

大学院教育支援機構 (DoGS) 海外渡航助成金 報告書

Outcome report

計画名 Plan	電気泳動 NMR を用いた α -シヌクレインと ATP の結合特性評価
氏名 Name	首藤佑輔
研究科・専攻・学年 Graduate school/Division/Year level	農学研究科・応用生命科学専攻・博士後期課程 1 年
渡航国 Country	ドイツ
渡航日程 Travel schedule	2023 年 9 月 6 日 ~ 2023 年 11 月 1 日

- ページ数に制限はありません。No limits on the number of pages
- 写真や図なども組み込んでいただいて結構です。You can include pictures or illustrations.
- 各項目について具体的に記述してください。Please fill in each item specifically.
- 日本語または英語で記載ください。Please use Japanese or English.

渡航計画の概要 Outline of the travel plan

[研究の背景・目的]

生体内環境は圧力・流れ・電場といった物理的な変動や物質濃度の変動などの影響を常に受けている。近年、この動的に変動する環境下ではタンパク質の凝集(オリゴマー化やアミロイド線維化)が促進されることが分かってきた。本研究で注目する電場を例に挙げると、パーキンソン病関連タンパク質である α -シヌクレインは試験管内で神経細胞の活動電位に匹敵する強度の電場が印加されるとオリゴマー化が促進される(Osawa et al., 2008)。この発見は神経細胞内でも α -シヌクレインが電場により凝集する可能性があることを意味する。一方、生命が活動するための共通のエネルギー源として一般に知られている ATP は生体内と同等の高濃度になると、電場とは逆にタンパク質の凝集体形成を直接抑制することが分かった(Patel et al., 2017)。この傾向は α -シヌクレインも例外ではないと推測される。このような背景のもと、「生体内において高濃度の ATP は電場による α -シヌクレインの凝集体形成を直接抑制できる」と仮説を立てた。博士後期課程ではこの仮説の実証を主目標としている(図 1)。

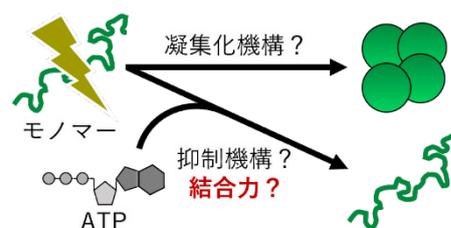


図1. 海外渡航の目的

本研究プロジェクトでは、仮説の実証に必要なであろう「 α -シヌクレインと ATP の結合特性評価」に焦点を当てた。というのも、先行研究で α -シヌクレインと ATP が非特異的に結合することが明らかになった(Nishizawa et al., 2021)一方、 α -シヌクレインに ATP が何分子結合しているのか・どの程度結合しやすいのかという点については未だわかっていないからである。これら二分子間の結合特性を評価するために電気泳動 NMR(Hallberg et al., 2008; Scheler, 2012)の使用を計画した。これは溶液中の分子に電場を印加しながら NMR 測定を行う手法である。この手法はバッテリーの開発において電解質に含まれるイオンの移動を調べるために使われており、様々な分子に応用しようという風潮が高まりつつある。電気泳動 NMR を用いると各分子の電気泳動移動度を計算することができ、これと拡散 NMR から得られる拡散係数から分子の持つ電荷が見積もられる。今回の研究では ATP が負電荷をもっていることから、ATP が多く結合するにつれて α -シヌクレインの持つ電荷が大きくなると予想され、この変化を追跡することで α -シヌクレインに結合する ATP の数を推定し、結合のしやすさを明らかにするという目的を達成できると考えた。さらに、 α -シヌクレインは電場によって凝集体を形成するため、ATP による凝集化抑制効果の有無を同時に観測できる可能性が高い。

以上のことから本研究プロジェクトでは、拡散 NMR と電気泳動 NMR を用いて α -シヌクレインと ATP

の結合特性を評価することを目的とする。

[実験方法]

