

レオロジー NMR 法によるタンパク質凝集のその場観察

In situ observation of protein aggregation by Rheo-NMR spectroscopy

森本大智

京都大学 大学院工学研究科

Daichi Morimoto

Graduate School of Engineering, Kyoto University

Accumulation of abnormal protein aggregates is a common hallmark of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders; these aggregates mainly consist of protein fibrils, *i.e.*, amyloid fibrils. Despite the growing interest in their pathogenesis, the detailed formation mechanism remains elusive. To analyze the formation of amyloid fibrils at the atomic level, we have developed a novel rheological NMR (Rheo-NMR) spectroscopy to observe structural changes of proteins under shear conditions at the atomic level and in real time. By using the developed Rheo-NMR spectroscopy, we simultaneously monitored structural changes of the folded and unfolded states of an ALS-related protein SOD1 during the amyloid formation processes.

1. はじめに

神経細胞に異常な線維状のタンパク質凝集体 (アミロイド) が蓄積することは、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の共通した病理学的特徴である [1]. そのため、アミロイドの形成や蓄積は、神経変性疾患の発症や進行に関連していると考えられている [2]. アミロイド形成の最も特徴的な点は、タンパク質の構造変化を伴う複数の反応によって進行する点であり、結果として、アミロイド形成がほとんど見られないフェーズ (ラグフェーズ)、指数関数的に形成が進行するフェーズ (ログフェーズ)、そして形成が止まるフェーズ (プラトーフェーズ) が観察される [3]. これまで、複雑なアミロイド形成の分子メカニズムを理解するために様々な速度論的モデルが提案されてきたが [4,5], アミロイド形成中に起こる反応 (モノマーからオリゴマー、オリゴマーから線維への状態変化) に関する原子レベルの構造的知見は依然として不足している.

アミロイド形成におけるタンパク質の過渡的な構造変化をその場かつ原子分解能で捉える方法としてレオロジー NMR 法が挙げられる. レオロジー NMR 法は 1990 年に高分子化学分野で確立された方法論であり [6], 剪断ストレスを試料に加えながら NMR 測定ができる手法である. しかし、生物学的研究は数例あるものの [7,8], 従来法では NMR 感度が低いためタンパク質科学にほとんど利用されてこなかった. この NMR 感度の問題を克服するため、2017 年に我々は極低温プローブ (プリアンプが約 20 K まで冷やされたプローブ) を利用した新規のレオロジー NMR 法を確立した [9]. ポリユビキチン鎖 (ヘキサユビキチン) およびスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) は剪断ストレスを加えない生理条件 (pH, 温度, イオン強度組成など) ではアミロイドを形成しないタンパク質であるが、構築したレオロジー NMR 法によって剪断ストレ

スを加えることにより、これらのタンパク質のアミロイド形成を誘導することができ、その形成過程を NMR 測定により追跡することに成功した [9,10]. また、興味深いことに、レオロジー NMR 法を用いて SOD1 のアミロイド形成過程における過渡的な構造変化も捉え、線維形成中間状態の構造特性も明らかにすることが可能になった [11]. 本稿では、新しく構築したレオロジー NMR 法とそれによって得られたアミロイド形成に関する原子レベルの構造学的知見について解説する.

2. 新規レオロジー NMR 法の実施方法

従来のレオロジー NMR 法は [7,12-15], インナーロッドを取り付けた NMR サンプル管を電磁波照射とシグナル検出を担うプローブに直接挿入する必要があるため、測定ごとに NMR マグネットからプローブを脱着する必要があった. しかし、極低温プローブの場合、コストや時間の観点から測定ごとのプローブの脱着は現実的ではない. 実際、プローブの脱着が不要なレオロジー NMR ハードウェアが開発されているが [8,16,17], 極低温プローブ搭載の NMR 装置への導入実績は報告されていない. その中で我々は、通常の方法(リフトエアー)で NMR サンプル管を極低温プローブ搭載 NMR 装置に入れ、その後インナーロッドを挿入するという、プローブ脱着を必要としない簡便なレオロジー NMR 法を開発した(図 1a). 外径 3 mm のガラス棒を NMR サ

