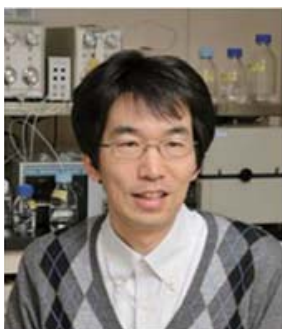


フォーカス 26 <第 2 2 回> : 成果事例クローズアップ (中部地区ナノテク総合支援: ナノ材料創製加工と先端機器分析)

## 920MHz 超高磁場 NMR 装置を用いた神経変性疾患関連タンパク質の構造解析

国立長寿医療センター研究所 柳澤勝彦, 理化学研究所 山口芳樹, 名古屋市立大学大学院薬学研究科 矢木真穂  
分子科学研究所 加藤晃一



(左から) 国立長寿医療センター研究所 柳澤勝彦, 理化学研究所 山口芳樹, 名古屋市立大学 矢木真穂, 分子科学研究所 加藤晃一

### 1. はじめに

アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の多くは、タンパク質の異常な凝集体が神経組織に蓄積することによって引き起こされると考えられている。例えば、アルツハイマー病は大脳皮質に老人斑が形成されることを特徴とするが、その実体はアミロイドβ (Aβ) とよばれるアミノ酸約 40 残基からなるタンパク質の凝集体である。また、パーキンソン病においては、αシヌクレインが神経細胞内において凝集体を形成することが1つの原因となっている。こうしたタンパク質の異常凝集体は、いずれもアミロイド線維と総称される不溶性の線維を形成しており、アミロイド線維はβシート構造が規則的に多数積み重なった構造を有していることが知られている。

国立長寿医療センター研究所の柳澤博士らは、アルツハイマー病患者の大脳皮質において、神経細胞膜に豊富に存在する GM1 ガングリオシドと強固に結合した Aβ 分子種が存在することを発見し、一連の *in vitro* 実験において GM1 結合型 Aβ は非常に高いアミロイド線維形成

能を有していることを明らかとしてきた [1]。また、この GM1 と Aβ の複合体を特異的に認識する抗 Aβ 抗体を作製し、GM1-Aβ 複合体は可溶性の Aβ とは異なる構造的特徴をもつことを示唆してきた [2]。しかしながら、GM1 との結合を契機として促進される Aβ のアミロイド線維形成メカニズムは明らかとなっておらず、GM1-Aβ 複合体の高次構造の解明が強く望まれていた。この問題に関して、名古屋市立大学大学院薬学研究科の矢木真穂博士は、NMR 法をはじめとする分光学的手法を用いて取り組んできた。

理化学研究所の山口博士は、神経変性疾患に関与するタンパク質のオリゴマー化・線維化を阻害する薬物の合理的なデザインとその作用機序の解明をテーマに研究を進めている。そのためには、オリゴマー化や線維化の引き金となる凝集核の立体構造に関する情報が必須であるが、現時点ではその立体構造に関するコンセンサスが得られていない。これまでαシヌクレインを題材としてその単量体の NMR 解析を進めていたが、オリゴマーの動的構造や薬物との相互作用様式の解明のためには、特に高感度・高分解能の NMR 計測が必要であった。

一方、分子科学研究所においては、世界有数の 920MHz 超高磁場 NMR をナノネットに供しており、シグナルが観測しづらい巨大な分子複合体や、シグナルの重複が激しい天然変性タンパク質を高い分解能で観測可能であるという利点を有している [3]。すなわち、水溶液中で巨大な超分子複合体を形成する GM1 と Aβ の相互作用解析、および天然変性タンパク質の代表格ともいえ

\* 問い合わせ:

中部地区ナノテク総合支援: ナノ材料創製加工と先端機器分析  
自然科学研究機構 分子科学研究所

明大寺地区: 〒 444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

山手地区: 〒 444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1

電話: 0564-55-7345

E-mail: yokoyama@ims.ac.jp

る  $\alpha$  シヌクレインの構造解析を遂行する上で、超高磁場 NMR 計測は必要不可欠である。疾患の原因となるタンパク質凝集のメカニズムの構造基盤を原子レベルで解明することは、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患をターゲットとする創薬研究の基礎を築くとともに、疾患発症の分子メカニズムを理解するうえで重要な課題である。さらに、最近、アミロイド線維は疾患に関連するタンパク質凝集体として捉えられる一方で、タンパク質の規則正しく秩序だった構造体、すなわち機能性ナノ繊維として再生医療やナノ材料学の分野での利用を視野にいたした研究も展開されている [4]。