α -シヌクレインや ATP の調製は日本で行い、NMR サンプルの調製やすべての NMR 測定はドイツのドレスデン・ライプニッツ・ポリマー研究所で行った。

α -シヌクレインと ATP の調製

α -シヌクレインタンパク質の精製は以下のように行った。GST-SUMO タグをつけた α -シヌクレインを BL21(DE3)によって発現させて培養した後、アフィニティークロマトグラフィーにより GST-SUMO タグをつけた α -シヌクレインを精製した。そして、透析中に SUMO タグ切断酵素 SENP2 を用いて GST-SUMO タグを切断し、陰イオン交換クロマトグラフィーと透析によるバッファー置換により高い純度の α -シヌクレインを得た。この α -シヌクレイン溶液はあらかじめ NaOH で pH7.0 に調製したうえで、凍結乾燥して粉末にした。ATP は ATP・Na₂水和物(Sigma)を純水に溶解させ NaOH で pH7.0 に調製したうえで、凍結乾燥して粉末にした。NMR 測定には 150 μ M の α -シヌクレインと 10 種類の ATP 濃度(0.15, 1.5, 3.0, 3.75, 4.5, 5.25, 6.0, 7.5, 10.5, 15 mM)を用い、99.97% D₂O (Eurisotope)に溶解した。すべての調製後のサンプルの pH は 7.0 \pm 0.5 であることを測定前にあらかじめ確認した。

拡散 NMR 分光法

拡散 NMR は Bruker 社の Avance III 500 MHz 分光計を用いて 295.6 K で実施した。溶液中の自由拡散による分子の移動はパルス磁場勾配 NMR 法で測定された。拡散時間は 50 ms、磁場勾配パルスを当てる時間は 1 ms に設定した。磁場勾配パルスの強度は対象分子に応じて変更し、具体的には α -シヌクレインの解析には 800-4000 mT m⁻¹、ATP の解析には 85-1700 mT m⁻¹の強度に設定し、16 ステップで測定した。解析には Topspin (ブルカー社)と Matlab を用い、Stejskal-Tanner equation(式 1)に従い拡散係数を算出した。

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\gamma^2 \delta^2 G^2 \left(\tau - \frac{\delta}{3} \right) D \quad \dots (式 1)$$

γ は磁気回転比、 G は磁場勾配パルスの強度、 δ は磁場勾配パルスを当てる時間、 τ は delay の長さ、 D は拡散係数、 S はシグナル強度、 I_0 は初期のシグナル強度に対応する。この拡散係数をもとにストークス-アインシュタインの式から分子の粒子半径を算出した(式 2)。

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r} \quad \dots (式 2)$$

η は溶液の粘度、 r は粒子半径に対応する。本研究では $\eta = 1.24 \times 10^{-3}$ (D₂O の粘度)とした。

電気泳動 NMR 分光法

電気泳動 NMR は Bruker 社の Avance III 300 MHz 分光計を用いて 295.6K で実施した。装置は図 1 に示すように設計されている。最大 \pm 1000 V の電圧を 64 ステップに分けて印加し、一回当たりの電圧の印加時間は 50 ms に設定した。解析には拡散 NMR と同様に Topspin と Matlab を用い、式 3 を用いて分子の有効電荷を算出した。

