

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32503

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07315

研究課題名（和文）凝集誘起発光イメージングで「観る」プリオンタンパク質オリゴマーの形成・伝播機構

研究課題名（英文）Formation and Propagation Mechanism of Prion Protein Oligomers "Watched" by Aggregation-Induced Emission Imaging

研究代表者

山本 典史 (Yamamoto, Norifumi)

千葉工業大学・工学部・教授

研究者番号：30452163

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、プリオンタンパク質オリゴマーの動態を生細胞内で「観る」ために、抗プリオン化合物と凝集誘起発光色素を融合した新しい蛍光プローブを開発した。開発した蛍光プローブとプリオンオリゴマーが相互作用することで蛍光強度が増加することを確認し、凝集誘起発光イメージングの基礎を確立することに成功した。さらに、新たな蛍光プローブの開発に向けて、テトラフェニルエチレンおよびシアノステルベン誘導体で観測される凝集誘起発光過程の理論的な解析に取り組み、その分子機構を明らかにした。これらの成果は、プリオン病に代表される「タンパク質の異常凝集」に起因する疾病の診断・治療法開発に貢献するものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、抗プリオン化合物に凝集誘起発光特性を付与するという着想を出発点として、これまで観測できなかったPrPオリゴマーを検出する新しい方法論を提案し、プリオン病研究の突破口を切り拓くことで、その診断・治療法開発への貢献が期待できる。プリオン病のみならず、アルツハイマー病においても、アミロイドオリゴマーが重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。本研究で提案するタンパク質凝集体のイメージング技術をPrP以外のタンパク質に応用することで、有症率の高いアミロイドーシスについても診断・治療法確立を実現する新たな道筋を切り拓くことが可能性となり、保健医療福祉分野への大きな波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a new fluorescent probe that combines an anti-prion compound and an aggregation-induced emission (AIE) luminogen to "watch" the dynamics of prion protein oligomers in living cells. We confirmed that the fluorescence intensity increased when the developed fluorescent probe interacted with prion oligomers and succeeded in establishing the basis for AIE imaging. Furthermore, to develop new fluorescent probes, we analyzed the AIE process observed with tetraphenylethylene and cyanostilbene derivatives and clarified the molecular mechanism. These advances are expected to contribute to the development of diagnostic and therapeutic methods for diseases caused by "abnormal protein aggregation" such as prion diseases.

研究分野：分子シミュレーション

キーワード：プリオン病 凝集誘起発光 タンパク質 アミロイド 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

■ プリオン病およびプリオンタンパク質オリゴマーに関連する国内外の研究動向

プリオンタンパク質 (PrP) は主に脳神経細胞に偏在し、天然構造を持つ正常型 (PrP^C) は細胞保護能を担うと考えられているが、構造が変化し凝集体を形成する異常型 (PrP^{Sc}) は細胞毒性を示しプリオン病の病原となる。プリオン病はタンパク質が変性・凝集することで発症するというアルツハイマー病に代表されるアミロイド性神経変性疾患に共通する病態のみならず、**個体間でタンパク質の異常構造が伝播する** (体外から侵入した PrP^{Sc} が体内の PrP^C を PrP^{Sc} に変換させる) という他に類のない特殊な感染動態を持ち、その発見当初から医学・生物学の常識を覆す奇妙な疾患として注目を集めたが、感染・発症のメカニズムは未だ不明である。

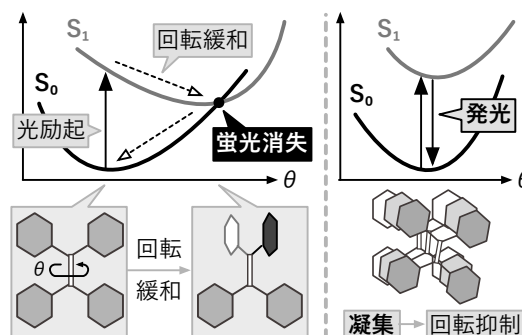
プリオン病について、従来、多数の PrP が凝集したアミロイド線維の脳内沈着が病態の中心だと考えられてきた。しかし近年、**少数の PrP が重合したオリゴマーがより強い細胞毒性と感染性を持ち、プリオン病で中心的な役割を果たす**という説 [1,2] がきわめて有力になりつつある。従って、プリオン病発症・感染の分子機構を解明する手掛かりは PrP オリゴマーにある。しかしこれまで、PrP オリゴマーを生きた細胞内で直接可視化する方法は確立されていなかった。

