

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15049

研究課題名（和文）一残基置換による高温でのRO形成の阻害を応用したアミロイド抑制法の開発

研究課題名（英文）The development of molecular design to inhibit the amyloid fibrillation by inhibiting the reversible oligomerization at high temperature with a single residue mutation

研究代表者

早乙女 友規（Saotome, Tomonori）

長岡技術科学大学・工学研究科・助教

研究者番号：40867610

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小型球状蛋白質の複雑な熱変性過程に注目し、熱凝集の初期段階で生じる可逆的なオリゴマー（RO）を一残基置換によって阻害することで、細胞毒性や神経変性疾患の原因とされるアミロイド線維の効果的な抑制を目指した。その結果、シナプス後肥厚の足場蛋白質を由来とするPSD95-PDZ3では、結晶構造中のオリゴマー接触面に存在する疎水性アミノ酸がRO形成に重要と判明した。そこでF340AやL342Aなど親水性アミノ酸に一残基置換すると、ROが阻害されたことで間接的にアミロイド線維の成熟も抑制された。以上のように最小限のアミノ酸置換によって、モデル蛋白質の熱凝集傾向性を有意に低下させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で考案した一残基置換による分子設計法では、モデル蛋白質の本来の構造・機能に殆ど影響することなく、高温でのRO形成だけを阻害することで、アミロイド線維をはじめとする蛋白質の熱凝集を効果的に抑制することが示された。今後はより多くのモデル蛋白質で同様の傾向を示せば、蛋白質凝集を人工的に抑制するための汎用的な手法としての活躍が期待される。また本研究では、逆に疎水性アミノ酸へ一残基置換することで、アミロイド線維が人工的に形成されることも発見した。よってRO形成には、一残基レベルの局所的な疎水性相互作用が駆動力となる仮説が立てられ、蛋白質凝集のメカニズム解明に向けた学術的意義も見出された。

研究成果の概要（英文）：In this study, the complex thermal denaturation process of small globular proteins was examined to precisely inhibit amyloid fibrils, which are known to cause cytotoxicity and neurodegenerative diseases. Detailed calorimetric studies have revealed that reversible oligomer (RO) formation is the early stage of thermal aggregation. Surprisingly, RO was significantly inhibited by single-residue substitution. In the case of PSD95-PDZ3, which is derived from a scaffold protein of postsynaptic thickening, hydrophobic amino acids located at the interface of crystallographic oligomers were determined to play a key role in RO formation. Furthermore, single substitutions with hydrophilic amino acids (F340A and L342A) resulted in significant inhibition of RO at high temperatures, as confirmed by simplified DSC thermograms, and the suppression of amyloid fibril maturation was confirmed by TEM observation.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：蛋白質工学 アミロイド線維 蛋白質凝集 DSC測定 一残基置換

1. 研究開始当初の背景

アミロイド線維は蛋白質凝集の一種で、非天然の cross- 構造を形成し、細胞内に蓄積されることで細胞毒性を示すだけでなく、アルツハイマー病・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症など神経変性疾患の原因とされている。そのため、アミロイド線維の形成メカニズムの解明、および効果的な阻害方法の開発は、臨床学的・学術的にも非常に価値が高い。またアミロイド線維形成のプロセスは、核形成と線維伸長の 2 段階に大別され、凝集核が一定のサイズまで成長するとアミロイド線維の形成速度は急激に増大する。よってアミロイド線維の形成には、初期段階で見られる凝集核の存在が重要と考えられる。

その一方で、申請者の先行研究では、一部の小型球状蛋白質がシンプルな立体構造に反して複雑な熱転移をしており、熱変性した蛋白質が高温で可逆的なオリゴマー (RO; Reversible Oligomer) を形成したのが原因であると特定した。例えば示差走査型熱量計 (DSC; Differential Scanning Calorimetry) のサーモグラムでは、2 本の吸熱ピークが観測されたことから、少なくとも 2 段階で熱変性が進行していると考えられる。さらに結晶構造中のオリゴマー接触面に存在する疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸に一残基置換することで、野生型の構造や機能に殆ど影響することなく、RO の阻害に成功した。以上の結果から、僅か一残基のアミノ酸置換によって、小型球状蛋白質の複雑な熱転移を制御可能であると示唆された。そこで申請者は、高温で形成された RO がアミロイド線維の初期段階で生じる凝集核ではないかと仮説を立て、僅か一残基のアミノ酸置換によって RO を不安定化することで、間接的にアミロイド線維の抑制を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、様々な種類の小型球状蛋白質に対して、アミロイド線維形成を効果的に抑制するための分子設計法の開発を目指した。このとき RO に関する先行研究で獲得した知見を基に、結晶構造中のオリゴマー接触面に存在する疎水性アミノ酸が RO 形成に重要であると考え、親水性アミノ酸へと一残基置換する手法をとった。