$$z = \frac{k_b T \mu}{eD} \quad \dots (式 3)$$

z は有効電荷、 μ は電気泳動移動度、 e は電気素子、 k_b はボルツマン定数、 D は拡散 NMR により算出された拡散係数に対応する。

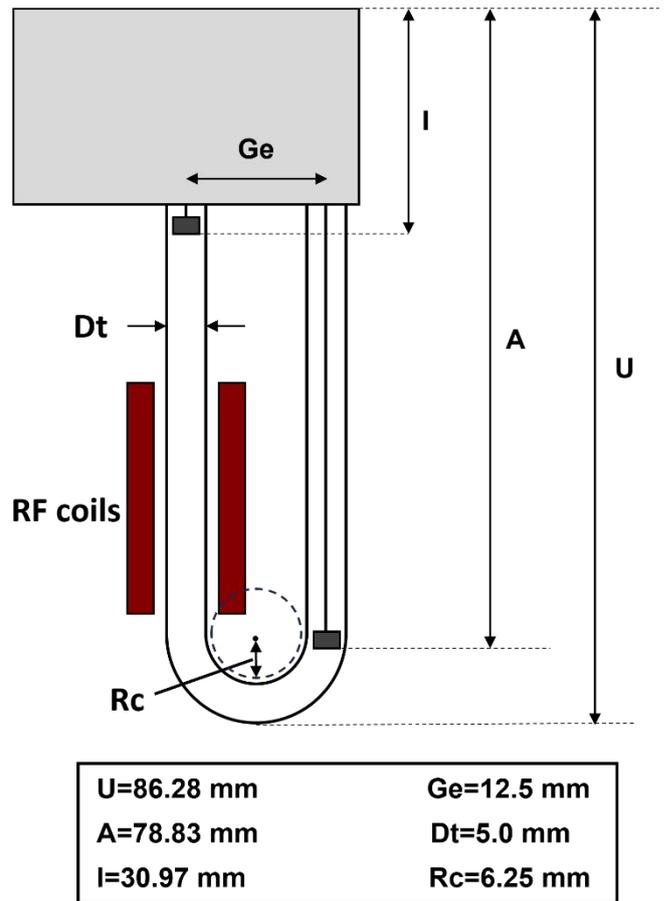
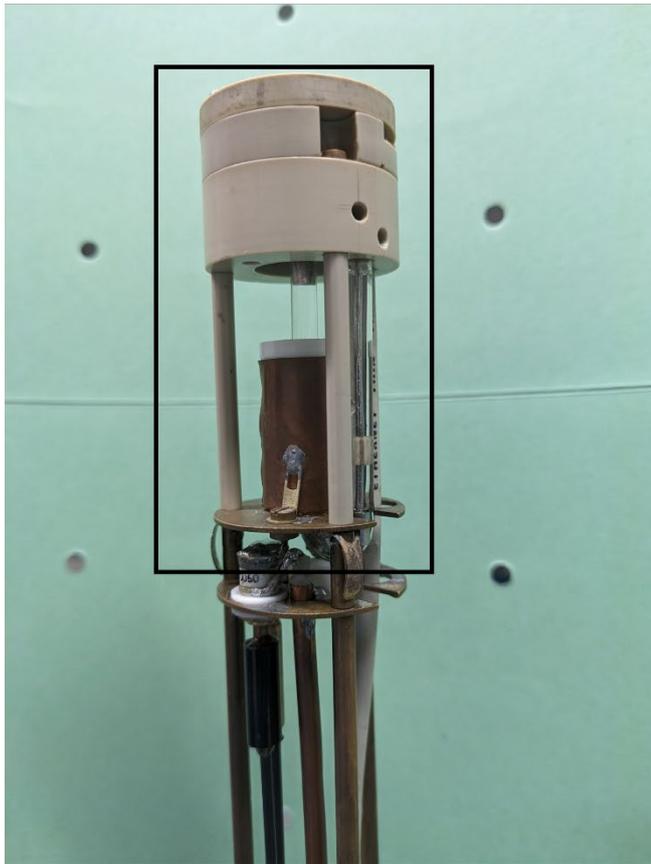


図1: 電気泳動 NMR の装置図(左)と横から見た時の平面図(右)。右図の赤四角は NMR シグナルを検出するコイルを、黒四角は電極を指す。右下には装置のサイズを示す。

成果 Outcome

拡散 NMR や電気泳動 NMR のデータを解析する際に最も重要な点は、溶液に含まれている分子それぞれを高いスペクトル分解能で検出することである。そこで初めに α -シヌクレインと ATP の 1D ^1H スペクトルを取得し、それぞれの分子に対応するピークを同定した(図2)。

