

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14707

研究課題名(和文)天然変性タンパク質の分子シールド効果を応用したタンパク質凝集抑制剤

研究課題名(英文)Application of molecular shielding effect of intrinsically disordered proteins towards development of protein stabilizers

研究代表者

廣明 秀一 (HIROAKI, Hidekazu)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：10336589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：分子クラウディング効果とは、細胞内のような高濃度の高分子溶液中で、分子の性質が変化する現象である。筆者は、天然変性タンパク質(IDP)の高分子クラウダーとしての性質に着目し、ヒトゲノムにコードされているIDPにタンパク質に対する凍結保護活性を見出した。この効果は、従来理論(排除体積効果)では説明できず、新たに分子シールド効果について解析する必要がある。二つのモデルタンパク質(VLドメイン・Aペプチド)で検証し、IDPには新たにAペプチドのアミロイド線維形成阻害活性があることを見出した。併せて、既存のタンパク質試料中からIDP領域を判別する簡便なNMR分析手法の開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Macromolecular crowding is the phenomenon that alters the properties of molecules in a solution when high concentrations of macromolecules (molecular crowders) are present. In a living cell, one of the most abundant molecular crowders is the protein itself. We focus on the properties of the intrinsically disordered proteins (IDPs) as a macromolecular crowder. We recently found that IDPs have cryoprotective activity against the other proteins, and we hypothesized that this cryoprotective activity was originated by IDP's molecular shielding effect. For further understanding IDP's molecular shielding effect, aggregation inhibition of IDPs in the other conditions were examined. We found that some IDPs can suppress amyloid formation of A $\beta$ (1-42) peptide. We have also succeeded in developing the new method to discriminate IDPs from non-IDPs using NMR signal. In detail, chemical shift temperature coefficient (CSTC) of amide protons is a good indication.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子シールド効果 分子夾雑 高分子クラウディング 朝倉・大沢理論 天然変性タンパク質 アミロイド線維

## 1. 研究開始当初の背景

分子クラウディング効果とは、「分子の込みあい効果」とも呼ばれ、例えば細胞内のような、高濃度の高分子溶液中で、分子の性質が変化する現象である。研究や医療においては、生体分子に比較的性質に近い水溶性の高分子（高分子クラウダー）を添加することが一般的である。研究用・医療用・産業用の高分子クラウダーとして、ポリエチレングリコール（PEG）、Ficoll, dextran, BSAなどが知られている。従来、分子クラウディングがタンパク質に及ぼす効果は、朝倉・大沢理論から導かれる排除体積効果が主であると考えられてきた。このモデルによれば、分子クラウディングによりタンパク質のフォールドした状態の安定性が増す一方、凝集・沈殿も促進される。他方、近年、デヒドリンに代表される天然変性タンパク質（IDP）の凍結保護効果を説明する目的で、分子クラウダーの持つ分子シールド効果が注目され始めてきた。

以上のような背景のもと、筆者は、ヒトゲノムにコードされているIDPの半網羅的物性解析を実施し、IDPおよびその部分ペプチド(20~44 アミノ酸)10種類以上にLDHを含む3種のタンパク質に対する凍結保護活性を見出した(Matsuo et al., 2018)。

## 2. 研究の目的

(達成目標1) IDPの示す凍結保護効果が、分子クラウディング効果のうち、特に分子シールド効果によるものであることを、実験により証明する。一方で、既知高分子クラウダーに較べて、排除体積効果は限定的であることも検証する。併せて、分子シールド効果の検証として、IDPが室温~体温付近および高温域での標的タンパク質の凝集を阻害する効果を持つことを検証する。

(達成目標2) IDPは既にモデル酵素に対して凍結保護活性を有することから、次世代のバイオ医薬品の安定剤として応用可能であると考えられる。凍結融解以外の条件での凝集阻害効果も検証された場合は、更に有用性が増す。その場合、特定のタンパク質がIDPかどうかを検証する、より簡便な方法の開発が望まれる。本研究では、NMRシグナルの温度依存性を利用した、新規IDP判定測定法を開発する。