また本研究では、脳の神経細胞のシナプス後肥厚に存在する足場蛋白質を由来とする PSD95-PDZ3 をモデル蛋白質とした (以降、PDZ3 とする)。PDZ3 は分子量 11 kDa の単ドメインから成る小型球状蛋白質で、60 で熱変性したときに半径 2.6 nm のオリゴマーを形成しており、さらに 60 で加熱し続けると最終的にアミロイド線維へと成長することが判明している。したがって RO がアミロイド線維の前駆体であれば、RO を阻害するためのアミノ酸置換によって、同時にアミロイド線維も抑制できると予想される。

3. 研究の方法

(1) 変異体設計

はじめに PDZ3 の X 線結晶構造を調べ、分子表面に露出した 7 種類の疎水性アミノ酸をターゲットにし、どれか 1 つを親水性のアラニンに一残基置換することで 7 種類の変異体を設計した。またターゲットに選んだ 7 種類の疎水性アミノ酸のうち、V328・F340・L342・I389 はグループ 1 (オリゴマー接触面に存在する)、V315・L349・V365 はグループ 2 (オリゴマー接触面から離れている) へそれぞれ分類した。

(2) 示差走査熱量計 (DSC; Differential Scanning Calorimetry)

凍結乾燥した目的蛋白質を純水に溶かした後、50 mM K-Phosphate buffer (pH 7.5) を外液に用いて 4 で一晚透析し、限外濾過で蛋白質凝集を除去した後、分光光度計で蛋白質濃度を 0.50-1.0 mg/mL に調整した。次にサンプルの超音波脱気を行ってから、VP-DSC 装置 (Microcal, USA) の内部セルにサンプル 500 μ L をインジェクトし、温度範囲 20-110、昇温速度 +1.0 /min でセル内部の温度を上昇させていった。そして観測された DSC サーモグラムの低温および高温のベースラインをとって非線形最小二乗フィッティングを行い、変性中点温度 (T_m)、変性エンタルピー ($H(T_m)$) などの熱力学的パラメーターを算出した。

(3) 透過型電子顕微鏡 (TEM; Transmission Electron Microscope)

DSC 測定と同じ条件のサンプルを 60 で 1 週間インキュベートし、純水で 10 倍希釈してから酢酸ウラニルでネガティブ染色した。そのサンプル 5 μ L を銅グリッドの上にスポットしてから脱水処理を済ませ、JEM-1400 (JEOL, Japan) でアミロイド線維の画像撮影を行った。

4. 研究成果

(1) DSC 測定

PDZ3 野生型では2本の吸熱ピークが観測されており、非線形最小二乗フィッティングの結果、その熱転移モデルは $4N-1_4-4D$ となった。つまり低温側のピークではモノマーが熱変性してテトラマーを形成しており、高温側のピークではテトラマーがさらに高温でモノマーへと解離したとみなせる。このように PDZ3 野生型では、高温での R0 形成を原因とする複雑な熱転移が起きたと考えられる。

ところが7種類の PDZ3 変異体のうち、2種類の変異体 (F340A と L342A) では、1本の吸熱ピークが観測され、 T_m の値に蛋白質濃度依存性が見られないことから、その熱転移モデルは N-D と解析された。つまり熱変性反応は1段階で進行し、モノマーが熱変性してもモノマーのままだとみなせる。したがって2種類の変異体では、高温での R0 形成を阻害できたと考えられる。

またグループ1に属する F340 と L342 を一残基置換すると劇的な変化が見られたのに対して、グループ2に属する疎水性アミノ酸を一残基置換しても、PDZ3 野生型と同様に DSC サーマグラムの吸熱ピークは2本のままであった。したがって R0 形成に重要なのは、分子表面に露出した疎水性アミノ酸の位置であり、表面積の大部分がオリゴマー接触面に埋もれている疎水性アミノ酸をターゲットにすることで、僅か一残基のアミノ酸置換であっても R0 形成に大きな影響を及ぼすものと推測される。

(2) TEM 測定

PDZ3 野生型と2種類の変異体 (F340A と L342A) に注目し、TEM で撮影した画像を比較した。その結果、PDZ3 野生型では紐状につながった線維が見られ、60 で1週間インキュベートしたことでアミロイド線維が十分に成熟したと考えられる。一方、F340A と L342A では断片化された線維や不定形のアモルファス凝集が見られ、アミロイド線維の形成は不十分であった。以上の結果から、R0 形成が阻害された2種類の PDZ3 変異体では、同様にアミロイド線維形成も十分に抑制できると分かった。

