

筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質 SOD1 の アミロイド形成機序の解明

所属：京都大学 工学研究科 分子工学専攻

助成対象者：森本 大智

概要

筋萎縮性側索硬化症は運動ニューロンが侵される病気で、発症原因の一つが運動ニューロン中における SOD1 というタンパク質の線維状凝集体（アミロイド）形成である。しかし現在、SOD1 のアミロイド形成の原子分解能の形成機序の解明には至っていない。そこで本研究では、新規に開発したバイオレオロジーNMR法を用いて、SOD1 のアミロイド形成を原子分解能で解析した。アミロイド形成下で連続的に NMR 測定をしたところ、SOD1 は構造状態から変性状態に変化し、線維を形成することがわかった。また、SOD1 単量体は、核やオリゴマーといった反応中間体と特定の分子表面で相互作用し、線維を形成することが分かった。

abstract

Abnormal protein aggregates (amyloids) of SOD1 have often been observed in the motor neurons of Amyotrophic Lateral Sclerosis patients. However, the amyloid formation mechanism remains unclear. In this study, we analyzed formation of SOD1 amyloids by using our recently established biological Rheo-NMR spectroscopy that enables to detect atomic-level structural changes of a protein during amyloid formation in real time. By using Rheo-NMR, we found that native SOD1 was converted into its denatured species during amyloid formation. In addition, monomeric SOD1 was shown to interact with oligomers and/or nucleus via the specific molecular surface to form amyloids.

研究内容

[背景]

高齢化が加速する現代社会において、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患は社会問題である。発症機構の解明や治療法の開発は急務であるが、現在、いずれの疾患においても根本的な理解には至っていない。神経変性疾患のひとつである筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、難病指定されており、発症からおよそ5年で死に至る病である。ALSでは、SOD1というタンパク質が運動ニューロン中で異常な線維状タンパク質（アミロイド）を蓄積し、疾患発症や病状進行に深く関与することが報告されている。しかし、SOD1は試験管内で安定なタンパク質としても知られており、細胞内で凝集体が形成するメカニズムは未だよく理解されていない。

[目的]

我々は2017年にバイオレオロジー-NMR法という新しいNMR測定法を開発し⁽¹⁾、NMR管内のタンパク質試料を攪拌することで、アミロイド形成を *in situ*、原子レベル、そして多様な時間軸で解析することが出来る。従来のアミロイド研究では、蛍光解析や円二色性解析により速度論解析を行ない、固体NMRや電子顕微鏡を用いて原子レベル構造解析を行ってきたが、細胞毒性を呈する核やオリゴマーといった反応中間体の解析は進んでいない。バイオレオロジー-NMR法は、アミロイド形成を原子レベルで「その場」観察することから、過渡的で細胞毒性の高い分子種を追跡することが出来ると考えられる。本研究では、バイオレオロジー-NMR法によって過渡的で微小なタンパク質構造・状態変化を捕らえ、原子分解能でSOD1のアミロイド形成機構を解明することを目的としている。

[結果]

1. アミロイド形成時の分子間相互作用の検出

バイオレオロジー-NMR装置を用いて、NMR管内に入れたSOD1に剪断流を与えるとアミロイド形成に伴い、単量体SOD1に由来するNMRシグナル強度の減少を観測した⁽²⁾。強度は指数関数的に減少していたが、アミロイド形成初期と後期で減少度合いが異なり、単純な一次反応の式では曲線回帰はできなかった（図1a）。一般的に、アミロイド形成は多段階反応により進行することが分かっており、単量体は反応中間体や線維と相互作用することが予想される⁽³⁾。

そこで、アミロイド形成有無で SOD1 のアミド窒素の横緩和速度をアミノ酸レベルで測定したところ、アミロイド形成下で横緩和速度が増加していることが分かった (図 1b)。横緩和速度は構造変化や分子間相互作用といった化学交換により増加する。アミロイド形成によって、単量体 SOD1 のアミド水素・窒素の化学シフト (化学的環境) が大きく変化していなかったことから横緩和速度は

