

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20727

研究課題名（和文）タンパク質凝集過程におけるドロプレットの化学的安定化戦略

研究課題名（英文）Chemically stabilizing droplets associated with protein aggregation

研究代表者

澤崎 鷹（Sawazaki, Taka）

和歌山県立医科大学・薬学部・助教

研究者番号：20911671

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高いアミロイド性を有し構造解析には適さないタンパク質やペプチドに対し、凝集過程における中間体であるドロプレットの安定化を図る構造誘導化を基軸に研究を進めた。化学修飾されたタンパク質およびペプチドの合成を基盤に種々の検討を進めた結果、分子間の疎水性相互作用のチューニングが重要であることを見出し、結晶構造解析に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドーシスは、本来溶けて機能を発揮するタンパク質が不溶化しアミロイドとなり沈着することで発症される。この繊維化過程において液液相分離を経ることが近年明らかになりつつある。したがって、中間体である液滴（ドロプレット）に関する構造的な理解は、その後の疾患を予防できることや、現象の解明に大きく貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In the process of fibrillization, amyloidogenic proteins or peptides form droplets as an aggregation intermediate. The aim of this study was the structural study of the droplets. We employed chemical modification and took a stabilization strategy. We found intermolecularly hydrophobic interaction pivotal for controlling self-assembly and succeeded in gaining structural insight.

研究分野：有機合成化学

キーワード：アミロイド 非天然アミノ酸 化学合成 液液相分離 有機合成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アミロイドシスは、生理的機能をもつタンパク質が突如、疎水的相互作用により繊維化しアミロイドとして体内で沈着することで引き起こされる。そのためタンパク質の繊維化を防ぐ戦略は、良い治療法になると考えられ、研究が進められてきた。しかし、凝集阻害剤などによる繊維化阻害戦略に基づく薬が上市に至った例はない。近年、タウなどのタンパク質は凝集する際に、液液相分離 (LLPS) と呼ばれる状態を経ることが提唱されている (*Nat. Commun.*, 2017, 8, 275, 1. など)。すなわち、可溶性タンパク質が適度に集まり濃縮化されると、まず液滴 (ドロプレット) を形成する。ドロプレット内での集積化がさらに進行すると繊維化する。凝集化を阻害することのできる化合物はこれまでに多く開発されてきた一方で、上市に至った薬はない ( 個体レベルでの治療効果が低い) ことを鑑みるに、中間体であるドロプレットも加味した創薬アプローチにも興味もたれる。しかしながらこれまでの LLPS 研究は、人為的環境下でドロプレットを得る手法に基づいていた。したがって、ドロプレットに対しての知見はこれまでに多く蓄積されてきている一方で、繊維化過程における中間体としての構造的な理解は十分にされていないことが課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、高いアミロイド性を有し構造解析には適さないタンパク質やペプチドに対し、ドロプレットの安定化を図る構造誘導化を基盤に研究することで、ドロプレット構造に対する知見を得ることを目的とする。ドロプレット形成が繊維化と一続きにあることを基軸にした本研究は、ドロプレット特有の立体構造や物性などの解明につなげることが可能になると期待される。

### 3. 研究の方法

アミロイド化することが知られているタンパク質 ( 例えば、タウ、FUS、TDP-43 やアミリンなど) やそれらの凝集に関わる部分配列に由来するペプチドを母構造にして、ドロプレット形成に関与することが想定されているアミノ酸残基や官能基の化学修飾化ないし構造誘導化を進めることで、構造解析が可能な人工的自己凝集性タンパク質ないしペプチドを合成する。続いて、構造解析研究を推し進める。

### 4. 研究成果

#### (1) 自己凝集性タンパク質・ペプチドの合成法と凝集評価の確立

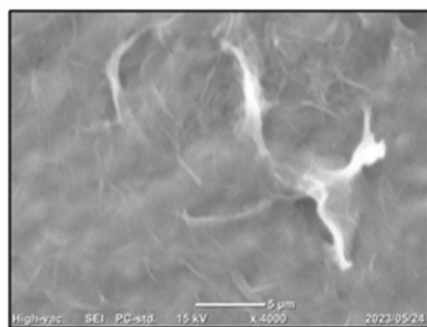
本研究では、非天然構造を含むアミノ酸をタンパク質に組み入れることが必要になった。そのようなタンパク質は、大腸菌での全長合成は難しいため、化学合成法の確立が要請された。有機合成にて得られた非天然アミノ酸を天然アミノ酸に組合わせて、目的のペプチドを化学的に合成することとした。比較的長いペプチドやタンパク質は、上述の手法にて得たペプチド断片を、大腸菌発現ないし化学合成した別のペプチド断片とのケミカルライゲーションにて目的物を合成することとした。

研究開始当初は一般的なタンパク質・ペプチドの合成方法に習い自己凝集性タンパク質・ペプチドの合成を進めていたが、合成物の高い自己凝集性に反映して、目的の反応の進行が遅いことや、低水溶性に由来した精製の困難さ等が問題になっていた。種々の検討の結果、適切なタイミングにおける Triton X-100 などの界面活性剤の添加、グアニジン変性の利用が効果的であることを見出した。また特に、アミロイド性ペプチドの合成に関して、一般的な固相合成法では精製後に 1% 以下の収率でしか目的ペプチドが得られなかったため、より効率的な合成法が求められた。検討の結果、固相合成の後処理時、溶液濃縮や洗浄など際に特に抽出困難なゲル状不溶物の産生が見受けられたため、固相合成ではアミロイド化しない部分ペプチドを合成し、それを DMF 溶媒の高希釈条件下の液相法で目的のペプチドに誘導することで、ゲル化の副生を回避しながら HPLC 精製を完了できた。また本手法は、効率的に種々の化学修飾体を合成することができた。例えばペプチドの C 末端カルボン酸を化学修飾したアミロイドが種々必要な場合には、C 末端を有機合成で化学修飾したアミノ酸誘導体を N 末端が保護されたペプチドと縮合することにより、種々のアミロイド誘導体が迅速に得られた。同様の手法は N 末端修飾にも適用できた。続いて、得られた非天然修飾化タンパク質・ペプチドの凝集性を、チオフラビン T アッセイや、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、高速液体クロマトグラフ (HPLC)、電子顕微鏡 ( 走査型電子顕微鏡ないし透過型電子顕微鏡) 等の測定を駆使して多面的に評価した。

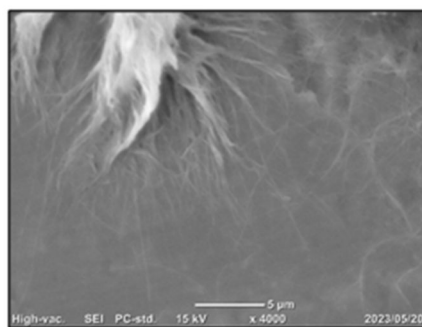
#### (2) 構造解析研究

ドロレットは、分子間のアルギニン-チロシンなどの組み合わせに由来するカチオン- 相互作用 (*Cell*, 2018, 174, 688.) などの静電相互作用や低複雑性ドメイン同士の疎水的相互作用 (*Cell*, 2015, 163, 123., *Science* 2022, 377, eabn5582. など) が働き形成される。そこでアミロイド性タンパク質に対して、リン酸基などのイオン性官能基を付与し、静電相互作用を強化することを目的とした合成を進めてきた。合成は完了したため、構造解析を現在鋭意検討中である。一方で、アミロイド性ペプチドに対しては、濃縮化されたドロレット内にて疎水性相互作用が次第に強く働きアミロイド形成へと進むことに着目し、その相互作用を弱める戦略を軸に設計および合成を進めた。種々の結果、立体障害の大きな疎水性官能基の導入が凝集化に大きく影響を与えることを見出した。