(3) リバースエンジニアリング

ここまでの研究では、疎水性アミノ酸を一残基置換してアミロイド線維を抑制することを目指してきた。そこで発想を転換させ、R0 の阻害に成功した変異体 (F340A) をモデルとし、オリゴマー接触面に存在する親水性アミノ酸を、疎水性アミノ酸に一残基置換した。その結果、N326L の変異を新たに導入することで、DSC サーマグラムで再び2本目の吸熱ピークが観測されるようになった。またアミロイド線維を特異的に標識する Thioflavin T 蛍光を測定したところ、PDZ3-F340A N326L では PDZ3 野生型の5倍以上高い値が得られ、アミロイド線維を人工的に形成することが可能となった。アミロイド線維を人工的に形成することに応用的価値は見出しづらいが、「オリゴマー接触面に存在するアミノ酸の疎水性が強いほど、R0 およびアミロイド線維は形成しやすくなる」と判明し、これまで行ってきた一残基置換による分子設計法の方向性が確立された。

(4) 総括

これまでアミロイド線維の形成メカニズムに関する研究は国内外で数多く実施されてきたが、本研究のように「高温での R0 形成」という珍しい物理化学的現象を踏まえながら、「疎水性アミノ酸の一残基置換」のように系統的な変異体設計法を確立した例はまだ報告されていない。したがって本研究で獲得した知見は、僅か一残基のアミノ酸置換で本来の構造・機能を変えずに熱凝集傾向性だけを低下出来る新規分子設計法としての応用性だけでなく、アミロイド線維の前駆体とされる R0 の物性を明らかにした点で、蛋白質科学の研究における独自性・有効性を見出させたと考えている。

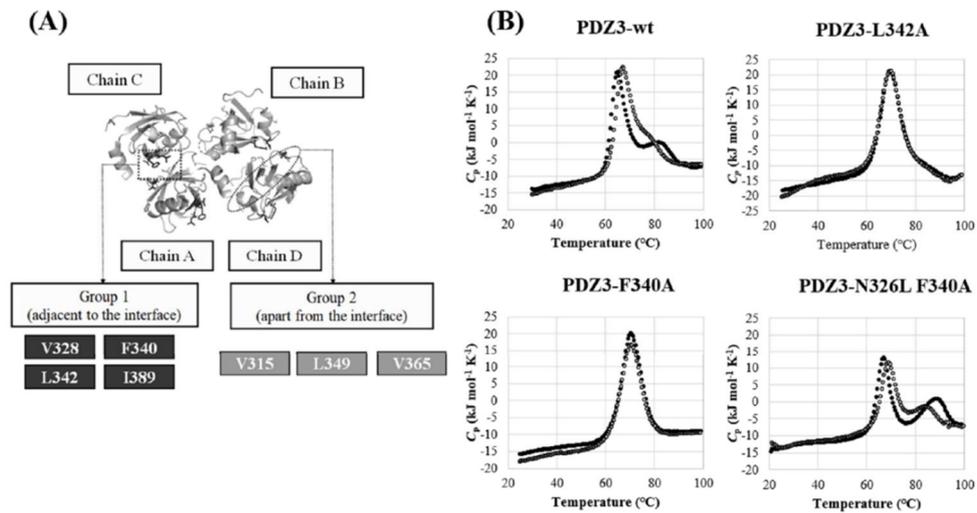


図1 . PSD95-PDZ3 の一残基置換による変異体設計 (A) および DSC サーマグラム (B) [熱測定、50(3) 103-109 2023]

