

44. 相分離を介した α シヌクレインの線維形成機構の解明

宮ノ入 洋平

大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質次世代構造解析センター

Key words : NMR, 安定同位体標識, アミロイド線維, 液-液相分離, 神経変性疾患

緒言

近年、様々な神経変性疾患の発症に関与する天然変性蛋白質が、相分離過程を介して凝集性のアミロイド線維を形成することが明らかとなってきた。パーキンソン病 (PD) や多系統萎縮症 (MSA) の発症と関連する α シヌクレイン蛋白質 (α Syn) も液液相分離を介して凝集性の線維構造を形成することが示されたが、重要な点として、各種神経変性疾患で観察される α Synの凝集線維が、疾患ごとに全く異なる構造を示すことが明らかとなった。具体的には、PDやレビー小体に関与する神経変性疾患の患者さんではrod様の α Syn線維が確認され [1, 2]、MSAではtwistされた線維が確認される。つまり、線維構造の多型性と神経変性疾患の発症には相関関係があり、 α Synの相分離過程における構造動態や外的因子が α Synに及ぼす影響が注目されている。このような背景から、 α Synの線維形成機構の解明に向けた研究が世界中で展開され、pHや塩濃度、リン脂質の変化が、 α Synの液滴形成能および線維構造に影響を及ぼすことが示されてきた [1, 2]。そこで、これら外的因子の影響を詳細に解明するため、 α Synの構造情報を原子分解能で捉えることが重要視されている。

α Synは140アミノ酸からなる天然変性蛋白質であり、両親媒性を有するN末領域、疎水性残基が多い中央部 (NAC領域) および、負電荷を有するアミノ酸残基に富むC末領域で構成されている (図1)。 α Synをはじめとする天然変性蛋白質の構造動態を原子分解能で捉えるうえで、NMR法を用いた研究が威力を発揮している。特に、 α Synの単量体から線維構造を形成する過程では、NAC領域およびC末端領域のアミノ酸残基において、アミド基由来のシグナルに特徴的な変化が確認されている。さらにNMR法およびクライオ電子顕微鏡解析によりアミロイド線維の高分解能立体構造も報告されている。しかし、従来の研究では相分離形成時の α Synの構造動態情報が欠けているため、その分子機構はおろか、疾患によって異なる線維構造の、形成機構の解明には至っていない。近年では、in-cell NMR法が開発され、生細胞内における標的蛋白質の立体構造解析や相互作用解析が可能となっているが、相分離を介するような分子夾雑化や、粘性の高い条件下においては十分なシグナル感度が得られず、詳細な分子機構の解明には至っていない。特に、従来の α Syn等の天然変性蛋白質を対象としたNMR解析では、アミド基を観測対象とした解析が主流であることが問題である。アミド基の観測は簡便である反面、溶媒中の水との交換運動の影響が顕著となり信号が消失してしまう傾向がある。また蛋白質主鎖の情報しか得られないため、相互作用や相分離形成において重要視されている疎水性相互作用や静電相互作用、水素結合等をアミド基のみから解析することはできず、 α Synの構造動態を理解するうえで、十分なデータを得ることが困難である。

著者は、上記問題点を解決するため、独自の安定同位体標識技術を確立し、100~500 kDaに及ぶ高分子量蛋白質複合体についても、各種アミノ酸残基のメチル基やメチレン基、芳香環由来のNMR信号を高感度に観測し、構造動態を捉えることに成功してきた [3]。また、溶媒中の水との交換運動に影響されない多核種NMR観測実験も確立し [4]、天然変性蛋白質をはじめ、様々な種類の蛋白質に対して動態解析法を確立している。これら独自の技術と著者の所属先で整備している高磁場NMR装置を活用することで、 α Synの液滴形成時の構造動態および線維形成の分子機構を明らかにする。また、著者の所属機関では、独自の ^{19}F 化合物ライブラリーを保有しており相互作用スクリーニングが可能である。上述の構造動態解析と共に化合物スクリーニングを行い各種疾患に観られる線維構造の形成を阻害する薬剤のリード化合物を探索する。

方法

1. 高度に安定同位体標識された α Syn の調製

α Syn の線維形成過程では、 α Syn 同士が相互作用して多量体を形成する。そのため、分子量が増大し NMR シグナルが観測できなくなる恐れがある。そこで、 α Syn を均一に重水素標識して、みかけの分子量を低減させつつ、部位特異的およびアミノ酸残基特異的に NMR シグナルを観測する手法を選択した。具体的には、 α Syn 遺伝子をコードする発現プラスミドによって形質転換した大腸菌を、重水および重水素化グルコースを用いて調製した最小培地 (M9 D₂O 培地) で培養し、重水素化 α Syn の大量発現系を確立した。また、この発現系をもとに、Tyr 残基を特異的に安定同位体標識する手法を確立した。