本稿では、アルツハイマー病とパーキンソン病を例にとり、これらの疾患の原因となるタンパク質凝集のメカニズムとその制御の可能性について、920MHz NMR 装置を用いて行った研究の成果を中心に紹介する。

## 2. 神経変性疾患関連タンパク質の構造解析

### 2.1 アルツハイマー病発症の構造基盤：A $\beta$ の NMR 研究

冒頭でも述べたとおり、柳澤博士らによって GM1 ガングリオシドと結合した A  $\beta$  は非常に高いアミロイド線維形成能を有していることが明らかとされたことを契機に、

GM1 と A  $\beta$  の複合体が核となって A  $\beta$  の凝集・沈着が促進される可能性が指摘されている (図 1)。これまでに、ガングリオシドがアルツハイマー病などの神経変性疾患と関連していることを示唆する知見が次々と蓄積されてきているが、その分子メカニズムの構造基盤は明らかとはなっていない。A  $\beta$  の構造研究に関しては、溶液中で遊離した A  $\beta$  や最終生成物であるアミロイド線維については、NMR 法を用いて様々な構造解析がなされているが、GM1 クラスタに結合している A  $\beta$  分子の構造を直接観測した例は報告されていなかった。その理由として、ガングリオシドは水溶液中において流動性を伴う高分子量複合体を形成するために、一般的な構造生物学の方法論の適用が困難であったことが挙げられる。更に、GM1 と相互作用した A  $\beta$  はすみやかに線維化してしまい、両者の複合体を安定に捉えることが困難であることも詳細な構造解析を阻んできた要因となっている。そこで我々は、こうした問題を克服し、超高磁場 NMR を用いて A  $\beta$  と GM1 の相互作用の構造的基盤を明らかにすることを試みた。

まず、GM1-A  $\beta$  複合体を安定に捉えるために様々なガングリオシドミセルを作製し、そのサイズを比較検討した。その結果、GM1 ミセル (140 kDa) に比べて lyso-GM1 は、小型のミセル (60 kDa) を形成し、かつ、A  $\beta$

