

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19224

研究課題名（和文）ポリリン酸に依存した蛋白質凝集とその生理的意義の探索

研究課題名（英文）Polyphosphate-dependent protein aggregation and its biological significance

研究代表者

後藤 祐児（Goto, Yuji）

大阪大学・大学院工学研究科・特任研究員

研究者番号：40153770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ポリリン酸は、リン酸がエステル結合によって直鎖状に重合した高分子であり、細菌からヒトまで広く存在する。ポリリン酸は強い蛋白質凝集作用をもつことから、生体においてもアミロイドーシスの発症、さらには老化を左右する重要な因子である可能性がある。本研究では、ポリリン酸によるアミロイド形成機構を研究し、その効果が、静電的相互作用やホフマイスター塩析効果によって説明できることを示した。なお、ポリリン酸に対する特異抗体を作製して、生体においては微量に存在するポリリン酸の変化や分布を検出することを目指したが、効果的な抗原を作成することができず、特異抗体の作製には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリリン酸は無味無臭で強い保水効果をもつことから、食品、飲料に添加されている。他方、リン酸が高度に重合したポリリン酸は、蛋白質凝集、アミロイド線維形成を強く促進するなど、生命機能における意義や、食品添加物としての妥当性に懸念がある。本研究は、これらを追求するものであり、ポリリン酸の効果やその作用機構の基盤を明らかにすることができた。本研究の成果をもとにさらに生命機能における意義や、食品添加物としての妥当性をさらに追及することができれば、より安全で安心な社会の構築につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Polyphosphate (polyP), consisting of up to 1,000 phosphoanhydride bond-linked phosphate monomers, is one of the most ancient, enigmatic, and negatively charged molecules in biology. Because polyP is present all around us, from cellular components to food additives, clarifying its effects and consequent biological roles will be important to further advance our understanding of amyloid fibrils and related topics. We studied the effects of polyP on amyloid fibril formation of beta2-microglobulin and alpha-synuclein and showed that amyloid fibril formation of both beta2-microglobulin and alpha-synuclein could be accelerated by counter anion-binding and preferential hydration at relatively lower and higher concentrations of polyP, respectively, depending on the chain length of polyP. On the other hand, although we challenged to prepare antibodies specific to polyP, we could not achieve the goal because the preparation of protein antigens with polyP attached was difficult.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：蛋白質 生体分子 老化 蛋白質凝集 アミロイド線維 過飽和 溶解度 相転移

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシス：ゆで卵の白身に象徴されるように、凝集は蛋白質の基本的な特徴である。特にアミロイド線維と呼ばれる規則的な凝集は、アミロイドーシスと総称されるさまざまな疾病の原因となる。アミロイドーシスには、アルツハイマー病（アミロイド $\beta$ ）、パーキンソン病（ $\alpha$ -シヌクレイン）、透析アミロイドーシス（ $\beta$ 2ミクログロブリン）など30種類を超える種類があり、カッコ内の原因蛋白質がアミロイド線維を形成して発症する。アミロイドーシスには、遺伝性、加齢（孤発）性、感染性の3つのタイプがある。加齢性アミロイドーシスの第一の危険因子は、原因蛋白質の増加であるが、透析アミロイドーシスの研究から、原因蛋白質濃度の上昇した患者の全員がアミロイドを発症するわけではないことがわかっている。従って、原因蛋白質の増加に加えて、重要な因子が存在すると考えられるが、その詳細は不明である。

ポリリン酸は、リン酸がエステル結合によって数十個以上に直鎖状に重合した高分子である。ヒトでは、重合数が70程度のポリリン酸が1 mM程度、血小板内に存在する。ポリリン酸は生体に必須なリン貯蔵物質の役割を担うと考えられている。リン酸あるいはポリリン酸は、酢酸や塩酸と異なり無味無臭である。特にポリリン酸は、水和による保湿作用が強いことから、乾燥防止のための食品添加剤として、ハムやソーセージをはじめとするさまざまな食品に添加されている。コーラなどの清涼飲料水にも含まれている。なお、コーラのpHは2.5と胃酸に匹敵するが、意外なことに酸味は全くない。また、ポリリン酸は歯の美白に効果があるとして、歯磨きペーストに含まれていることもある。他方、リン酸カルシウム結石の形成など、リン酸の危険性が指摘されている。このため、リン酸の排泄が困難な血液透析患者では、リン酸塩を多く含むコンビニの食品は避けるように指導されている。

