

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04362

研究課題名(和文)蛋白質凝集の原理と制御

研究課題名(英文) Mechanism and regulation of protein aggregation in complicated cellular systems

研究代表者

後藤 祐児 (Goto, Yuji)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：40153770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、アミロイド線維と呼ばれる線維状の凝集がアミロイドーシスと呼ばれる一連の疾患の原因となることから、その構造や形成機構の研究が盛んに行われている。他方、別の代表的な凝集であるアモルファス凝集については、その形成機構や、アミロイド線維との関係は明らかではない。本研究では、さまざまな蛋白質の凝集状態の構造・物性・構造転移反応を、熱力学的、速度論的に解析し、それらが「溶解度」、「過飽和」、「結晶性およびガラス性状態の区別」によって、原理的かつ包括的に理解できることを示した。蛋白質凝集を原理的に理解することにより、蛋白質研究の基盤を大きく広げることができた。

研究成果の概要(英文)：Understanding the mechanisms of protein aggregation is important for advancing our knowledge of proteins. Amyloid fibrils are fibrillar aggregates associated with various amyloidoses. On the other hand, the term amorphous aggregate has been used for other types of aggregates. However, the relationship between amyloid fibrils and amorphous aggregates has not yet been elucidated. We studied the aggregation of various proteins with a focus on distinguishing amyloid fibrils and amorphous aggregates. The results indicated that amyloid fibrils and amorphous aggregates correspond to crystals and glasses of solutes, respectively, and that solubility and supersaturation are two of the most important factors determining protein aggregation. Further understanding the role of supersaturation in determining aggregation-based phase transitions of denatured proteins will provide an important complementary point of view to structural studies of protein aggregates.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：蛋白質 脳神経変性疾患 生体分子 凝集 変性 アミロイド線維 溶解度 過飽和

1. 研究開始当初の背景

1940年代、生体の重要な構成要素として蛋白質が認識された頃、蛋白質の特徴は凝集であった。ゆで卵の白身の日常の直観的な凝集と同じである。50年代にX線結晶解析がはじまり、構造に基づく蛋白質機能の理解が研究の中心となると、凝集は研究をむしろ妨げるものと考えられた。しかしながら、1990年以降、組み換え蛋白質や化学合成蛋白質の凝集、プリオン病やアルツハイマー病における凝集など、凝集は重要な研究課題となっていた。現在、高齢化に伴う疾患のほとんどに蛋白質凝集が関わると言っても過言ではない。

代表者は2000年頃からアミロイド線維の研究を開始した。当初、アミロイド線維は曖昧な構造状態と考えられていたが、研究を進める内にその構造や物性のユニークさに圧倒されるに至った。アミロイド線維は変性蛋白質の形成する結晶性の秩序構造であった。

2000年以降、アミロイド線維の構造生物学研究が世界的に発展し、「アミロイド構造生物学」が台頭し、現在に至っている。代表者もその進展にいくつかの貢献をした。代表者は水素・重水素交換と多次元NMR測定を用いてアミロイド線維の構造安定性を残基レベルで評価する方法を開発した。その後、2ミクログロブリンの断片ペプチドの立体構造を明らかにした。

代表者は2004年頃からアミロイド線維の熱測定に関する研究を開始した。等温滴定型熱量計でアミロイド線維のシーディング反応の熱測定に成功した。他方、示差走査熱量計では、興味深い結果が得られるものの解釈はむずかしかった。しかしながら、今年遂に自発的なアミロイド線維形成の熱測定に成功した。2010年頃より、代表者は「過飽和」という概念の重要性を国内外に発信し続けてきた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)蛋白質のさまざまな凝集状態の物性と構造転移反応を、熱力学、速度論的に解析し、凝集の原理的理解を達成する。また、(2)アミロイドとアモルファス凝集の選択的・制御を目指すと共に、(3)天然構造の結晶化や機能的構造形成にも研究を広げることを目指す。

(1)蛋白質凝集の原理的理解：

アミロイド線維と物質凝の結晶化との対比：蛋白質の天然状態は単結晶を形成する一方、硫酸沈殿で見られるようなアモルファス凝集（ガラス状態）を形成する。全く同じ状況が変性蛋白質においても起きる。結晶性の析出がアミロイド線維であり、それ以外の凝集はガラス状態に相当する。本研究では、アミロイド凝集とアモルファス凝集に注目し、これらの違いや、さまざまな手法によって解析する。