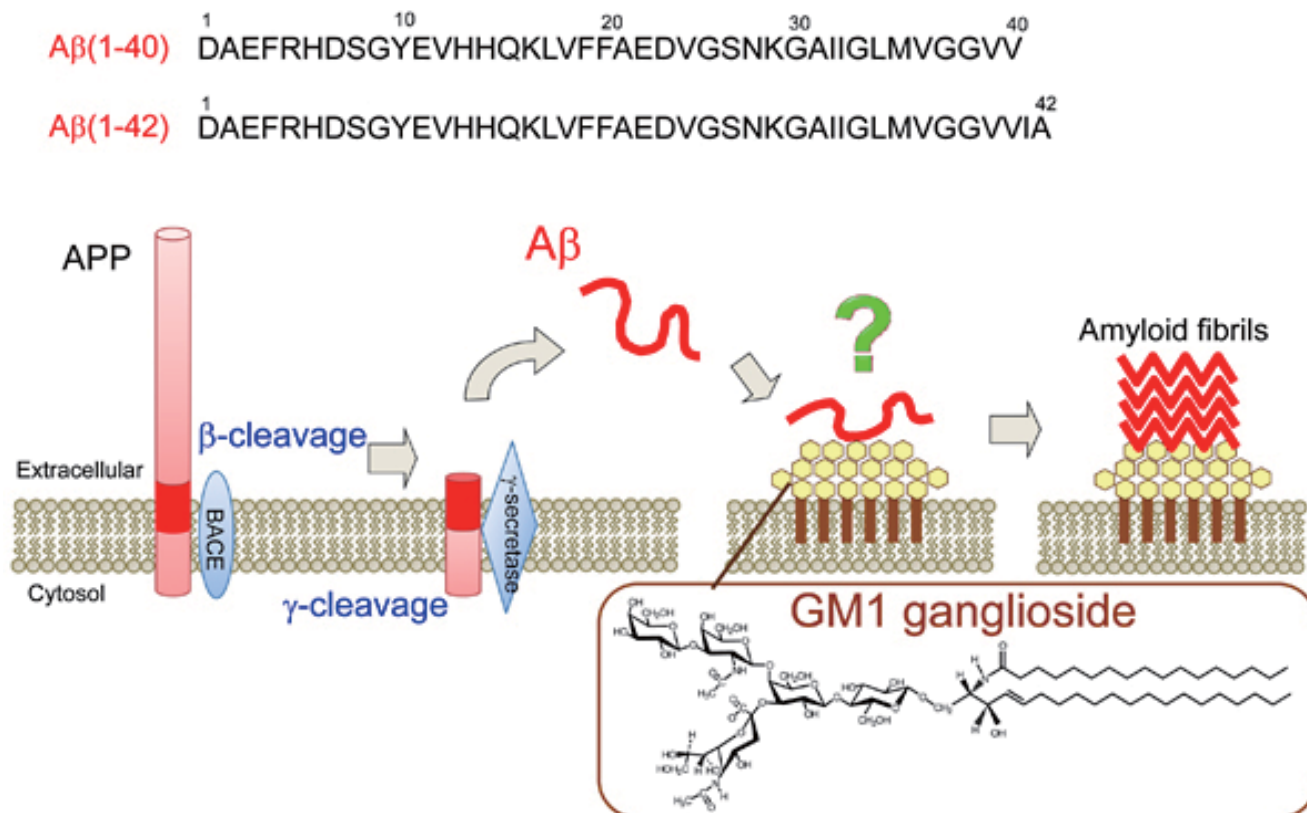


図 1 GM1-A  $\beta$  複合体による A  $\beta$  の重合  
アミロイド前駆体タンパク質 (APP) から 2 段階の酵素反応により切り出された A  $\beta$  は、神経細胞表層の GM1 クラスタと相互作用することによってアミロイド線維形成が促進される。

の凝集を抑制することから、詳細なNMR解析のモデル系として有用であることが明らかとなった。さらに、信号の広幅化を改善するために、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ に加えて $^2\text{H}$ を用いて安定同位体三重標識を施したA $\beta$  (1-40)を調製し、920MHz 超高磁場 NMR 装置を利用した計測を行った。それにより、シグナルの広幅化により観測が困難であった状況を大幅に改善することができ、巨大なGM1-A $\beta$ 複合体の高分解能 NMR 計測に初めて成功した [3][5] (図 2)。

NMR 解析の結果から、A $\beta$  (1-40) は中央部分に2つの $\alpha$ ヘリックス構造を形成してGM1 ミセルに結合しており、他の領域は特定の二次構造を形成していないことが判明した。さらに、A $\beta$  (1-40) はGM1 クラスターの親水性と疎水性の境界面に横たわるかたちで結合しており、2つの $\alpha$ ヘリックスとC末端はミセル内部に埋もれ、それ以外の領域はミセル外部に露出していることが明らかとなった [5] (図 3)

次に、A $\beta$ 分子を取り巻く環境に着目し、A $\beta$ が結合したガングリオシドクラスター側の高次構造情報を得ることを試みた。まず、NOEデータに基づく距離情報を制限項として分子動力学計算を行うことにより、lyso-GM1の糖鎖部分のコンフォメーションを決定した。さらに、GM1とA $\beta$ の分子間のより広範囲に及ぶ距離情報を抽出するため、A $\beta$ の部位特異的に変異を導入し、化学修飾を施すことによりスピラベル化A $\beta$ を作製し、GM1クラスター上のA $\beta$ 結合部位を同定した。その結果、A $\beta$ の結合および上記トポロジーの形成には、GM1クラスターの内側にあたる還元末端の糖残基および脂質の頭部部分が重要であることが明らかとなった [6] (図 4)。

次に、GM1 クラスターの親水 / 疎水界面に結合した状態のA $\beta$ が、アミロイド線維を形成するに至る構造変化の過程を解明することを試みた。A $\beta$ とGM1ミセルの量比を系統的に変化させてNMR計測を行った結果、両者

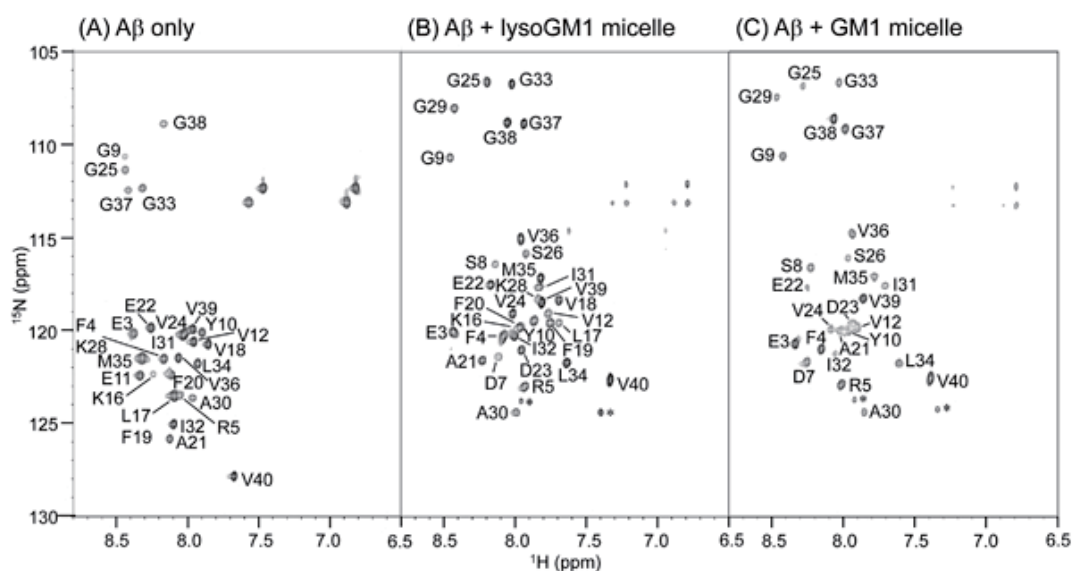


図 2 920MHz 超高磁場 NMR 計測により得られた A $\beta$  の NMR スペクトル (文献 5 より引用).  
(A) A $\beta$  単体 (4 kDa), (B) lyso-GM1 ミセルに結合した A $\beta$  (60 kDa), (C) GM1 ミセルに結合した A $\beta$  (140 kDa)

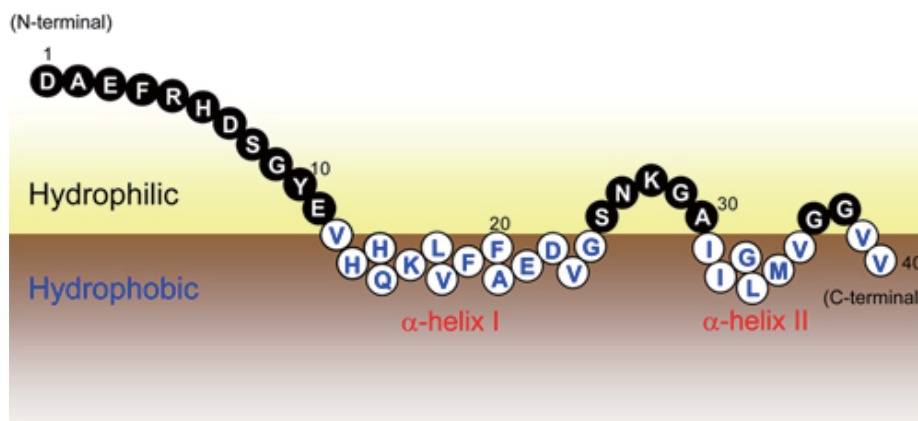


図 3 GM1 ミセルに結合した A $\beta$  のトポロジー (文献 5 より一部改変して引用).  
NMR 解析によって明らかになった GM1 クラスター上での A $\beta$  の分子トポロジー。  
2つの $\alpha$ ヘリックス構造およびC末端は疎水的環境に埋没し、それ以外の領域は親水的な環境に露出している。

