

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

【目的】本課題では、独自の安定同位体標識 NMR 法を駆使して、相分離過程を介した α シヌクレイン蛋白質 (α Syn) のアミロイド線維形成機構を原子分解能で解明することを目的とする。 α Syn を種々の溶液条件下において NMR 測定を行い、相分離および線維形成に伴う構造変化を原子分解能で解析する。その際に、独自に開発を進めてきた立体整列安定同位体標識 (Stereo Array Isotope Labeling : SAIL) 法も活用し、種々の神経変性疾患に關与する線維形成機構の解明を目指す。

【方法】均一に ^2H 、 ^{15}N 標識した α Syn を、大腸菌生合成系を用いて調製し、各種溶液条件にて NMR 測定を行った。特に、塩濃度とリン脂質を添加した際に NMR 測定を行い、 α Syn の線維形成および相分離形成に伴う構造変化を、各アミノ酸残基のアミド基を対象に解析した。その後、 α Syn の Tyr 残基を特異的に NMR で観測するために、改良型の SAIL-Tyr 残基 (SAIL-Tyr) を設計し、合成を依頼した。合成された SAIL-Tyr を大腸菌の培養培地に添加することで、SAIL-Tyr 標識 α Syn を調製した。この標識体を用いて、Tyr 残基の芳香環 δ 位に由来する ^{13}C - ^1H ならびに ^{12}C - ^1H 信号を NMR にて特異的に観測し、 α Syn の線維形成・相分離過程における Tyr 残基の変化を原子分解能で解析した。

【結果】著者らは、 α Syn 単量体が NaCl および CaCl_2 の濃度に依存して、そのコンフォメーションが変化し、パーキンソン病 (PD) 等にみられる rod 型の α Syn 線維が形成されることを見出した。実際に、 ^2H 、 ^{15}N 標識した α Syn について ^1H - ^{15}N HMQC スペクトルを確認したところ、おもに α Syn の C 末端領域と中央部 (NAC) 領域において、アミド基由来の NMR シグナルに変化が見られた。また著者らは、 α Syn とリン脂質との相互作用が PD にみられる rod 型線維およびレビー小体といった凝集体形成を促進していることを示し、 ^2H 、 ^{15}N 標識 α Syn を利用した同様の NMR 実験より、 α Syn の N 末端領域が中心となり、PI-3,4,5- P_3 と強く結合していることを明らかにした。これらの結果から、 α Syn が単量体から特定のコンフォメーションを形成し、rod 型線維の形成を促進することが示唆された。一方で、これらアミド基を対象とした NMR 実験では、そのコンフォメーション形成過程を高い分解能で明らかにすることは困難であり、コンフォメーション形成や線維形成のカギとなるアミノ酸残基や相互作用様式を明らかにすることができなかった。そこで、観測対象を α Syn のチロシン残基 (Tyr) に限定し、Tyr の芳香環側鎖由来の NMR 信号を高感度かつ高分解能に捉える手法を確立した。具体的には、独自の安定同位体標識技術である SAIL 法を活用し、芳香環 δ 位 CH 基に由来する NMR シグナルを高感度かつ高分解能に観測することに成功した。その結果、従来法では捉えることができなかった α Syn の Tyr 芳香環を介したコンフォメーション変化を直接的に捉えることに成功した。本手法は粘性の高い溶液条件下でも NMR シグナルを高感度に検出することが可能であり、相分離状態における α Syn の相互作用様式を詳細に解明することが期待できる。

革新的安定同位体標識による α Syn 線維形成機構の解明