アミロイド線維の形成を決める因子：直観

的に大きな蛋白質は規則的なアミロイドを形成することは困難と予想される。実際、分子量が2万以上の蛋白質がそのままアミロイド線維を形成した例はほとんどない。他方、アミロイドをはじめ、ペプチド断片がアミロイド線維を形成する例は数多い。本研究では蛋白質の大きさをはじめとするアミロイド線維形成を決める内的因子、あるいは溶媒や温度などの外的因子を系統的・網羅的に明らかにする。

(2)アミロイド線維形成の制御：

アミロイド線維やアモルファス凝集の形成機構を理解することによって、それらの形成を阻害し、ひいてはアミロイドーシス発症の予防・治療の基盤を達成することが可能である。現在、アミロイド線維形成の阻害剤としては、ポリフェノール類（エピガロカテキン、テトラサイクリンなど）が注目されているが、その作用機構は不明である。これらの作用を研究することにより、アミロイド阻害剤の作用機構を明らかにすることが期待できる。

3. 研究の方法

(1)蛋白質凝集の原理的理解：

蛋白質の変性状態が形成するアミロイド線維とアモルファス凝集を区別しながら、それらの形成機構の違いを、熱力学的、速度論的に解析する。これにより、蛋白質の凝集機構を原理的に示す。

(2)蛋白質凝集の制御：

アミロイド線維とアモルファス凝集の形成機構は異なる。溶媒条件や環境を調節することにより、両者を区別して形成し、さらに抑制・促進する方法を達成する。

4. 研究成果

(1)熱力学的機構：2ミクログロブリンやニワトリ卵白リゾチームなどを材料として、フォールディングとアミロイド凝集、アモルファス凝集を包括する蛋白質の構造安定性の熱力学的機構の一般性を確立することを目指した。この際、ヘパリンがアミロイド線維やアモルファス凝集を促進する効果に着目して、その作用機構に迫った。2ミクログロブリンとリゾチームについて、ヘパリンに依存した相図を作成した。これらの相図を、電荷に基づく作用と、一般的な塩の効果に区別してヘパリンの作用を理解することに成功した。

さらに2ミクログロブリンについては、塩濃度と温度効果を詳細に調べた。室温付近、高塩濃度の条件下ではアモルファス凝集を形成したが高温にすることによりアミロイド線維を形成した。さらに高温では凝集は溶解した。これらをもとに塩濃度と温度に依存した構造状態の相図を作成した。アミロイド線維とアモルファス凝集は、一般的な結晶とガラス状態の関係にあり、溶解度以下になる

と、まずアミロイド線維が析出し、さらに析出力が強まるとアモルファス凝集の析出することを示した。これにより、蛋白質凝集の包括的な機構を提唱した。

(2)速度論的機構：プレートリダを用いる HANABI および、通常の蛍光光度計のセルに直接超音波を照射するシステムを利用して、2 ミクログロブリンやニワトリ卵白リゾチームのアミロイド線維とアモルファス凝集の競争的形成を速度論的に詳細に調べた。添加剤としてヘパリンを用いた。ヘパリンは、条件に依存してアミロイド形成を促進あるいは抑制した。このような複雑な現象は、ヘパリンによって過渡的に形成される凝集体の安定性に依存し、「オストワルトの成熟則」によって理解できた。また、興味深いことに、微量のアモルファス凝集は過飽和状態の解消、アミロイド線維の形成の促進を担うことを示した。

(3)ポリリン酸による蛋白質凝集とアミロイド線維形成の促進：ポリリン酸は強く負に帯電した高分子であり、生体内においてはリン酸基の備蓄に使われると共に、添加物として、さまざまな食品に含まれる。ポリリン酸が、蛋白質の凝集、ひいてはアミロイド線維形成を強く促進することを見出した。蛋白質としては、2 ミクログロブリンや シヌクレインを用いた実験を行い、これらの蛋白質の生理的条件におけるアミロイド形成を強く促進することを示すと共に、静電的な機構と、塩析効果の2種類の機構によって起きることを示した。

(4)ThT サイレントな線維中間体による主鎖支配的線維構造：アミロイド線維に強力な超音波を照射することにより、アミロイド線維に特異的に結合するチオフラビンTの蛍光強度が減少した。2 ミクログロブリンとインスリンを用いて、強力な超音波照射によって、線維の二次構造は変化していないが、三次構造が変化した中間体の形成することを明らかにした。