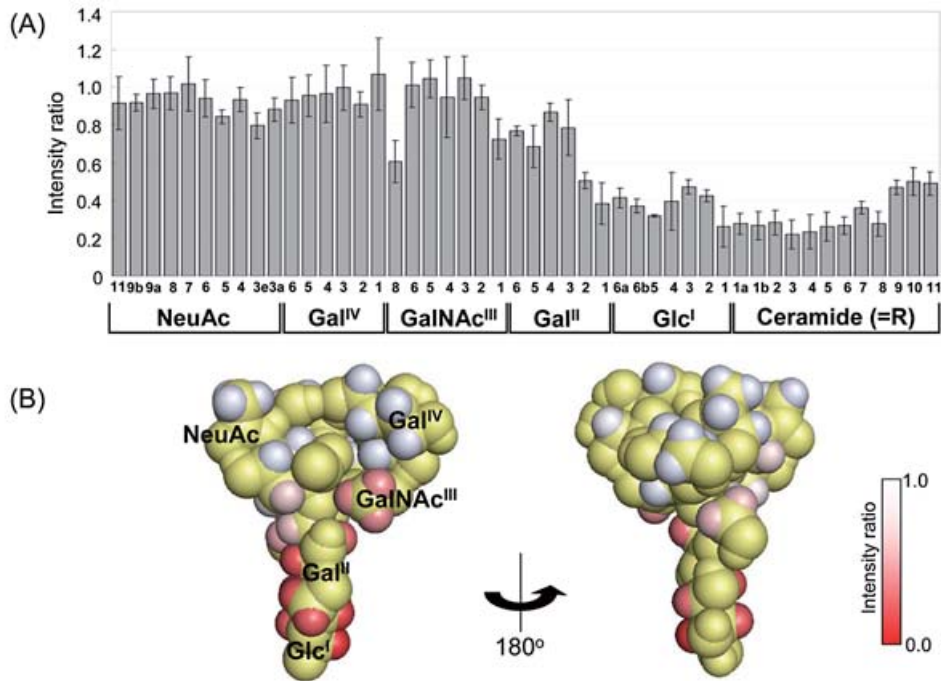


図4 Aβの結合には、ガングリオシドに共通な内側の糖残基が重要である（文献6より引用）。  
 (A) Aβに付加したスピラベルが lyso-GM1 の CH シグナルに及ぼす強度減弱の度合い。  
 (B) lyso-GM1 の糖鎖部分の立体構造および Aβ の結合部位のマッピング（赤色）。

の量比に依存したスペクトルの変化がみとめられた。興味深いことに、AβがGM1ミセル上に密に存在する条件下においては、C末端領域に由来するNMRピークが複数観測され、アミロイド線維などのβシート構造に特異的に結合して発色するチオフラビンTとの結合性を示した。これらの結果から、AβのC末端がGM1クラスター上におけるAβ分子間の相互作用に起因していることが示唆された[7]。

以上の結果より、ガングリオシドクラスターはその親水性/疎水性境界面において、本来特定の二次構造を持たないAβ分子のαヘリックス構造への構造転移を誘起するとともに、その空間配置を規定していることが明らかとなった。Aβが高密度に存在する条件下ではAβのC末端領域における特異的な分子間相互作用が促され、重

合体形成に至るものと考察される（図5）。すなわち、ガングリオシドクラスターという限定された空間がAβの分子内相互作用（αヘリックス形成）から分子間相互作用（βシート形成）への変換を促進する触媒的環境を提供している可能性がある。したがって、ガングリオシドクラスター上に形成されるαヘリックスを安定化することができれば、Aβの重合を開始段階で止めることが可能であるものと期待される。