2. α Syn の NMR 測定 (¹H-¹⁵N HSQC スペクトル)

上記 1 にて確立した手法を用いて、均一に ²H、¹⁵N 標識した α Syn ([²H, ¹⁵N]- α Syn) を用いて、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した。NMR 測定には、0.1 mM の α Syn 溶液 (buffer : 50 mM Tris-HCl, 5% D₂O, pH 7.4) を使用した。NMR 装置は 600 MHz (Bruker Avance III HD 600, QCI-P 型極低温プローブ) を使用した。 α Syn の線維形成過程を確認するため NaCl の濃度を 50~500 mM まで変化させながら測定を行った。また、リン脂質 PI-3,4,5-P₃ との相互作用を確認するため、1 mM PI-3,4,5-P₃ 添加に伴う α Syn のアミドシグナルの変化を解析した。すべての NMR 実験は温度 310 K において行った。

3. 新規 SAIL-Tyr の設計・合成および変異型 α Syn の調製

α Syn の Tyr 残基由来の NMR 信号を特異的かつ高感度に観測するために、独自の SAIL 技術を活用して、立体・位置特異的に ²H 及び ¹³C を導入した新規 SAIL-Tyr を 2 種設計した (図 2)。一方の SAIL-Tyr (SAIL-Tyr 1) では、芳香環の δ 位の CH 基を特異的に ¹³C-¹H 標識した。もう一方 (SAIL-Tyr 2) では、芳香環由来の ¹H 信号を高分解能かつ高感度に捉えるために、¹²C-¹H 標識した。いずれも β 位メチレン基については ¹³C _{β} -¹H _{β_3} /²H _{β_2} のパターンを保持しており、メチレン基由来の ¹³C-¹H 信号を観測できるように設計した。各 SAIL-Tyr は SAIL テクノロジーズの協力を得て合成された。 α Syn には 3 つの Tyr 残基が存在するが (Y125, Y133, Y136)、Tyr 信号の帰属を簡便化するため Y133 をアラニンに置換した α Syn-Y133A を作製し、上記 1 に従って NMR 測定用の試料を調製した。

4. α Syn の NMR 測定 (¹H-¹³C HSQC、¹H-¹H NOESY、¹H 1D スペクトル)

上記 3 にて作製した SAIL-Tyr で標識した [²H, ¹⁵N]- α Syn ([SAIL-Tyr, ²H, ¹⁵N]- α Syn) を、上記 1 で確立した手法で調製した。NMR 測定には、0.1 mM の α Syn 溶液 (buffer : 50 mM Tris-HCl, 5 or 100%D₂O, pH 7.4) を使用した。NMR 装置は 600 MHz (Bruker Avance III HD 600, QCI-P 型極低温プローブ) および 950 MHz (Bruker Avance III 950, TCI 型極低温プローブ) を使用した。線維形成に伴う α Syn の Tyr 残基の NMR 信号の変化を捉えるために 50~500 mM の NaCl 濃度下で、¹H-¹³C HSQC、¹H-¹H NOESY 及び ¹H 1D スペクトルを測定した。すべての NMR 実験は温度 310 K において行った。

結果および考察

1. [²H, ¹⁵N]- α Syn の線維形成に伴う構造動態変化

共同研究者らとの先行研究から、 α Syn 線維の形態に依存して、異なる神経疾患が関与していることが知られていた。具体的にパーキンソン病 (PD) では rod 型の線維を示し、多系統萎縮症 (MSA) では twist 型の線維形成が確認されていた。この形態形成は、 α Syn の単量体の状態変化に起因することが見出され、NaCl の濃度が 300 mM 未満であれば twist 型の線維形成が促進され、300 mM 以上では rod 型の線維が促進された [1]。また、PD の患者さんにみられる α Syn の凝集体ではリン脂質が含まれることがわかり、特に PI-3,4,5-P₃ が α Syn の凝集体形成および rod 型線維の

形成を促進することが明らかとなった [2]。そこで、rod 型線維の形成過程を明らかにするため、 $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ - αSyn を用いて NaCl および PI-3,4,5- P_3 添加に伴う αSyn の構造動態変化を、NMR 法を用いて解析した。

