

# パーキンソン病発症と関連する天然変性蛋白質 $\alpha$ -シヌクレインの「構造」解析

“Structural” analysis of the intrinsic denatured protein,  $\alpha$ -synuclein, which is related to the pathogenesis of Parkinson's disease

藤原 悟<sup>1)</sup>西久保 開<sup>2)</sup>

Satoru FUJIWARA

Kai NISHIKUBO

<sup>1)</sup>量研機構<sup>2)</sup>茨城大学

## (概要)

パーキンソン病発症と関連する天然変性蛋白質  $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ Syn)の線維状異常凝集体形成機構解明のため、凝集開始に直結する  $\alpha$ Syn 単量体のふるまいを明らかにする。そのため、 $\alpha$ Syn 単量体の構造分布を導出する。特に、3つの領域からなる  $\alpha$ Syn の詳細な構造分布を導出するために、特定の amino 酸残基を「軽水素化」した重水素化  $\alpha$ Syn を複数種類、調製し、それらの中性子小角散乱実験を行う。得られた散乱曲線を統一的に解析することで詳細な  $\alpha$ Syn 単量体の構造分布を導出する。特に凝集体形成のしやすさの異なる条件下での構造分布を導出・比較することで、凝集体形成機構解明の手掛かりを得ることを目指す。

## キーワード:

中性子小角散乱、シヌクレイン、パーキンソン病、蛋白質重水素化

## 1. 目的

本研究は、重篤な神経変性疾患パーキンソン病(PD)発症と深く関係する、天然変性蛋白質(IDP)  $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ Syn)の繊維状異常凝集体(アミロイド線維)形成の分子機構の解明を目指して、 $\alpha$ Synの詳細な構造分布を導出することを目的とする。IDPは、通常の溶液条件下で、特定の構造を持たず様々な構造状態を遷移するため、IDPの構造解析には構造分布そのものを調べる必要がある。一方、アミロイド線維の凝集開始は蛋白質の変性が引き金となるため、IDPである $\alpha$ Synは、自然に凝集開始の引き金がかかった状態にある。従って、線維のなりやすさが異なった溶液条件下での構造分布を比較することにより、凝集開始のカギとなる構造(変化)が明らかになることが期待される。我々は、 $\alpha$ SynのX線小角散乱(SAXS)実験を行い、塩添加による線維のなりやすさの変化に対応した平均構造の変化を明らかにした[1]。SAXSは、IDPの構造分布の解析にも有効である[2]が、SAXSシグナルの由来となる蛋白質の電子密度分布はほぼ一定のため、蛋白質の極性(N末端側とC末端側)を本当には区別できない。 $\alpha$ Synは、1-60残基のN末端領域、61-95残基のNAC領域、96-140残基のC末端領域の3つの領域から成り、それぞれの領域が線維形成に異なった役割を果たすことが示唆されている。従って、 $\alpha$ Synの「構造」解析には、それぞれの領域を区別できる詳細な構造分布を導出しなければならない。本研究では、蛋白質重水素化技術と中性子小角散乱(SANS)を組み合わせることで、 $\alpha$ Synの3つの領域を区別しうる詳細な構造分布の導出を目指す。

## 2. 方法

SANSシグナルの由来となる原子散乱長は水素と重水素で大きく異なるため、完全重水素化蛋白質中の特定 amino 酸残基を「軽水素化」することで蛋白質内部に散乱長密度分布を作り出すことができる。 $\alpha$ Synでは、図1に示すように、残基毎に配列中の位置の分布が偏っているため、異なった amino 酸残基を軽水素化することで異なったパターンの散乱長密度分布を持つ蛋白質を調製できる。これらの試料のSANS測定を行い、得られた散乱曲線を統一的に解析することで詳細な構造分布を導出することができる。

蛋白質重水素化は、重水素化緑藻ペプトンを用いた方法[3]を用いて行った。また、特定 amino 酸残基の軽水素化は重水素化用培地に通常の(軽水素化) amino 酸を過剰に加えることにより行

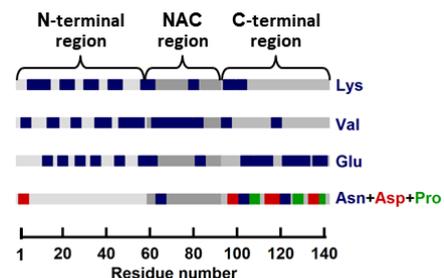


図1.  $\alpha$ Syn 配列中の amino 酸残基の位置

なわれた[4]。本研究では、(1)重水素化(D-)αSyn中でLys残基が軽水素化されたH-Lys-D-αSyn、(2)Valが軽水素化されたH-Val-D-αSyn、(3)Gluが軽水素化されたH-Glu-D-αSyn、(4)Asn、Asp、Proが同時に軽水素化されたH-AAP-D-αSynを、それぞれ調製した。さらに基準試料として、(5)通常の軽水素化(H-)αSyn及び(6)D-αSynも調製した。それぞれの試料は、低塩濃度及び高塩濃度重水溶液(50 mM HEPES (pD 7.5) or 50 mM HEPES (pD 7.5) + 150 mM NaCl in D<sub>2</sub>O)に懸濁した。重水素化率98%のD-αSynが得られること、軽水素化アミノ酸残基がD-αSynへ挿入できることは質量分析で確認済みである。またH-αSynとD-αSynは同様の構造で、重水素化による構造への影響はないこともSAXS測定により確認済みである。