■ 抗プリオン化合物と機能性色素の研究成果を踏まえ着想に至った経緯

鎌足 (研究分担者) らは抗プリオン化合物 GN8 を発見し、GN8 が PrP と選択的に結合することでプリオン病を抑制することを明らかにしていた [3]。山本 (研究代表者) は **GN8 を出発物質とする抗プリオン剤の開発・作用機序の解析 [4] とプリオン病発症機序の解明 [5-7] に取り組んでいた**。さらに山本は自らが開発したタンパク質変性状態の新しい解析法 (二次構造主成分分析) と分子シミュレーションを組み合わせることで、**プリオンタンパク質の凝集を促進する特殊な変性状態の存在を明らかにしていた [8]**。

山本は、機能性色素の発光メカニズムについて、量子化学計算を用いた解析にも取り組むなかで、分散状態では発光しないが凝集すると強く発光する蛍光色素に注目し、この凝集誘起発光 (Aggregation Induced Emission: AIE) 現象の理論的解析に取り組んでいた [9] ところ、山本が開発に関わった **抗プリオン剤の GN8 が凝集誘起発光 (AIE) 色素のテトラフェニルエチレン (TPE) と類似な分子骨格を有することに気付いた**。

TPE は、光励起後にフェニル基がエチレン骨格 C=C 結合を軸に回転すると無輻射で (発光せずに) 励起エネルギーを消失する。このことから、GN8 の PrP 結合能と TPE の AIE 特性を融合させた分子 (GN8-TPE) を開発できれば、PrP と選択的に結合し、PrP が分散した状態では発光しないが、PrP が凝集した状態では無輻射緩和が抑制されて強く発光する機能を持つため、**PrP オリゴマーを「観る」ことができるタンパク質凝集体プローブ**となることを考案し、本研究の着想に至った。



Scheme 1. TPE で予測される AIE 機構

2. 研究の目的

■ テトラフェニルエチレンの凝集誘起発光過程の分子機序を解明する

テトラフェニルエチレン TPE は凝集誘起発光 (Aggregation Induced Emission; AIE) を示す蛍光色素であり、希薄溶液中に分散した状態での蛍光量子収率 (Φ_f) 値は 0.0024 であるが、凝集して微粒子や結晶になると Φ_f 値は 0.49 まで増大する [10]。この TPE が示す AIE については、従来、分散状態では 4 つのフェニル基部位の分子内回転運動により光励起エネルギーを無輻射失活するが、凝集状態では周囲分子との相互作用によりフェニル基の回転運動が大幅に抑制されるためにこの無輻射経路が阻害されて発光すると考えられてきた。しかし最近、TPE と同様に AIE を示すシアノスチルベン誘導体 CN-MBE において、ethylenic C=C 結合の分子内回転運動が AIE で重要な役割を果たすことが理論的研究によって明らかになっている [11]。

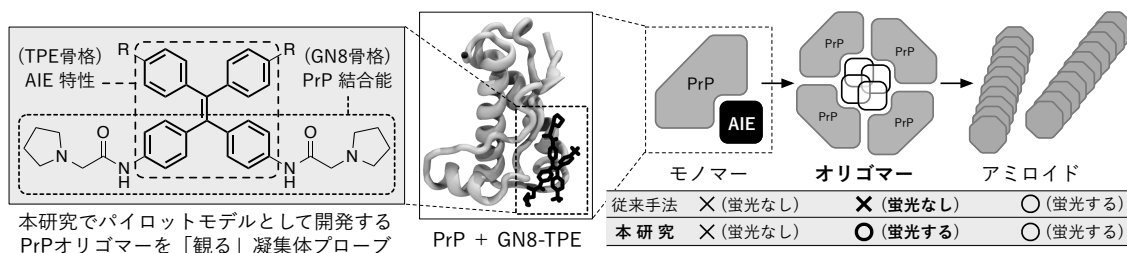
そこで本研究では、はじめに、TPE が示す構造依存的な AIE の分子機構について、電子状態計算及び分子動力学 (MD) 計算による理論的解析に取り組んだ。