まず、 $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ - αSyn について、50~500 mM の NaCl 存在下における ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し各残基についてアミドシグナルの変化を解析した。その結果、NaCl 濃度が上昇することに伴い、C 末領域全体 (V95~A140) および NAC 領域の前半 (K60~G68) において、顕著にシグナル感度が減少することが分かった (図 1)。サイズ排除クロマトグラフィー等の解析より、 αSyn は 300 mM 以上の NaCl 条件下において、よりコンパクトな構造を形成することが示唆されていた [1]。また一般的に、塩濃度の上昇に伴い疎水性相互作用が強くなる傾向にあることから、300 mM 以上の NaCl 条件下では αSyn は C 末領域と NAC 領域前半で疎水性相互作用を形成すると考えられた。

次に、 αSyn とリン脂質との相互作用を NMR 測定により確認した。 $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ - αSyn に PI-3,4,5- P_3 を含むリポソームを添加したところ、 αSyn の N 末領域 (V3~T59) でシグナル感度が顕著に低下し、NAC 領域前半と C 末領域でも、シグナル感度減少がみられた (図 1) [2]。N 末領域は正電荷に富むアミノ酸残基が多く存在することから、PI-3,4,5- P_3 のリン酸基と静電相互作用を介して結合すると考えられた。また NaCl 添加時と同様に、NAC 領域前半と C 末領域でシグナル感度が低下したことから、両ドメイン間での相互作用が生じていると考えられた。

以上の NMR 測定の結果から、 αSyn 単量体が rod 型線維を形成していく過程では、以下のような構造変化が起きていると考えられた。①低塩濃度下では αSyn は完全なランダムコイル状態で、N 末領域、NAC 領域 C 末領域が自由に運動することができる。その中で、各ドメイン同士が弱い相互作用を介して、さまざまなコンフォメーションを形成している。②そこに、NaCl や PI-3,4,5- P_3 が共存すると、 αSyn はそれらと結合することで、運動性が抑えられ、かつ、ドメイン間の相互作用様式も制限される。N 末領域と C 末領域間では静電相互作用を形成することも示唆されたが、塩や脂質との相互作用で両ドメイン間での静電相互作用は抑制され、その代わり疎水性残基に富む NAC 領域が C 末領域と疎水性相互作用を形成しやすくなる。③NAC 領域前半と C 末領域が相互作用したコンフォメーションが増加することで、 αSyn 同士の相互作用も均一化され、最終的に rod 型の線維が形成されていく (図 1)。この仮説においては、C 末領域と NAC 領域前半との疎水性相互作用の形成がカギとなる。実際に、NAC 領域前半にはバリン (V) やアラニン (A) 残基が局在しており、C 末領域には 3 つの Tyr 残基が存在する。これら疎水性残基が、塩濃度やリン脂質添加に伴い、相互作用することを直接的に観測することが必要となる。従来のアミド基を対象とした解析では、この点を直接的に示すことは困難である。そこで、Tyr 残基の側鎖芳香環由来の NMR 信号をプローブとして、 αSyn の構造動態の変化を観測することにした。

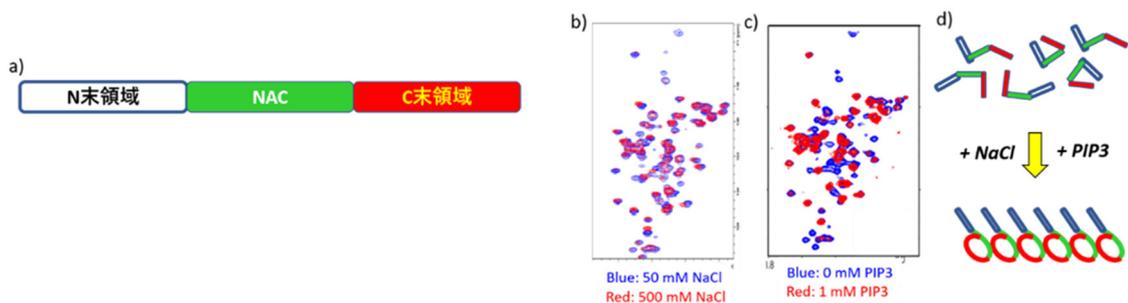


図 1. αSyn と NaCl およびリン脂質との相互作用

- αSyn のドメイン構造。N 末領域、NAC 領域、C 末領域より構成される。
- NaCl 濃度に依存した αSyn ^{15}N HSQC スペクトルの変化。500 mM NaCl 添加時 (赤) では C 末領域と NAC 領域前半のシグナル感度が低下した。
- PIP3 添加に伴う αSyn ^{15}N HSQC スペクトルの変化。PIP3 添加時 (赤) では C 末領域と NAC 領域前半に加え N 末領域でも顕著にシグナル感度が低下した。
- Rod 型線維形成過程のモデル。複数のコンフォメーションを有する αSyn が、NAC と C 末領域間で相互作用した均一なコンフォメーションを示す。

2. [SAIL-Tyr, ^2H , ^{15}N] - αSyn を用いた NMR 測定

αSyn の Tyr 残基の NMR 信号を、特異的かつ高感度に観測するため、SAIL-Tyr1 および SAIL-Tyr2 (図 2) で標識した αSyn を調製した。具体的には M9 D_2O 培地 250 ml あたり 5 mg の SAIL-Tyr を添加して大腸菌を培養することで αSyn の Tyr 残基に SAIL-Tyr を導入することの成功した (標識率 95%以上)。まず、[SAIL-Tyr, ^2H , ^{15}N] - αSyn について、 ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定した。その結果、すべての Tyr 残基について、芳香環 δ 位に由来する ^{13}C - ^1H シグナルを観測することに成功した。次に Y133A 変異 αSyn 等を利用して、Y133, Y136 および Y125 に由来する δ 位 ^{13}C - ^1H シグナルを帰属することに成功した (図 2)。

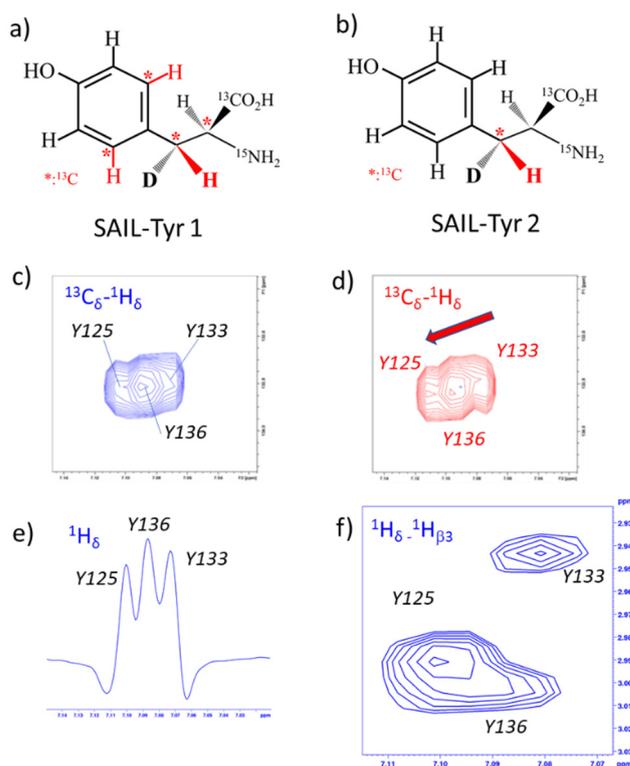


図 2. SAIL-Tyr を利用した αSyn Tyr 残基側鎖の NMR シグナルの観測

- SAIL-Tyr 1 の構造式。 δ 位は ^{13}C - ^1H HSQC で観測される。
- SAIL-Tyr 2 の構造式。 δ 位は ^1H 1D、 ^1H - ^1H NOESY で観測される。
- 50 mM NaCl 条件下における αSyn Tyr 残基 δ 位の ^{13}C - ^1H HSQC スペクトル。
- 500 mM NaCl 条件下における αSyn Tyr 残基 δ 位の ^{13}C - ^1H HSQC スペクトル。
塩濃度の上昇によりわずかに低磁場側にシフトする (赤矢印の方向)。
- 50 mM NaCl 条件下における αSyn Tyr 残基 δ 位の ^1H 1D スペクトル。 SAIL-Tyr 2 を利用することで、3つの Tyr 残基を明確に分離して観測できた。
- 50 mM NaCl 条件下における αSyn Tyr 残基の ^1H - ^1H NOESY スペクトル。 SAIL-Tyr 2 を利用することで、3つの Tyr 残基について、 $^1\text{H}_\delta$ と $^1\text{H}_{\beta 3}$ 間の NOE シグナルを帰属することができた。