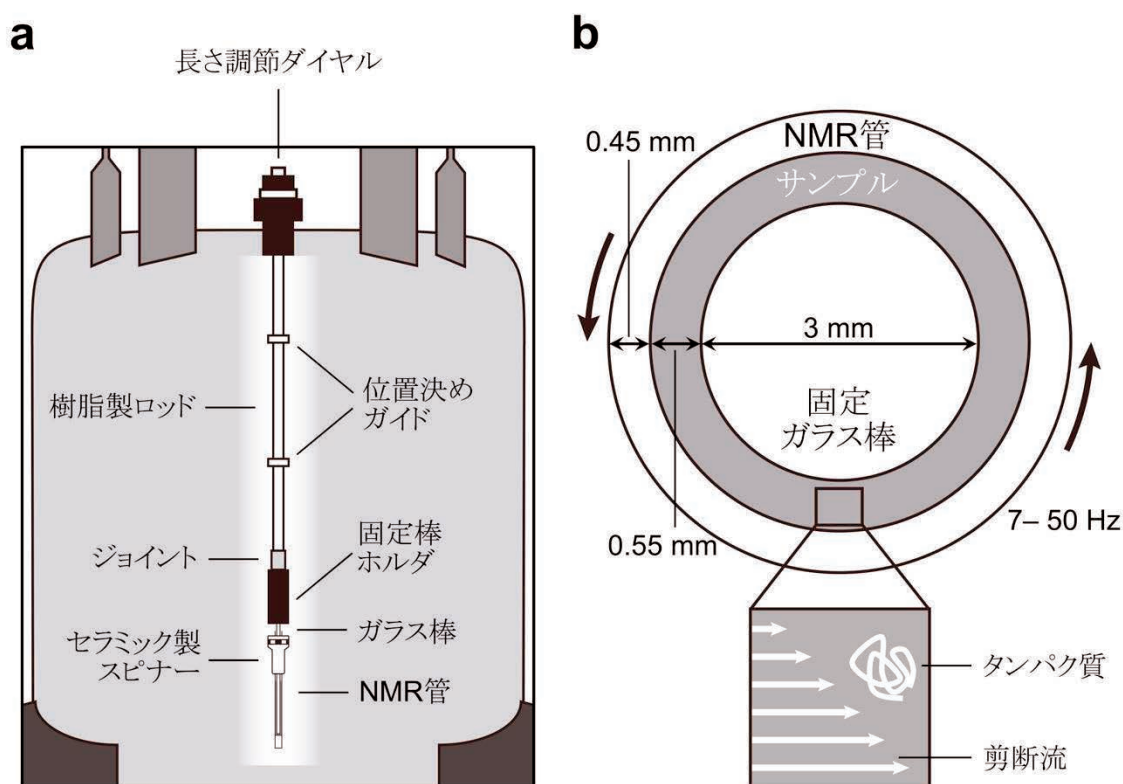


図 1. 開発したレオロジー NMR 法の模式図.

a, クライオプローブを用いたレオロジー NMR 法では、長さ調節ダイヤル(上)、樹脂製ロッド(中)、固定棒ホルダ(下)からなるインナーロッドを NMR サンプル管に挿入する. 固定棒ユニットの下端には外径 3 mm のガラス棒が接続されており、ガラス棒は NMR サンプル管の中心に位置する. b, 3 mm のガラス棒を外径 5 mm の NMR サンプル管(内径 4.1 mm)に挿入する. NMR サンプル管はスピナースピニングにより回転させ、ガラス棒は静止させる(上). スピナースピニングによりサンプル溶液中に剪断流が発生する(下). 図は D. Morimoto *et al.*, *Curr. Protoc.* 2, 1-15, (2022)[18] を改変したものである.

ンプル管 (外径 5 mm, 内径 4.1 mm) に挿入することによって二重同心円管 (クエットセル) が構成できる (図 1b 上) . NMR サンプル管 (外管) を NMR 装置デフォルト機能であるスピナースピニングによって回転させることで, クエットセルのギャップ (0.55 mm) 内に入れた試料溶液に剪断流を発生させることができる (図 1b 下) . スピナースピニングの回転周波数は 7 Hz から 50 Hz の整数値に設定することができる. このレオロジー NMR 法のインナーロッドの扱い方はエアプロ株式会社のホームページ (https://urheoe.airpro-net.com/wp-content/uploads/2020/06/uRheo_guide.pdf) にも記載されている. ここでは, タンパク質 NMR 研究者の立場からレオロジー NMR 実験に関する詳細を解説する.

2-1. NMR 装置にサンプル投入

2-1-1. NMR 装置の目標測定温度を設定する. 高温 (40 °C 以上) になると, アッパーシムスタックが膨張し始めるためインナーロッドの固定が不十分になる場合があるため注意が必要である.

2-1-2. 外径 5 mm のシゲミ社製 NMR サンプル管 (一般的に使用されるシゲミチューブの外管のみ) に 5–10% D₂O を含む 300 µL のサンプル溶液を入れる (図 2a 左) . 300 µL を大きく下回るとプローブコイルの検出可能範囲に気液界面があるため磁場の均一性が不十分になり S/N が悪くなる. 他社製の NMR サンプル管も代用可能であるが, クエットセルを構成するために内側のガラス底面は平らである必要がある.

2-1-3. NMR サンプル管内のサンプル溶液を脱気する (図 2a 左から中) . NMR 測定時に気泡が発生するのを防ぐため, NMR 装置に投入前に 5–10 分程度の脱気処理を行う.

2-1-4. NMR サンプル管にセラミックスピナーを深さ 2 cm のところで装着する (図 2a 中) . スピナー回転中の NMR サンプル管の振動を軽減するため, 比較的重いスピナーを使用する. また, 挿入するインナーロッドの長さを一定にするためすべての実験で NMR サンプル管の深さは 2 cm に固定する.

2-1-5. リフトエアで NMR サンプル管を NMR 装置に投入する (図 2a 左) . 投入後, ロックディスプレイには比較的弱い (添加した D₂O による) ロックシグナルが観測されるが, これは NMR サンプル溶液の一部がプローブの検出可能範囲外に位置しているためである. ガラス棒が挿入されることを想定しており, 挿入されるとサンプル管内 (つまり NMR プローブコイル内) のサンプル溶液レベルが上昇し, ロックシグナルの強度が上昇する.

2-1-6. スピナースピニングが適切に動作するか確認する (図 3c) . この時点におけるスピナースピニングがうまくいかない場合は, NMR 装置のエンジニアに問い合わせる必要がある.

2-2. NMR 装置にインナーロッドを挿入

2-2-1. 固定棒ユニット (3 mm ガラス棒付き) を樹脂製ロッドに接続する (図 2b 左, 中) . ガラス棒は蒸留水またはエタノールで軽く洗浄し, 実験用ティッシュで軽く拭き完全に乾燥させる.

2-2-2. インナーロッド (樹脂製ロッドに接続された固定棒ユニット) を NMR 装置に挿入する前に, 挿入する部分 (ガラス棒の下端から長さ調節ユニットの底までの領域) の長さを NMR サンプル管の底から NMR 装置のアッパーシムスタックの上までの高さに合わせる (図 3b) . エアプロ株式会社のマニュアルに詳しく記載されているようにアッパーシムスタックの長さは NMR 装置の種類によって異なり, ガラス棒の端が NMR サンプル管の底面に密着することを防ぐためにインナーロッドの挿入領域をわずかに短く (～ 1 cm) 調整する必要がある.

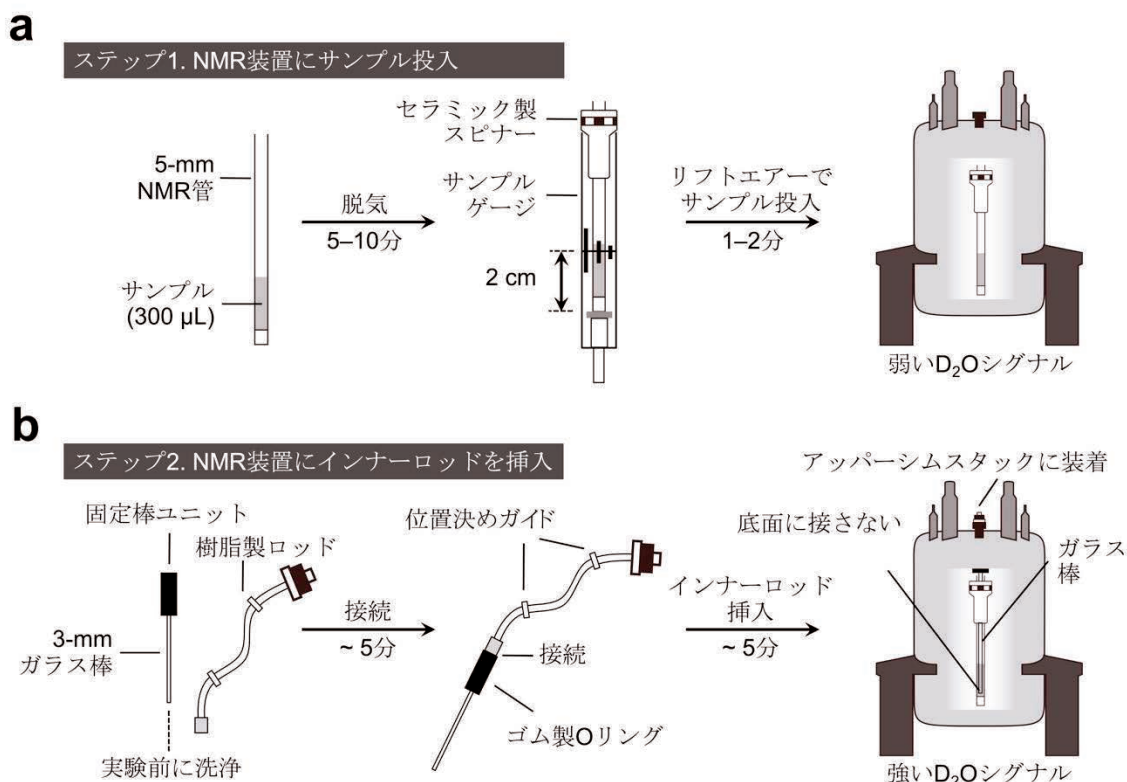


図 2. レオロジー NMR 測定のセットアップ.

a, NMR 装置へのサンプル管の投入方法. 左, 外径 5 mm のサンプル管に 5-10% D_2O を含む 300 μL の試料溶液を入れる. NMR 測定中に気泡が発生するのを防ぐため 5-10 分間脱気する. 中央, サンプル管にはセラミックスピナーを装着する. サンプル管の底は 2 cm の位置にセットする. 右, リフトエアでサンプル管を NMR 装置に投入する. サンプル溶液の一部がプローブの検出範囲外に位置するためこの段階ではまだ比較的弱いロックシグナルが観測される. b, インナーロッドの挿入方法. 左, 樹脂製ロッドに外径 3 mm のガラス棒を接続した固定棒ユニットを取り付ける. ガラス棒は毎回使用前に洗浄する. 中央, インナーロッドを NMR 装置に慎重に挿入する. 適切かつ安全に挿入するために, 固定棒ユニットには 2 つのゴム製 O リングが装着されており, 樹脂製ロッドには複数の位置決めガイドが備え付けてある. ガラス棒が正しく挿入されるとサンプル管内 (つまり NMR プローブコイル内) のサンプル溶液レベルが上昇し, ロックシグナルの強度が上昇する. 図は D. Morimoto *et al.*, *Curr. Protoc.* 2, 1-15 (2022)[18] を改変したものである.

2-2-3. インナーロッドを NMR 装置内に慎重に挿入する. 安全に挿入するため, 固定棒ユニットには 2 つのゴム製 O リングがあり, 樹脂製ロッドには複数 (2-4 個) の位置決めガイドがある. 固定棒ユニットと位置決めガイドの直径はアップーシムスタックの穴の直径よりわずかに小さく設計されているが, 2 つのゴム製 O リングの直径はわずかに大きく, ゴムの弾性によりインナーロッドを装置に固定できる. ただし, インナーロッドの約 22 cm の下部領域 (ガラス棒の先端から固定棒ユニットの最初のゴムリングまで) にはアシストがなく, この領域を抜き挿しする際には細心の注意が必要である.

2-2-4. 長さ調節ユニット (樹脂製ロッドの上端部に装備) をアップーシムスタックに装着する. アップーシムスタック上面には数カ所突起があり, 長さ調節ユニットにはその突起に合う穴が開いているので長さ調節ユニットの向きを調整してから挿入する. ガラス棒を NMR サンプル管に挿入し終わると, 強いロックシグナルが得られる (図 2b 右).

3. SOD1 のアミロイド形成における多状態同時構造解析

新規に構築したレオロジー NMR 法を用いて、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 関連タンパク質である SOD1 のアミロイド形成過程を原子レベルで解析した。一般的に、アミロイドを形成する球状のタンパク質はオリゴマー化や線維形成する前に、その三次構造をアンフォールディングする [19]。したがって、アンフォールド状態の挙動 (フォールド状態からの形成とオリゴマー状態への移行) を追跡することはアミロイド形成における核形成メカニズムを理解する上で重要である。しかし、アンフォールド状態自体は生理的条件下 (中性 pH, 室温付近) では非常に限られた割合しか存在しないため直接解析することは困難である。実際、アンフォールドした SOD1 は生理的条件下において 0.5% しか存在しなかった [11]。そこで、我々はタンパク質のアンフォールディングを誘導する尿素を用いた中程度の変性条件下で、SOD1 のフォールド状態とアンフォールド状態の NMR シグナルを同時に追跡した (図 3a)。2 M 尿素存在下ではフォールド状態とアンフォールド状態は ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルのクロスピーク強度比からそれぞれ 65% と 35% と見積もられた。つまり、この条件において両状態を同時かつ十分な NMR 感度で追跡することができる。

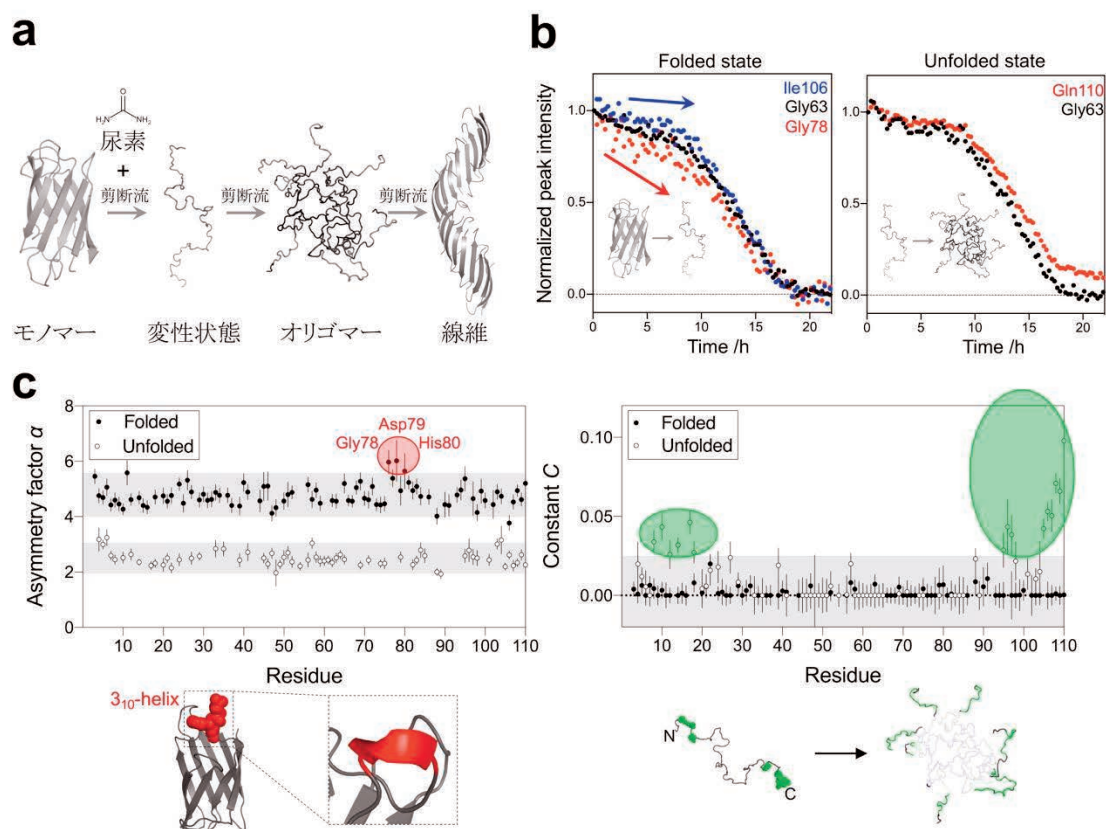


図 3. レオロジー NMR 法による SOD1 のアミロイド形成過程の追跡.

a, 尿素存在下における SOD1 のアミロイド形成の模式図。アンフォールディングされた SOD1 はアミロイドオリゴマーや線維の前駆体であるため、尿素によるアンフォールディングは SOD1 のアミロイド形成を促進する。尿素による中程度の変性条件下では、SOD1 のフォールド状態とアンフォールド状態の両方の NMR シグナルが検出可能である。b, 剪断流によるアミロイド形成過程における SOD1 のフォールド状態 (左) とアンフォールド状態 (右) のクロスピークの強度変化。c, ピーク強度減衰プロファイルを修正シグモイド関数でデータフィッティングして得られた減衰カーブの非対称性因子 α (左上) と定数 C (右上) の残基に対するプロット。顕著に大きな値を示した残基をフォールド状態 (左下, 赤), アンフォールド状態 (右下, 緑) にマッピングしている。

この尿素存在下でレオロジー NMR 法を用いて溶液中に剪断流を発生させ、連続的に ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定すると、SOD1 のフォールド状態とアンフォールド状態由来の NMR シグナルはいずれもシグモイド曲線様に減衰することが観察された (図 3b) . 実際、レオロジー NMR 実験後の溶液を透過型電子顕微鏡で観察するとアミロイド線維が形成されていることが確かめられた [11]. 興味深いことに、状態および残基によって異なる減衰プロファイルを示すことがわかった (図 3b) . そこで、定量的に減衰プロファイルの違いを解析するために修正シグモイド関数でデータフィッティングし、減衰カーブの非対称性因子 α と定数 C という二つのパラメータを得た.