■ 生きた細胞内で PrP オリゴマーを可視化する凝集誘起発光イメージング技術を確立する

従来、コンゴレッドやチオフラビン T がアミロイド線維を染色する方法として用いられてきた。これらの色素は、多数のタンパク質が凝集することで形成したアミロイド線維のクロスβシート（タンパク質同士がβシート領域で積層した構造）に結合し呈色する。しかしオリゴマー状態はタンパク質の重合度が低いため、これらの従来の色素では検出することができなかった。

そこで本研究では、低い重合度でもタンパク質凝集体を検出できる凝集誘起発光色素を新しく開発することで、これまでの手法では捉えることができなかった PrP オリゴマーを可視化し、タンパク質の特殊な変性・凝集構造が伝播するという医学・生物学の常識を覆すプリオン現象が起こるその現場を生きた細胞内で「観る」ことを目指した。

具体的には、抗プリオン剤が有する PrP に選択的に結合する機能、凝集誘起発光 (AIE) 色素を持つ凝集状態でのみ蛍光する機能を融合した凝集体プローブをこれまでの研究成果等を踏まえて合理的に設計し、合成をおこない、これを用いて様々な分子が混在する生きた細胞内でも標的とする PrP オリゴマーを選択的・高感度に可視化できる凝集誘起発光イメージング技術を確立することを目的として研究に取り組んだ。



Scheme 2. 本研究で開発する凝集体プローブの AIE 発光メカニズム

3. 研究の方法

■ テトラフェニルエチレンの凝集誘起発光についての理論的解析

TPE の電子状態は、スピン対称性を考慮したスピン反転時間依存密度汎関数 (SA-SF-TD-DFT) 法を用いて解析した。DFT 法の汎関数には BHHLYP, 基底関数は 6-31G(d) を用いた。プログラムには Q-Chem (version 5.4) を使用した。S₁/S₀ 円錐交差構造 (S₁/S₀-MECI) は、branching-plane 法を用いて探索した。基底状態の最適化構造 (S₀-MIN) と S₁/S₀-MECI を繋ぐ最小エネルギー経路 (MEP) は、string 法を用いて決定した。THF 溶液および凝集構造中における MEP に沿った自由エネルギー変化は、QM/MM 自由エネルギー摂動法を用いて解析した。

■ 抗プリオン剤のリード化合物 GN8 と代表的な AIE 分子 TPE を組み合わせた PrP 凝集体プローブのパイロットモデル分子 GN8-TPE の合成

GN8-TPE について、TPE 誘導体の合成 [12] を参考にジアミノベンゾフェノンを出発材料として合成した。GN8-TPE を水 / THF 混合溶媒に溶解し、各溶媒の混合比を変えてこの化合物の凝集度を変化させて蛍光測定することで、GN8-TPE の AIE 特性を検証した。さらに、PrP 過飽和溶液に凝集剤 (ドデシル硫酸ナトリウムなど) と開発・合成した凝集体プローブ GN8-TPE を添加し、蛍光分光装置を用いて測定することで、この化合物が PrP 凝集体を検出する蛍光プローブとして機能するか否かを検証した。

4. 研究成果

■ テトラフェニルエチレンの凝集誘起発光過程の分子機構を明らかにした

Figure 1 に、TPE の分子構造、電子基底 (S₀) 状態で最適化された局所最小構造 (S₀-MIN), S₀ 状態と第一励起 (S₁) 状態の間の最小エネルギー円錐交差点の構造 (S₁/S₀-MECI) を示す。



Figure 1. (A) Chemical structure of TPE, (B) local minimum structure optimized at the electronic ground (S_0) state (S_0 -MIN), and (C) structure at the minimum energy conical intersection between the S_0 and first excited (S_1) states (S_1/S_0 -MECI).

