

# 高感度ラマン光学活性装置の開発とそれによるタンパク質アミロイド線維の立体配座解析

## Conformational Analysis of Protein Amyloid Fibril by Using Newly-Developed Highly-Sensitive Raman Optical Activity Spectrometer

(日本分析化学会推薦)

代表研究者 大阪大学 山本 茂樹 Osaka University Shigeki YAMAMOTO  
協同研究者 Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i. Petr BOUŘ

Raman Optical Activity (ROA) is a chiral vibrational spectroscopy which can determine not only absolute configuration of chiral molecules but also molecular conformation in fast structural equilibria. This novel spectral technique, when combined with quantum mechanical simulation of the spectra, can give also conformational probabilities of chiral molecules. ROA has been expected to be a new analytical method of molecular structures in solutions, however, there are tasks we should solve in ROA spectroscopy itself, i.e. low sensitivity of ROA instrument and a difficulty in application to structural analysis of denatured proteins including amyloid fibril of which detailed structure is still difficult to analyze with the other analytical methods. In order to overcome these points, we did developments of instrumentation of ROA and quantum mechanical simulation of amyloid fibril. Design and construction of a new two-lens ROA instrument was tried, and quantum mechanical simulation of ROA and Raman spectra of insulin amyloid was achieved successfully.

### 研究目的

タンパク質アミロイド線維の構造変化を、二次、三次構造および側鎖局所構造の全てについて炭素鎖ねじれ角 120 度の分解能で解析できる、新原理に基づいた分析法を開発する。

分子立体配座に鋭敏なラマン光学活性(Raman Optical Activity; ROA, Fig. 1)分光装置の検出感度を、高強度レーザーを用いた周囲検出法の開発により市販装置と比較して飛躍的に高め、測定時間を数時間から数分に削減し、かつ少ない試料量 (0.1 mg) で行うことを初めて可能とする。開発した ROA 装置を用いて、タンパク質アミロイド線維の二次構造変化を分単位で測定することを可能とする。

さらに、ROA スペクトルの量子力学計算により、タンパク質全体の溶液構造を解析する手法を開発し、タンパク質の揺らいだ立体配座構造と、それらの存在比分布を決定する一般的なタンパク質構造解析法を確立する。すなわち、ROA 実験スペクトルと量子

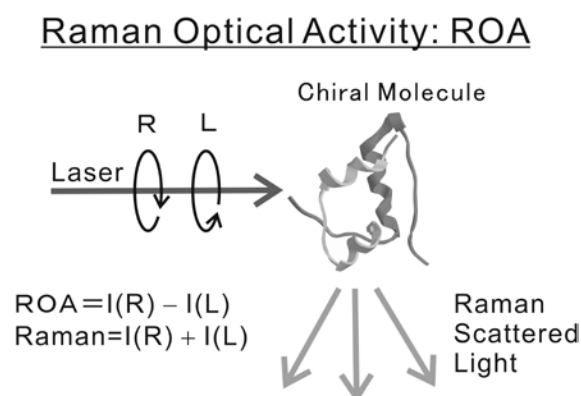


Figure 1. Scheme of Raman Optical Activity

力学計算スペクトルとの合致度合の定量的評価を構造探索過程に組み込むことで、多数のタンパク質構造と存在比率を炭素鎖ねじれ角 120 度の分解能で得る、新規 ROA 構造解析法を開発する。もってアミロイド線維の天然化過程の構造変化を解析し、その構造変化部位と変化原因を明らかとする。