次に、NaCl 濃度の変化に伴う Tyr 残基 δ 位の ^{13}C - ^1H シグナルの変化を解析した。その結果、いずれのシグナルについても、化学シフト変化を示していた。このことから、rod 型線維への形成過程において、Tyr 残基の芳香環が関与した相互作用および構造動態変化が確認された。

一方で、各シグナルの線幅は広幅化しており、3つのシグナルを明確に分離して観測することは困難であるため、Tyr と相互作用するアミノ酸残基を特定することは困難であった。そこで、 δ 位の ^{13}C を ^{12}C に置き換えた SAIL-Tyr2 を

利用することで、核緩和効果を抑制して δ 位 ^1H シグナルを高分解能で観測することを試みた。その結果、3つのTyr残基に由来する δ 位 ^1H シグナルを明確に分離観測することができ、 ^1H - ^1H NOESY スペクトルからもTyr残基 ϵ 位や $\beta 3$ 位の ^1H とのNOEシグナルを観測することができた(図2)。 ^1H 1D実験は短時間で高感度なシグナルを観測できるため、今後の相分離条件下でのNMR測定やrod線維形成の阻害剤スクリーニング実験への応用が期待できる。

今回設計したSAIL-Tyr1およびSAIL-Tyr2は、Tyr残基側鎖由来のNMRシグナルの高感度観測に効果を示したが、アミノ酸配列特異的なシグナル帰属にも配慮した設計となっているため、高感度観測においては、更なる改良の余地がある。具体的には、Tyr残基の δ 位のみ ^1H とし、その他の水素はすべて重水素化し、炭素、窒素も ^{12}C 、 ^{14}N とすることで、核緩和源を究極的に排除したアミノ酸を設計する。またTyrのみならず他のアミノ酸残基についても、SAIL技術を応用した部位特異的な安定同位体標識を導入し、相分離状態での α Synの構造動態変化を詳細に解明することを目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学系研究科神経内科学研究室の望月秀樹博士、池中建介博士、César Aguirre博士である。

文献

- 1) Cesar Aguirre, Kensuke Ikenaka, Masatomo So, Takahiro Maruno, Keiichi Yamaguchi, Kichitaro Nakajima, Chi-Jing Choong, Kei Nabekura, Goichi Beck, Kentaro Tomii, Yu Yamamori, Junko Doi, Tomoyasu Matsubara, Maho Morishima, Keita Kakuda, Makoto Hideshima, Yasuyoshi Kimura, Seiichi Nagano, Kousuke Baba, Shigeo Murayama, Hirotugu Ogi, Yoshitaka Nagai, Yasushi Kawata, Susumu Uchiyama, Yohei Miyanoiri, Yuji Goto, Hideki Mochizuki. Conformational change in the monomeric alpha-synuclein imparts fibril polymorphs. *bioRxiv*. 2022 Feb 10; DOI: 10.1101/2022.02.10.479831
- 2) Chi Jing Choong, César Aguirre, Keita Kakuda, Goichi Beck, Hiroki Nakanishi, Yasuyoshi Kimura, Shuichi Shimma, Kei Nabekura, Makoto Hideshima, Junko Doi, Keiichi Yamaguchi, Kichitaro Nakajima, Tomoya Wadayama, Hideki Hayakawa, Kousuke Baba, Kotaro Ogawa, Toshihide Takeuchi, Shaymaa Mohamed, Mohamed Badawy, Shigeo Murayama, Seiichi Nagano, Yuji Goto, Yohei Miyanoiri, Yoshitaka Nagai, Hideki Mochizuki, Kensuke Ikenaka. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate interacts with alpha-synuclein and initiates its aggregation and formation of Parkinson's disease-related fibril polymorphism. *Acta Neuropathologica* 145; 573–595 (2023). PMID: 36939875 DOI: 10.1007/s00401-023-02555-3
- 3) Yohei Miyanoiri, Mitsuhiro Takeda, Tsutomu Terauchi, Masatsune Kainosho. Recent Developments in Isotope-aided NMR Methods for Supramolecular Protein Complexes -SAIL/Aromatic TROSY. *BBA Gen Subj.* 1864(2); 129439 (2020). PMID 31593752 DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.129439
- 4) Yuichi Yoshimura, Masatomo So, Yohei Miyanoiri. Carbonyl ^{13}C -detect solution-state protein NMR experiments to circumvent amide-solvent exchange broadening: Application to $\beta 2$ -microglobulin. *BBA-Proteins Proteomics* 1869(3) 140593-140593 (2021). PMID 33359410 DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140593