## 3. 研究の方法

IDPの分子シールド効果を検証するために、評価タンパク質として、凝集・沈殿または酵素活性の失活が知られているモデルタンパク質(抗体IgGまたはその一部、A $\beta$ ペプチド)・モデル酵素(グルタチオンS転移酵素、乳酸デヒドロゲナーゼ、アルギナーゼ、耐熱性アミラーゼなど)を選定する。それにIDPを添

加する、またはIDPを用いた化学架橋修飾を行い、特定の温度条件で一定時間経過の凝集・沈殿またはタンパク質の失活を定量する。比較対象物質として、BSA, PEG, オスモライトなどを適宜用いることとした。

今回、モデル基質としてイムノグロブリン軽鎖VLドメインと、アルツハイマー病の原因物質でもあるA $\beta$ (1-42)に着目した。

### (VLドメイン試料の選定と調製)

今回、AL amyloidosisの患者由来の、アミロイド凝集を特に形成しやすいVLドメイン試料を用いてIDPの凝集抑制効果の検証を試みた。凝集傾向の強いVLドメインと凝集傾向の弱いVLドメインの系統的な先行研究例がある試料として、VL-REI/VL-BREおよびそれらの点変異体(VL-BRE(N45K) / BRE(D50E))の試料を、大腸菌発現系により組換え生産し、準備した。また、NMRにより凝集研究がなされているため、試料の大量調製が可能なVL-6ajL2について、試料発現用の大腸菌プラスミドの構築を行った。

### (A $\beta$ (1-42)試料の調製)

A $\beta$ (1-42)は、筆者らが確立し論文発表した方法(Shigemitsu et al., 2016)に従い、大腸菌発現系を用いて組換え生産し、最終的にHPLCで生産した。筆者らの方法では、化学的にほぼ均一な純度であるものの、すでに微量の凝集核が含まれ30分以内に凝集が始まるfraction Aと12時間以上凝集が起こらない(凝集核を含まない)fraction Bをそれぞれ得ることができる。これらを混合して、約3時間以内に凝集が完了する試料を調製し、凝集阻害実験に用いた。

## 4. 研究成果

(達成目標1) IDPが室温~体温付近および高温域での標的タンパク質の凝集を阻害する効果を持つことの検証

ヒト体内では、正常な免疫細胞は、完全にフォールドしたイムノグロブリンと、少量の軽鎖のみを分泌することが知られている一方で、機能不全の細胞が、イムノグロブリン軽鎖分子のみを大量に分泌することが知られている。この異常分泌されたイムノグロブリン軽鎖が凝集することによりAL amyloidosisという疾病が発症する。VLドメインとは、イムノグロブリン軽鎖のN末端側の130アミノ酸程度のドメインで、抗体の抗原を認識する超可変ループを含む。

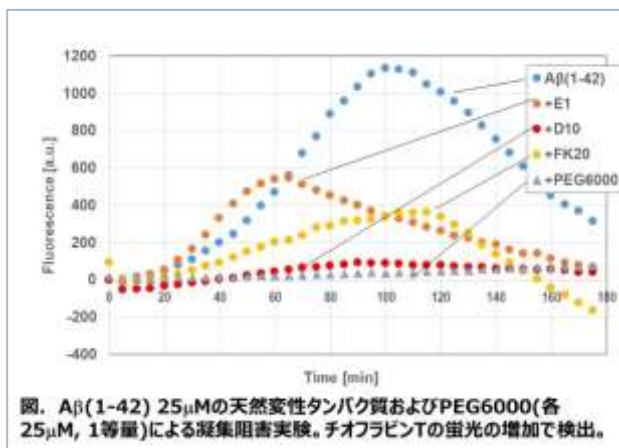
VL-BRE(N45K) / BRE(D50E)について、まずIDP未添加の状態での凝集条件を検討した。しかし、先行研究を参考に複数回の実験を行ったが、最大30日間の凝集実験では、VL-BRE(N45K) / BRE(D50E)に有意な凝集は観

