

## 西村 勝之 (准教授) (2006年4月1日着任)

横田 光代 (事務支援員)

A-1) 専門領域：固体核磁気共鳴，構造生命科学

A-2) 研究課題：

- 固体 NMR による糖脂質含有脂質二重膜上で誘起されるアミロイド  $\beta$  会合状態の構造解析
- クマムシ由来高耐熱性タンパク質の固体 NMR を用いた構造解析
- アミロイドタンパク質の大量発現系の確立と試料調製
- 固体 NMR プローブの開発
- 固体 NMR を用いた各種分子材料の構造解析

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- アミロイド  $\beta$  タンパク質 (A $\beta$ ) はアルツハイマー病発症に深く関与すると考えられ，凝集して不溶性のアミロイド線維を形成する。本研究では，A $\beta$  と高い親和性を有する糖鎖脂質 GM1 を含有した脂質膜下で形成される A $\beta$  オリゴマーの構造解析に基づき，アミロイド線維形成分子機構を解明することを目的としており，加藤 (晃) 教授グループと共同研究を行ってきた。前報告までの実験結果から二次構造を同定し，GM1 存在下では，前研究で決定した中性脂質膜上で誘起される構造とは異なる分子構造を示すことが判明していた。今回新たに磁気双極子相互作用に基づく  $^{13}\text{C}$  同種核相関 NMR 実験を，安定同位体非標識 A $\beta$  で希釈した同試料に適用し，これまで区別が困難であった分子内，分子間の相関信号の区別に成功した。この解析から得られた分子内，分子間の近，中長距離情報に基づき，NMR データのみから大まかな分子配座の検討に成功した。さらに本年度から奥村グループと共同研究を行い，固体 NMR データを抑制条件として用いた MD 計算により，同分子の詳細な分子構造，および分子配座の決定に成功した。
- クマムシは特徴的な乾眠メカニズムを有し，乾眠状態で数十年生存することが可能である。これには，クマムシ固有のタンパク質が関与していると考えられているが，その詳細は不明である。クマムシの中で構成タンパク質が良く研究されているヨコヅナクマムシの熱耐性が非常に高い secretory abundant heat soluble (SAHS) タンパク質，および cytosolic-abundant heat soluble (CAHS) タンパク質の構造を固体 NMR を用いて解析することを試みた。本研究は，名古屋市立大学佐藤匡史准教授グループと分子研加藤晃一教授のグループとの共同研究である。Val 残基のみ全  $^{13}\text{C}$ ， $^{15}\text{N}$  標識，Ile 残基のみ  $^{15}\text{N}$  標識した [U- $^{13}\text{C}$  C,  $^{15}\text{N}$ ]Val-[U- $^{15}\text{N}$ ]Ile-SAHS，および Phe 残基のみ全  $^{13}\text{C}$ ， $^{15}\text{N}$  標識，Tyr 残基のみ  $^{15}\text{N}$  標識した [U- $^{13}\text{C}$  C]Phe-[ $^{15}\text{N}$ ]Tyr-CAHS に関して，2次元  $^{13}\text{C}$  同種核相関 NMR，および2次元  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  異種核間相関 NMR 測定を行った。SAHS タンパク質に関して，残基数と同じ6対の信号を観測し，この内の1つの信号の絶対帰属に成功した。CAHS タンパク質に関して，残基数と同じ3種の Phe 信号を観測まで完了した。SAHS，CAHS タンパク質共に，変異株を用いた信号の内訳の決定を来年度行う予定である。
- 複数のアミロイドタンパク質の大量発現系の構築に関して，国立感染症研究所の谷生道一博士と共同研究を行っている。この内の一つに関して大腸菌を用いた大量発現系構築，精製を試みてきたが，構造解析に必要な高純度試料精製法の確立には至っていない。このため，別のアミロイドタンパク質の大量発現系構築に主軸を移すと共に，同タンパク質の重要ドメインに関して，まず化学合成により同位体標識試料の調製を行った。現在，固体 NMR 測定のための試料調製検討実験を行うと共に，固体 NMR を用いた脂質膜との相互作用解析を行っている。