(5)断片ペプチドのアミロイド線維形成：2 ミクログロブリンの断片ペプチド K3 の線維形成に対する他のペプチドや全長 2 ミクログロブリンの効果を検討した。その結果、他の蛋白質やペプチドが混在すると K3 ペプチドのアミロイド線維形成や抑制されること、そしてこの抑制が主に疎水の相互作用に基づく非特異的な相互作用によって起きることを明らかにした。細胞内夾雑系のモデルとして興味深い結果である。

(6)オバルブミンの凝集機構：ニワトリ・オバルブミンをトリプシン分解することにより 23 アミノ酸残基からなるアミロイド性ペプチド pOVA を得た。pOVA を化学合成したと

ころ極めて強いアミロイド性を示した。オバルブミンはセルピンファミリーの属するが、pOVA 領域の高いアミロイド性は、セルピンファミリーに一般的なことを示した。セルピンファミリー蛋白質は、ドメインスワップによりポリマーを形成することが知られており、アミロイドとセルピンポリマーとが関係することが示唆された。

以上をもとに蛋白質凝集が、「溶解度」、「過飽和」、「結晶性およびガラス状態の区別」によって、原理的かつ包括的に理解できることをまとめた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 26 件)

(1) Goto, Y., Adachi, M., Muta, H. and So, M. Salt-induced formations of partially folded intermediates and amyloid fibrils suggests a common underlying mechanism. *Biophys. Rev.*, 10(2), 493-502 (2018).

(2) So, M., Hata, Y., Naiki, H. and Goto, Y. Heparin-induced amyloid fibrillation of β 2-microglobulin explained by solubility and a supersaturation-dependent conformational phase diagram. *Protein Sci.* 26(5), 1024-1036, (2017)

(3) Nitani, A., Muta, H., Adachi, M., So, M., Sasahara, K., Sakurai, K., Chatani, E., Naoe, K., Ogi, H., Hall, D. and Goto, Y., Heparin-dependent aggregation of hen egg white lysozyme reveals two distinct mechanisms of amyloid fibrillation, *J. Biol. Chem.*, 292(52), 21219-21230 (2017).

(4) Araki, K., Yagi, N., Nakatani, R., Sekiguchi, H., So, M., Yagi, H., Ohta, N., Nagai, Y., Goto, Y. and Mochizuki, M., A small-angle X-ray scattering study of alpha-synuclein from human red blood cells. *Sci. Rep.* 6, 30473 (2016)

(5) Noda, S., So, M., Adachi, M., Kardos, J., Akazawa-Ogawa, Y., Hagihara, H. and Goto, Y. Thioflavin T-silent denaturation intermediates support the main-chain dominated architecture of amyloid fibrils. *Biochemistry*, 55(28), 3937-3948 (2016).

(6) Nakajima, K., Ogi, H., Adachi, K., Noi, K., Hirao, M., Yagi, H. and Goto, Y. Nucleus factory on cavitation bubble for amyloid β fibril. *Sci. Rep.* 6, 22015 (2016).

(7) Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y.H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112(24), E3095-2103 (2015).

(8) Adachi, M. So, M., Sakurai, K., Kardos, J. and Goto, Y. Supersaturation-limited and unlimited phase transitions compete to produce the pathway complexity in amyloid fibrillation. *J. Biol. Chem.* 290(29), 18134-18145 (2015).

(9) So, M., Ishii, A., Hata, Y., Yagi, H., Naiki, H. and Goto, Y. Supersaturation-limited and unlimited phase spaces compete to produce maximal amyloid fibrillation near the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulfate. *Langmuir*, 31(36), 9973-9982 (2015).

(10) So, M., Hall, D. and Goto, Y. Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 36, 32-39 (2016).

〔学会発表〕(計 21 件)

(1) Goto, Y., Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. The 2nd Joint Symposium of IPR, Osaka University, and RSC, ANU: Protein Structure and Function, Osaka Univ., Dec. 3-5, 2017, Osaka.

(2) Goto, Y., Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. The 3rd Trilateral Workshop for Frontier Protein Studies, National Center for Protein Science in Shanghai, Aug. 31-Sept. 2, 2017, China.

(3) Goto, Y., Supersaturation-limited phase transition of denatured proteins producing amyloid fibrils. The 5th APPA/12th PST joint conference, Jul 11-14, 2017, Bangsaen, Thailand.

