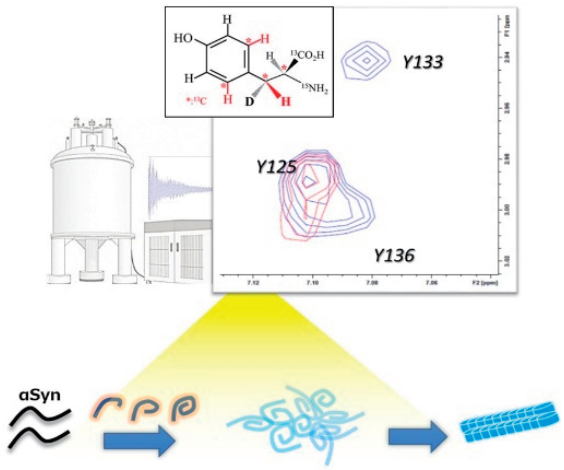
44　相分離を介したαシヌクレインの線維形成機構の解明	宮ノ入　洋平

【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（αSyn）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。αSyn 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関与する線維形成機構の解明を目指す。

【方法】均一に^{2}H、^{15}N 標識したαSyn 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、αSyn 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、αSyn 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αSyn 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-^{1}H ならびに^{12}C-^{1}H 信号を NMR にて特異的に観測し、αSyn 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、αSyn 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αSyn 線維が形成されることを見出した。実際に、^{2}H、^{15}N 標識したαSyn について^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを確認したところ、おもにαSyn 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、αSyn 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、^{2}H、^{15}N 標識αSyn を利用した同様の NMR 実験より、αSyn 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、αSyn 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αSyn 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αSyn 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、相分離状態のおけるαSyn 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αSyn 線維形成機構の解明



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（αSyn）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αSyn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やレビー小体が関与する神経変性疾患の患者さんではrod様のαSyn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、αSynの相分離過程における構造動態や外的因子がαSynに及ぼす影響が注目されている。このような背景から、αSyn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、αSyn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、αSyn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。

αSyn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）。αSyn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は、NMR法を用いた研究が威力を発揮している。特に、αSyn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αSyn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αSyn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、αSyn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、αSyn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αSynの調製

αSynの線維形成過程では、αSyn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、αSyn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 D_2O培地）で培養し、重水素化αSyn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. αSynのNMR測定（^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル）

上記1にて確立した手法を用いて、均一に^{2}H、^{15}N標識したαSyn（[^{2}H, ^{15}N]-αSyn）を用いて、^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定した。NMR測定には、0.1 mMのαSyn溶液（buffer：50 mM Tris-HCl、5 % D_2O、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。αSyn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-P_3との相互作用を確認するため、1 mM PI-3,4,5-P_3添加に伴うαSyn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αSynの調製

αSyn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^{2}H及び^{13}C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^{13}C-^{1}H 標識した。もう一方（SAIL-Tyr 2）では、芳香環由来の^{1}H信号を高分解能かつ高感度に捉えるために、^{12}C-^{1}H標識した。いずれもβ位メチレン基については$^{13}C_{\beta}$-$^{1}H_{\beta 3}$／$^{2}H_{\beta 2}$のパターンを保持しており、メチレン基由来の^{13}C-^{1}H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。αSyn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αSyn -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. αSynのNMR測定（^{1}H-^{13}C HSQC、 ^{1}H-^{1}H NOESY、 ^{1}H 1D スペクトル）

上記3にて作製したSAIL-Tyrで標識した［^{2}H, ^{15}N］-αSyn（[SAIL-Tyr, ^{2}H, ^{15}N］-αSyn）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αSyn溶液（buffer：50 mM Tris-HCl、5 or 100%D_2O、pH 7.4）を使用した。NMR装置は600 MHz（Bruker AvanceⅢ HD 600、QCI-P型極低温プローブ）および950 MHz（Bruker AvanceⅢ 950、TCI型極低温プローブ）を使用した。線維形成に伴うαSyn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、^{1}H-^{13}C HSQC、^{1}H-^{1}H NOESY及び^{1}H 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. ［^{2}H, ^{15}N］-αSyn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、αSyn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、αSyn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αSyn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-P_3がαSyn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}H, ^{15}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}H, ^{15}N］-αSyn について、50～500 mM の NaCl 存在下における^{1}H-^{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}H, ^{15}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 末端領域（V3～T59）でシグナル感度が顕著に低下し、NAC 領域前半と C 末端領域でも、シグナル感度減少がみられた（図 1）［2］。N 末端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 末端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。

