

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450188

研究課題名(和文)トレハロースの新たな水和特性とタンパク質凝集抑制メカニズム

研究課題名(英文) New hydration characteristics and the mechanism underlying the anti-aggregation functions of trehalose

研究代表者

奥 和之 (OKU, Kazuyuki)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：40549797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：トレハロースが持つ生体構成成分の保護・安定化効果について、水和特性からみた新規なメカニズムを提唱した。本研究では、トレハロースが芳香族アミノ酸と直接相互作用することを実験的および理論解析により明らかにした。次に、トレハロースのタンパク質凝集抑制作用として、 $\beta$ -アミロイドの凝集反応について検討し、トレハロースは  $\beta$ -アミロイドと直接作用して  $\beta$ -アミロイドの凝集を抑制することがわかった。トレハロースの疎水ポケットに  $\beta$ -アミロイドの疎水基が作用し、疎水基同士の相互作用を抑制することによって考えられ、トレハロースの新たな水和特性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We proposed a novel mechanism from the viewpoint of hydration characteristics on the protective and stabilizing effect of trehalose on biological constituents. In this study, experimental and theoretical analysis made it clear that trehalose directly interacts with aromatic amino acids. Next, as an inhibitory action on protein aggregation of trehalose, we examined the agglutination reaction of  $\beta$ -amyloid, and it was found that trehalose directly acts with  $\beta$ -amyloid to suppress aggregation of  $\beta$ -amyloid. These results suggest that the hydrophobic group of  $\beta$ -amyloid acts on the hydrophobic pocket of trehalose and suppresses the interaction between the hydrophobic groups, suggesting a new hydration property of trehalose

研究分野：糖質科学

キーワード：トレハロース 疎水性相互作用 タンパク質凝集抑制  $\beta$ -アミロイド 生体間相互作用解析 核磁気共鳴分析

## 1. 研究開始当初の背景

トレハロース(、-トレハロース)は、昆虫や植物、キノコ類、酵母、細菌などに存在する天然の非還元性二糖で、他の糖類と同様にこれらの生物のエネルギー源として利用されている。また温泉などの極限環境に生息するバクテリア(Thermus属)には体内にトレハロースを合成する特殊な遺伝子系をもちトレハロースを蓄積して生存するなど、多くは生物が外界から過酷なストレスを受けたときにトレハロースが大量に細胞内に産生され、生体構成成分を破壊から護る役割を果たしている。最近では、奥田らのグループにより、アフリカの半乾燥地帯に生息するネムリユスリカ(Polypedilium vanderplanki)の幼虫がクリプトピオシス(完全脱水により無代謝休止状態になること)をする際、適合溶質としてトレハロースを大量に合成することが見出されている。このように乾燥や凍結ストレスに対して、トレハロースが水に代わる適合溶質として作用し、タンパク質や細胞膜を保護すると考えられる。また、トレハロースを生成する新たな酵素系が発見され、デンプンからトレハロースを効率的に製造する方法が確立されたことにより、トレハロースの新しい機能・用途開発が進み、急速な需要の増加が続いている。

乾燥ストレスに対するトレハロースの作用機構について、トレハロースが膜やタンパク質表面に結合水と置換して結合し、これらの高次構造の破壊を防ぐ作用(水置換説)と、さらに乾燥が進むとトレハロースがガラス化して、生体構成成分をカプセルのように包み込んで機械的に保護する作用(ガラス化説)がある。これが、トレハロースの乾燥保護作用のシナリオとされており、トレハロースに他のオリゴ糖にはない用途が期待されている要因である。また、トレハロースは、乾燥や凍結ストレスなどの水ストレスのみならず、不飽和脂肪酸の酸化に対する抑制効果やタンパク質に対する凝集抑制効果なども見いだされている。特に理化学研究所の貴名らは、トレハロースにハンチントン病の症状軽減作用があることを見出しており、グルタミン繰り返し構造をもつ異常タンパクの凝集をトレハロースが抑制することを明らかにした。この効果はまさに化学シャペロンと呼ぶにふさわしい機能効果であり、トレハロースの持つ多様なストレス保護機能の応用例であると考えられる。