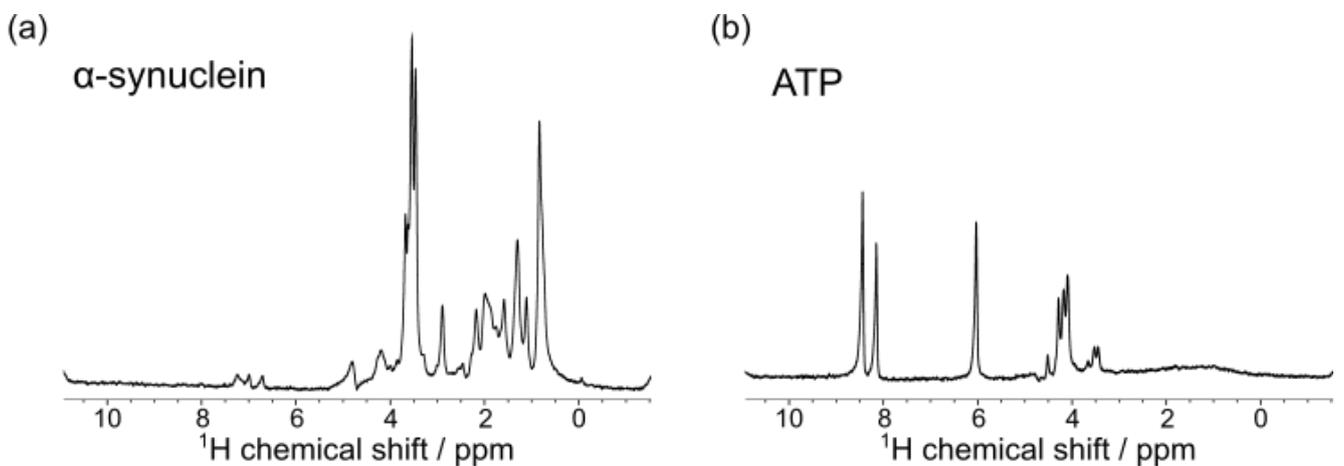


図2: (a) 150 μM α -シヌクレインと (b) 10.5 mM ATP の ^1H スペクトル。Avance III 500 MHz を用いて測定し、NMR サンプルに含まれる水は Solvent suppression により飽和させた。

本研究では解析に支障をきたさないようにするために、 α -シヌクレインのピークにはアルキル基由来の 0.8 ppm を、ATP のピークにはプリン環由来の 8.5 ppm を選択した。

次に、電気泳動 NMR と拡散 NMR の解析結果を示す。一例として、150 μ M α -シヌクレインと 3.0 mM ATP の混合溶液に対する測定結果を以下に示す(図 3)。

