

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム  
研究者派遣プログラム

成果報告書

提出日：平成29年5月1日

〔基本情報〕

○申請者

採 択 年 度：平成28年度

部 局 名 等：工学研究科分子工学専攻

職 名：助教

氏 名：森本 大智

研究課題名：レオロジー-NMRによるポリユビキチン線維の形成機構の解明

○渡航先

国 名：Germany

研究機関名：The Leibniz Institute of Polymer Research Dresden

研究室名等：〔研究室名〕 Polyelectrolytes and Dispersions

〔職名等・氏名〕 Head of the Department・Dr. Ulrich Scheler

渡 航 期 間：平成28年10月1日～28年10月31日（31日）

平成29年1月27日～29年3月31日（64日）

○渡航期間中の出張

出 張 先：Zürich, Switzerland

目 的：Bruker Biospin 社の Dr. Rainer と共同研究の打ち合せ

期 間：平成29年3月20日～29年3月22日

**京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム**  
**研究者派遣プログラム**

**【成果】**

**○プロジェクトの成果及び今後の展開**

**・研究概要**

高齢化社会の最も深刻な問題は、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患患者の増加である。長年、発症機構解明のため国内外で研究が行われているが不明な点が多く残されている。その中でも最大の不思議は、これらの疾患で共通して確認される脳内の封入体（異常タンパク質凝集体）形成である。注目すべき点は、それらの封入体の多くにポリユビキチンの凝集体が含まれていることである。しかし、詳細な蓄積メカニズムはその発見以来 100 年以上未解明のままである。本研究では、レオロジー-NMR 装置を用いて、ポリユビキチンの凝集体形成機序をリアルタイムかつ原子レベルで解明することを目指している。レオロジー-NMR 装置とは、NMR 管内に等方的にずり応力を負荷することで、タンパク質の構造変化を原子レベルで追跡することが出来る装置である。未だ日本国内には存在せず、本プロジェクトにより、レオロジー-NMR 装置を使って世界で初めてタンパク質を観察した Scheler 博士のもと、レオロジー-NMR 装置の設置方法や使用方法を学び、国内でのレオロジー-NMR 研究の基盤となる技術を学んだ。

**・国際共同研究の立上げ・ネットワークの構築**

**【新規高感度レオロジー-NMR 装置の開発】**

既存のレオロジー-NMR 装置は十分な NMR 感度を持っておらず、タンパク質試料を観察するためには高濃度の試料調製が必須となる。しかし、タンパク質凝集体形成を解析する上では、微量試料や高分子量試料を測定出来なければならない。そこで、Scheler 博士と共同で、クライオプローブを装着した高感度 NMR 装置にも適応可能なレオロジー-NMR の方法論を開発した。これは、NMR 装置のデフォルト機能であるスピナー回転を利用した安価で単純なレオロジー-NMR システムである。内管を固定し、スピナー回転で外管を回転させることにより、溶液中に一方方向にずり応力を与えることが出来る。現在、国際学術雑誌に論文投稿準備中である。

**【緩和実験による反応中間体の検出実験】**

タンパク質凝集体形成ならびに線維形成研究における課題は反応中間体の検出である。一般に、線維形成は、タンパク質が外的因子により立体構造を変化させ（反応中間体生成）、自己会合する反応である。しかし、NMR 装置は、感度ならびに測定可能な分子量（測定可能な横緩和時間を持つ分子）の問題を抱える。本研究では逆ラプラス変換解析によって、通常では検出しにくい反応中間体の横緩和時間を検出することを目指した。様々な条件下で測定を行なったが、微小な横緩和時間の分布の変化は観察されたが優位な結果と判断するに及ばなかった。原因の一つは、NMR 感度があり、今後は上述の新規高感度レオロジー-NMR 装置と組み合わせ、実験を行う必要がある。

**【応募予定の外部研究資金】**

論文発表でき次第、若手研究 (JSPS) あるいはさがけ研究 (JST) 等の外部資金獲得を目指す。

**・国際共著論文の投稿・発表等の状況、国際学会等での発表状況 [予定を含む]**

**【国際共著論文】**

前述の新規高感度レオロジー-NMR 装置の開発について、現在論文投稿準備中である。

**【学会発表】**

発表者：森本大智、Erik Walinda、西澤菜由、Ulrich Scheler、山本昭彦、白川昌宏、菅瀬謙治

学会名：第 55 回 NMR 討論会 (2016 年 11 月)

発表題目：高感度レオロジー-NMR の開発と応用

## 京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム 研究者派遣プログラム

### ・在外研究経験によって習得した能力等

#### 【効率性重視の研究姿勢】

在外研究経験によって最も影響を受けたのが、研究に対する「効率性」の考え方である。研究を進める上で、入念に計画することは重要である。だが、ヨーロッパ（ドイツ）の研究者は日本の研究者に比べ、より多くの時間を実験計画ならびにディスカッションに費やすことに気付いた。実験科学において実験をしなければ結果が予想出来ないことは多い。従って、「まず実験をして確かめる」という行動に陥り易い。しかし、ヨーロッパの研究者は、「まず行動する」ことを極限まで避け、必要最低限の実験量にする努力をしている。一見、怠惰のように見えるがそうではない。総合的に考えたとき、不必要な実験をしてしまうと、実験費用だけではなく貴重な時間を無駄にしてしまう。つまり、より多くの時間を実験計画に費やした方が結果として時短になる。もちろん、行なった実験で必ずしも求めている結果が得られるとは限らない。しかし、入念に考え抜いた実験は決して無駄ではなく、次の実験に役立つ有用な情報源と成り得る。日本には「頑張れば良い」という風潮がある。しかし、時間は有限であり、場合によっては競争のある研究分野もある。より早く真理にたどり着くことが出来るのは、効率的に実験を進めた研究者であろう。帰国後、まだ間もないが、出来る限り、ドイツで学んだ効率性を重んじる研究姿勢を実践したい。

#### 【学生ならびに研究員との頻繁かつ簡潔な相互作用】

研究を進める上で共に研究を行なう学生ならびに研究員をマネジメントすることは重要である。研究者各々が独自の方針を持っているが、今回の在外研究経験によって、Scheler 博士の指導方法に学ばされる場所があった。それは「頻繁かつ簡潔な相互作用である」。Scheler 博士は、週一回のグループミーティングだけではなく、毎日、ほんの数分全員と話している。必ずしも研究の進捗状況を議論するわけではなく、単に雑談で終わる場合もある。しかし、頻繁にコミュニケーションを取ることは大切である。重要な点は、話す時間を短時間にする点である。Scheler 博士の研究室はそれほど多くの人数はいないが、それでも一人ずつと話す多くの時間を要する。要点を捉えた簡潔な会話は、効率的であり、話し掛けられる方にも負担が掛からない。もちろん場合によって、実験に問題を抱える者がいる。その場合は、より深いディスカッションが必要である。しかし、その場では深いディスカッションを始めず、その必要性を踏まえ、時間をおいてディスカッションを行っていた。これは、相互的に考えをまとめ円滑にディスカッションを進める術なのかもしれない。このように、毎日ほんの数分ずつ皆と会話することは全体をエンカレッジするだけでなく、実験における問題や研究方針の軌道修正の必要性を早期に発見することを可能にする。帰国後、早速取り入れ学生と密に、そして短時間にコミュニケーションすることを心掛けている。

### ・在外研究経験を活かした今後の展開

#### 【本学での研究活動と Scheler 博士との更なる共同研究】

在外研究経験により、ヨーロッパ流の効率性を重視する研究姿勢を実体験し、自身の研究姿勢を見直すことが出来た。この経験を活かし、まずは開発した高感度レオロジー-NMR 法をより改良した方法論を作成したい。現在の高感度レオロジー-NMR 法は、レオロジー-NMR として世界最高感度を達成できたが、回転数（応力）の制限や試料の蒸発の問題がある。解決策として、外管を固定し、内管を外付けのモーターで回転させるレオロジー-NMR 装置を新たに開発する予定である。一体型にすることで内容物の蒸発を防ぐことができ、容易に NMR 装置に装着することが出来る。本研究では、より汎用性のある装置を作製することを目指す。

