

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570163

研究課題名（和文）：圧力によるタンパク質解離・会合の制御技術の開発

研究課題名（英文）：Development of controlling technology for protein dissociation and aggregation using high pressure.

研究代表者

鎌足 雄司 (YUJI O. KAMATARI)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：70342772

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、人の健康やタンパク質の生産の上で深刻な問題となっているタンパク質の凝集の問題を解決するために、タンパク質の解離・会合を制御する技術を開発することである。そのため本研究では、下記の4つの項目の研究を進め、高圧力および低分子化合物による凝集制御の有効性を示した。1. 高圧 NMR 法を用い、高圧下で凝集を抑制した条件で、タンパク質リゾチームの変性初期過程を観測し、準安定状態および変性中間体を平衡条件下で初めて観測することに成功した (Kamatari et al., Biophys Chem. 156, 24-30, 2011)。2. 大容量高圧装置の構築と巻き戻し実験を行った。3. 高圧蛍光装置の構築とアミロイド繊維解離実験を行った。4. 我々は凝集抑制のために、圧力だけではなく低分子化合物の効果も検討した。新たにプリオン病の凝集を抑制する複数の新規化合物を発見した (Hosokawa-Muto et al., Antimicrob. Agents Chemother., 53, 765-771, 2009)。また、抗プリオン化合物 GN8 の最適化を行い、より効果の高い化合物を報告した (Kimura et al., Bioorg Med Chem Lett. 21, 1502-1507, 2011)。

研究成果の概要（英文）：

Protein aggregation is one of the serious problems for human health and production of recombinant proteins. Purpose of this study is development of controlling technology for protein dissociation and aggregation using high pressure. In this study, we did following four topics. 1. We observed denaturation process of hen lysozyme using high pressure NMR spectroscopy, in which high pressure suppress protein aggregation. We succeed to observe low-lying excited states and unfolding intermediates at equilibrium condition (Kamatari et al., Biophys Chem. 156, 24-30, 2011). 2. We made a high-volume high pressure apparatus and did refolding experiments from inclusion bodies. 3. We made a high pressure apparatus for fluorescence spectroscopy and observed dissociation process of amyloid fibrils. 4. We used chemical compounds to suppress aggregation in addition to high pressure. We found several new anti-prion compounds (Hosokawa-Muto et al., Antimicrob. Agents Chemother., 53, 765-771, 2009). We optimized a anti-prion compound, GN8, and found higher efficiency compound than GN8 (Kimura et al., Bioorg Med Chem Lett. 21, 1502-1507, 2011).

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：生物物理学、フォールディング、神経変性疾患、プリオン病、凝集、圧力、巻き戻り、リゾチーム

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の凝集は、人の健康やタンパク質の生産の上で深刻な問題となっている。たとえば、プリオン病やアルツハイマー病をはじめとする“コンフォメーション病”の原因となっているのはアミロイド線維とよばれるタンパク質の規則的な凝集体である。また、組み換えタンパク質生産の際に機能を持つ天然状態のタンパク質の生産を困難としているのは封入体とよばれる凝集体である。いったん生成した凝集やアミロイド線維を天然状態に戻すことは難しいため、凝集・アミロイド形成反応はこれまで不可逆の過程として扱われることが多かった。最近、我々は、高圧 NMR 法を用いて、リゾチーム変異体のアミロイドプロトフィブリルが高圧下では解離し、常圧下では会合する過程を直接観測することに世界で初めて成功した (Kamatari et al., *J. Mol. Biol.*, 349, 916, 2005)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、人の健康やタンパク質の生産の上で深刻な問題となっているタンパク質の凝集の問題を解決するために、タンパク質の解離・会合を制御する技術を開発することである。圧力はタンパク質の解離・会合を制御する一つの有力な手法となりうるため、本研究では、高圧力を用い、1. 凝集等のためこれまで困難であった天然状態・変性中間体の構造を観測可能にする条件、2. 凝集体・封入体からの巻き戻し条件、3. アミロイドの圧力解離の条件等を検索する。さらに、我々は凝集抑制のために、圧力だけではなく、4. 低分子化合物の効果も検討する。そしてこれらの研究を通じて、制御の基盤となる一般的法則を見出すことを目指している。