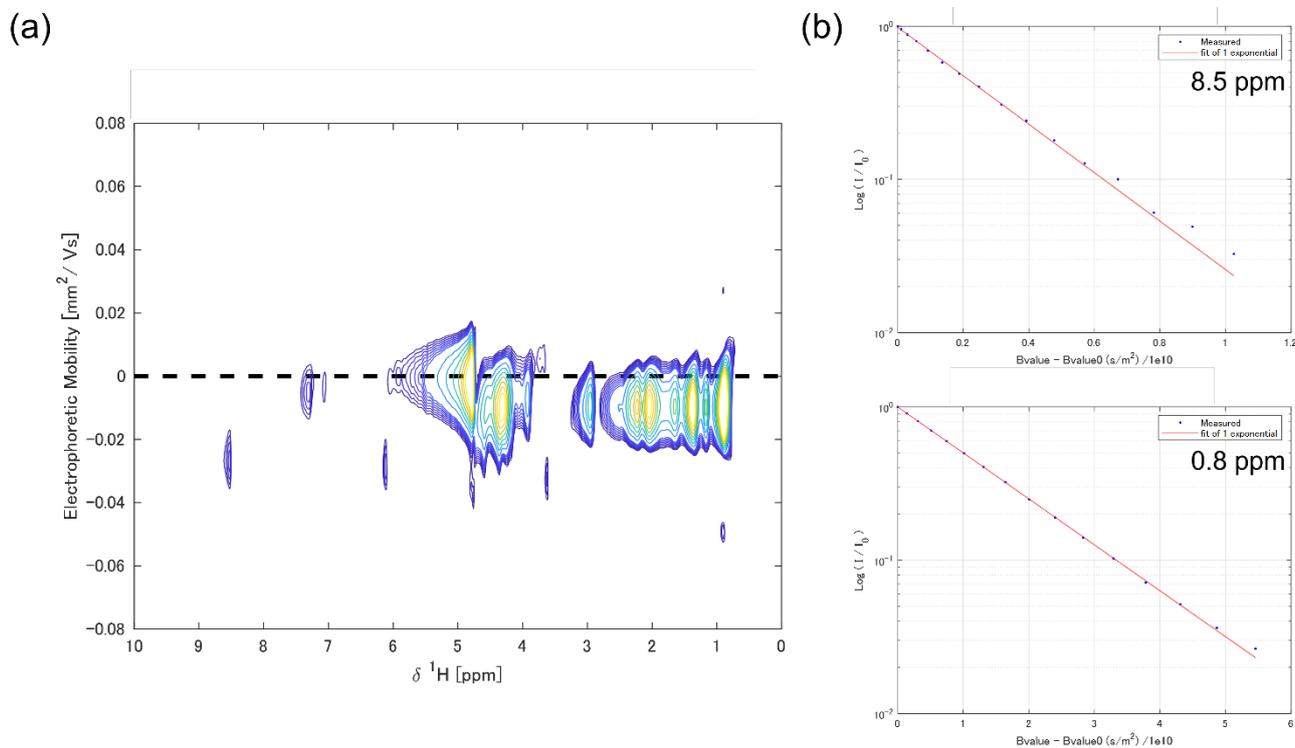


図 3: 150 μ M α -シヌクレインと 3.0 mM ATP の混合溶液に対する (a)電気泳動 NMR と (b)拡散 NMR による解析結果。(b)の上図は 8.5 ppm (ATP)、下図は 0.8 ppm (α -シヌクレイン)に位置するピークに対して解析を行った結果である。横軸の“Bvalue-Bvalue0”は式 1 の“ $\gamma^2 \delta^2 G^2 \left(\tau - \frac{\delta}{3} \right)$ ”に対応しており、得られた測定結果をグラフにプロットし線形回帰した。黒点は実際の測定結果、赤線は線形回帰した結果を示す。

その結果、図 3a から α -シヌクレインと ATP の電気泳動移動度はそれぞれ $-0.011 \text{ nm}^2 / \text{Vs}$ 、 $-0.028 \text{ nm}^2 / \text{Vs}$ と算出された。また、拡散 NMR からはそれぞれの拡散係数が $6.90 \times 10^{-10} / \text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ 、 $3.64 \times 10^{-10} / \text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ と算出された。