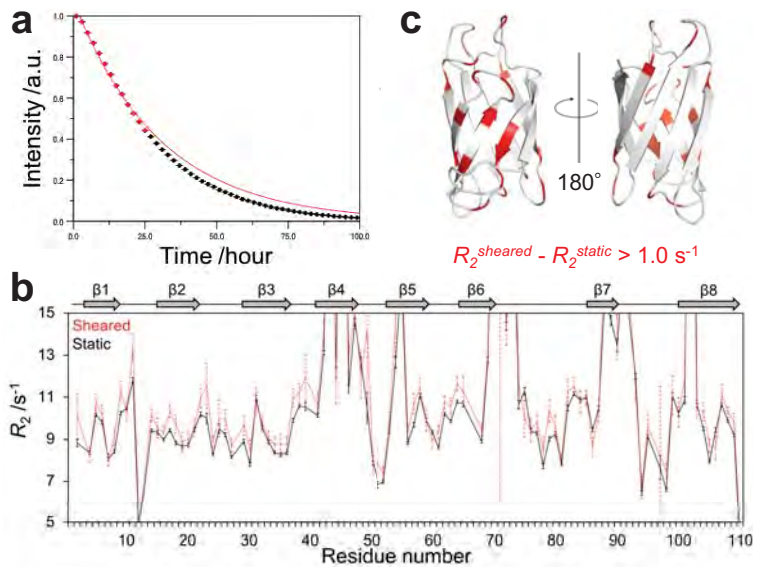


Figure 1. Weak interactions with amyloid

分子間相互作用、特にアミロイド形成によって新しく生成された分子種と単量体との相互作用によるものと考えられる。事実、アミロイド形成中の溶液を取り出し、動的光散乱法で溶液中に存在する粒子の粒子径を解析したところ、単量体よりもはるかに大きい線維ではない核やオリゴマーと考えられる分子種が存在することが確認できた。興味深いことに、横緩和速度の増加が観察された部位は SOD1 の構造の β シート 4 番から 7 番が形成する面に集中しており、SOD1 の単量体はこの表面を介して反応中間体や線維を相互作用することが示唆された (図 1c)。

2. 反応中間体の検出

アミロイド形成中において、単量体 SD1 の ^1H - ^{15}N 相関 NMR スペクトルを連続的に測定すると、新規にピークが複数出現し、その強度がアミロイド形成とともに増加することがわかった (図 2a)。新規のピークのアミド水素の化学シフトが 8 ppm 付近に集中することから、SOD1 の変性状態由来のピークであることが予想された。

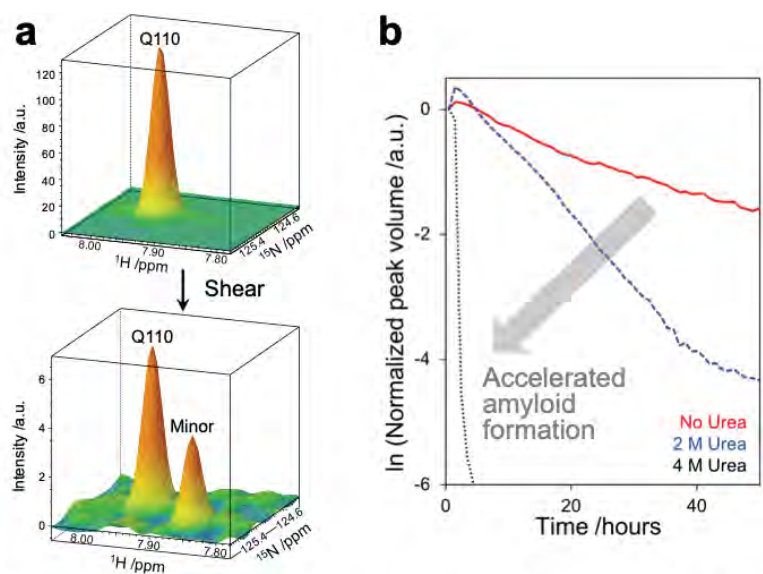


Figure 2. Increased population of unfolded states

実際、尿素によって人工的に変性させた SOD1 のピークの化学シフトと非常に近い値を示した。これらの結果から、SOD1 は天然状態から立体構造が解かれた変性状態を経由し、アミロイドを形成すると考えられる。また、SOD1 の変性状態は尿素の濃度が高くなるに従って高くなり、尿素が 2 M、4 M 存在する条件下でアミロイドを形成させると、尿素非存在下に比べ、アミロイド形成が尿素の濃度依存的に加速した (図 2b)。この実験結果は、SOD1 の変性状態がアミロイド形成における反応中間体であることを裏付ける結果である。

[今 後]