また、Scheler 博士との継続した共同研究を行なう予定である。滞在中、レオロジー-NMR において多くの課題が生まれた。その一つが、流体力学応力下のナノメートルオーダーの分子の振る舞いである。ミリメートルオーダーの分子については、ずり応力下の分子運動の理解は進んでいるが、より小さな分子については未だ理論が立ち上がっていない。今後、Scheler 博士と共同で実験的な情報を集め理論的な基盤を築きたい。

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム  
研究者派遣プログラム

英文成果報告書

○申請者情報

部 局 名 : Department of Molecular Engineering

職 名 : Assistant Professor

氏 名 : Morimoto, Daichi

研究課題名 : Elucidation of formation mechanism of polyubiquitin fibrils by Rheo-NMR

渡 航 期 間 : From 1<sup>st</sup> Oct, 2016 to 31<sup>st</sup> Oct, 2016 (31 days)

From 27<sup>th</sup> Jan, 2017 to 31<sup>st</sup> Mar, 2017 (64 days)

○渡航先情報

国 名 : Germany

研究機関名 : The Leibniz Institute of Polymer Research Dresden

研究室名等 : Polyelectrolytes and Dispersions

受入研究者名 : Dr. Ulrich Scheler

○渡航報告

Ubiquitin is one of the most soluble and stably folded proteins. However, its intracellular aggregates have often been observed in patients of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. It remains unclear why ubiquitin is contained in such pathological protein aggregates. We previously observed shear-induced amyloid fibril formation of polymeric forms of ubiquitin (polyubiquitin). The aggregation kinetics depends on the chain length of polyubiquitin. Intriguingly, when expressed in cells, we also detected insoluble aggregate formation of polyubiquitin chains depending on chain length. I am currently interested in how polyubiquitin forms pathological aggregates by hydrodynamic (shear) forces. Therefore, in this project, I tried to investigate shear-induced structural changes by using Rheo-NMR spectroscopy.

Rheo-NMR spectroscopy was initially established to study the rheological properties of polymers in 1991. In 2008, Dr. Scheler first investigated protein samples by using Rheo-NMR (Scheler, *et al.* JACS 2008). To date, however, state-of-the-art Rheo-NMR spectroscopy did not provide detailed structural and dynamical information on pathological protein fibril formation. This would be because existing Rheo-NMR methodologies have insufficient sensitivity. In this study, to resolve the problem in NMR sensitivity of Rheo-NMR, we have established a simple and versatile Rheo-NMR methodology that can be applied for an NMR instrument equipped with a cryoprobe (the manuscript on the new methodology is in preparation). The high sensitivity of the cryoprobe-based Rheo-NMR instrument will enable protein NMR measurements that were not achievable by existing Rheo-NMR systems. In addition, by using inverse Laplace transformation analysis of transverse relaxation data, we tried to detect changes in distribution of transverse relaxation times. Although we investigated a tiny change in the distribution of transverse relaxation times of polyubiquitin during the fibril formation, the observed change did not appear to be significant. In the future, it is important to combine the inverse Laplace transformation analysis with our established Rheo-NMR methodology.

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム  
研究者派遣プログラム

During my stay in the Leibniz Institute of Polymer Research Dresden (IPF), I was impressed with the efficient research approach of the researchers in the IPF. They spend more time planning and discussing for experiments than Japanese researchers. Namely, compared with European researchers, many Japanese researchers seem to do a lot of unnecessary experiments. However, it is more important to find the shortest way for getting results than to do many experiments. This is a basic thing for researchers, but not easy to do. In fact, I realized that I was doing many of unnecessary experiments. We should spend sufficient time planning and discussion for our researches. Thanks to this project, I reconsider my research approach and will spend less time doing unnecessary experiments.

In addition, while I stayed in the IPF, I had an opportunity to present my recent data as a lecture in the institute. The audience in the IPF consists of chemists and physicists, but of few biologists. Because I am now studying structural biology, it seemed to be difficult to share the scientific background with them. However, fortunately, I could have a good discussion with them and this was a valuable experience for me. In the conferences and meetings that I attended previously, I presented my data to the researchers who possess similar scientific backgrounds and are interested in similar scientific field. However, when presenting the data to the researchers who are unfamiliar with my scientific field, it was found to be more important to focus on the importance of the research rather than to explain the experimental details. I realized that my previous presentation seemed to be too professional for audience and therefore, by this experience, I hope my presentation will be improved.