アルツハイマー病やヤコブ病においては、特定の

タンパク質が $\alpha$ ヘリックス構造から $\beta$ シート構造へ高次構造の変化を起こし、不溶性アミロイド線維を形成し、脳内などにおいて沈着を起こす。この不溶化過程および、その逆反応であるアミロイド線維構造の天然化過程を理解し、反応を制御する為には、アミロイド線維の変化を高分解能で構造解析し、その変化原因を分子的観点で明らかとする必要がある。しかし、既存の分析方法では、アミロイド線維およびその構造前駆体など、時間的揺らぎを持ったタンパク質高次構造を立体配座の分解能で解析することは難しい。NMR 分光法は測定に数時間を要し、相互作用距離が短く、スペクトル時定数がミリ〜マイクロ秒であるため、構造的揺らぎを含む系や時間変化する系については解析が困難である。本研究においては、速い構造平衡系にある分子系に適用でき、かつ分子立体配座とその存在分布を決定できる ROA の測定感度を、市販装置の劇的に向上させ測定時間を数分に短縮し、さらに溶液中タンパク質構造を立体配座の分解能で構造解析することを可能とする。もって、アミロイド線維の高次構造変化を構造ゆらぎも含めて分子立体配座の分解能で解析可能な、新たな原理に基づいた分析法を確立する。

## 研究経過

上記課題を解決するために、高感度な ROA 測定装置の開発を行った。試料からのラマン散乱光を捕集するレンズを 2 枚用い、試料の半周囲を覆う検出系を構築することで、検出効率を飛躍的に高め、かつ装置由来の測定誤差を効果的に減少させる ROA 測定装置を設計した (Fig. 2)。この装置は 3 次元的に光学部品が配置された非常に独創的なものである。

最大出力 6W の高強度レーザーを測定装置に組み込み、試料に照射した。高強度レーザーによる試料の損傷を回避するために、レーザー光を緩く集光し、単位面積あたりのレーザー強度密度を従来装置と同じとした。高強度のレーザーによる光学部品の損傷が考えられるため、レーザー径を広げレーザー光強度密度を減少させると共に、空気中の塵の焼きつきを防ぐためにクリーンブースを設置した。

上記 ROA 測定装置には、有効径 200  $\mu\text{m}$  の 2 分岐バンドルファイバーを採用している。これを用いるために、透過型回折格子を組み込んだ明るいレンズ分光器 (F/2) を設計し、作製した。これは非対称な焦点距離を持つ分光器であり、透過型回折格子、カ

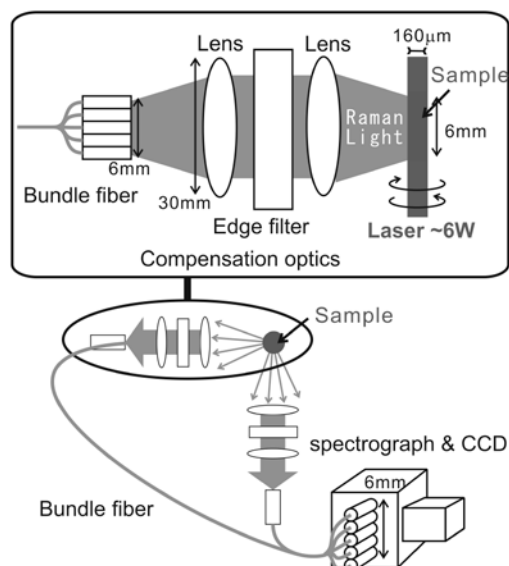


Figure 2. Scheme of Raman optical activity instrument

メラレンズ、および色消しレンズからなる。

上記の明るいレンズ分光器 (F/2) は明るい、その代償として、分光器入りロスリットの像が検出器において湾曲する収差が発生する。この像湾曲が起こると、測定スペクトルの分解能は著しく下がるため、この収差を解消する必要がある。このために収差とは逆向きに湾曲した形状をもつバンドルファイバーを設計、作製した。バンドルファイバーの出射端においては、多数 (62 本) のファイバー素線が一行に配置されており、この配列を収差と逆向きに湾曲 (曲率 108 mm) させた。この湾曲した出射端を分光器入り口に設置し、分光器スリットの代替として用いた。これにより、像湾曲の収差を解消することができた。このバンドルファイバーの入射端は 2 分岐しており、出射端とは異なり円形のファイバー素線配置となっている。試料内の検出部位の像と対応し、散乱光を効率良く捕集する。