Figure 2 に、THF 溶液中における TPE の自由エネルギープロファイルを示す。この図から TPE は光励起後、Franck-Condon (FC) 点から 0.5 eV 安定な S_0/S_1 円錐交差 (CI) 点に緩和することが分かる。したがって、THF 溶液中で TPE が光らないのは、 S_0 -MIN 構造 (Fig. 1B) から S_1/S_0 -MECI 構造 (Fig. 1C) への変化がすみやかに起こることで、 S_0/S_1 CI 点を経て無輻射緩和することが原因であることが明らかになった。

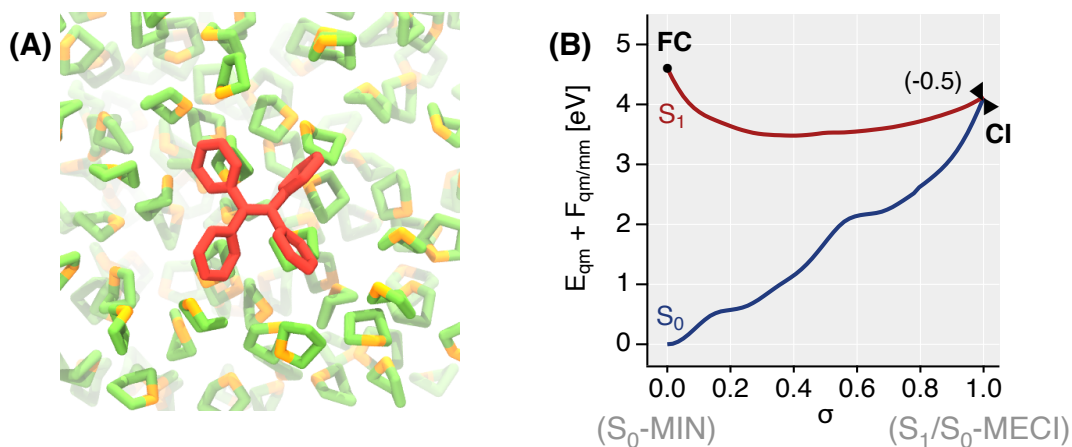


Figure 2. (A) Snapshot picture and (B) free-energy profile of TPE in THF solution

Figure 3 に、凝集構造における TPE の自由エネルギープロファイルを示す。FC 点から CI 点へと辿り着くには 0.2 eV のエネルギーが必要となることが分かった。このように、凝集体中では光励起後、分子構造の変化を経て S_0/S_1 交差点に至る無輻射経路がエネルギー的に不利となることで強い発光を示すことが明らかになった。

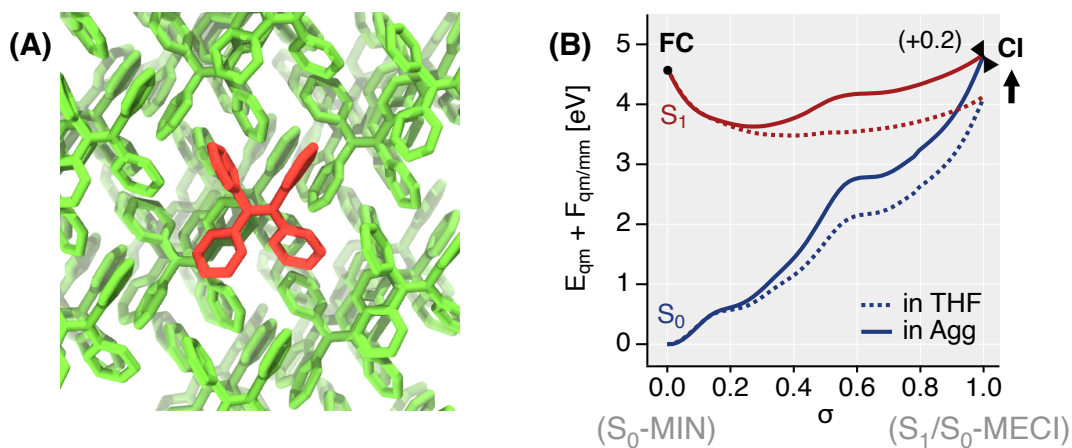


Figure 3. (A) Snapshot picture and (B) free-energy profile of TPE in aggregated state