SANS測定は、中性子小角散乱装置SANS-Jを用いて行った。上記試料および2種類のバッファー並びに空の試料セルの測定を、試料-検出器間距離 4 m及び2 mにおいて、試料温度20°Cにて行った。試料濃度は1.8~3.0 mg/mlであった。主検出器及び前方検出器により得られた2次元プロファイルを円筒平均し、空セルの寄与を差し引くことで1次元の散乱曲線を得た。さらにバッファーの散乱曲線を差し引くことで蛋白質由来の散乱曲線を導出した。

### 3. 結果及び考察

図2に得られた散乱曲線を示す。4 m及び2 mにおける測定で得られた主検出器からのデータ並びに前方検出器からのデータを連結した曲線を示している。H-αSynとD-αSynが、ほぼ同様の曲線であることが示された。これはSAXS測定で確認されたように、重水素化により構造が変化しないことを示している。一方、特定アミノ酸残基が軽水素化されたD-αSynは、軽水素化されたアミノ酸残基の種類により散乱曲線が異なることが明らかとなった。これはアミノ酸残基の分布の偏りにより散乱曲線が異なることを示しており、統一的な解析によりαSynの3つの領域を区別できる詳細な構造分布を導出できる可能性を示す。本研究の有効性を示唆するものである。

さらに、低塩濃度条件と高塩濃度条件でも散乱曲線が異なることが明らかとなった。これは、塩濃度の違いによる構造の変化を反映して散乱曲線が変化することを示している。低塩濃度と高塩濃度の構造分布を比較することにより、線維の成りやすさと関係する構造を明らかにすることが期待できる。現在、モデル計算等を用いた詳細な解析を実施中である。

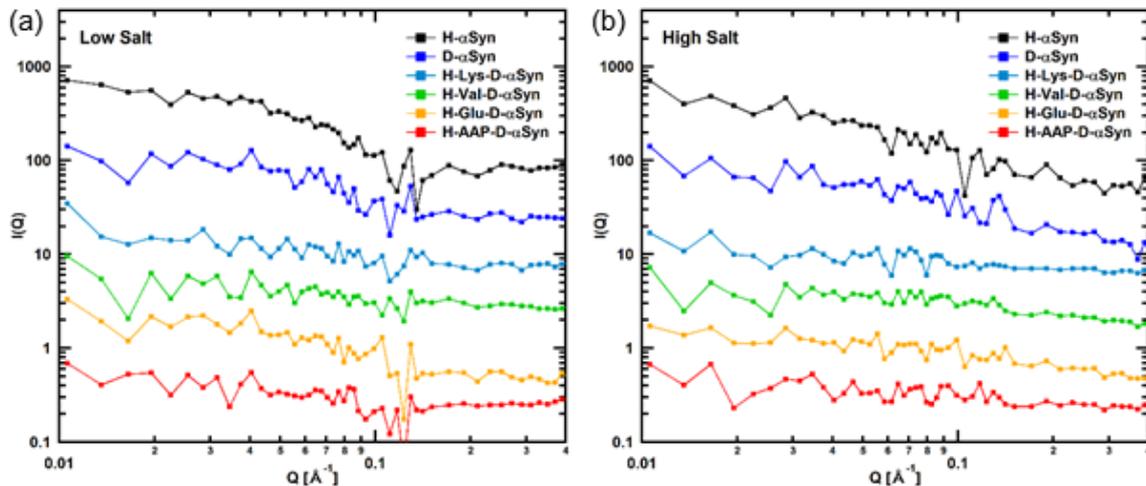


図2. 得られた1次元の散乱曲線のまとめ。(a) 低塩濃度条件及び(b) 高塩濃度条件の散乱曲線を示す。それぞれの曲線は縦軸方向にずらしてある。

### 4. 引用(参照)文献等

- [1] Fujiwara et al. *J. Mol. Biol.* (2019) **431**, 3229-3245.
- [2] Tria et al., *IUCrJ* (2015) **2**, 207-217.
- [3] Matsumoto et al. *J. Mol. Biol.* (2004) **342**, 1209-1221.
- [4] Réat et al. *PNAS* (1998) **95**, 4970-4975.