アンフォールド状態の非対称性因子 α は全体的に小さな値を示し、残基間で大きな差異がなかった (図 3c 左上) . それに対し、フォールド状態の Gly78, Asp79, His80 は比較的大きな非対称性因子 α を示した (図 3c 左上) . これは、これらの残基の NMR シグナルが他の残基に比べて減衰が速かったこと意味する. フォールド状態では、これらの残基は 3_{10} ヘリックスを形成する. つまり、 3_{10} ヘリックスが全体的なアンフォールディングよりも前にアンフォールディングすることが示唆された (図 3c 左下) .

また、フォールド状態のいずれの残基も定数 C はほぼゼロの値を示したが、アンフォールド状態の N 末端と C 末端にある残基でのみ大きな定数 C を示した (図 3c 右上) . つまり、これらの残基の NMR シグナルがオリゴマーや線維状態においても検出されたことを意味しており、N 末端と C 末端にある残基はオリゴマーや線維状態でも柔軟に動くことができたと考えられる (図 3c 右下) .

これらの解析から、SOD1 のアミロイド形成過程において、全体的なアンフォールディングの前に 3_{10} ヘリックスのアンフォールディングが引き起こることがわかり、オリゴマー状態や線維状態における柔軟な領域を特定することができた. 次に、どのようにアンフォールド状態がオリゴマーを形成するかを調べるため、ほぼ完全にアンフォールディングする条件 (4 M 尿素存在下) で水素交換実験 (CLEANEX-PM) を行った. タンパク質のアミドプロトンと水との間の水素交換は溶媒への露出または保護の程度に依存する. したがって、水素交換プロファイルはオリゴマー形成におけるモノマー分子同士の相互作用を知るために有用な情報となる. オリゴマーはアンフォールド状態の分子が段階的に分子間相互作用することによって形成され、結果的に水素交換プロファイルは絶えず変化すると考えられる.

実際、実験開始時とラグフェーズにおける水素交換度 (100 ミリ秒水素交換をさせた時のアミド水素のクロスピークのピーク強度と水素交換をさせていない時の強度との比) を比較したところ、50 番付近の残基において相対的に水素交換度が減少していた (図 4a 右上) . 水素交換度が減少した残基は実験開始時に比べてラグフェーズでより溶媒から保護されていることを意味する. さらに、二種類のラグフェーズで水素交換度を測定し、比較したところ、28 番から 50 番に存在する残基でアミロイド形成が進むにつれて水素交換度が減少していることが観察された (図 4a 右中央, 右下) . これらの水素交換度が減少した残基は、過去の研究で特定した線維コア構造を形成する残基と一致しており [20], アミロイド形成においてこれらの同定した残基を介して分子間で相互作用し、オリゴマーのコア構造を形成することが示唆された.

このように新規レオロジー NMR 法を用いて、SOD1 のアミロイド形成過程における構造変化を、その場かつ原子分解能、そして複数の状態について同時に追跡することができた (図 4b) . このような時空間分解能の高い構造解析をおこなうことで複雑なアミロイドの形成機構のさらなる理解に役立つことを期待する.