■ PrP 凝集体プローブのモデル分子 GN8-TPE が凝集誘起発光を示すことを明らかにした

プリオンタンパク質 PrP と凝集体プローブのパイロットモデル分子として開発した GN8-TPE の結合構造について、ドッキングシミュレーションにもとづいて予測した (Figure 4). 予測された結合構造をみると、凝集体プローブである GN8-TPE は、抗プリオン化合物である GN8 と同様に、PrP のヘリックス末端部位に結合することが明らかになった。

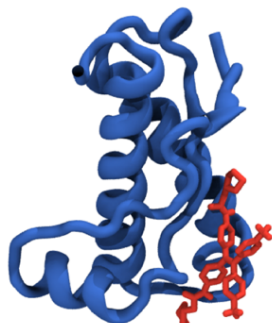


Figure 4. Binding structure between PrP and GN8-TPE

Figure 5A に示すように、凝集体プローブ GN8-TPE について、蛍光スペクトルを観測したところ、THF 溶液中に分散した状態では発光しないが、貧溶媒である水を添加したところ、この化合物は凝集することで、蛍光強度が顕著に増加することが明らかになった。さらに、Figure 5B に示すように、PrP を溶解した溶液に GN8-TPE を添加し、その蛍光スペクトルを観測した。その結果、PrP を低濃度溶解させた場合、その蛍光強度は PrP を添加しない場合と同程度であるのに対して、PrP を予めアミロイド化させたものを添加した場合、その蛍光強度が顕著に増加した。このことから、今回開発した化合物が PrP オリゴマーを特異的に「観る」ための凝集誘起発光イメージング色素として有用であることが明らかになった。

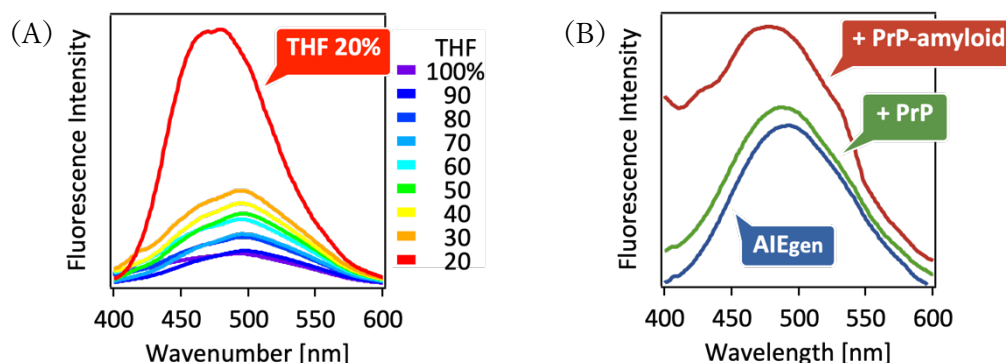


Figure 5. Fluorescence spectra of GN8-TPE in (A) THF solution and (B) when added to PrP solution and its aggregates.