(4) 後藤祐児、蛋白質の凝集と過飽和生命科学の開拓、長岡技術科学大学特別講演会、2017年10月12日、長岡技術科学大学、長岡。

(5) 後藤祐児、蛋白質研究の歴史における凝集の位置づけと展望、蛋白研セミナー：産業応用を志するタンパク質溶液研究、2017年9月11□12日、大阪大学、吹田。

(6) Goto, Y., The 2020 PS/APPA/PSSJ Joint Symposium. APPA/PS/PSSJ Joint Workshop-IPR Seminar: Toward international cooperation in protein science. June 21, 2017, Sendai.

(7) 後藤祐児、超音波に依存した蛋白質過飽和溶液の相転移現象、日本物理学会第72回年次大会シンポジウム「フォノン物理学のフロンティ：格子振動解析から超音波応用研究まで」、2017年3月18日、大阪大学、豊中。

(8) Goto, Y., Role of supersaturation in the phase transitions of denatured proteins. IPR Seminar/RIKEN Symposium/MEXT Kakenhi:

New frontiers in protein misfolding and aggregation. January 26-27, 2017, IPR, Osaka University.

(9) 後藤祐児、アモルファス凝集とアミロイド線維の区別および疾患関連性、企業現場のニーズと先端蛋白質科学との接点を探るシンポジウム、2016年11月16日、東京大学、東京。

(10) Goto, Y., Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. Third International Symposium on Protein Folding & Dynamics, November 8-11, 2016 at NCBS, Bangalore, India.

(11) 後藤祐児、「蛋白質の凝集と病気」後藤祐児、大阪大学リサーチクラウドカフェ2016年10月12日、京阪電車、なにわ橋駅。

(12) Goto, Y., Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. PRION2016 TOKYO, May 10-13, May 11, 2016 National Center of Sciences Building, Tokyo.

(13) 後藤祐児、変性蛋白質が形成する超分子ポリマー：アミロイド線維、後藤祐児、日本化学会特別企画「超分子ポリマーの精密合成：実例とヒント」、2016年3月27日、同志社大学、京都。

(14) Goto, Y., Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. International Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins. Dec. 4-5, 2015, Seoul National Univ., Seoul, Korea.

(15) Goto, Y., Supersaturation-limited phase transitions of proteins. IPR and Research School of Chemistry, ANU, Joint Symposium: Protein Structure and Function. Nov. 14-16, 2015, Canberra, Australia.

(16) Goto, Y., Toward understanding the unified mechanism of protein aggregation. 農芸化学会中部関西合同大会・シンポジウム：酵素活性分子研究の新展開-タンパク質のフォールディング研究と酵素機能の利用、2015年9月19日、富山県立大学(射水市)。

(17) Goto, Y., Supersaturation-limited protein misfolding revealed by ultrasonication. IUBMB-SBBq Satellite Symposium: Frontiers in Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases and Cancer, August 30□31, 2015, Rio de Janeiro, Brazil.

(18) Goto, Y., Supersaturation-limited protein misfolding revealed by ultrasonication. The 23rd International Union of Biochemistry and

Molecular Biology (IUBMB) Congress. August 24□28, 2015, Foz do Iguacu, Brazil.

(19) Goto, Y., Supersaturation-limited and unlimited phase transitions compete to produce the pathway complexity in amyloid fibrillation. SFB1035 Conference on Conformational Transitions in Proteins. May 3-6, 2015, Venice International University, Venice, Italy.

(20) Goto, Y., Supersaturation-limited phase transitions of proteins. The First Trilateral Workshop for Frontier Protein Studies. April 23□25, 2015, Peking University, China.

(21) 後藤祐児、アミロイド線維形成における過飽和の果たす役割、第3回日本アミロイドーシス研究会学術集会：シンポジウム「アミロイド形成機構の解明と新たな治療戦略への展開」、2015年8月21日、KKR東京。

〔図書〕(計1件)

(1) タンパク質凝集の新たな理解 タンパク質凝集を支配するオストワルドの段階則池之上達哉、後藤祐児、化学 71 (5), 70-71 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：超音波発生部材、超音波照射装置および超音波変性観察装置

発明者：後藤祐児、荻博次 他

特許権者：大阪大学、コロナ電気

種類：

出願番号：JP2017-127224

出願日：2017年6月29日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/physical/yoeki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 祐児 (GOTO YUJI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：40153770

(2) 研究分担者

櫻井 一正 (SAKURAI KAZUMASA)

近畿大学・先端技術総合研究所・准教授

研究者番号：10403015

(3) 連携研究者

荻 博次 (OGI HIROTSUGU)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90252626