2016年、ある高等学校からの質問を端緒として代表者は、「コーラに少量の牛乳を混ぜると、牛乳が著しく凝集する現象（ネットで多くの動画あり）」に興味をもった。もともと牛乳はコロイド状態にあり濁っているが、コーラに加えると、牛乳は著しく凝集・沈殿する。これを調べた結果、牛乳を凝集させる物質は、コーラに含まれるポリリン酸であることを突き止めた。その後、ポリリン酸は、透析アミロイドーシスの原因蛋白質である $\beta$ 2ミクログロブリンのアミロイド線維形成を強く促進することを明らかにした[Zhang et al., PNAS, 116, 12833-12838 (2019)]。

### 2. 研究の目的

以上より、ポリリン酸はアミロイド線維形成の促進因子であり、生体においてもアミロイドーシス発症、さらには老化を左右する重要な因子である可能性が考えられる。本研究の目的は、「ポリリン酸に対する抗体を作製し、抗体を用いた生体におけるポリリン酸のアッセイ方法を確立することにより、ポリリン酸の役割を探索すること」である。なお、化学反応を用いたリンの定量は、健康診断における血液検査のチェック項目にも含まれているが、生体におけるポリリン酸の、精度の高い定量法はない。また、ポリリン酸に依存したアミロイド線維形成を「溶解度」や「過飽和」に基づいて理解することも目指した。

### 3. 研究の方法

ポリリン酸に対する抗体を作製する。透析患者血清を用いたパイロット研究を行い、ポリリン酸とアミロイド発症リスクとの関係を明らかにする。 $\beta$ 2ミクログロブリン（ $\beta$ 2ミクログロブリン）、加齢性全身性アミロイドーシス（トランスサイレチン）などのアミロイドーシスについても、ポリリン酸の定量的アッセイを広げる。ポリリン酸は広く老化全般のバイオマーカーとなる可能性があり、そのような可能性を探索する。また、ポリリン酸による凝集促進機構を、「溶解度」や「過飽和」に基づいて蛋白質構造物性的に検証する。

### 4. 研究成果

(1)ポリリン酸に対する抗体作製:ポリリン酸の抗原活性を高めるためには、血清アルブミンなどのキャリア蛋白質に結合させることが重要である。そこで、マレイミド基を持つポリリン酸を化学合成し、これをキャリア蛋白質に結合させて抗原とすることを計画した。ポリリン酸の合成には核酸合成法の一つであるホスホロアミダイト法を応用し、実験条件等の課題から従来用いられる固相法ではなく液相法を選択した。反応生成物の有無はESI-MSで確認したが、目的の質量値を得ることができず、多くの副反応物が生成された。副反応を抑えるために、アミダイト試薬や保護基の変更など、さまざまな条件でポリリン酸にマレイミド基の導入を試みたが、マレイミド導入ポリリン酸の合成効率を改善することができず、効果的な抗原が作成できなかった。このためポリリン酸に対する抗体作製は中止し、異なった視点から、ポリリン酸に関する研究を進めた。

(2)液液相分離:ポリリン酸は酵母においては液・液相分離を引き起こし、「ポリリン酸グラニュール」を形成することが知られている。これを追求する中で、デキストラン(DEX)とポリエチレングリコール(PEG)のドロップレットが、 $\beta$ 2ミクログロブリンのアミロイド線維形成を強く誘導することを見出した。ドロップレットによるアミロイド促進モデルとして、DEX/PEGの作用機構を検討した。その結果、PEG溶媒中でDEXが形成するドロップレットの外側においてアミロイド形成が



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 山口圭一、中島吉太郎、後藤祐児	4. 巻 53 (9)
2. 論文標題 ポリリン酸が引き起こすアミロイド線維形成機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 571-574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yamaguchi Keiichi、Nakajima Kichitaro、Goto Yuji	4. 巻 20
2. 論文標題 Mechanisms of polyphosphate-induced amyloid fibril formation triggered by breakdown of supersaturation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v20.0013	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0件

〔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	八木 寿梓 (Yagi Hisashi) (10432494)	鳥取大学・工学研究科・准教授  (15101)	

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