引用文献

1. Silveira et al., *Nature*, Vol. 437, p.257 (2005)
2. Ohhashi et al., *Nature Chem. Biol.*, Vol. 6, p.225 (2010)
3. K. Kuwata, **Y. O. Kamatari**, 他 11 名, S. Katamine, *PNAS*, Vol. 104, p. 11921(2007)
4. **N. Yamamoto**, K. Kuwata, *J. Phys. Chem. B*, Vol. 113, p. 12853 (2009)
5. **N. Yamamoto**, K. Kuwata, *Chem. Phys. Lett.*, Vol. 498, p. 184 (2010)
6. **N. Yamamoto**, K. Kuwata, *J. Bio. Inorg. Chem.*, Vol. 14, p. 1209 (2009)
7. **N. Yamamoto**, K. Kuwata, *J. Mol. Str. Theochem*, Vol. 895, p. 52 (2009)
8. **N. Yamamoto**, *J. Phys. Chem. B*, Vol. 118, p. 9826 (2014)
9. Y. Fujimoto, **N. Yamamoto**, K. Furukawa, H. Sekiya, *Chem. Lett.*, Vol. 45, p. 637 (2016)
10. Z. Zhao., et al, *J. Mater. Chem.*, Vol. 22, p. 23726 (2012)
11. **N. Yamamoto**, *J. Phys. Chem. C*, Vol. 122, p. 12434 (2018)
12. Dhara et al., *Chem. Commun.*, Vol. 48, p.11534 (2012)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Norifumi Yamamoto	4. 巻 23
2. 論文標題 Free energy profile analysis to identify factors activating the aggregation-induced emission of a cyanostilbene derivative	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phys. Chem. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 1317-1324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CP04246C	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 Norifumi Yamamoto	4. 巻 124
2. 論文標題 Free Energy Profile Analysis for the Aggregation-Induced Emission of Diphenyldibenzofulvene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry A	6. 最初と最後の頁 4939-4945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.0c03240	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 Norifumi Yamamoto	4. 巻 122
2. 論文標題 Mechanisms of Aggregation-Induced Emission and Photo/Thermal E/Z Isomerization of a Cyanostilbene Derivative: Theoretical Insights	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 12434-12440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b02147	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16件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 山本 典史
2. 発表標題 凝集誘起発光過程の自由エネルギープロファイル解析
3. 学会等名 IQCE 量子化学探索講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳 南帆, 山本 典史
2. 発表標題 三脚巴状分子の凝集誘起発光過程に関する自由エネルギープロフィール解析
3. 学会等名 第16回 分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井 祐輔, 山本 典史
2. 発表標題 テトラフェニルエチレンの凝集誘起発光過程に関する自由エネルギープロフィール解析
3. 学会等名 第16回 分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norifumi Yamamoto
2. 発表標題 Theoretical Insights into the Mechanism of Aggregation-Induced Emission
3. 学会等名 化学系学協会東北大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳 南帆, 山本 典史
2. 発表標題 三脚巴状分子の凝集誘起発光メカニズムについての理論的研究
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井 祐輔, 山本 典史
2. 発表標題 テトラフェニルエチレンの凝集誘起発光についての理論的研究
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳 南帆, 山本 典史
2. 発表標題 クマリンを有する三脚巴状分子の凝集誘起発光についての理論的研究
3. 学会等名 第15回 分子科学討論会, オンライン, ポスター発表, 2P086
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳 南帆, 山本 典史
2. 発表標題 三脚巴状分子の凝集誘起発光メカニズムについての理論的研究
3. 学会等名 日本コンピュータ化学会 2021年 秋季大会, オンライン, ポスター発表, 1P12
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 典史
2. 発表標題 Theoretical insights into the mechanisms of aggregation-induced emission of a cyanostilbene derivative
3. 学会等名 Pacifichem 2021, オンライン, 口頭発表 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Norifumi Yamamoto
2. 発表標題 Theoretical insights into the mechanisms of aggregation-induced emission (AIE) of a cyanostilbene derivative
3. 学会等名 American Chemical Society National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norifumi Yamamoto
2. 発表標題 Theoretical Insights into the Mechanisms of Aggregation-Induced Emission of a Cyanostilbene Derivative
3. 学会等名 American Chemical Society National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norifumi Yamamoto
2. 発表標題 Theoretical Insights into the Mechanisms of Aggregation-Induced Emission of Tetraphenylethylene
3. 学会等名 American Physical Society March Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本典史
2. 発表標題 シアノスチルベン誘導体の凝集誘起発光についての理論的研究
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本典史
2. 発表標題 分子シミュレーションを用いたプリオン形成中間体の解析：プリオン病感染機構の解明を目指して
3. 学会等名 情報計算化学生物 (CBI) 学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Norifumi Yamamoto
2. 発表標題 Theoretical Insights into Aggregation-Induced Emission of a Cyanostilbene Derivative
3. 学会等名 International Conference of Computational Methods in Science and Engineering (ICCMSE) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norifumi Yamamoto
2. 発表標題 Theoretical Study on the Aggregation Induced Emission of a Cyanostilbene Derivative
3. 学会等名 日本化学会春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担者	島崎 俊明 (Shimasaki Toshiaki) (10452476)	千葉工業大学・工学部・准教授 (32503)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	鎌足 雄司 (Kamatari Yuji) (70342772)	岐阜大学・研究推進・社会連携機構・助教 (13701)	

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