グルコース残基2分子からなるこの単純な糖が、このような多様な機能を有する要因の一つは“水との相互作用の特異性”にあると考えている。トレハロースの有する保護作用に関する2つの仮説(水置換説とガラス状態説)のうち、奥らはトレハロースを含む様々なグルコ二糖のガラス状態での分子運動性と安定性を評価したところ、トレハロー

スが最も高いガラス転移温度、活性化エネルギーを有し、安定なガラス状態を形成することを明らかにした(低温生物工学会誌, 50, 97-102 (2004))。トレハロースの形成するガラス状態が物質の保護・安定化に寄与している結果である。しかし、トレハロースが作る水クラスターは強固なものである。水和による物質の安定化には、水との結合に関するペナルティー(水和エネルギー)を超えてトレハロース物質間の相互作用・結合を構築する必要がある。

我々の研究グループでは、トレハロースの水和特性に関する従来の実験的・理論的研究に加え、疎水性物質とトレハロースとの実験的相互作用研究を行い、トレハロースが直接疎水性物質と結合(水素結合)していることをNMR解析により見出した。また、計算機シミュレーションの結果に基づいて、トレハロースが親水性と疎水性の両面の性質をもつ両親媒性であることを明らかにした(J. Phys. Chem. B, 115(32), 5823-5830 (2011).)。

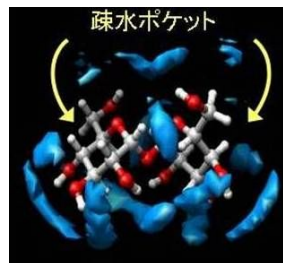


図 トレハロースに対する水の分布(水色)

トレハロースが両親媒性を持つというこの結果は、トレハロースがWater structure MakerであるとともにWater structure Breakerとして作用していると考えられる。すなわち、本研究を進めることは、トレハロースが持つ生体構成成分の保護・安定化効果について、水和特性からみた新規なメカニズムを提案するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、物理化学の基礎法則からトレハロースの作用機構を解明することを目的とした。具体的には、次のいくつかの事項を明らかにした。

(1)「なぜトレハロースは結合水と置換したり疎水基と結合したりできるのか?」という疑問に対し、芳香族アミノ酸との相互作用実験とこれらの過程はエントロピー駆動であるという仮説に基づいて計算機シミュレーションから解答を得る。

(2)「どのようにしてトレハロースはタンパク質の凝集過程に影響を与えるか?」という疑問に対し、タンパク質の凝集モデルとして-アミロイド(A)を用い、A凝集に及ぼす影響を解析する。

(3)「実際にアミロイドタンパク質の凝集抑制効果を発揮するか?」という疑問に対し、アルツハイマーモデル動物を用いた投与実験から明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)トレハロースと芳香族アミノ酸との相互作用を調べるため、芳香族アミノ酸の水に対する溶解度に及ぼす影響、NMR (NOESY) による相互作用解析および計算機シミュレーションによる解析を行った。芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン、チロシン) および Final 5%濃度のトレハロースまたはマルトース溶液中の溶解度 (25 ) を調べた。トレハロースとフェニルアラニンとの NMR 解析は、トレハロース 50mM、フェニルアラニン 10mM の DMSO- $d_6$  溶液を用いた。計算機シミュレーションによるトレハロースとフェニルアラニンとの相互作用解析は、トレハロース-ベンゼン複合体の構造をもとに分子動力学シミュレーションにより安定化構造を求めた後 (MM79) 分子軌道法による最適化エネルギー計算を行った。

(2)  $\beta$ -アミロイドの凝集反応は、生体間相互作用解析装置 Biacore (BiacoreX100, Biacore J) を使用した。センサーチップに  $\beta$ -アミロイド 40 (A<sub>40</sub>) をアミンカップリング法 (A<sub>40</sub> 100  $\mu$ g/ml, pH4.5) により固定化した。ゲスト側に A<sub>40</sub> (0.23~46  $\mu$ M)、トレハロース (0.15~30mM) の試料溶液 (pH4.5) を添加して屈折率変化を観測し、Lineweaver-Burk プロットによるトレハロースの A<sub>40</sub> 凝集阻害様式の決定と阻害係数 (K<sub>i</sub>) の算出を行った。また、トレハロースと A<sub>40</sub> との直接作用を明らかにするため、A<sub>40</sub> とトレハロースの混合重水溶液のプロトン NOESY 解析 (JEOL Model JMN AL-400) を行った。