3. 研究の方法

高圧下で凝集を抑制した条件で、タンパク質の変性初期過程の直接観測するためには、高圧 NMR 法 (Kamatari et al., *Methods* 34, 133-143, 2004) を用いた。タンパク質調製の際の封入体の巻き戻しには大容量の高圧容器が必要であるため、これを作成し、封入体の巻き戻し反応を行った。アミロイド線維の圧力解離のためには、高圧蛍光装置を作成し、これを用いた。低分子化合物を用いた凝集抑制には、抗プリオン化合物アッセイ系 (Kuwata et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11921-11926, 2007) を用い、新規化合

物の探索、最適化を行った。凝集抑制機構の解明には、NMR および SPR 等を用いた。

4. 研究成果

1). リゾチームの変性初期過程を観測

本研究では、高圧 NMR 法を用い、高圧下で凝集を抑制した条件で、タンパク質リゾチームの変性初期過程を観測し、準安定状態および変性中間体を平衡条件下で初めて観測することに成功した (Kamatari et al., *Biophys Chem.* 2011)。そして、初期過程に水がタンパク質分子内のキャビティーに入り込んでいくことを示した。また、種の異なるリゾチーム間でキャビティーの位置が保存されていることを明らかにし、キャビティーが準安定状態の出現やタンパク質の機能発現にとって重要な役割を果たしていることを示した。

2). 大容量高圧装置の構築と巻き戻し実験

タンパク質調製の際の封入体の巻き戻しには大容量の高圧容器が必要である。大容量のサンプルに対して利用可能な、または、溶媒条件を変えた複数のサンプルに対しての圧力実験を可能とする大容量の高圧容器の作成をした。これにより 130ml の体積のサンプルに対して 4000 気圧までの圧力実験が可能となった。そしてこの大容量高圧装置を用い、全長および C 末ドメインのプリオンタンパク質の封入体、およびリゾチームの封入体の巻き戻し実験を行っている。解離・会合ともなる物理学的パラメータを正しく評価するため、処理圧力、処理時間、タンパク濃度等を系統的に変え、効率の高い条件を検索中である。

3). 高圧蛍光装置の構築とアミロイド繊維解離実験

4000 気圧まで制御可能な高圧蛍光装置を完成させ、リゾチームおよびプリオンタンパク質を用いてアミロイド繊維の圧力解離実験を行っている。現在条件の最適化中であるが、すでに他のグループがこれらのタンパク質のアミロイド繊維の解離について報告 (El Moustaine et al., *J Biol Chem.* 286, 13448-59, 2011; Shah et al., *Biophys J.* 102, 121-126, 2012) を行ったため、我々は、株の違いによる圧力応答の違い等の新たな知見を追加し、発表予定である。

4). 低分子化合物によるプリオンタンパク質の凝集抑制

我々は凝集抑制のために、圧力だけではな

く低分子化合物の効果も検討した。これまでに、タンパク質の凝集により起こるアミロイド病の一つであるプリオン病に対して、低分子化合物を用いた制御が有効であることを示してきた。そして本研究では、新たにプリオン病の凝集を抑制する複数の新規化合物を発見した (Hosokawa-Muto et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 765-771, 2009)。また、最初に発見した抗プリオン化合物 GN8 の最適化を行い、より効果の高い化合物を見いだした (Kimura et al., *Bioorg Med Chem Lett.* 21, 1502-1507, 2011)。また、これらの化合物の凝集抑制機構について詳細に調べ、効果を発揮するために重要な部位を同定し、さらに、その作用機構についても推定した (論文執筆中)。

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 7 件)