最後に、以上のように得られた電気泳動移動度と拡散係数を式 2 と式 3 に代入して各分子の粒子半径と有効電荷を算出した(図 4)。

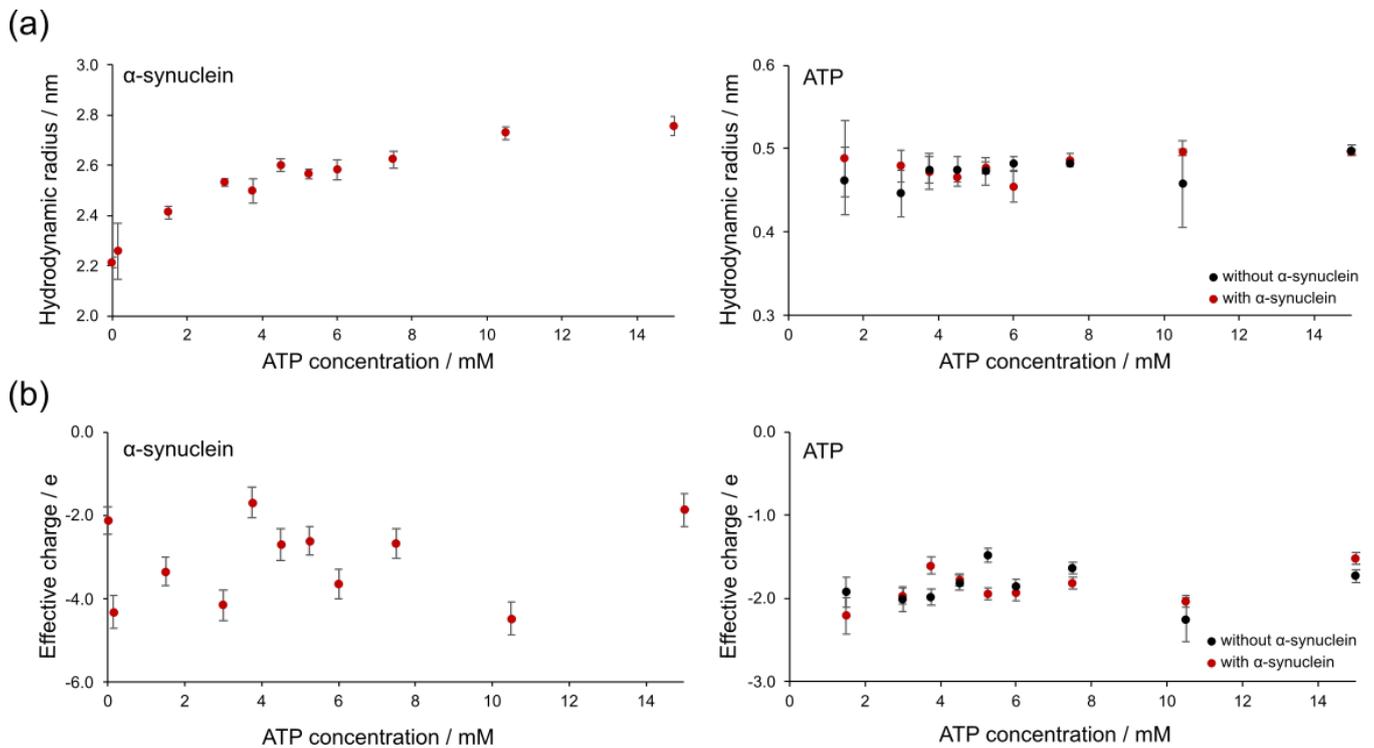


図 4: 150 μ M α -シヌクレインと異なる濃度の ATP の混合溶液それぞれから得られた、各分子の(a)粒子半径と(b)有効電荷。左は 0.8 ppm (α -シヌクレイン)、右は 8.5 ppm (ATP)に注目した結果。また、黒点は ATP のみの溶液、赤点は α -シヌクレインと ATP の混合溶液を意味する。すべてのエラーバーは標準偏差を指す。

図 4a を見ると、ATP 分子の粒子半径は ATP 濃度や α -シヌクレインの有無に関係なくほとんど変化しなかった。一方、 α -シヌクレインの粒子半径は ATP が高濃度になるにつれて線形的に増加した。加えてその増加傾向に着目すると、低濃度の ATP では流体半径が急激に増加するのに対し、高濃度になると粒子半径が変化しなくなるプラトー段階に入る様子が観測された。この結果は、 α -シヌクレインに結合する ATP の数に限りがあることを意味している。また、図 2a 右の結果では ATP の粒子半径はほとんど変化していないことから、 α -シヌクレインに ATP はモノマーとして結合していると予想される。この予想に基づくと、有効電荷についても図 2a と同様の傾向(有効電荷の増加)がみられるはずであり、 α -シヌクレインのみとの有効電荷の比較により α -シヌクレインへの ATP の結合のしやすさ(見かけの解離定数)を見積もることができると当初考えていた。しかし、図 4b 左に示すように α -シヌクレインの有効電荷に一定の傾向を見出すことはできなかった。ちなみに電気泳動 NMR の前後の pH を比較するとほとんどの条件において測定前に比べ測定後の pH が小さくなっていたが、 7.0 ± 0.5 の範囲に収まっていた。 α -シヌクレインを構成するアミノ酸の pKa はこの pH 範囲にはないため、アミノ酸の電荷は本条件下では変化しないと考えられる。本実験結果を解釈する際に注意しなければならない点として、“本実験では溶液の粘度を考慮していない”ことと“イオン強度の違いを考慮していない”ことの二点考えられる。“溶液の粘度を考慮していない”という点については、粘度の値は粒子半径に関係する。粘度を測定するための粘度計を当該研究室は保有していなかったため、今回の解析では溶媒である D_2O の粘度を用いて計算を行った。しかし、タンパク質溶液は純溶媒に比べ粘度が高くなることが予想される。実際、150 μ M と 280 μ M の α -シヌクレインの拡散係数を比較するとそれぞれ $7.89 \times 10^{-11} / m^2 s^{-1}$ 、 $7.29 \times 10^{-11} / m^2 s^{-1}$ と算出され、同じ α -シヌクレインであるにもかかわらず異なる粒子半径が算出された。そのため粒子半径が大きく見積もられている可能性がある。もう一方の“イオン強度の違いを考慮していない”という点については、先行研究でイオン強度が大きくなると電気泳動