測されなかった。これは、先行研究において考慮されていなかった、発現・精製したタンパク質試料への極微量の「凝集核」の混入の有無の差であると考えられ荒れ田。そのため、この系を用いての、IDPの分子シールド効果による凝集阻害効果の検証はできなかった。

そこで、前述の分子シールド効果について、更に検証することを目的に、常温で短時間にアミロイド凝集することが確実な試料として、アルツハイマー病の原因物質でもある A $\beta$ (1-42)について、IDPの凝集阻害を見ることとした。

monomer であることが確認された A $\beta$ (1-42)を終濃度 25 $\mu$ M で 0.5 x PBS 溶液とし、蛍光色素 Thioflavin-T を 100 $\mu$ M 添加した。天然変性タンパク質として、E1, D10 および天然変性タンパク質由来ペプチド FK20 を、他のコントロールとして PEG6000 を、1 等量 (25 $\mu$ M) 添加した試料と、A $\beta$ (1-42)単独の試料を用意した。Thioflavin-T の蛍光を 5 分ごとに測定し、アミロイド凝集反応を追跡した。

その結果、A $\beta$ (1-42)に対して 1 等量・25 $\mu$ M という低濃度で天然変性タンパク質 D10 にほぼ完全なアミロイド形成の阻害が見られた。FK20 の凝集阻害活性は、D10 に比べて弱く、E1 はさらに弱い。一定の阻害活性が認められた。特筆すべきは、希薄な PEG6000 にも強いアミロイド形成阻害活性が認められた。すなわち、これら IDP のアミロイド凝集阻害の機構が、分子シールド効果によるものであることが強く示唆された (図)。



(達成目標 2) NMR シグナルの温度依存性を利用した、新規 IDP 判定測定法の開発

筆者らは、NMR のスペクトルを指標に、タンパク質に存在している IDR を分別する手法の改良を試みた。その際、タンパク質主鎖アミドプロトン HN の化学シフトの温度依存性 (chemical shift temperature correlation : CSTC) に着目した。

構造を有しているタンパク質試料 3 種および、既に別の方法で全領域が IDR と確定しているモデル試料 B3, C1 について、連鎖帰属が行われていないものについては主鎖シグナルの帰属を行った。その後、288K, 293K, 298K, 303K の 4 点の温度で HSQC 測定を行い、各残基の CSTC を計算した。構造部分と IDR の HN-CSTC の値の分布には明確な偏りがあり、IDR に属する残基のほうが CSTC の値は小さい (負に大きい)。判別用の閾値を -3.6 ppb/K としたときにマッシュズの相関係数が最大となった。

この方法を、従来法 (HN の化学シフトのみから判別する方法) に組み合わせて使用することにした。学習セットとして用いなかった判別用データとして SUMO1, SUMO3 を用意し、新しい判別法の有効性を検査したところ、HN の化学シフト法のみを用いる従来法に比べて 19% (62%  $\rightarrow$  81%) の精度改善が見られた。CSTC は二点の温度からでも算定可能なため、本法はタンパク質から IDR 部分を切り出すための簡単な方法として汎用性が高いと予想された (論文投稿・リバイズ中)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Matsuo, N., Goda, N., Shimizu, K., Tenno, T., Fukuchi, F., Ota, M. and Hiroaki, H.\*, 2018, Discovery of Cryoprotective Activity of Human-genome derived Intrinsically Disordered Proteins. *Int J Mol Sci.*, 19(2), 401; doi: 10.3390/ijms19020401 査読有り

3. Shigemitsu, Y., Hiroaki, H.\*. Common molecular pathogenesis of disease-related intrinsically disordered proteins revealed by NMR analysis, 2018, *J Biochemistry*, 163(1), 11–17 (invited review), DOI:10.1093/jb/mvx056 総説・査読無し