(3) 老年性アミロイド症モデルである老化促進モデルマウス (SAMP1/SLC) を用いたトレハロース投与実験を行い、病理解析と脳組織における A<sub>40</sub> とトレハロースの定量解析を行った。10 週齢の老化促進モデルマウス (SAMP1/SLC) 雄 50 匹を 1 群 10 匹の 5 群に分け、AIN-93G 基本組成の飼料にて 2 ヶ月間飼育した。糖質 (トレハロースまたはマルトース) は飲水投与とした。飼育終了後、脳を採取しホルマリン固定後、病理標本の作製および脳ホモジネート中の A<sub>40</sub> (ELISA 法)、トレハロース (キャピラリー GC 法) を定量した。

### 4. 研究成果

(1)トレハロースは、芳香族アミノ酸の溶解度を高めた (フェニルアラニン 1.81 g/L、3.51 g/L、チロシン 0.52 g/L、1.24 g/L) と溶解度を高めた。マルトースも芳香族アミノ酸の溶解度を高めたが、その作用はトレハロースより弱かった。

次にトレハロースとフェニルアラニンとの NMR (NOESY) 解析より、トレハロースの 1 位プロトンとフェニルアラニンのリングプロトン間に相関信号 (NOE) が観測され、両者が直接相互作用 (錯体形成) していること

がわかった。

そこで、計算機シミュレーションによるトレハロースとフェニルアラニンとの相互作用解析を行ったところ、ベンゼンと同様にトレハロースの疎水ポケットにフェニルアラニンのフェノール環が作用した構造で収束した。その構造における相互作用エネルギーは -35.2 kcal/mol (MP2/6-31G\*\*) であった。

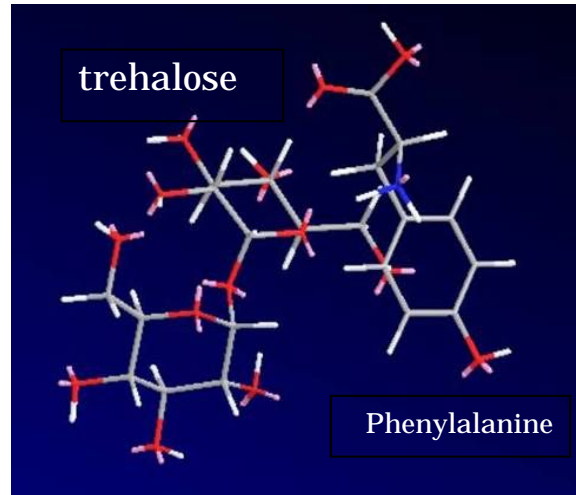


図 トレハロースとフェニルアラニンとの相互作用構造

トレハロースは、タンパク質やペプチドを構成するアミノ酸と直接疎水性相互作用することがわかった。

(2)トレハロースと疎水性物質との直接作用との応用例としてタンパク質の凝集抑制作用が考えられる。タンパク質の凝集・沈殿には、構成する疎水性アミノ酸同士の疎水性相互作用 (ベンゼン環同士のスタッキング作用、CH- $\pi$  相互最右など) による。この疎水基をトレハロースでブロックすることにより、タンパク質の表面上親水基が増加すると考えられる。タンパク質の凝集モデルとして  $\beta$ -アミロイド (A<sub>40</sub>) を用い、A<sub>40</sub> 凝集に及ぼすトレハロースの影響を解析した。

ゲストに A<sub>40</sub> を添加した場合の屈折率の変化 (傾き) から求めた A<sub>40</sub> の凝集反応における K<sub>m</sub> 11.3 mM、V<sub>max</sub> 18.4 mM/min であった。ゲストにトレハロースのみを添加

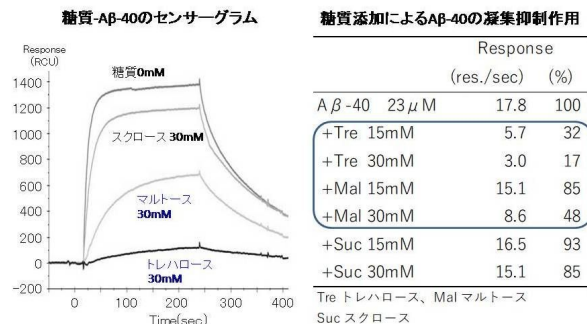


図 A 凝集抑制作用解析

した場合、屈折率の変化は見られなかった。一方、A 40 (23 μM)、トレハロース(15mM)の混合溶液を添加したところ、屈折率変化はトレハロース無添加の 32%に低下したが、他の糖質(マルトース、スクロース)では変化はわずかであった。