本研究のバイオレオロジー-NMR 解析により、SOD1 がアミロイドを形成する上で、SOD1 は変性状態を経て過渡的に核やオリゴマーといった反応中間体を形成し、単量体と反応中間体が相互作用することで、最終的生成物である線維を形成することが分かった (図 3)。既存の溶液 NMR 法では本研究で観察したような過渡的な状態変化ならびに分子間相互作用を

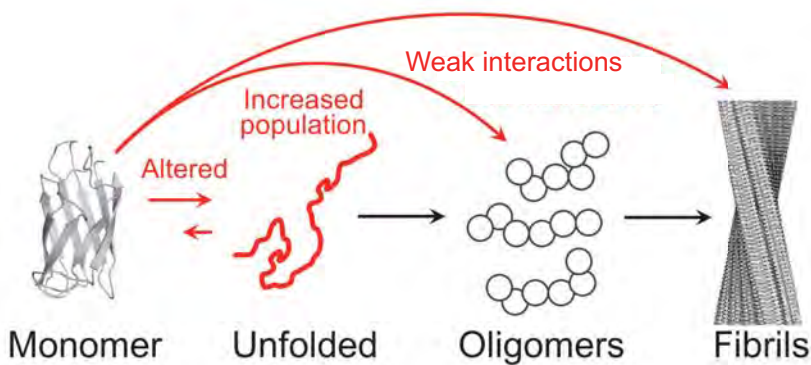


Figure 3. Model of amyloid formation of SOD1

検出することは困難である。

バイオレオロジー-NMR 法によって、SOD1 のアミロイド形成の原子分解能の構造情報を取得することができ、今後より詳細な形成機序を明らかにすることができるかと期待できる。

また、バイオレオロジー-NMR

法はアミロイド形成環境下で

NMR 測定をすることができるため、アミロイド形成を阻害するような薬剤スクリーニングも今後期待できる。近年、カレーのスパイスに含まれるクルクミンや緑茶に含まれるカテキン (没食子酸エピガロカテキン) など食物由来の天然物がアミロイド形成に対して阻害能があることが報告されている。特に、没食子酸エピガロカテキンはパーキンソン病原因タンパク質の α -シヌクレインのアミロイド線維の形成阻害ならびに一度形成した線維の破壊の効果があり注目されている。本研究の発展型として、SOD1 のアミロイド形成に関して、アミロイド阻害能がある天然物が、どのようにアミロイド形成を阻害するかバイオレオロジー-NMR を駆使し、形成速度や核形成にどのような影響があるか原子分解能で明らかにすることは興味深い。

引用文献

- (1) Morimoto D, Walinda E, Iwakawa N, Nishizawa M, Kawata Y, Yamamoto A, Shirakawa M, Scheler U, and Sugase K, High-Sensitivity Rheo-NMR Spectroscopy for Protein Studies. *Anal. Chem.*, 2017, 89(14), 7286-7290.
- (2) Iwakawa N, Morimoto D, Walinda E, Kawata Y, Shirakawa M, and Sugase K, Real-Time Observation of the Interaction between Thioflavin T and an Amyloid Protein by Using High-Sensitivity Rheo-NMR. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18(11), 2271.
- (3) Knowles TPJ, Waudby CA, Devlin GL, Cohen SIA, Aguzzi A, Vendruscolo M, Terentjev EM, Welland ME, Dobson CM, An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science*, 2009, 326, 1533-1537.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

- Walinda E, Morimoto D, Shirakawa M, Scheler U, and Sugase K, Visualizing protein motion in Couette flow by all-atom molecular dynamics. *BBA*, 2020, 1864(2), 129383.

[口頭発表]

- 森本大智、バイオレオロジーNMR法の開発と応用、第20回若手NMR研究会、蒲郡市、2019年8月2日～4日（招待講演）。

[ポスター発表]

- Morimoto D, Amyloid formation of poly-ubiquitin chains investigated by biological rheo-NMR spectroscopy, EUROISMAR 2019, Berlin, 25th-30th Aug 2019.

[その他（書籍等）]

- 森本大智、菅瀬謙治、「高感度 Rheo-NMR によるアミロイド線維化過程のその場観察」、月刊「細胞」2019年10月臨時増刊号。
- 森本大智、菅瀬謙治、「生体分子レオロジーNMRの開発と応用」、日本核磁気共鳴学会機関誌、2019年度、第10巻。