## 2.2 パーキンソン病発症の構造基盤：αシヌクレインのNMR研究

神経変性疾患に関与するタンパク質のオリゴマー化・線維化を阻害する薬物を開発することは、神経疾患の治

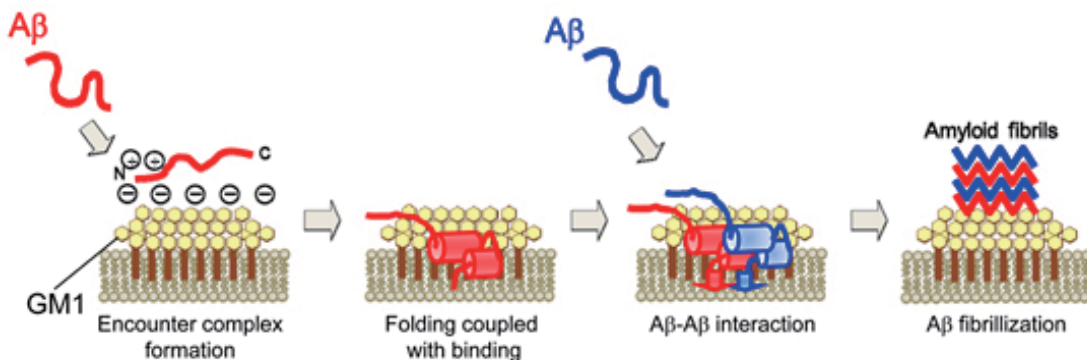


図5 GM1クラスターを舞台とするAβのアミロイド線維形成機構のモデル  
 GM1が多数集合しクラスターを形成することが、Aβの構造変化および分子間相互作用を誘起する場として機能しており、こうした環境場においてAβはアミロイド線維形成に至る。

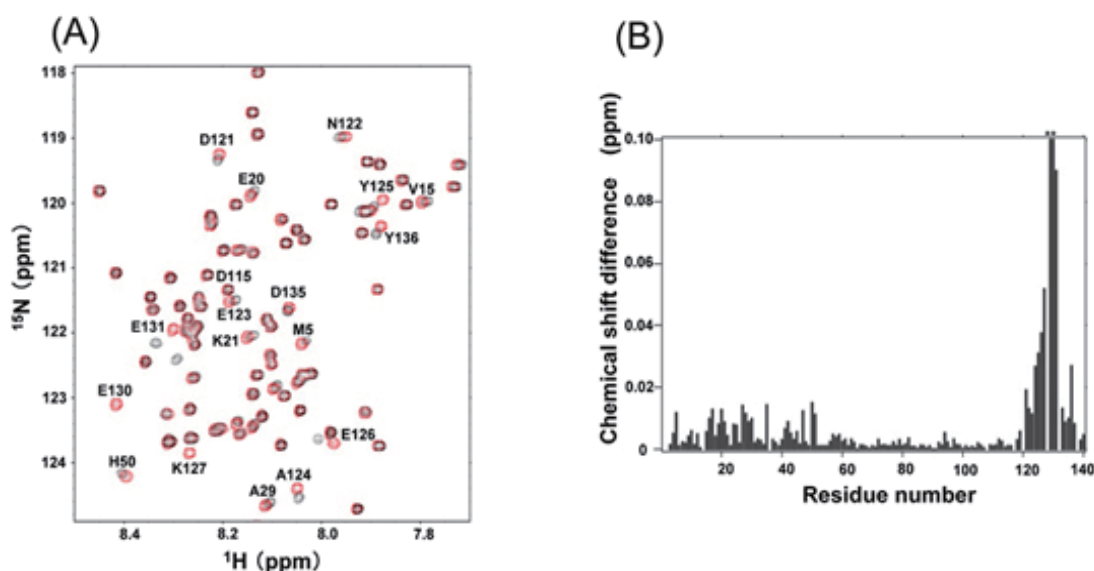


図6 (A)  $\alpha$ シヌクレイン (黒) とリン酸化 $\alpha$ シヌクレイン (赤) の NMR スペクトルの比較と (B) Ser129 のリン酸化に伴う $\alpha$ シヌクレインの化学シフト変化のプロファイル (文献 8 より一部改変して引用)。

療や予防に大きく貢献する。しかしながら、オリゴマー化・多量体化の引き金となる "凝集核" の立体構造に関する知見はほとんど得られていないのが現状である。筆者らは、NMR を用いてタンパク質凝集開始の立体構造基盤を原子レベルの分解能で解明するとともに、オリゴマー・凝集形成を阻害する化合物の合理的デザインを行うことにより、神経変性疾患の治療・予防・診断に資することを目的として研究を進めている。