1. Fukuoka M, Minakuchi M, Kawaguchi A, Nagata K, Kamatari YO, Kuwata K., Structure-based discovery of anti-influenza virus A compounds among medicines., *Biochim. Biophys. Acta.*, 査読有, 1820, 90-95, 2012.
2. Kamatari, Y. O., Smith, L. J., Dobson, C. M., Akasaka, K., Cavity hydration as a gateway to unfolding: An NMR study of hen lysozyme at high pressure and low temperature. *Biophys. Chem.* 査読有, 156, 24-30, 2011,
3. Kimura T, Hosokawa-Muto J, Kamatari YO, Kuwata K., Synthesis of GN8 derivatives and evaluation of their antiprion activity in TSE-infected cells., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 21, 1502-1507, 2011,
4. Urushisaki T, Takemura T, Tazawa S, Fukuoka M, Hosokawa-Muto J, Araki Y, Kuwata K., Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in brazilian green propolis water extract., *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 査読有, 未定, 2011.
5. Takemura T, Urushisaki T, Fukuoka M, Hosokawa-Muto J, Hata T, Okuda Y, Hori S, Tazawa S, Araki Y, Kuwata K., 3,4-Dicaffeoylquinic Acid, a Major Constituent of Brazilian Propolis, Increases TRAIL Expression and

Extends the Lifetimes of Mice Infected with the Influenza A Virus., *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 査読有, 未定, 2011.

6. Kimura T, Hosokawa-Muto J, Asami K, Murai T, Kuwata K., Synthesis of 9-substituted 2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole derivatives and evaluation of their anti-prion activity in TSE-infected cells. *Eur. J. Med. Chem.*, 査読有, 46, 5675-5679, 2011.
7. J. Hosokawa-Muto, Y. O. Kamatari, H. K. Nakamura, K. Kuwata, Variety of antiprion compounds discovered through an in silico screen based on cellular-form prion protein structure: Correlation between antiprion activity and binding affinity., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 査読有, 53, 765-771, 2009.

[学会発表] (計 24 件)

1. 鎌足雄司, 構造生物学・医学・論理的創薬の拠点構築を目指して, 第一回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム, 2012年3月23日, 岐阜.
2. Y. O. Kamatari, L. J. Smith, C. M. Dobson, K. Akasaka, Cavity hydration as a gateway to unfolding: An NMR study of hen lysozyme at high pressure and low temperature, 6th International Meeting on Biomolecules under Pressure, 2011年12月15日, 滋賀.
3. Y. O. Kamatari, K. Yamaguchi, & K. Kuwata, Low-lying excited state of prion protein directly linked to pathogenic conversion, The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, 2011年11月16日, 横浜.
4. T. Nakagaki, K. Satoh, Y. Kamatari, R. Atarashi, N. Nishida, FK506 prolongs survival time of FK-1 infected mice, International Union of Microbiological Sciences 2011 Congress, 2011年9月15日, 札幌.
5. M. Fukuoka, M. Minakuchi, A. Kawaguchi, K. Nagata, Y. O Kamatari, K. Kuwata, Discovery of anti-influenza virus compounds from medicines on the market, International Union of Microbiological Sciences 2011 Congress, 2011年9月15日, 札幌.
6. Kamatari, Y. O., Akasaka, K., Cavity

