoto, Shigeki)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60552784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン光学活性(Raman Optical Activity; ROA)は分子立体配座に鋭敏な分光法であり、新たな溶液中タンパク質の立体配座分析法となりうる。しかし、検出感度が低く、解析法が確立していないという課題がある。我々はアミロイド線維を形成したインスリンをモデルとし、その高次構造解析法を開発を行った。分子動力学および量子力学計算の結果を実験結果と比較することで、線維中に安定なインスリン構造をロール構造と決定した。多レンズ型の周囲検出法を用いたROA装置を開発し、ラマン散乱光の検出感度を既存装置の10倍に高めることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Raman Optical Activity (ROA) is a vibrational spectroscopy sensitive to molecular conformation in solutions, which can be a new analytical method for protein structures in solution phase. However, there has been tasks to solve in ROA, a lack of standard way of interpretation of amyloid fibril proteins and a low sensitivity of the instrument. We targeted on a protein insulin as a good model of amyloid fibril-forming proteins and analyzed its second- and higher-order proteins structures of the amyloid. On the basis of comparisons of experimental and calculated ROA spectra, we could determine the stable insulin structure in the fibril as beta-roll structure, not beta-helical one. The calculation was done by combining molecular dynamics simulation and quantum mechanical simulation of the spectra aided with a fragment method. We developed a new ROA instrument with multi-lens setup which brings 10-times stronger Raman signal compared to conventional back-scattered one.

研究分野：分光分析

キーワード：アミロイド 二次構造 振動光学活性 分子断片化法 インスリン ラマン光学活性

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病やヤコブ病においては、特定のタンパク質が α ヘリックス構造から β シート構造へ高次構造の変化を起こし、不溶性アミロイド線維を形成し、脳内などにおいて沈着を起こす。この不溶化過程および、その逆反応である天然化過程の理解と制御の為に、アミロイド線維の構造変化を高分解能で構造解析し、その構造変化原因を分子的观点で明らかとする必要がある。

しかし、既存の分析方法では、アミロイド線維およびその構造前駆体など、時間的揺らぎを持ったタンパク質高次構造を立体配座の分解能で解析することは難しい。NMR 分光法は測定に数時間を要し、相互作用距離が短く、スペクトル時定数がミリ~マイクロ秒であるため、構造的揺らぎを含む系や時間変化する系については高分解能な解析が困難である。近年発展している固体 NMR によっても、例えば本研究で対象とするインスリンアミロイド線維の明確な三次元構造解析は達成されていない。極低温電子顕微鏡はタンパク質の二次構造、三次構造を測定できない。アミロイド線維の高次構造変化を構造ゆらぎも含めて分子立体配座の分解能で解析できる、新たな原理に基づいた分析法の確立が必要である。

(2) 得られたタンパク質 ROA スペクトルの解析手法も改良する必要がある。これまでの ROA によるタンパク質構造解析は、結晶構造と溶液中 ROA スペクトルを対応させる経験的ピーク帰属に基づいており、構造ゆらぎを解析できなかった。しかし、申請者のアミノ酸 12 個から成るペプチドについての、量子力学計算による ROA スペクトル解析の研究によって、主鎖および側鎖の立体配座を炭素鎖ねじれ角 120 度の分解能で解析できることが明らかとなった。この解析方法を巨大なタンパク質に適用する為には、分子動力学および量子力学計算による解析法の開発が必要となる。

2. 研究の目的

タンパク質アミロイド線維の構造変化を、二次、三次構造および側鎖局所構造の全てについて炭素鎖ねじれ角 120 度の分解能で解析できる、新原理に基づいた分析法を開発する。分子立体配座に鋭敏なラマン光学活性 (Raman Optical Activity; ROA) 分光装置の検出感度を、高強度レーザーを用いた全周囲検出法の開発により市販装置の 200 倍に向上させ、測定時間を数時間から数分に削減し、かつ少ない試料量 (0.1 mg) での測定を可能とする。さらに、タンパク質全体の溶液構造を ROA スペクトルの量子力学計算により解析する手法を開発し、溶液中タンパク質の揺らいだ高次構造と、それらの存在比分布を定量的に決定する一般的なタンパク質構造解析法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 高強度レーザーを用いた全周囲多レンズ型 90 度散乱検出による高感度 ROA 装置を開発し、ROA 検出効率を市販装置の 200 倍に飛躍的に高め、タンパク質の ROA 測定を数分、少ない試料量 (0.1mg) で行うことを初めて可能とする。開発した ROA 装置を用いて、インスリンアミロイド線維の構造変化を分単位で測定することを可能とし、さらに構造変化のタンパク質濃度依存性を観測することで、これまで不明であった、アミロイド線維の構造変化過程に何種類の構造タイプが存在するのか明らかとする。

(2) ROA 実験スペクトルと量子力学計算スペクトルとの合致度合の定量的評価をタンパク質構造の探索過程に組み込むことで、実在する多数の溶液中タンパク質構造とそれらの存在比率を炭素鎖ねじれ角 120 度の分解能で得る、新規 ROA 構造解析法を開発する。アミロイド線維の天然化過程の構造変化を解析し、その構造変化部位と変化原因を明らかとする。

4. 研究成果

(1) 高強度レーザーを用いた周囲検出型高感度 ROA 装置の開発を行った。まず装置の設計、部品性能の検討、部品調達、および組み立てを行った。高出力でかつ低ノイズのレーザーを選定し調達した。ゆるく集光させたレーザー光と、それに平行に配列させたファイババンドルによって、スペクトル分解能を落とすことなく検出体積の増体を計る。そのため分光器の収差を補正するような曲率を配列方向にもったバンドルファイバを設計し作製した。

開発した ROA 測定装置の概念図を図 1 に、全体の写真を図 2 に示す。この装置は立体的な光学配置を持ち、2 つのレンズによってラマン散乱光を捕集する特異な光学系である。図 2 の写真において手前に設置される、円偏

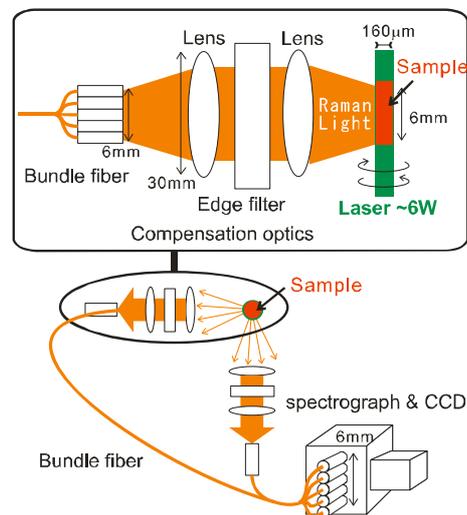


図 1. 周囲検出型高感度 ROA 装置の概念図

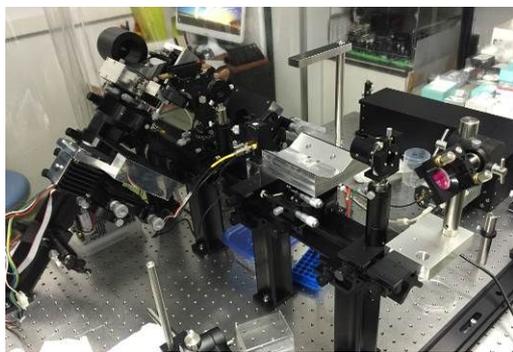


図2. 周囲検出型高感度 ROA 装置の写真

光スイッチのためのポッケルスセルが省略されている。右後方に見える黒い直方体は手製の分光器である。最大出力 6W の高強度レーザーを測定装置に組み込み、試料に照射した。高強度レーザーによる試料の損傷を回避するために、レーザー光を緩く集光し、単位面積あたりのレーザー強度密度を従来装置と同じとした。この装置を用い、トルエンのラマン測定を行い、従来の後方散乱 ROA 装置と検出感度を比較した。トルエンの 1003 cm^{-1} のピークの強度を、単位時間、単位レーザー強度あたりに変換し、申請者が依然に開散した後方散乱 ROA 装置と比較したところ、周囲検出型高感度 ROA 装置においては約 10 倍の検出感度が達成できた。このことから、高感度化が達成可能であることが示された。しかし、周囲検出型高感度 ROA 装置においては、装置由来の偽信号が予想外に大きいことが明らかとなった。装置光学系の偏光特性の不完全性によるスペクトル背景を抑制するために、ラマン散乱光の直線偏光成分を平均化し、偽信号の発生を抑える回転波長板装置部品を開発し、装置に組み込んだ。既存 ROA 装置と比較して、約 10 倍の検出感度を達成できたことは、高感度 ROA 装置の開発を大きく前進させた結果であり、評価に値する。今後、補償光学系の導入などにより装置誤差を削減することで、高感度 ROA 測定が可能となると予想される。

(2) 量子力学による ROA 構造解析法の開発においては、熱変性によりアミロイド線維を形成したインスリンをモデルタンパク質とし、アミロイド線維の高次構造解析法の開発を行った。インスリンアミロイド線維は平行 β シート構造を持つことが我々の実験から分かっている。天然状態インスリンは2つのS-S結合を内部に持ち、それはアミロイド線維状態においても切断されることなく保持されることが知られている。以上の事実を基に、ヘリックスおよび β ロール構造を持つインスリンをアミロイド線維の単量体構造としてモデル化した(図3)。天然状態において β ロール構造および β ヘリックス構造を持つタンパク質の結晶構造を結晶構造データベースから入手した。その β ロール構造の典型的な部分について、ペプチド鎖ねじれ角を讀

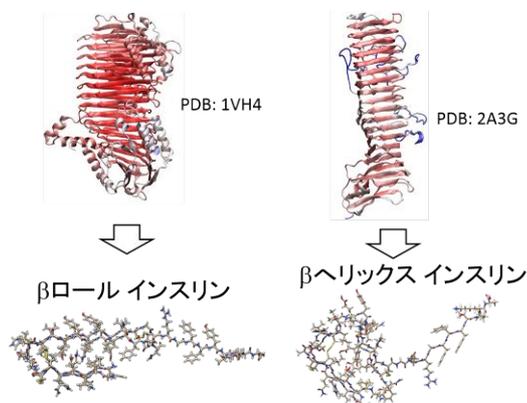


図3. アミロイド線維構造のモデル

み取り、インスリンを構成するアミノ酸へ複写した。その際、インスリンの2つのS-S結合が保持されるようにした。

これらモデル単量体について、アミロイド線維状態を模倣した周期境界条件下において分子動力学計算を行い、安定なインスリンアミロイド線維構造を予測した。その結果、線維内において β ロール構造は維持されるが、 β ヘリックス構造は不安定であり維持されないことが明らかとなった。構造揺らぎを持つ β ロール構造、計 865 個を分子動力学計算の結果から抽出し、全てについて ROA およびラマンスペクトルを量子力学により計算した。計算には分子断片化法を用い、インスリン全体のスペクトルを計算した。865 個全ての構造についての平均スペクトルを計算した。天然型インスリンについても、同様に分子動力学を適用し、量子力学計算を行った。以上により得られたアミロイド線維および天然型インスリンの計算スペクトルは、実験におけるスペクトル変化の特徴をよく再現した。この結果は、今回採用したモデル構造(積層した β ロール構造)が、現実のインスリンアミロイド線維の構造に近い構造であることを示している(図4)。量子力学による ROA 構造解析法が可能であることを示した重

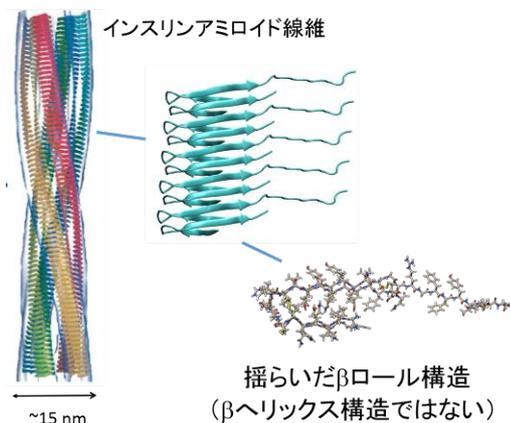


図4. 本研究において明らかとなったインスリンアミロイド線維の階層構造(最左の線維ナノ構造は既知)

要な結果である。NMR による構造解析が難しいインスリンアミロイド線維の構造を ROA によって解析できることを示せた点は非常に意義がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Jiří Kessler, Shigeki Yamamoto, and Petr Bouř, Establishing the Link between Fibril Formation and Raman Optical Activity Spectra of Insulin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 査読有, 19, 2017, 13614–13621. DOI: 10.1039/c7cp01556a

Shigeki Yamamoto, Mai Miyada, Harumi Sato, Hiromichi Hoshina, Yukihiro Ozaki, Low-Frequency Vibrational Modes of Poly(glycolic acid) and Thermal Expansion of Crystal Lattice Assigned On the Basis of DFT-Spectral Simulation Aided with a Fragment Method, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, 121, 2017, 1128–1138. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b11304

Harumi Sato, Mai Miyada, Shigeki Yamamoto, Kummetha Raghunatha Reddy, Yukihiro Ozaki, CH₂O (ether) Hydrogen Bonding along the (110) Direction in Polyglycolic Acid Studied by Infrared Spectroscopy, Wide-Angle X-Ray Diffraction, Quantum Chemical Calculations and Natural Bond Orbital Calculations, *RSC Adv.*, 査読有, 6, 2016, 16817–16823. DOI: 10.1039/c5ra19900j

Bui Linh Chi Huynh, Thuc Huy Duong, Thi My Lien Do, Travis George Pinnock, Lawrence Michael Pratt, Shigeki Yamamoto, Hitoshi Watarai, Takao Tanahashi, and Kim Phi Phung Nguyen, New γ -Lactone Carboxylic Acids from the Lichen *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale, *Parmeliaceae*, *Rec. Nat. Prod.*, 査読有, 10, 2016, 332–340. <https://doaj.org/article/48bebc0f4e474d9ab96de3eff97fa894>

Valery Andrushchenko, Daniele Padula, Elena Zhivotova, Shigeki Yamamoto, and Petr Bouř, Magnetic Circular Dichroism of Porphyrin Lanthanide M³⁺ Complexes, *Chirality*, 査読有, 26, 2014, 655–662. DOI: 10.1002/chir.22365

Shigeki Yamamoto, Tatsuya Furukawa, Petr Bouř, and Yukihiro Ozaki, Solvated States of Poly-L-alanine α -Helix Explored by Raman Optical Activity, *J. Phys. Chem. A*, 査読有, 118, 2014, 3655–3662.

DOI: 10.1021/jp500794s

〔学会発表〕(計6件)

山本 茂樹, 量子力学計算による結晶性ポリエステル低周波振動と高次構造相関, 日本分光学会年次講演会, 2017年5月23日, 早稲田大学, 招待講演

山本 茂樹, ラマン光学活性と量子力学/分子動力学計算によるインスリンアミロイド線維の高次構造解析, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月16日, 北海道大学

山本 茂樹, 宮田真, 佐藤春実, 保科宏道, 尾崎幸洋, 量子化学計算によるポリグリコール酸の低波数振動の帰属, 日本分光学会年次講演会, 2016年5月24日, 大阪大学

Shigeki Yamamoto, Peptide Conformations and Solvent Environments Obtained from Raman Optical Activity, 8th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS8), 15th Jul. 2015, Vienna, Austria, Plenary

山本 茂樹, Low-Frequency Vibrational Spectra of Polymers Deciphered by Quantum Mechanical Simulation, Frontier of Terahertz Science, 2014年8月6日, 沖縄科学技術大学院大学, 招待講演

山本 茂樹, Raman Optical Activity Spectroscopy and Quantum Mechanical Calculation on Protein Structures in Solutions, 日本分光学会年次講演会, 2014年5月26日, 理化学研究所 和光キャンパス, 奨励賞受賞講演

〔図書〕(計1件)

尾崎 幸洋, 佐藤 春実, 勝本 之晶, 森田 成昭, 森澤 勇介, 山本 茂樹, 培風館, エッセンシャル化学, 2015, 139-164

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/tukahara/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 茂樹 (YAMAMOTO, Shigeki)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 60552784

(4) 研究協力者

尾崎 幸洋 (OZAKI, Yukihiro)
Petr Bouř (BOUŘ, Petr)
塚原 聡 (TSUKAHARA, Satoshi)