高分解能で見るアミロイド線維形成

―アルツハイマー病や ALS などの発症機構理解のための新たな研究手法―

概要

アルツハイマー病や筋萎縮性軸索硬化症（ALS）など様々な神経変性疾患はタンパク質のアミロイド線維化により引き起こされると考えられています。アミロイド線維化は複数の状態が存在する複雑な過程であるため、未だ詳細なメカニズムはわかっていません。

京都大学大学院工学研究科 岩川直都 博士課程学生（研究当時）、森本大智 同助教、白川昌宏 同教授、菅瀬謙治 同准教授、Erik Walinda 同医学研究科助教の研究グループは、神経変性疾患発症に関わるタンパク質のアミロイド線維化過程を原子分解能という高分解能でモニターすることに世界で初めて成功しました。

本研究では高感度 Rheo-NMR 法という本研究グループが開発した測定法を用いることにより、アミロイド線維化に伴うタンパク質の立体構造変化を“複数の状態を同時”かつ“残基分解能”という高分解能で解析することに成功しました。

構造変化に関する高分解能の情報は、アミロイド線維化を阻害する治療薬を設計するうえで重要な知見となると考えられ、未だ治療法の限られている神経変性疾患の治療薬開発に大きく貢献することが期待されます。

本成果は、2021 年 7 月 8 日に、国際学術誌「*Journal of the American Chemical Society*」にオンライン掲載されました。

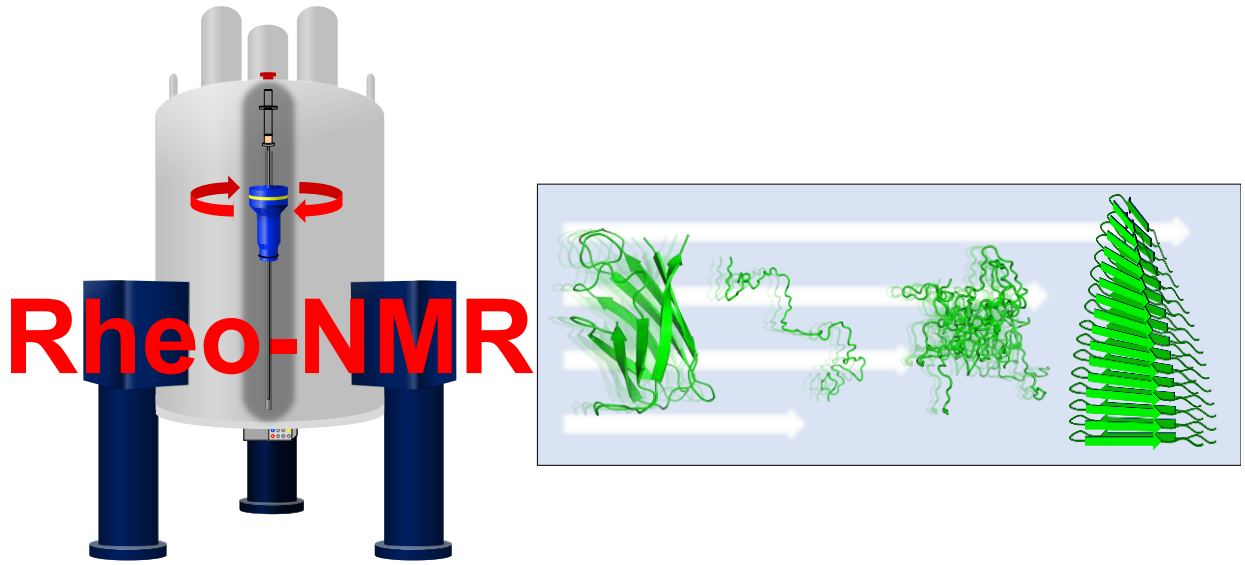

図: せん断力を加えた状態で NMR 測定を行う Rheo-NMR 法を用いて、SOD1 のアミロイド線維化過程を高分解能で詳細に解析することに成功しました。

１．背景

タンパク質は様々な生体反応を司る重要な生体高分子です。タンパク質の機能は、特定の立体構造を形成することにより発揮されます。しかし、本来の立体構造と異なる構造を形成してしまうと様々な疾患が引き起こされることが知られています。そのような疾患の中で、アミロイド線維[注1]と呼ばれるタンパク質の異常凝集体の形成は、アルツハイマー病・筋萎縮性側索硬化症（ALS）・パーキンソン病などの神経変性疾患を発症する原因と考えられています。アミロイド線維は、多数のタンパク質分子が異常に会合することにより形成する不溶性の凝集体で、神経変性疾患患者の組織に沈着しているものが広く認められます。アミロイド線維の持つ細胞毒性により疾患発症が引き起こされるとされており、世界中の様々な分野の研究者によってその発症原因が研究されています。

従来のアミロイド線維化メカニズムの研究は、蛍光法や電子顕微鏡法により行われてきました。蛍光法はアミロイド線維化過程の速度論的な解析に用いられ、電子顕微鏡法はアミロイド線維の巨視的な分子形態や立体構造の解析に用いられてきました。これらの手法を用いた研究によりアミロイド線維に関する知見が深まってきています。しかし、アミロイド線維が形成する過程におけるタンパク質の立体構造変化を詳細に解析することはこれまで不可能でした。アミロイド線維化過程における立体構造変化を詳細に解析することは、そのメカニズム解明につながり、ひいてはアミロイド線維化を阻害し、神経変性疾患の治療薬を設計するうえで非常に重要であると考えられます。

２．研究手法・成果

タンパク質の立体構造を詳細に解析する手法の一つに、核磁気共鳴分光法（NMR法）[注2]があります。NMR 法は、タンパク質にラジオ波を照射することでタンパク質を構成する各原子核の状態を解析することができます。溶液状態における立体構造を解析するための最も強力な手法として広く用いられています。

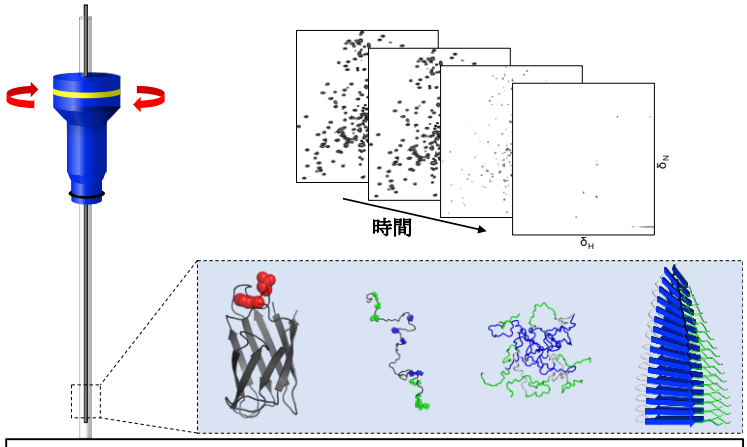

図 1 Rheo-NMR 法の概略
流れを発生させた状態で NMR 測定を行う。各 NMR シグナルはタンパク質中の各アミノ酸残基のアミド基（-NH）に由来し、NMR スペクトルの変化からタンパク質の構造変化を残基分解能で解析できる。

アミロイド線維化するタンパク質の多くは、生理条件下では自発的にアミロイド線維を形成しません。そのようなタンパク質のアミロイド線維化メカニズムを解析するために、古くから流れの力（せん断力）が利用されてきました。せん断力はタンパク質のアミロイド線維形成を促進する因子として知られています。生体内でも血流や細胞内の流れに伴うせん断力が、タンパク質をアミロイド線維化させる因子であることが示唆されています。

しかし、これまで流れを発生させながらタンパク質の NMR 測定を行う手法は存在せず、アミロイド線維化過程を NMR 法で解析することは困難でした。そこで私たちは高感度 Rheo-NMR 法という独自の手法を開発しました（**図 1**）。この手法を用いることによって、せん断力によりアミロイド線維化していくタンパク質をリアルタイムに NMR で測定することが可能となりました。

本研究では、この高感度 Rheo-NMR 法を用いて、ALS 発症原因とされる superoxide dismutase 1 (SOD1)

のアミロイド線維化に伴う立体構造変化を残基分解能という高い分解能で解析した成果を報告しました。

まず、アミロイド線維化していく SOD1 を残基分解能かつリアルタイムに計測し、観測された NMR シグナルの強度がどのように時間変化するのかを解析しました。一般に NMR のシグナル強度は分子の濃度に比例するため、当初はアミロイド線維化に伴い、SOD1 の全てのシグナル強度が一様に減少することが予想されました。しかし実際には、特定の領域のシグナル強度が他よりも速く減少することがわかりました（**図 2**）。この結果は、アミロイド線維化に先立って、その領域の立体構造が部分的にほどけることを示唆します。

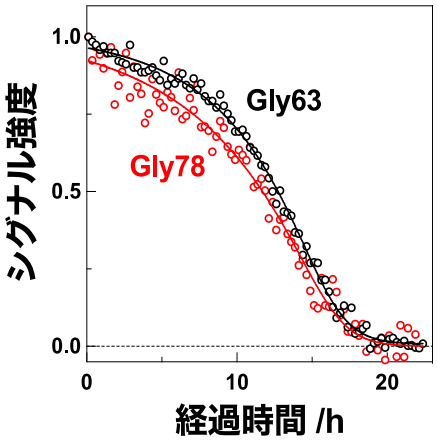

図 2 シグナル強度の時間変化

次に、アミロイド線維の初期段階（核形成過程）における分子間相互作用を CLEANEX-PM 法により解析しました。CLEANEX-PM 法とは、タンパク質の各アミノ酸残基が持つアミド水素（-NH）と水との交換を検出する NMR 法で、タンパク質のどの領域がどれほど水へ露出しているかを調べることができます。CLEANEX-PM 測定の結果、アミロイド線維化の核形成過程において、立体構造がほどけた SOD1 の複数の領域で水素交換が抑制されることが明らかになりました。このことは、これらの領域を介して SOD1 分子同士が相互作用することによって、アミロイド線維の核が形成されることを示唆します。

3．波及効果、今後の予定

本研究は、タンパク質がアミロイド線維化する際の立体構造変化を追跡した研究の中で、最も高分解能で解析したものであります。高分解能の立体構造情報は、新薬を開発する上で非常に重要です。今回の研究で明らかになった SOD1 の構造変化や相互作用は、SOD1 のアミロイド線維形成を阻害する ALS 治療薬を開発する上で重要な知見となると考えています。また本手法は、SOD1 だけでなくアミロイド化するあらゆるタンパク質の研究にも応用可能であるため、アルツハイマー病・パーキンソン病など様々な神経変性疾患の発症機構の研究に適用されることが期待されます。超高齢化社会が進む日本では加齢に伴い罹患数が増える神経変性疾患が大きな社会問題となっています。しかし、残念なことに有効な治療法が確立していません。そのため、本研究手法が神経変性疾患の根本的な発症機構を研究する手法の一つとして確立され、神経変性疾患治療薬の開発に貢献することが期待されます。

他にも、今まさに人類の脅威となっている新型コロナウイルスの感染では、vWF タンパク質が血流のせん断力によって構造変化し、血栓を作ることで重篤化に至ることが知られています。重篤化のしやすさが血液型によって異なることも、このせん断力と vWF の仕業であります。今後は、高感度 Rheo-NMR 法を用いて、これら vWF の性質を解明するための研究にも取り組む予定です。

4．研究プロジェクトについて

本研究は、JSPS 科研費・公益財団法人豊田理化学研究所・公益財団法人住友電工グループ社会貢献基金・京都大学微細構造解析プラットフォームの支援を受けて行われました。

＜用語解説＞

注１　多数のタンパク質分子が異常会合した構造体。分子間でβシートを組んだ非常に強固で安定な構造を持つ。細胞毒性を持つとされ、神経変性疾患発症の原因の一つであると考えられている。

注２　試料を磁場中に置き、ラジオ波を照射することにより、試料中の核スピンの情報を取得する物理化学的な解析手法。原子分解能でのタンパク質の構造情報やダイナミクスに関する情報を取得できる。

＜論文タイトルと著者＞

タイトル：Multiple-state monitoring of SOD1 amyloid formation at single-residue resolution by Rheo-NMR spectroscopy

（Rheo-NMR 法を用いた SOD1 のアミロイド形成の残基分解能かつ複数状態同時観測）

著　　者：　Naoto Iwakawa, Daichi Morimoto, Erik Walinda, Masahiro Shirakawa, and Kenji Sugase

掲 載 誌：　Journal of the American Chemical Society, DOI：10.1021/jacs.1c02974