ラマン散乱光に残存する直線偏光成分が、装置構成部品 (レンズ、波長板など) の非理想的光学的性質 (偏光方向、リターダンスの若干のずれ) に作用することで、ROA スペクトルに装置由来の偽信号が発生する。ROA 信号強度は元のラマン散乱光強度の  $10^{-3}$  以下と非常に小さいため、装置由来の偽信号はさらにその 1/10 以下とする必要がある。これを達成するために、ラマン散乱光に残存する直線偏光成分を無効化する部品を設計し、作製した。これは半波長板、ブラシレスモーター、プーリー、タイミングベルトからなる装置であり、半波長板を 1 秒間に 20 回転、均質なスピードで回転させることで、時間的

に直線偏光成分を平均化する。

試料の2方向からラマン散乱光の捕集を行う為に、光学セルを設計し、作製した。この光学セルは0.5 mmの薄いガラス壁によって3方を囲まれており、1方からレーザー光が入射し、他2方からラマン散乱光を捕集する。ガラスの歪みによって装置由来の誤差を発生させないために、ガラスは可能な限り薄くした。さらに、測定に必要な試料量を削減するために、15  $\mu\text{L}$ の容量となるよう設計を行った。

アミロイド線維のモデルとしてインスリンアミロイド線維を研究対象とし、線維内におけるインスリン単量体の2次構造および積層構造を、ROAスペクトルの実験と量子力学計算との比較から考察した。このためにはインスリンのOAおよびラマンスペクトルを量子計算する必要があるが、インスリン分子は大きいため、通常の方法で量子力学計算を行おうとすると無限に近い時間と計算能力が必要となり、現実的に不可能である。これを解決するために、我々がこれまで研究してきた分子断片化法を用いた。これは、そのスペクトルを計算したい巨大分子の構造を幾つもの小さな分子断片に切断し、分子断片のスペクトルテンソルを量子計算し元の巨大分子へ転写する、巨大分子のスペクトルを再現する方法である。既に以前の研究において、我々は天然状態インスリンのROAおよびラマンスペクトルをその結晶構造に基き計算することに成功している。本研究では、インスリンのアミロイド線維のモデル構造を予想し、それに基いてスペクトル計算を行った。

インスリンアミロイド線維は平行 $\beta$ シート構造を持つことが我々の実験から分かっている。天然状態インスリンは2つのS-S結合を内部に持ち、それはアミロイド線維状態においても切断されることが知られている。さらに、極低温透過型電子顕微鏡(Cryo-TEM)によるインスリンアミロイド線維のナノメートル構造は、インスリンアミロイド線維が $\beta$ ロール構造を持つことを示唆している。この予想を基に、 $\beta$ ロール構造を持つインスリンをアミロイド線維の単量体構造としてモデル化した(Fig. 3)。

天然状態において $\beta$ ロール構造を持つタンパク質の結晶構造を結晶構造データベースから入手した。その $\beta$ ロール構造の典型的な部分について、ペプチド鎖ねじれ角を読み取り、インスリンを構成するアミノ酸へ複写した。その際、2つのS-S結合が保持さ