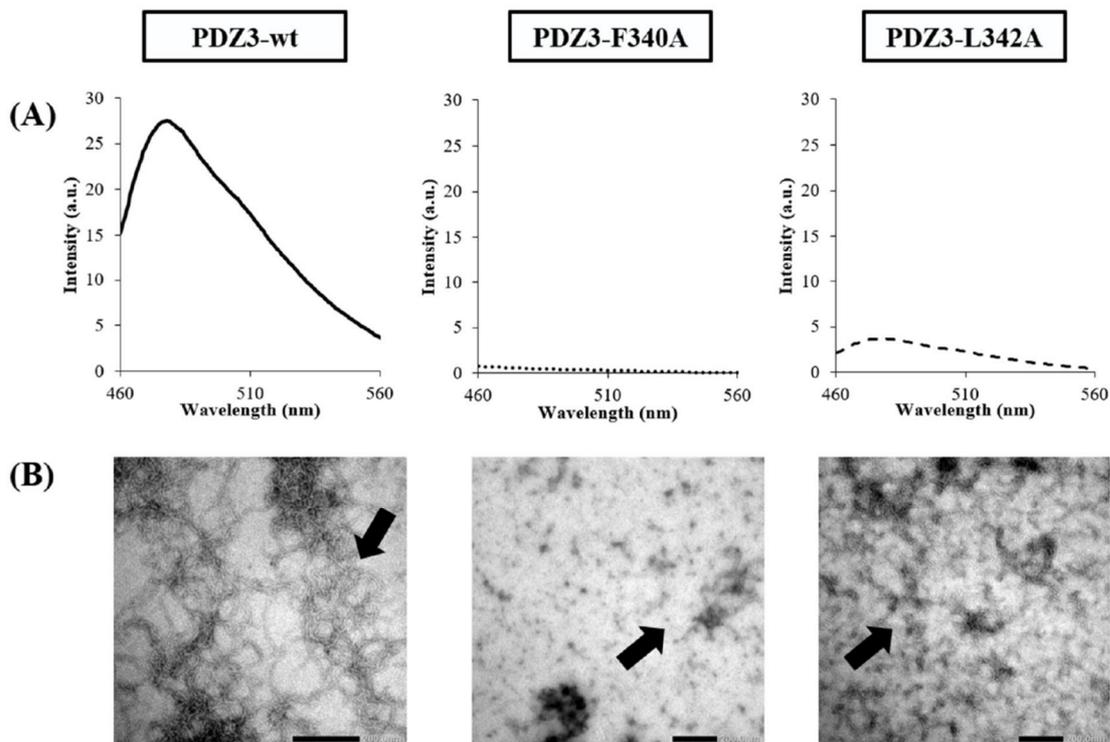


図2 . PSD95-PDZ3 野生型を 60 で 1 週間インキュベートした後の ThioflavinT 蛍光スペクトル (A) および TEM 測定で撮影した写真 (B) [熱測定、50(3) 103-109 2023]

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 早乙女 友規	4. 巻 50
2. 論文標題 小型球状蛋白質の高温での可逆的な オリゴマー (RO) 形成およびアミロイド線維の抑制	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 熱測定	6. 最初と最後の頁 103-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11311/jscta.50.3_103	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 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 T, Onchaiya S, Brindha S, Mezaki T, Unzai S, Noguchi K, Martinez JC, Kidokoro SI, Kuroda Y.	4. 巻 289
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 3205-3216
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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomonori Saotome, Shun-ichi Kidokoro
2. 発表標題 Physicochemical characterization of irreversible oligomers considered precursors of thermal aggregation of hen egg white lysozyme
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomonori Saotome, Sawaros Onchaiya, Brindha Subbaian, Jose Martinez, Yutaka Kuroda, Shun-ichi Kidokoro
2. 発表標題 The reversible oligomerization (RO) of small globular proteins at high-temperature and the artificial suppression of their amyloidogenesis
3. 学会等名 26th International Conference on Chemical Thermodynamics (ICCT-2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomonori Saotome, Shun-ichi Kidokoro
2. 発表標題 The characterization of reversible oligomer (RO) at high temperature and the assessment of thermal aggregation of hen egg white lysozyme
3. 学会等名 第23回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomonori Saotome, Sawaros Onchaiya, Brindha Subbaian, Jose Martinez, Yutaka Kuroda, Shun-ichi Kidokoro
2. 発表標題 Reversible Oligomerization (RO) at high temperature: a trigger of complicated thermal transition of small globular proteins
3. 学会等名 第12回 日本生物物理学会 関東支部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomonori Saotome, Onchaiya Sawaros, Jose C Martinez, Yutaka Kuroda, Shun-ichi Kidokoro
2. 発表標題 PSD95-PDZ3の高温での可逆的なオリゴマー形成における速度論的效果の定量的な評価
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早乙女 友規
2. 発表標題 PSD95-PDZ3の高温での可逆的なオリゴマー（R0）形成およびアミロイド線維の一残基置換による阻害
3. 学会等名 第62回 新潟生化学懇話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早乙女 友規, Onchaiya Sawaros, 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

1. 発表者名 早乙女 友規, Onchaiya Sawaros, 目崎 太一, Martinez Jose, 城所 俊一, 黒田 裕
2. 発表標題 PSD95-PDZ3の一残基置換による高温での可逆的なオリゴマー（R0）形成の阻害およびアミロイド線維の抑制
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 2021年11月27日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sawaros Onchaiya, Tomonori Saotome, Shun-ichi Kidokoro, Jose C. Martinez, Yutaka Kuroda
2. 発表標題 Reverse engineering of high-temperature reversible oligomers and amyloids in PDZ3
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
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
---------	---------