2. Shigemitsu, Y., Iwaya, N., Goda, N., Matsuzaki, M., Abe, Y., Narita, A., Tenno, T., Hoshi, M., and Hiroaki, H.\* 2016, Nuclear magnetic resonance evidence for the dimer formation of beta amyloid peptide 1–42 in 1,1,1,3,3,3-hexa-fluoro-2-propanol *Analytical Biochemistry*, 498:59–67. DOI: 10.1016/j.ab.2015.12.021 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

- |   |   |
|---|---|
| <p>1. 石原健広, 渡邊紀之, 山田智美, 尾山公一, 重光佳基, 天野名都子, <u>廣明秀二</u>, 近藤忠雄, 吉田久美, “アミロイド線維形成を阻害するアシル化キナ酸類の合成”, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都, 2017 年 3 月 17-20 日</p>  | <p>[図書] (計 0 件)</p> <p>[産業財産権]</p> <p>該当なし</p>  |
| <p>2. <u>廣明秀二</u>, 富井健太郎, 伊藤暢聡, “ペプチド構造解析と治療ワクチンへの応用”, 難治疾患共同研究拠点集会・能動免疫療法シンポジウム, 東京, 2017 年 2 月 22 日</p>   | <p>○出願状況 (計 0 件)</p> <p>○取得状況 (計 0 件)</p> <p>[その他]</p> <p>ホームページ等</p>   |
| <p>3. <u>廣明秀二</u>, “天然変性蛋白質は別の蛋白質の凍結を保護する”, 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, 東京, 2016 年 11 月 16 日</p>   | <p>6. 研究組織</p> <p>(1) 研究代表者</p> <p>廣明秀一 (HIROAKI, Hidekazu)</p> <p>名古屋大学・大学院創薬科学研究科・教授</p> <p>研究者番号: 10336589</p>   |
| <p>4. 天野 (合田) 名都子, 松尾直紀, <u>廣明秀二</u>, “ヒトタンパク質由来天然変性ペプチドを用いた細胞凍結保存”, 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日</p>  | <p>(2) 研究分担者</p> <p>なし</p>  |
| <p>5. 重光佳基・岩谷奈央子・合田名都子・松崎瑞季・天野剛志・成田哲博・星美奈子・<u>廣明秀二</u>, “Dimer formation of amyloid beta peptides in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol”, The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 京都, 2016 年 8 月 21-26 日</p>  | <p>(3) 連携研究者</p> <p>伊倉貞吉 (IKURA, Sadakichi)</p> <p>東京医科歯科大・難治疾患研究所・准教授</p> <p>研究者番号: 50251393</p> <p>濱田大三 (HAMADA, Daizo)</p> <p>神戸大学・大学院工学研究科・特命准教授</p> <p>研究者番号: 60372132</p> |
| <p>6. 岡崎寛貴, 松尾直紀, 天野剛志, 合田名都子, 福地佐斗志, 太田元則, <u>廣明秀二</u>, “<sup>1</sup>H<sup>N</sup> Amide Temperature Coefficients: Yet Another NMR Method To Assess Intrinsically Disordered Protein Regions”, The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 京都, 2016 年 8 月 21-26 日</p> | <p>(4) 研究協力者</p> <p>天野名都子 (TENNO, Natsuko)</p>  |
| <p>7. 松尾直樹, 岡崎寛貴, 天野剛志, 合田名都子, 清水佳奈, 福地佐斗志, 太田元規, <u>廣明秀二</u>, “高分子クラウダーとしての天然変性タンパク質とその応用”, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 2016 年 6 月 7-9 日</p>   |   |
| <p>8. 清水沙紀, 合田名都子, 山上健, 石野園子, 石野良純, 兒玉哲也, <u>廣明秀二</u>, “ヒト Rnase H1 と遺伝子修復因子 FANCM の天然変性領域間での相互作用”, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 2016 年 6 月 7-9 日</p>  |   |
| <p>9. 三田村賢吾, 天野剛志, <u>廣明秀二</u>, 織田昌幸, 田中俊樹, “安定な Type1 型銅タンパク質の設計”, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 2016 年 6 月 7-9 日</p>  |   |