### Modeling of insulin amyloid fibril

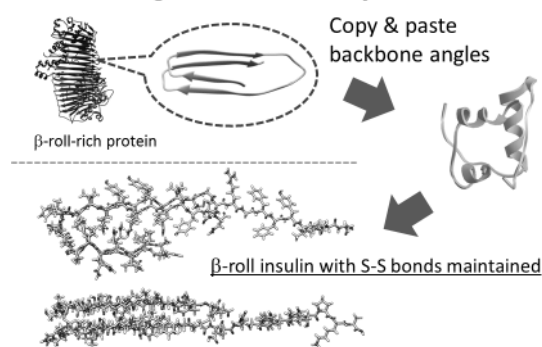


Figure 3. Scheme of modeling of amyloid-form insulin

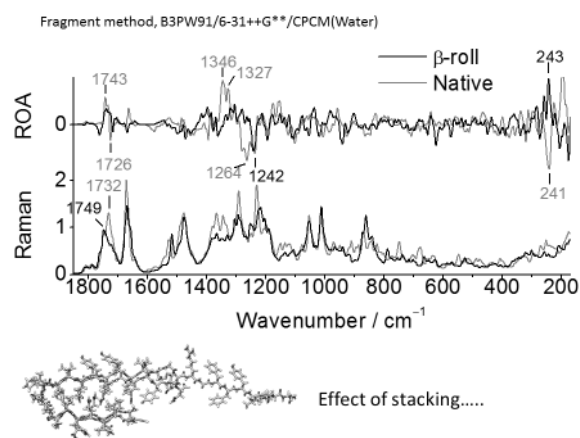


Figure 4. Calculated Raman (bottom) and Raman optical activity (top) spectra for native (grey) and  $\beta$ -roll-structured (black) insulin.

れるようにした。

得られた単量体モデル構造を基に、周期的境界条件を考慮した分子動力学計算を行い、アミロイド線維内の積層構造におけるインスリン単量体の構造を予想した。

得られた $\beta$ ロールインスリンの構造に基づき、分子断片化法を用いてROAおよびラマンスペクトルの量子力学計算を行った。その結果をFig.4に示す。実験において、インスリンがアミロイド線維状態から天然状態へ変化する際に観測されたスペクトル変化をよく再現する計算結果が得られた。

さらに、上記分子動力学計算において得られたインスリンの構造の時間的ゆらぎをスペクトルへ反映させるために、865個のスナップショット構造について、分子断片化法を用いてスペクトル計算を行い、その平均スペクトルを計算した。この平均化によっ

て、アミド I の ROA バンドについても実験と良い一致が得られた。このことから、我々のモデル構造が適切であることが分かった。

## 考察

湾曲した出射端を持つバンドルファイバーを使用することで、像湾曲の収差を削減できた。これによって、F2 と明るく、かつラマン測定に十分な分解能 ( $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ ) をもつ分光器を作製することができた。波長板回転装置によって、直線偏光成分を効率的に削減することが可能となった。今回作製した装置によっては、十分な装置誤差の抑制が行われなかったが、今後レーザーについても高速の波長板回転装置を用いることで、十分な装置誤差の抑制が行われると考えられる。

$\beta$ ロール構造を持つインスリンモデルが、実験スペクトルをよく再現することが分かったが、この結果はインスリンアミロイド線維が $\beta$ ロール構造を持ち、繊維内においてスタックしていることを支持する。 $\beta$ ヘリックス構造をとったインスリンにおいても同様の計算を試みたが、分子動力学計算において構造が収束することが無かった。このことから $\beta$ ロール構造がより妥当な構造であることが分かった。NMR による構造解析が難しいインスリンアミロイド線維の構造を ROA によって解析できることを示せた点は非常に意義があるだろう。今後さらに解析と実験を行い、より高精度の構造解析を行う予定である。

## 研究の発表

### 口頭発表

1. S. Yamamoto, “Peptide Conformations and Solvent Environments Obtained from Raman Optical Activity”, 8th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS8), WEPL1, Vienna, Austria, Jul. 2015, **Plenary**
2. J. Šebestík, V. Novák, J. Hudecová, S. Yamamoto, and P. Bouř, “Raman Optical Activity on Surfaces, in Gases and Lanthanide Complexes”, 15th International Conference on Chiroptical Spectroscopy, O12, Sapporo, Japan, Aug. 2015
3. S. Yamamoto, G. H. B. Berglund, S. Tsukahara “A Raman Optical Activity Study on Solution Structure of Nuclear Protein Protamine”, 第 74 回分析化学討論会, 郡山, 2014 年 5 月
4. 山本茂樹, “Raman Optical Activity Spectroscopy and Quantum Mechanical Calculation on Protein Structures in Solutions”, 日本分光学会年次講演会, 和光, 2014 年 5 月, **奨励賞受賞講演**

### 誌上発表

1. J. Kessler and P. Bouř, “Molecular Dynamics with Helical Periodic Boundary Conditions”, *J. Comput. Chem.*, 2014, 35, 1552-1559
2. J. Kessler, J. Kapitan, and P. Bouř, “First-Principles Predictions of Vibrational Raman Optical Activity of Globular Proteins”, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2015, 6, 3314-3319