の速度が小さくなることが示唆されている(Ibrahim et al., 2012)。特に高分子電解質の電気泳動移動度についてはイオン強度に応じて減衰するスピードが速い特徴を持つ。本研究で用いている ATP や α -シヌクレインも負電荷をもつため高分子電解質とみなして問題ないであろう。しかし、これら二つの点についてはともに解析結果に一定の規則性を持つ変化をもたらす要素であり、図 4a に示すような粒子半径の結果と図 4b に示すような有効電荷の結果の齟齬を説明することはできないと考えられる。現在、この原因として電気泳動 NMR の装置上の問題が関係していると考えており、さらなる再現実験が求められる。

最後に電気泳動 NMR により電場を印加する前と印加した後のサンプルを Diffusion NMR で測定し粒子半径を算出した(図 5)。

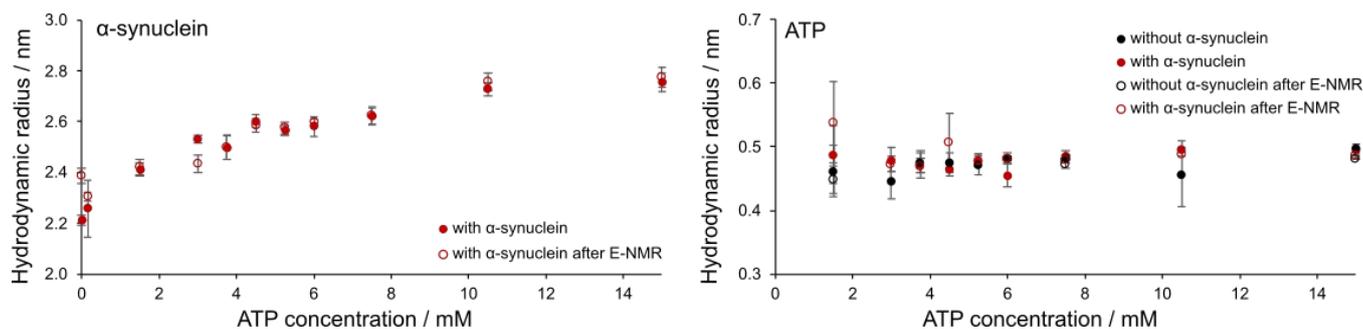


図 5: 電気泳動 NMR の測定前と測定後における分子の粒子半径の比較。黒が ATP のみの溶液、赤が α -シヌクレインと ATP の混合溶液、穴の開いた点は電気泳動 NMR 測定前、穴の埋まった点は電気泳動 NMR 測定後に対応する。すべてのエラーバーは標準偏差を表す。

図 5 右のグラフでは ATP の粒子半径は各条件下でほとんど変化していないのに対し、図 5 左に示した α -シヌクレインの粒子半径は低濃度の ATP 存在下(特に ATP が存在しない場合)では測定後に大きくなり、高濃度の ATP 存在下ではほとんど変化しないことが分かった。これらの結果は、電気泳動 NMR の測定によって電場による ATP の自己凝集は起きないことと ATP が存在しない場合に α -シヌクレインの粒子半径がわずかに大きくなる、言い換えると凝集体を形成しやすくなっていることを示唆している。また本実験では、”瞬間的に”強い電場を印加しているため、拡散 NMR と SDS-PAGE(図 6)では電気泳動 NMR の測定前と測定後のサンプルの間に顕著な違いは見られなかったと考えられる。