- hydration as a gateway to unfolding: An NMR study of hen lysozyme at high pressure and low temperature, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 17 日, 姫路.
7. A. Maeno, R. Kitahara, Y. O. Kamatari, Sunilkumar P.N., K. Akasaka, Cavity hydration and the dynamics of a protein, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 17 日, 姫路.
 8. 鎌足雄司, 早野陽介, 山口圭一, 武藤(細川)淳二, 桑田一夫, プリオンタンパク質への結合様式による抗プリオン化合物の分類と作用機構の解明, 第 49 回 NMR 討論会, 2010 年 11 月 15 日, 東京.
 9. Kamatari, Y. O., Classification of anti-prion compounds based on the binding properties of prion proteins, 第 48 回日本生物物理学会年会, 2010 年 9 月 21 日, 仙台.
 10. 武藤淳二, 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) による構造解析に向けたデュアルピンポイント蛍光標識プリオン蛋白質の合成, 第 149 回日本獣医学会, 2010 年 3 月 26 日, 東京.
 11. 鎌足雄司, プリオンタンパク質構造変換におけるホットスポットと抗プリオン化合物, 第 2 回先端創薬医療シンポジウム, 2009 年 12 月 19 日, 岐阜.
 12. 武藤淳二, 山口圭一, 鎌足雄司, 桑田一夫, 無細胞蛋白質合成系を用いたデュアルピンポイント蛍光標識プリオン蛋白質の合成, 第 4 回無細胞生命科学研究会, 2009 年 11 月 16 日, 岐阜.
 13. 鎌足雄司, 早野陽介, 木村力, 武藤淳二, 石倉孝一, 山本典史, 山口圭一, 桑田一夫, プリオンタンパク質構造変換におけるホットスポットと抗プリオン化合物, 第 48 回 NMR 討論会, 2009 年 11 月 10 日, 福岡.
 14. 木村力, 武藤淳二, 鎌足雄司, 桑田一夫 抗プリオン化合物 GN8 の類縁体合成および活性評価, 第 40 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2009 年 11 月 7 日, 岐阜.
 15. 中垣岳大, 佐藤克也, 鎌足雄司, 新竜一郎, 石橋大輔, 山口尚宏, 西田教行, プリオン病におけるタクロリムスの治療効果, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 26 日, 東京.
 16. 武藤(細川)淳二, 山口圭一, 鎌足雄司, 桑田一夫, アンバーおよび 4 塩基コドンを用いたデュアルピンポイント蛍光標識プリオン蛋白質の合成, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 26 日, 東京.
 17. 鎌足雄司, Hot spot for pathogenic conversion of prion protein and anti-prion compounds, Frontiers in Nanoscience and Technology - Multi-dimension Seminar, 2009 年 10 月 14 日, 石川.
 18. T. Kimura, J. Muto, Y. O. Kamatari, K. Kuwata, Synthesis of Isotope Labeled Anti-Prion Compound GN8 Derivative and Evaluation of Its Blood-Brain Barrier Permeability Using Positron Emission Tomography, Montreal, 2009 年 9 月 23 日, Canada.
 19. 鎌足雄司, 桑田一夫 NMR でタンパク質の構造・揺らぎ・相互作用を見る, 第 16 回岐阜シンポジウム, 2009 年 7 月 8 日, 岐阜.
 20. 福岡万佑子, 中村寛則, 鎌足雄司, 桑田一夫, 論理的創薬による抗ウイルス薬の開発, 第 16 回岐阜シンポジウム, 2009 年 7 月 8 日, 岐阜.
 21. Y. O. Kamatari, J. Hosokawa-Muto, H. K. Nakamura, Y. Hayano, K. Kuwata, Identification of a variety of anti-prion compounds that acts as chemical chaperons, VIII European Symposium of The Protein Society, 2009 年 6 月 17 日, Zurich, Switzerland.
 22. H. K. Nakamura, J. Hosokawa-Muto, Y. O. Kamatari, K. Kuwata, New evaluation scheme for anti-prion compounds using ensemble of docking models, VIII European Symposium of The Protein Society, 2009 年 6 月 17 日, Zurich, Switzerland.
 23. J. Muto, K.-I. Yamaguchi, Y. O. Kamatari, K. Kuwata, Development of double-fluorescent-labeled prion protein system for FRET analysis, VIII European Symposium of The Protein Society, 2009 年 6 月 16 日, Zurich, Switzerland.
 24. 鎌足雄司, 作用機構による抗プリオン化合物の分類, 第 2 回長崎プリオン研究会, 2009 年 4 月 17 日, 長崎.
- 〔図書〕 (計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 2 件)
1. 名称: プリオンタンパク質構造変換抑制剤及びその利用
発明者: 桑田一夫, 木村力, 武藤淳二
権利者: 岐阜大学
種類: 特許

番号：特願 2009-118076
出願年月日：2009 年 5 月 14 日
国内外の別：国内

2. 名称:アイソトープ標識化合物及びアイソトープ標識化合物前駆体
発明者：桑田一夫、木村力、武藤淳二、古山浩子、鈴木正昭、渡辺恭良、土居久志、佐古健生
権利者：理化学研究所、岐阜大学
種類：特許
番号：特願 2009-218247
取得年月日：2009 年 9 月 21 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~kamatari/publication.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌足雄司 (YUJI O. KAMATARI)
岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教
研究者番号：7 0 3 4 2 7 7 2

(2) 研究分担者

武藤 淳二 (JUNJI MUTO)
科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官
研究者番号：8 0 4 3 2 1 8 6

(3) 連携研究者

山口 圭一 (KEIICHI YAMAGUCHI)
岐阜大学・連合創薬医療情報研究科・特別研究員 (PD)