### 2.2.1 $\alpha$ シヌクレインの分子内相互作用 —リン酸化を例にして

$\alpha$ シヌクレインは神経細胞に高発現する可溶性のタンパク質であり、パーキンソン病においてはその凝集が認められる。凝集体に含まれている $\alpha$ シヌクレインの多くは、リン酸化が認められていることが知られており、リン酸化と凝集の関係に関心がもたれていた。そこでリン酸化が $\alpha$ シヌクレインの動的構造に与える影響を調べるために、安定同位体標識を施したリン酸化 $\alpha$ シヌクレインを調製し、超高磁場 NMR 装置を利用した解析を行った。その結果、C 末端近傍に位置する Ser129 のリン酸化に伴い、Ser129 近傍に位置する NMR シグナルのみならず、そこから一次構造上離れた部位 (Met5 ~ Gly51) にも化学シフト変化が観測された (図 6)。この結果から、Ser129 がリン酸化された $\alpha$ シヌクレインでは、その C 末端近傍と分子中央部とにおいて分子内の静電相互作用が存在することが示唆された。このように超高磁場 NMR 計測を行うことにより、リン酸化に伴う $\alpha$ シヌクレインの微細な動的立体構造の変化を捉えることに成功し、 $\alpha$ シヌクレインの分子内相互作用の様子を捉えることができた [8]。

### 2.2.2 $\alpha$ シヌクレインの分子間相互作用 —オリゴマーを例にして

神経変性疾患に関与するタンパク質のオリゴマーは細胞毒性との関係から広く注目されているが、オリゴマーの立体構造と活性についての関係は残念ながらほとんど解明されていない。筆者らは $\alpha$ シヌクレイン単量体の構造的知見をもとに、 $\alpha$ シヌクレインオリゴマーの超高磁場 NMR 解析を行った。ドパミン、エクシフォン、ゴセプチン (図 7) 3 種類の凝集阻害剤の存在下で形成された $\alpha$ シヌクレイン 2 量体を単離して NMR スペクトルをそれぞれ測定した結果、 $\alpha$ シヌクレイン 2 量体の C 末端側は単量体の NMR スペクトルと比較して変化が認められなかったが、N 末端側に由来するシグナルにおいて強度の減少が観測された (図 8)。このことより、凝集阻害剤の存在

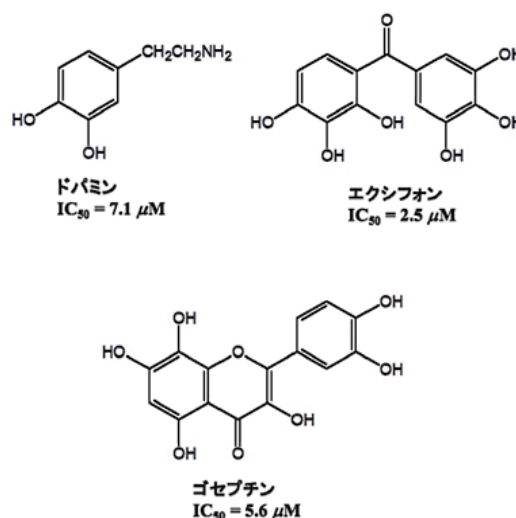


図 7 凝集阻害剤の化学構造式

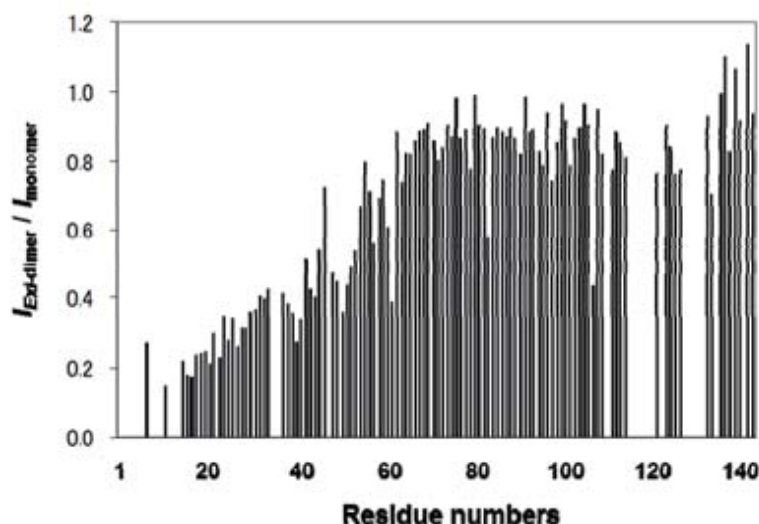


図8 凝集阻害剤エクシフォン存在下で形成された $\alpha$ シヌクレイン2量体とコントロール(単量体)のNMRシグナルの強度比のプロット(文献9より引用).

下で形成された $\alpha$ シヌクレインの2量体化にはそのN末端領域が関与しており、少なくともC末端側は2量体においても単量体と同じく特定の立体構造を形成していないことが判明した[9]。これらの知見により、オリゴマーの構造と細胞毒性を議論するための基礎を整えることができた。

### 3. おわりに

本稿で述べたように、私たちは920MHz超高磁場NMR装置を活用した、タンパク質-糖鎖相互作用、タンパク質-タンパク質相互作用などの詳細な構造解析を行うための基盤技術を整え、これを応用した研究を展開してきた。これまでA $\beta$ -GM1複合体や $\alpha$ シヌクレインのオリゴマーといった複雑な系に対しては、通常の構造生物学によるアプローチは困難であったが、超高磁場NMRの計測により問題を克服し、原子レベルの分解能で解明する道を切り開いた。本研究の成果は、他の神経変性疾患関連タンパク質に関しても分子構造論的な理解を促すうえで一つの大きな指針となるであろう。また、アミロイド線維を自己組織化現象として捉えその構造特性を解明することは、治療薬開発のみならず、ナノ材料の分野においても今後ますます重要性を増していくことが期待される。

### 謝辞

本稿で紹介した研究成果は、柳澤勝彦博士、山口芳樹博士、矢木真穂博士ならびに東京都精神医学総合研究所の長谷川成人博士との共同研究によるものである。また、920MHz核磁気共鳴装置(JEOL JMN-ECA-920)を用いたNMR計測は、文部科学省の「ナノテクノロジー・ネットワーク」委託事業の一環として、自然科学研究機構分

子科学研究所において実施されたものである。ここに感謝の意を表す。

### 参考文献

- [1] Matsuzaki K, Kato K & Yanagisawa K. A  $\beta$  polymerization through interaction with membrane gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 868-877 (2010).
- [2] Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H & Yanagisawa K. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J. Neurosci.* 24, 4894-4902 (2004).
- [3] Kato K, Sasakawa H, Kamiya Y, Utsumi M, Nakano M, Takahashi N & Yamaguchi Y. 920 MHz ultra-high field NMR approaches to structural glycobiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 619-625 (2008).
- [4] Hamada D, Yanagihara I & Tsumoto K. Engineering amyloidogenicity towards the development of nanofibrillar materials. *Trends Biotech.* 22, 93-97 (2004)
- [5] Utsumi M, Yamaguchi Y, Sasakawa H, Yamamoto N, Yanagisawa K & Kato K. Up-and-down topological mode of amyloid  $\beta$ -peptide lying on hydrophilic/hydrophobic interface of ganglioside clusters. *Glycoconjugate J.* 26, 999-1006 (2009).
- [6] Yagi-Utsumi M, Kameda T, Yamaguchi Y & Kato K. NMR characterization of the interactions between lyso-GM1 aqueous micelles and amyloid  $\beta$ . *FEBS Lett.* 584, 831-836 (2010).
- [7] Yagi-Utsumi, M., Matsuo, K., Yanagisawa, K., Gekko, K. & Kato, K. Spectroscopic characterization of

intermolecular interaction of amyloid  $\beta$  promoted on GM1 micelles. *Int. J. Alz. Dis.* ID 925073 (2011).

[8] Sasakawa, H., Sakata, E., Yamaguchi, Y., Masuda, M., Mori, T., Kurimoto, E., Iguchi, T., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., Hasegawa, M. & Kato, K. Ultra-high field NMR studies of antibody binding and site-specific phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 795-799 (2007).

[9] Yamaguchi, Y., Masuda, M., Sasakawa, H., Nonaka, T., Hanashima, S., Hisanaga, S., Kato, K. & Hasegawa, M. Characterization of inhibitor-bound  $\alpha$ -synuclein dimer: role of  $\alpha$ -synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J. Mol. Biol.* 395, 445-456 (2010).

(分子科学研究所 加藤晃一)