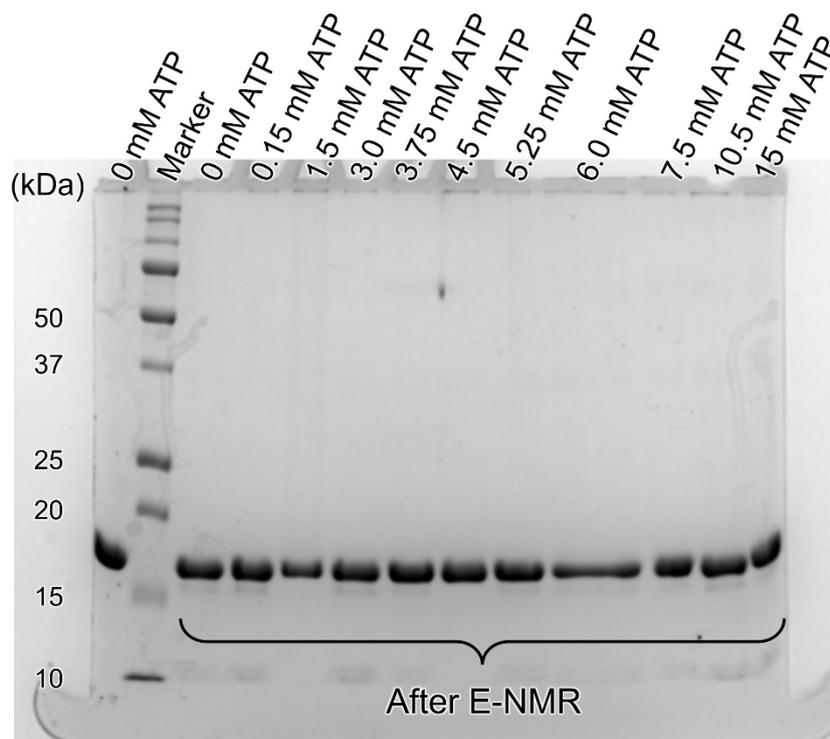


図 6: 電気泳動 NMR 測定後の溶液の SDS-PAGE。マーカーの左のバンドは電気泳動 NMR を測定する前の溶液(コントロール)であり、17 kDa 付近の濃いバンドがモノマーの α -シヌクレインを意味する。

今後の展望 **Prospects for the future**

本海外渡航では電気泳動 NMR と拡散 NMR を用いて α -シヌクレインと ATP の粒子半径と有効電荷を算出した。その結果、拡散 NMR から ATP 濃度に応じた粒子半径の増加傾向の変化をとらえることに成功した。しかし、この結果を電気泳動 NMR から得られた結果と結びつけることはできなかった。今後は、電気泳動 NMR のデータの再現性を取り、追加で粘度の測定も行ったうえで論文化を目指す。

謝辞

本プロジェクトを遂行するにあたり、ドレスデン・ライプニッツ・ポリマー研究所 (ドイツ) の Ulrich Scheler 博士と Benjamin Kohn 氏には、実験手法をはじめとしたさまざまなご教授をいただきました。心より御礼申し上げます。

参考文献

- (1) Hallberg, F., Furó, I., Yushmanov, P. V., & Stilbs, P. (2008). Sensitive and robust electrophoretic NMR: Instrumentation and experiments. *Journal of Magnetic Resonance*, *192*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2008.02.001>
- (2) Ibrahim, A., Allison, S. A., & Cottet, H. (2012). Extracting information from the ionic strength dependence of electrophoretic mobility by use of the slope plot. *Analytical Chemistry*, *84*(21), 9422–9430. <https://doi.org/10.1021/ac302033z>
- (3) Nishizawa, M., Walinda, E., Morimoto, D., Kohn, B., Scheler, U., Shirakawa, M., & Sugase, K. (2021). Effects of Weak Nonspecific Interactions with ATP on Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, *143*(31), 11982–11993. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c13118>

- (4) Osawa, Y., Ikebukuro, K., Kobayashi, N., Han, S., Nakamura, C., & Sode, K. (2008). Aggregation and Fibrillation Study of α -synuclein Under Applied Voltage. *Electrochemistry*, 76(8), 614–618. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.76.614>
- (5) Patel, A., Malinowska, L., Saha, S., Wang, J., Alberti, S., Krishnan, Y., & Hyman, A. A. (2017). ATP as a biological hydrotrope. *Science*, 356(6339), 753–756. <https://www.science.org>
- (6) Scheler, U. (2012). Electrophoretic NMR. *EMagRes*, 1(1), 127–134. <https://doi.org/10.1002/9780470034590.emrstm0154.pub2>