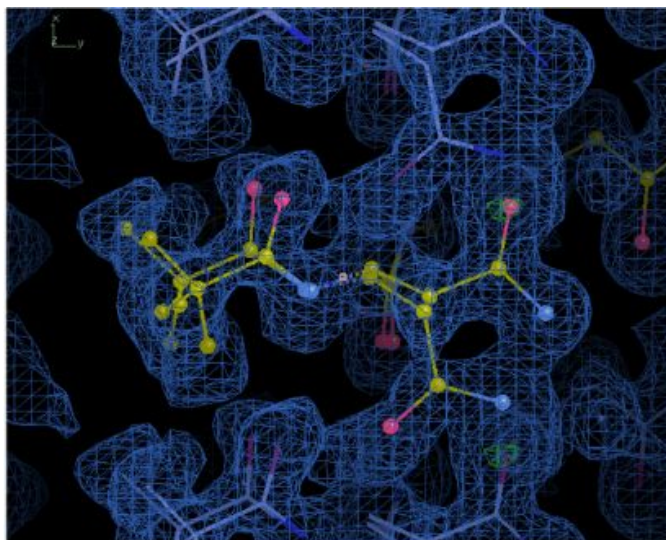
アセチル化ペプチド



ピバロイル化ペプチド



続いて、導入する疎水性官能基の種類や位置の検討を進めた。高いアミロイド性を有していた N 末端アセチル化ヘキサペプチドを、N 末端ピバロイル化へと誘導化すると、アミロイド性を強く抑制できた一方で、成熟したアミロイドでは、両ペプチドで同じ形態の細く長い繊維物が電子顕微鏡で観察された (左図)。



そこでピバロイル化ペプチドのアミロイド構造解析研究へと進んだ。具体的には、ギ酸溶液からの濃縮にて針状結晶が得られたため、X 線結晶構造解析を行った。解けた結晶構造から、ピバロイル基が立体的な反発に起因して 2 つの立体構造をとることが示唆された。この構造変化に連動して、繊維化過程に関与することが想定されるアスパラギン残基の側鎖の一級アミド基も 2 つの配座をもつことが見いだされた。このうち一つのアミド基の配座は、分子間での水素結合ネットワークが形成できなかった。一方 3 つのペプチド間で、疎水性アミノ酸残基の側鎖の相互作用を介して 1 つの集合を形成していることが明らかになった。このことから、疎水的相互作用がペプチドの濃縮に寄与し、アスパラギン残基の側鎖がこの疎水性相互作用の形成において重要である可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taka Sawazaki、Youhei Sohma、Motomu Kanai	4. 巻 70
2. 論文標題 Knoevenagel Condensation between 2-Methyl-thiazolo[4,5- <i>b</i> ]pyrazines and Aldehydes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 82 ~ 84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c21-00780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Youhei Sohma、Taka Sawazaki、Motomu Kanai	4. 巻 19
2. 論文標題 Chemical catalyst-promoted photooxygenation of amyloid proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 10017 ~ 10029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D10B01677F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 澤崎鷹、鈴木崇允、堀由起子、富田泰輔、相馬洋平、金井求
2. 発表標題 細胞内タウアミロイドを光酸化化する化学触媒の開発
3. 学会等名 第48回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taka Sawazaki、Daisuke Sasaki、Youhei Sohma
2. 発表標題 Catalysis driven by amyloid-substrate complex (CASL)
3. 学会等名 Future Drug Discovery Empowered by Chemical Biology（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤崎鷹、佐々木大輔、相馬洋平
2. 発表標題 アミロイドと基質の複合化を起点にする触媒反応の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅田大輝、澤崎鷹、鈴木崇允、古田将大、三ツ沼治信、川島茂裕、堀由起子、富田泰輔、相馬洋平、金井求
2. 発表標題 アルツハイマー病患者由来のタウアミロイドに対する触媒的光酸化
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 相馬 洋平、澤崎鷹、鈴木崇允、樋口真人、堀由起子、富田泰輔、金井求
2. 発表標題 脳内タウアミロイドの除去を促進する化学触媒
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木大輔、澤崎鷹、相馬洋平
2. 発表標題 TDP-43の病原性構造基盤の解明に向けた翻訳後修飾体化学合成経路の構築
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アミロイド触媒を用いるアミノ基の修飾方法	発明者 相馬洋平、澤崎鷹	権利者 公立大学法人和歌山県立医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-024577	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 タウアミロイドを酸素化する光触媒	発明者 金井求、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-195981	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------