- d) 現在使用している Bruker 社製分光器, および周辺機器と完全互換性を有する独自の固体 NMR プローブの開発を行ってきた。まずベースとなる 400MHz NMR 用 2.5mm 試料管用固体 MAS  $^1\text{H-X}$  (可変) 二重共鳴プローブの製作を行った。本プローブでは, 最終的に 2.5mm 試料管用試料回転モジュール, および回転検出用の光電圧変換モジュールの 2 部品のみ同社製部品を使用し, それ以外を全て独自に設計, 製作した。さらに, 故障時のメンテナンスと更なる高効率化を考慮して設計変更を行った改良版プローブの設計, 部品製作が完了し, 組み立て中である。また, 多くの共通構造を有する  $^1\text{H-}^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$  三重共鳴プローブは, 同改良版をベースに再設計し, 同様に組み立て中である。さらに, すべての部品を独自設計のモジュールに置き換えるため, 独自のスピニングモジュールの開発を開始した。本モジュール設計では, 現在使用している外径 2.5 mm 試料管より設計が容易な, 4.0 mm 試料管を対象としたデザインの異なる 2 種類の試作品の設計を行った。一種目の試作品は製作が完了し, 回転テストでは比較的良好な結果が得られた。現在, 2 種類の試作品の部品製作中である。後者のテスト結果を考慮し, 両試作品の長所を組み合わせたデザインを最終品として製作中である。また, 同モジュール完成後, 試料量が必要な安定同位体非標識試料などの低感度試料を対象とした 4.0 mm 試料管用固体 MAS  $^1\text{H-X}$  二重共鳴プローブを製作する予定である。
- e) 固体 NMR を用いた分子材料の構造解析に関して, 2 件の共同研究を引き続き行っている。大阪大学の戸部義人教授グループが開発された有機分子材料に関して, 固体 NMR を用いた電子状態解析の共同研究を行っている。解析対象の残り 1 分子の合成が難航しており, 複数回の合成方法の改良検討を行ってきたが未だ完成には至っていない。さらに, 愛知教育大学の西 信之教授, 日鉄ケミカルとの共同研究で, 同グループが開発された分子材料の解析を行っている。暫定的な信号帰属, および状態解析を完了しているが, 現状では, 詳細な解析を行うにはスペクトル感度が著しく不足しており, 試料密度向上のための試料調製法を検討中である。

#### B-7) 学会および社会的活動

学会の組織委員等

第 22 回国際磁気共鳴会議 (ISMAR), 第 9 回アジア太平洋 NMR シンポジウム (AP-NMR), 第 60 回 NMR 討論会 (NMRSJ), 第 60 回電子スピンスイエンズ学会 (SEST2021) 合同会議組織委員 (2020–2021).

#### B-10) 競争的資金

科研費基盤研究 (C), 「超分子構造の分子間配座解析に資する固体 NMR 解析法開発とその適用」, 西村勝之 (2019 年–2021 年).

#### B-11) 産学連携

共同研究, (株) 日鉄ケミカル & マテリアル, 「ナノ材料の固体 NMR 研究」, 西村勝之 (2020).

#### C) 研究活動の課題と展望

これまで行ってきた脂質二重膜上で形成されるアミロイド  $\beta$  タンパク質オリゴマーの研究が, 構造および配座モデルの検討まで完了し, 本年度から奥村グループとの共同研究を行い, ようやく固体 NMR データに基づいた詳細な分子構造および配座決定が完了した。一方, 別のアミロイドタンパク質の大量発現系構築を別の共同研究先と進めて来たが, その性質上, 発現精製共に著しく苦戦している。一方, 開発を行ってきた独自の固体 NMR プローブは改良が進み, より良い状態になりつつある。また, 開発プローブの全ての部品を独自設計品に置き換えるためのモジュール

開発も進んでおり、残り2つとなった。現在、最難関のスピンングモジュールの開発を行っており、試作品の回転テストは良好な結果を得ている。今後これらを活用、発展させて行きたい。これまで何年間か、上述のような性質の異なる全ての作業を一人で行ってきたが、生産性に限界があり、特に新規試料の調製初期段階では多くの地道な作業が必要である為、試料調製を担う有能なスタッフを渴望している。本年度は本の執筆も2部行っており、年度末は時間に追われたが、どうにか締め切りに間に合わせることができそうである。