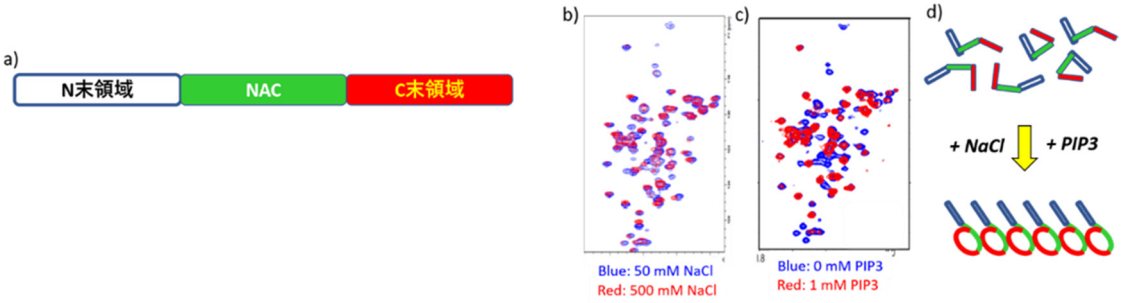


図 1. αSyn と NaCl およびリン脂質との相互作用

a) 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。

b) 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。

c) 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。

d) 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, ^{2}H, ^{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, ^{2}H, ^{15}N］-αSyn について、^{1}H-^{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-^{1}H 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-^{1}H シグナルを帰属することに成功した（図 2）。

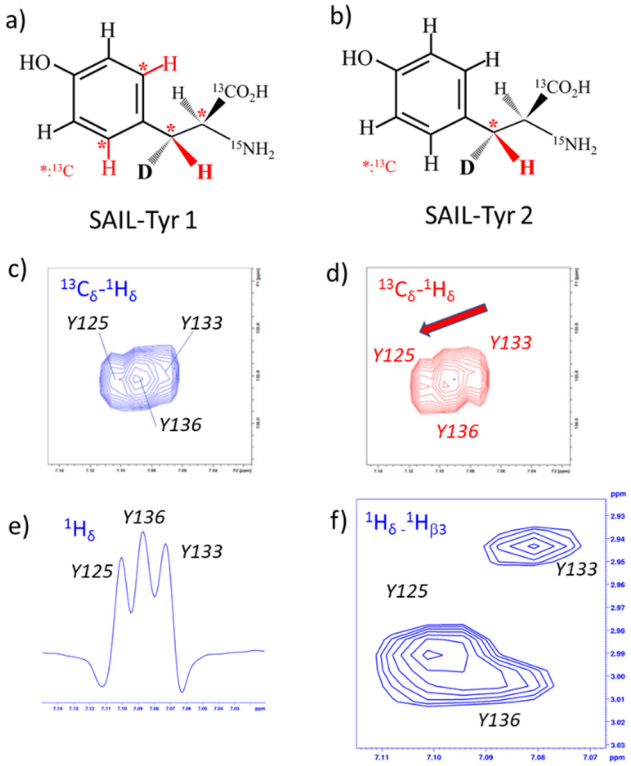


図 2. SAIL-Tyr を利用したαSyn Tyr 残基側鎖の NMR シグナルの観測

a) SAILL-Tyr 1 の構造式。δ位は ^{13}C-^{1}H HSQC で観測される。

b) SAILL-Tyr 2 の構造式。δ位は ^{1}H 1D、^{1}H-^{1}H NOESY で観測される。

c) 50 mM NaCl 条件下におけるαSyn Tyr 残基δ位の ^{13}C-^{1}H HSQC スペクトル。

d) 500 mM NaCl 条件下におけるαSyn Tyr 残基δ位の ^{13}C-^{1}H 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）。

e) 50 mM NaCl 条件下におけるαSyn Tyr 残基δ位の ^{1}H 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。

f) 50 mM NaCl 条件下におけるαSyn Tyr 残基の ^{1}H-^{1}H 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、$^{1}H_{\delta}$ と $^{1}H_{\beta 3}$ 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-^{1}H 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^{1}H 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^{1}H シグナルを明確に分離観測することができ、^{1}H-^{1}H NOESY スペクトルからも Tyr 残基ε位やβ3 位の^{1}H との NOE シグナルを観測することができた（図 2）。^{1}H 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^{1}H 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安定同位体標識を導入し、相分離状態でのαSyn 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, Hirotsugu 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 13C-detect solution-state protein NMR experiments to circumvent amide-solvent exchange broadening: Application to ß2-microglobulin. BBA- Protei Proteo 1869(3) 140593-140593 (2021). PMID 33359410 DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140593