トレハロース添加量を 0.15~30mM に変化させた場合での各 A 40 濃度における屈折立変化(反応速度)の逆数をプロットしたところ、Vmax は変化しなかったがトレハロース添加により Km 値が上昇し、トレハロースによる A 40 凝集の阻害様式は拮抗阻害型であることがわかった。さらにトレハロースの Ki 値は 0.81mM となった。また、トレハロースと A 40 混合液の NMR 解析( NOESY)の結果、トレハロース 1 位および 2 位プロトンと A 40 リングプロトン間に明確な NOE が観測された。

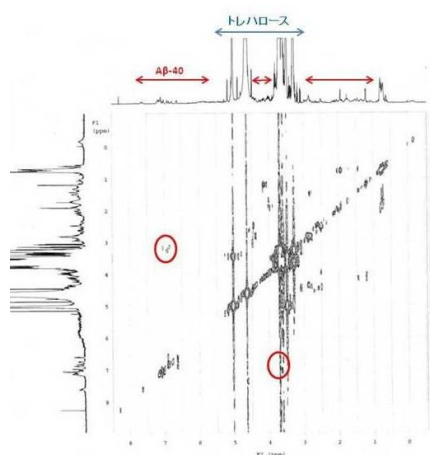


図 トレハロースと A-アミロイドとの相互作用解析( NOESY)

以上の結果から、トレハロースは A-アミロイドと直接作用してその凝集を抑制することがわかった。その効果は、トレハロースの疎水ポケットに A-アミロイドの疎水基が作用し、疎水基同士の相互作用を抑制することによって考えられ、トレハロースの新たな水和特性が示唆された。

(3)「実際にアミロイドタンパク質の凝集抑制効果を発揮するか」という疑問に対し、アルツハイマー型モデルである老化促進マウス(SAM/P1)を用いて、トレハロース経口摂取が A の蓄積・凝集に及ぼす影響を調べた。

トレハロース 5%水溶液の 2 ヶ月連続飲水摂取により脳萎縮が抑制された。

次に脳ホモジネート中の A 含量を ELISA 法にて測定したところ、トレハロース 5%水溶液の飲水摂取により有意に低下した。

一方、脳ホモジネート中のトレハロース含量は 0.71 μM と僅かであるが検出されており、小腸で吸収されたトレハロースは脳関門を通過し直接 A に作用することが考えられる。しかし、脳ホモジネート中のトレハロース濃度は、Biacore で測定した Ki 値の 1/1000 で

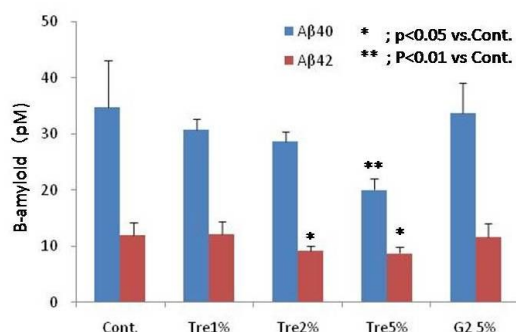


図 脳ホモジネート中の A 濃度

あった。脳神経変性モデルマウスにトレハロースを経口投与すると、脳内オートファジーが活性化する報告がある。すなわち、*in vivo* におけるトレハロース飲水投与による A の蓄積・凝集抑制はトレハロースと A の直接作用ではないことがわかった

以上の本研究の結果から、トレハロースの新たな水和特性がこの糖質の機能発現に関与していることが明らかになった。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

・奥和之,川崎靖子, A-アミロイド凝集に及ぼすトレハロース添加の影響. 第61回低温生化学会年会,2016.6.26( 埼玉県・比企郡鳩山町).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥 和之 (OKU Kazuyukio)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・臨床栄養  
学科・教授

研究者番号：40549797

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )