

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05288

研究課題名(和文)蛋白質の変性可逆的会合体から不可逆的会合核形成過程の熱測定を活用した解析と応用

研究課題名(英文) Calorimetric evaluation of the irreversible nucleation process from the reversible oligomers of denatured proteins and its application

研究代表者

城所 俊一 (Kidokoro, Shun-ichi)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：80195320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：数多くの疾病に関係するアミロイド線維形成機構について、蛋白質変性状態が可逆的に形成する数分子の会合体(R0)から、アミロイド線維形成の会合核形成についての不可逆過程に着目し、特に熱転移の可逆的な中間状態としてR0状態が出現する蛋白質を用いて、複数の蛋白質濃度と温度走査速度によるDSCデータを、一組の平衡論的および速度論的パラメーターでグローバル解析する解析法を開発し、実際のデータに応用した。また、R0の安定性を制御するアミノ酸変異体を複数作成し、R0の安定性の増加がアミロイド線維形成の促進につながることを示す等、R0状態とアミロイド線維形成との関係についての新たな手法を開発し、知見を蓄積した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質の変性状態の可逆的な会合体(R0)形成については、多くの蛋白質で平衡論的によって確認されているが、未だ一般的な現象として認知されていない。本研究では、R0の安定性制御への分子表面の疎水性残基の役割を更に明確化するとともに、それらがアミロイド線維形成反応にも関与することを明確にしておき、蛋白質物性の基礎的な知見としても、また疾病予防や治療につながるアミロイド線維形成を制御するための応用研究につながる知見としても重要と考えられる。また、温度走査熱量測定によって、平衡論的な転移と同時に速度論的な反応を観測する試みは挑戦的であり、様々な他の現象への応用が可能で波及効果が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regarding the mechanism of amyloid fibril formation, which is related to many diseases, we focused on the irreversible process of the assembly nucleation of amyloid fibrils from the reversible assembly of several molecules (R0 state) formed by the denatured state of protein molecules, and developed a method of global analysis of DSC data at multiple protein concentrations and temperature scanning rates with a set of equilibrium and kinetic parameters, and applied it to actual data, using a protein in which the R0 state appears as a reversible intermediate state of the thermal transition. We also created several amino acid mutants where the stability of R0 is designed, and it was shown that increased R0 stability leads to enhanced amyloid fibril formation. The new methods have been developed and important knowledge have been accumulated about the relationship between the R0 state and amyloid fibril formation.

研究分野：蛋白質物性学

キーワード：示差走査熱量測定 反応エンタルピー アミロイド線維 会合核依存的伸長モデル 速度定数

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多くの疾病に関連する、蛋白質のアミロイド線維形成反応は、蛋白質数分子の会合核の形成が律速過程と考えられている(会合核依存的伸長モデル)が、会合核形成の機構は解明されていない。一方、近年、熱変性中間体や熱変性状態の数分子が可逆的な会合体(reversible oligomer, RO)を形成する現象が様々な蛋白質で明らかになってきており、ROがアミロイド形成会合核の前駆体となる例が報告されていた。しかし、ROからアミロイド形成会合核の反応過程についての実験的な報告はされていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、蛋白質のROを用いて、昇温走査と降温走査とを組み合わせた温度走査熱量測定(DSC)により、ROから不可逆的な会合核を形成する過程について、その反応次数、速度定数とその温度依存性とを決定することで、ROから会合核がどのように形成されるのかを速度論的に明らかにすることをめざした。また、ROの安定性や変性状態の物性を改変するアミノ酸置換や溶媒条件による速度論的な影響を調べることで、会合核形成を制御するための知見を蓄積することも試みた。

### 3. 研究の方法

上記目的を達成するため、下記(1)~(4)の項目について研究を実施した。

(1)変性状態の可逆的な会合体(RO)を確認した蛋白質を用いたDSCによるROから不可逆的な会合核への反応解析

既にROを報告し、アミロイド線維形成の前駆体であることが報告されているPSD95-PDZ3を用いて、降温走査と昇温走査を組み合わせたDSCを行った。降温走査に連続して昇温走査を行うことで、ROを含む可逆的な変性過程と不可逆的な速度論的過程の反応熱とを同時に測定し、両者を区別して解析することを試みた。これは、温度走査方向を逆にした際に、みかけの熱容量の差から、不可逆的な過程に伴う反応熱が評価できる可能性を試みたものである。

(2)明示的に不可逆過程を取り入れたDSCによるROから不可逆的な会合核への解析法の開発とその応用

熱転移の中間状態であるRO状態から、反応次数・速度定数とその温度依存性等をパラメータとして会合核への不可逆反応が生じ、それに伴って、不可逆反応に伴う反応熱、平衡反応に関与できる蛋白質濃度の減少とを、従来の平衡モデルに取り入れた、新しいモデル(平衡論と速度論とのハイブリッドモデル)を開発した。これを用いて、PSD95-PDZ3の熱転移の、不可逆過程のパラメータ評価の可能性について検討した。

(3)分子会合や変性構造に影響を与えるアミノ酸変異体の作成とその評価

我々は既に分子表面のアミノ酸を置換することで、ROを不安定化させたり、天然状態で溶媒に露出するように疎水性残基を導入することで、逆にROを安定化させたりすることに成功している。本研究では、このうちPSD95-PDZ3変異体については、東京農工大学等との共同研究により、本学でDSC測定を行いROの安定性評価を行った。また、高度好熱菌由来の低温ショック蛋白質(cold shock protein, CSP)の変異体については、本学で変異体蛋白質の調製を行い、同様に評価した。既にCSPに2本のジスルフィド結合を導入し、変性状態の自由度を下げて、天然状態の高安定化に成功しており、この変異体を元に、変性した際にRO状態の安定性を高める変異体を設計・調製し、様々な濃度やpHでの熱転移等々を評価した。

(4)作成したCSP変異体の低濃度での結合能評価法の開発

アミノ酸置換により変性状態の溶解度が下がると、これと平衡にある天然状態の溶解度も低下することになり、アミノ酸置換による天然状態の立体構造や安定性変化の評価が困難になる場合がある。前項で作成したCSP変異体でも、実際に溶解度が1/10以下に低下したため、低濃度での一本鎖DNAへの結合能を評価するため、分子ビーコンを利用した新規評価法を開発した。作成した分子ビーコンは、CSPへの特異的結合配列を持ち、5'末端に蛍光剤、3'末端にその消光剤をつけており、常温では分子ビーコンはステム・ループ構造を形成して蛍光は消光される。分子ビーコンにCSPが結合することで強い蛍光を発光することで、高感度の結合能の評価が期待される。

### 4. 研究成果

(1)オリゴマー中間体から不可逆的な会合核形成過程を考慮した解析法の試行

熱転移の際に2本の吸熱ピークが観測されるPSD95-PDZ3を用いて実際に測定・解析を行ったところ、より可逆性の高い低温側のピークにおいても、最初の降温走査中に生じる不可逆反応により、可逆的な構造転移可能な蛋白質濃度が減少し、これが次の昇温時の平衡反応に与える影響が無視できないことがわかった。これは、本研究の当初計画の方法では、不可逆過程の寄与が分離できないことを示している。このため、本研究では、測定中に生じる不可逆反応を明示的に取り入れた解析法を開発することとした。

(2) 明示的に不可逆過程を取り入れた DSC による R0 から不可逆的会合核への反応解析法の開発とその応用

まず、従来の R0 を含む熱転移の平衡論的モデルに、明示的に不可逆過程を反応次数・速度定数とその温度依存性等をパラメータとして、会合核への不可逆反応を取り入れた新しいモデルを作成した。実際の PSD95-PDZ3 の熱転移では、1 K/min の昇温速度で可逆性は通常 80%程度はあるので、それに合わせて速度定数を調整すると、PSD95-PDZ3 の熱転移で観測される 2 本の吸熱ピークの前半部分(主として天然状態から R0 への構造転移)は、不可逆過程の反応熱が小さい場合には、0.5~2.0 K/min の走査速度の変化ではピークの大きさや形に大きな変化は観測されないことがわかった。これに対して、後半部分(主として R0 状態から熱変性状態への構造転移)では、ピークの大きさやピーク温度が、走査速度によって顕著に影響を受けることがわかった。これは、R0 状態からの不可逆反応が走査速度が遅い場合には十分に進むためである。このことは、PSD95-PDZ3 のように、R0 状態を中間状態に持つ場合には、不可逆過程に伴う反応熱が全く無い場合でも、不可逆過程への反応速度を DSC で評価できる可能性を示唆していると考えられる。もちろん、不可逆過程に伴う反応熱が大きい場合には、前半部分のピークでも昇温速度による違いが観測されることが確認できた。これらの研究成果は 2023 年 8 月に開催された IUPAC 化学熱力学国際会議の招待講演として発表した。

この新解析法を用いて、PSD95-PDZ3 で、pH7.5 で、3 種類の蛋白質濃度(0.5, 0.75, 1.0 mg/mL)で、それぞれ 3 種類の昇温速度(0.75, 1.0, 1.5 K/min)で測定した 9 個の実験データを共通の 1 組の平衡論的および速度論的パラメータを用いてグローバル(非線形最小二乗法)解析を行った。この結果、不可逆過程を導入することで残差は明確に減少したものの、まだ理論曲線と実験データの間に系統的な残差があり、今後、実験条件や解析モデルの更なる検討が必要と考えられる。

(3) 分子会合や変性構造に影響を与えるアミノ酸変異体の作成とその評価

A) PSD95-PDZ3 分子表面のアミノ酸を置換することで、R0 を不安定化させた置換体 F340A と同様の効果が期待される L342A, V328A, I389A, V315A, L349A, V365A 変異体を作成し、R0 の安定性やアミロイド線維形成能について評価した。この結果、F340A と L342A 変異体では、R0 状態が顕著に不安定化し、アミロイド線維の形成が抑制されることがわかった。このことは、天然状態の分子表面にある、特定の疎水性残基が R0 状態の安定化に重要な寄与をしていること、また、R0 状態のモル分率を低下させることでアミロイド線維形成に必須な会合核形成が抑制されていることを示唆している。

B) R0 状態を顕著に不安定化した F340A 変異体の、分子表面の他の部位に疎水性残基を導入する 3 種類の 2 重変異体 F340A/R309L, F340A/E310L, F340A/N326L を作成し、R0 の安定性やアミロイド線維の形成能について評価した。この結果、F340A/N326L 変異体では、R0 状態が再度安定化され、アミロイド線維の形成が促進されたことがわかった。この実験結果は、上述の仮説を支持している。

C) 立体構造に基づいて、高度好熱菌由来の低温ショック蛋白質(CSP)の分子表面に 2 本のジスルフィド結合を導入することで変性状態のエントロピー効果により高安定化することに成功した 5 重変異体 (A11C/T40C/E52C/N56Q/V63C、以下 2SS 変異体と呼ぶ)では R0 の形成は確認できていないが、ジスルフィド結合を導入することで、変性状態での疎水核形成が安定化されていることが示唆されている。この変異体 2 分子を短いリンカーを介して結合させることで分子間会合を促進し、R0 が安定化されることが期待されるため、本研究では、Ser-Gly という 2 残基の短いリンカーを使ってタンデム化変異体を作成した。2SS 変異体に比べてやや溶解度は落ちるものの DSC 測定は可能であり、安定性は 2SS 変異体とほぼ同じであり、2SS 変異体と同様に立体構造は形成されていることが示唆された。DSC 測定からは、現在のところ R0 形成の証拠は得られていない。

D) 前項の CSP の 2SS 変異体に、分子表面にさらにもう 1 本のジスルフィド結合を導入した 7 重変異体 (A11C/T40C/E52C/N42C/N56Q/V63C/A71C、以下 3SS 変異体と呼ぶ)を作成した。こちらでも 2SS 変異体よりも溶解度が低下するとともに、試料調製の段階で、一部にジスルフィド結合のかけ違いによるミスフォールドした分子が含まれることがわかったが、熱転移温度は 2SS 変異体よりも高く、正しく 3 本のジスルフィド結合を形成した分子では、変性状態での疎水核形成がより安定化されたことが示唆された。3SS 変異体については、DSC 測定では、現在のところ R0 形成の証拠は得られていない。

(4) 作成した変異体の低濃度での結合能測定法の開発

前項で示すように、R0 を安定化させる変異を導入すると蛋白質の溶解度が低下することがいくつかの変異体で観測された。特に、前項の CSP の変異体では、実際に溶解度が 1/10 以下に低下し、天然構造を確認するための一本鎖 DNA との結合能の評価が困難なことがわかった。これは、従来法では CSP の DNA 結合部位に存在するトリプトファン残基の蛍光が DNA 結合により消光する現象を利用していたためであり、CSP 濃度が低下すると感度が低下してしまうことに依る。そこで、本研究では、CSP への特異的結合配列を持ち、ステム部分の熱安定性をやや低下させる mismatches を導入した新規分子ビーコン、6FAM-d(TTTAAAAACACAATCTTTTAAA)-Dabcyl (5' 末端側の 6FAM が蛍光剤で 3' 末端側の Dabcyl が消光剤、下線部が CSP の特異的結合部位)を作成し、pH7.0 50 mM リン酸カリウム、100 mM KCl の条件下で、1 nM の分子ビーコンを用いて、各種濃度の CSP 共存下での蛍光の温度変化や、一定温度での CSP の滴下実験により、15~25 °C での nM レベルの解離定数の評価に成功した。この手法を前項目で作成したタンデム化変異体に適用し

たところ、2SS 変異体に比べて結合定数が数十倍以上となり、タンデム化によって一本鎖 DNA への結合能が顕著に増加していることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tu Thao, Rathnayaka Tharangani, Kato Toshiyo, Mizutani Kenji, Saotome Tomonori, Noguchi Keiichi, Kidokoro Shun-ichi, Kuroda Yutaka	4. 巻 25
2. 論文標題 Design and Escherichia coli Expression of a Natively Folded Multi-Disulfide Bonded Influenza H1N1-PR8 Receptor-Binding Domain (RBD)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3943 ~ 3943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms25073943	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Onchaiya Sawaros, Saotome Tomonori, Mizutani Kenji, Martinez Jose C., Tame Jeremy R. H., Kidokoro Shun-ichi, Kuroda Yutaka	4. 巻 27
2. 論文標題 Reverse Engineering Analysis of the High-Temperature Reversible Oligomerization and Amyloidogenicity of PSD95-PDZ3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2813 ~ 2813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27092813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Saotome Tomonori, Onchaiya Sawaros, Brindha Subbaian, Mezaki Taichi, Unzai Satoru, Noguchi Keiichi, Martinez Jose C., Kidokoro Shun-ichi, Kuroda Yutaka	4. 巻 2021
2. 論文標題 Blocking PSD95 PDZ3's amyloidogenesis through point mutations that inhibit high temperature reversible oligomerization (RO)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16339	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 KIDOKORO Shun-ichi	4. 巻 61
2. 論文標題 DSC Analysis of Reversible Oligomers of Denatured Protein Molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 370 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shun-ichi Kidokoro
2. 発表標題 DSC Analysis Methods Considering Reversible Oligomer State of Denatured Protein Molecules
3. 学会等名 26th IUPAC International Conference on Chemical Thermodynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古賀伊織、加藤優貴、早乙女友規、城所俊一
2. 発表標題 分子ビーコンを用いた低温ショック蛋白質・一本鎖核酸間の低濃度での結合平衡解析
3. 学会等名 第60回熱測定討論会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 早乙女 友規、Sawaros Onchaiya、城所 俊一、黒田 裕
2. 発表標題 PSD95-PDZ3の高温での可逆的なオリゴマー（R0）の一残基置換による阻害を利用したアミロイド線維形成の抑制
3. 学会等名 第57回熱測定討論会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------