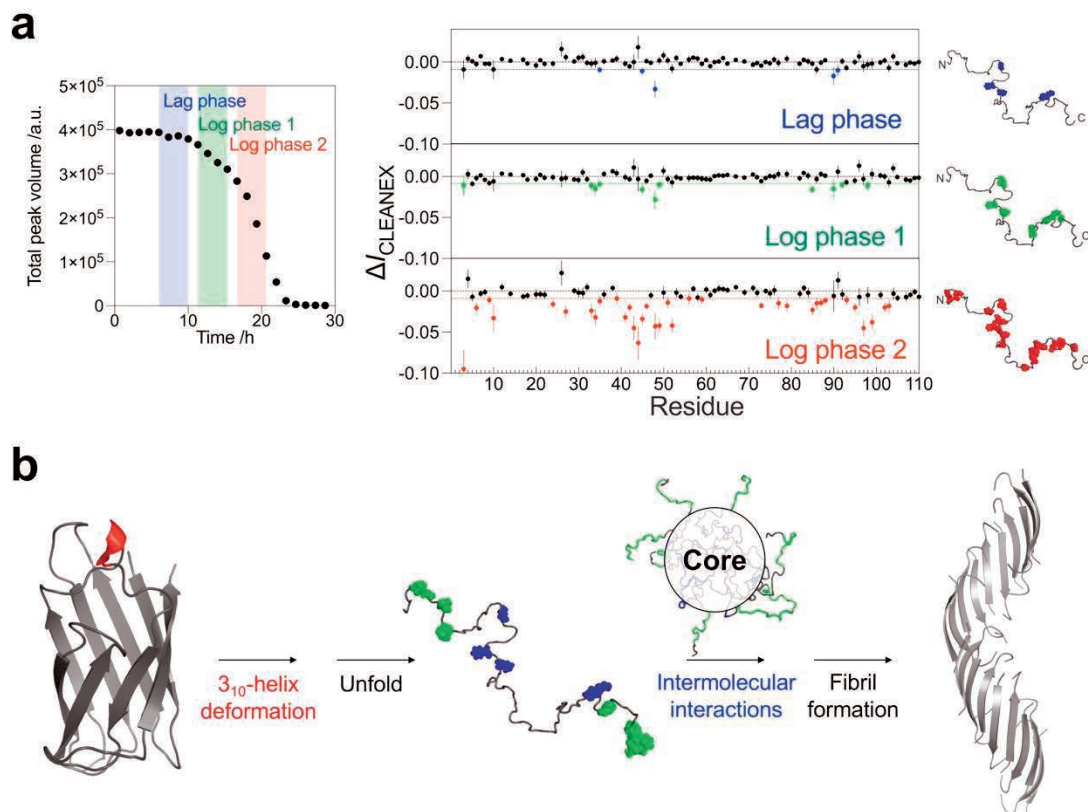


図 4. アミロイド形成のフェーズ依存的な水素交換プロファイル.

a, アミロイド形成の異なるフェーズにおける SOD1 のアミドプロトンと水の水素交換度の変化. 4 M 尿素が存在する条件下では SOD1 はほぼ完全にアンフォールド状態にある. 左, レオロジー NMR 実験におけるすべてのクロスピークのピーク強度の和の時間変化. 中央, 実験開始時とラグフェーズ (青), ログフェーズ 1 (緑), ログフェーズ 2 (赤) との水素交換度 (100 ミリ秒水素交換をさせた時のアミド水素のクロスピークのピーク強度と水素交換をさせていない時の強度との比) の差. 右, 顕著に水素交換度が実験前と比べて減少している残基を SOD1 のアンフォールド状態の構造にマッピング.

b, レオロジー NMR 実験に基づいた SOD1 のアミロイド形成モデル. 全体的なアンフォールディングの前に 3_{10} ヘリックスがアンフォールディングし (赤), 50 番付近の残基を中心にオリゴマーの核を形成し (青), N 末端と C 末端の領域はオリゴマー状態や線維状態において柔軟に動いている (緑).

4. おわりに

クライオプローブを用いたレオロジー NMR 法は, 蛍光や円二色性などの他の方法では困難であったタンパク質凝集におけるアミノ酸および状態特異的な構造情報を原子分解能で追跡することが可能である. そのため, アミロイド β , α -シヌクレイン, タウなど多くの神経変性疾患関連タンパク質の凝集をその場かつ高分解能で解明することに貢献できると考える. さらに, タンパク質凝集だけでなく, von Willebrand 因子 [21] や FimH [22] などの非凝集性タンパク質の剪断流による構造変化を解析することにも役立つことができるであろう. また, 剪断流は高分子複合体溶液の粘度上昇 [23] や無機・有機化合物の結晶化促進 [24,25] にも関係していることから幅広い研究分野に貢献する可能性がある.

現在, 本レオロジー NMR 法は NMR 感度ならびに分解能で世界最高を達成している. しかし, スピナー回転の回転数が制限されている点や, 使用する NMR 試料管が開放系になり試料の蒸発が問題になる点など, 改善点が幾つも存在する. 今後, より改良したレオロジー NMR 法の開発

に従事したいと考える。

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり，京都大学大学院工学研究科 白川昌宏教授，京都大学大学院農学研究科 菅瀬謙治教授，京都大学大学院医学研究科 Erik Walinda 助教，IPF Ulrich Scheler 博士，ブルカー・ジャパン株式会社 山本昭彦氏から多大なる助言および指導を賜りました。また，本研究は JSPS 科研費 JP22K06168，JST 創発的研究支援事業 JPMJFR2227，公益財団法人島津科学技術振興財団，みずほ学術振興財団，服部報公会，豊田理化学研究所，京都大学ジョン万プログラム，蛋白質研究奨励会，ソルト・サイエンス研究財団の助成を受けたものです。

参 考 文 献

- [1] C. Ross, M. Poirier, *Nat. Med.* **10 Suppl**, S10-7, (2004).
- [2] M. G. Iadanza, M. P. Jackson, E. W. Hewitt, N. A. Ranson, S. E. Radford, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 755–773, (2018).
- [3] P. Arosio, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 7606–7618 (2015).
- [4] F. Oosawa, M. Kasai, *J. Mol. Biol.* **4**, 10–21 (1962).
- [5] G. Meisl, J. B. Kirkegaard, P. Arosio, T. C. T. Michaels, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, S. Linse, T. P. J. Knowles, *Nat. Protoc.* **11**, 252–272 (2016).
- [6] A. I. Nakatani, M. D. Poliks, E. T. Samulski, *Macromolecules* **23**, 2686–2692 (1990).
- [7] K. Ohgo, F. Bagusat, T. Asakura, U. Scheler, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4182–4186 (2008).
- [8] P. J. B. Edwards, M. Kakubayashi, R. Dykstra, S. M. Pascal, M. A. K. Williams, *Biophys. J.* **98**, 1986–1994 (2010).
- [9] D. Morimoto, E. Walinda, N. Iwakawa, M. Nishizawa, Y. Kawata, A. Yamamoto, M. Shirakawa, U. Scheler, K. Sugase, *Anal. Chem.* **89**, 7286–7290 (2017).
- [10] N. Iwakawa, D. Morimoto, E. Walinda, Y. Kawata, M. Shirakawa, K. Sugase, *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2271 (2017).
- [11] N. Iwakawa, D. Morimoto, E. Walinda, M. Shirakawa, K. Sugase, *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 10604–10613 (2021).
- [12] M. M. Britton, P. T. Callaghan, M. L. Kilfoil, R. W. Mair, K. M. Owens, *Appl. Magn. Reson.* **15**, 287–301 (1998).
- [13] P. T. Callaghan, in *Encycl. Magn. Reson.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 737–750 (2002).
- [14] P. T. Callaghan, *Rheol. Acta* **47**, 243–255 (2008).
- [15] B. Medronho, J. Brown, M. G. Miguel, C. Schmidt, U. Olsson, P. Galvosas, *Soft Matter* **7**, 4938 (2011).
- [16] T. I. Brox, B. Douglass, P. Galvosas, J. R. Brown, *J. Rheol.* **60**, 973, (2016).
- [17] S. Kuczera, L. Gentile, T. I. Brox, U. Olsson, C. Schmidt, P. Galvosas, *Langmuir* **34**, 8314–8325 (2018).
- [18] D. Morimoto, E. Walinda, A. Yamamoto, U. Scheler, K. Sugase, *Curr. Protoc.* **2**, 1–15 (2022).
- [19] F. Chiti, C. M. Dobson, *Nat. Chem. Biol.* **5**, 15–22 (2009).
- [20] L. Lang, M. Kurnik, J. Danielsson, M. Oliveberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 17868–17873 (2012).
- [21] H. Fu, Y. Jiang, D. Yang, F. Schefflinger, W. P. Wong, T. A. Springer, *Nat. Commun.* **8**, 324 (2017).
- [22] W. E. Thomas, E. Trintchina, M. Forero, V. Vogel, E. V. Sokurenko, *Cell* **109**, 913–923 (2002).
- [23] Y. Shangguan, M. Liu, G. Luo, Q. Zheng, *RSC Adv.* **6**, 110367–110374 (2016).
- [24] J. Wang, J. Bai, Y. Zhang, H. Fang, Z. Wang, *Sci. Rep.* **6**, 26560 (2016).
- [25] J.-K. Sun, Y. I. Sobolev, W. Zhang, Q. Zhuang, B. A. Grzybowski, *Nature* **579**, 73–79 (2020).

著者略歴



森本大智 (MORIMOTO Daichi)

京都大学大学院工学研究科 分子工学専攻 助教

2014 年 4 月 京都大学大学院工学研究科 研究員

2014 年 9 月 より 現職

2015 年 3 月 京都大学 博士 (工学) 取得

2023 年 4 月 より JST 創発的研究支援事業 創発研究者