

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19284

研究課題名（和文）アミロイド形成を理解する相分離仮説の実証と共溶質の開発

研究課題名（英文）Study on phase separation to understand amyloid formation and development of additives

研究代表者

白木 賢太郎（Shiraki, Kentaro）

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：90334797

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）：タンパク質は凝集や相分離、ゲル化、アミロイド化などの多様な状態をとるのが特徴である。特にタンパク質の液滴から凝集体への状態変化は、疾患の原因解明につながるため注目を集めている。本研究ではタンパク質の相分離と凝集の状態を合理的に制御することを目的とした。その結果、相図を活用することで合理的に理解できることを明らかにした。さらに、狭小空間の方がアミロイドの核形成が遅くなること、液滴にフォールドしたタンパク質が取り込まれるときに多相化すること、液滴のサイズは低分子のATPで制御できることなども発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質の凝集と相分離の状態変化を、どうすれば合理的に理解し、制御できるのかというタンパク質に固有の難しい課題にチャレンジした。古典的な相図を用いることで、相分離した状態を安定に保つ条件と、凝集へと成熟する条件が見分けられることがわかった。このようなタンパク質の凝集と相分離のメカニズムの理解が深まれば、バイオ医薬品の安定化や、食品タンパク質の性質の制御など、タンパク質に関連する産業に広く役立つ情報を提供できる。

研究成果の概要（英文）：Proteins are characterised by their diverse states, including aggregation, phase separation, gelation and fibrilization. In particular, the change of state of proteins from droplets to aggregates has attracted much attention because it can lead to the elucidation of the causes of diseases. The aim of this study was to rationally control the phase separation and aggregation of proteins. Our results showed that they can be rationally understood by utilising phase diagrams. We also found that amyloid nucleation is slower in narrower spaces, that proteins folded into droplets become multiphase when they are incorporated, and that droplet size can be controlled by small molecule ATP.

研究分野：蛋白質溶液学

キーワード：タンパク質 凝集 相分離 アミロイド

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は多様な形状や状態を形成する。例えば、溶液に分散しているタンパク質は加熱すると、立体構造が壊れてアンフォールドする。アンフォールドしたタンパク質は、低濃度の場合には顆粒状の凝集体を形成し、高濃度の場合にはゲル化する。さらには高濃度のタンパク質溶液を低温においておくとオパレッセンスと呼ばれる乳白色の状態になったり、液-液相分離が起こったりもする。また、タンパク質溶液に塩を添加すると沈澱が生じたり、立体構造が壊れたりする。タンパク質は高分子の有機化合物であるため、もちろん溶液の条件によっては加水分解や酸化などの化学的な変化も容易に生じる。このようなタンパク質の状態の変化はきわめて複雑であり、タンパク質の基礎研究が困難になる原因になっている。同時にこのような状態変化を理解し、制御する方法ができれば、医薬品や食品、美容品などタンパク質が関連する多くの産業にも役立つと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質の相分離液滴や凝集体の形成に焦点をあて、どのような条件でそれぞれの状態を形成するか、または液滴から凝集体へと状態を変化させるのかを明らかにすることを目的とした。特にアミロイドと呼ばれる不溶性状態は疾患にも深く関連するため、液滴からアミロイドへの形成がどのような条件で生じるのかについて、定量的な解析を行う実験系の構築を試みた。タンパク質の状態変化を定量化することがもともとチャレンジングな課題であり、これまで開発してきた共溶質を用いるだけでなく、表面や空間サイズとの関連も想定する必要がある。また、定量化には古典的な相図の概念や、最新の1分子計測の画像解析なども取り入れる必要がある。

## 3. 研究の方法

(1) 実験の対象として、プリオン様の液滴を形成することが知られている酵母由来の Sup35 ペプチドを用いた。Sup35 ペプチドを用いて固定化した、マイクロメートルの大きさの液滴の中で形成されるアミロイドを画像解析するシステムを構築した。

(2) フォールドしたタンパク質でも液-液相分離が生じることを広範な溶液条件で精査するために、卵白リゾチームとオボアルブミンの系を用いた。このとき表面の影響を精査するために6種類の異なる化学的性質を持つガラスを準備した。

(3) 低分子と高分子の組み合わせによる液滴は、タンパク質混合物の液滴とは異なるのかを調べるため、ATP とポリリシンを対象に検討した。このとき、液滴の形成と消失を画像解析するために濃度勾配を用いる実験系を構築した。

(4) 古くから知られる高分子電解質によるコンプレックスコアセルベートを液滴のモデル系として、液滴への酸化酵素や加水分解酵素などの安定でフォールドした酵素の取り込みの過程を視覚化し、時間による液滴の状態変化を分析した。

## 4. 研究成果

(1) マイクロサイズの液滴中でのアミロイド形成：マイクロメートルサイズのさまざまなサイズの液滴をゲル中に固定し、その中でのアミロイドの形成を計測する技術を開発した。Sup35 ペプチドの核形成を計測したところ、臨界濃度より高濃度では相分離によって核形成が抑制され、それより低い濃度では核形成が促進された。従来の仮説ではアミロイドの形成は相分離液滴の中で促進されると予想されていたが、意外なことに核形成の速度が遅くなったのは興味深い実験データである。Anal Chem. 2023;95(26):9855-9862

(2) ヘテロタンパク質の濃縮体への界面と分子の共存溶質の効果：フォールドした2種類のタンパク質が液-液相分離することを、相図を用いることで詳細な条件を明らかにした。リゾチームとオボアルブミンをガラス表面で混合すると、混合比によって液滴と凝集体、分散した状態の3種類に分類できた。リシンを添加剤として用いると液滴が溶けたが、ガラス表面にアミン化合物をコーティングしても溶けないことがわかった。タンパク質の液-液相分離には広く、フォールドした領域に結合した天然変性領域が関連するとされてきたが、フォールドしたタンパク質だけでも2種類を混合すると相分離が生じることを明らかにした。Int J Biol Macromol. 2024;254(Pt 3):128095.

(3) ポリリシン・ATP による液-液相分離の相図による分析：相図 (Phase Diagram) は、物質の相状態を表現し理解するツールとして古くから活用されてきた。この研究では、低分子の ATP とアミノ酸ポリマーであるポリリシンによる単純な系を用いて、相図を利用することで相分離が生じる厳密な条件を設定する方法を提案した。濃度勾配を形成させる系を構築し、液滴が生成する系を直接観察した。ここで作成した相図を利用することで、ポリリシン・ATP の液滴に免疫グロブリン G が導入される条件を推測できた。Langmuir. 2023;39(48):17043-17049.

(4) 液滴へのタンパク質の取り込みによる多相化：高分子電解質によって形成させた液滴 (コンプレックスコアセルベート) は、立体構造を形成したタンパク質であるリゾチームやオボアルブミン、ピルビン酸オキシダーゼをどのようなプロセスで取り込むのかを画像解析によって調べた。その結果、フォールドしたこれらのタンパク質は外液ごと液滴に取り込まれ、液滴の中に希薄相の液滴が形成されることがわかった。この多相化した状態は数時間の幅で安定であった。複数の希薄相の液滴がコンプレックスコアセルベートの中にあると、互いに接触して数秒で単一の液滴になった。Soft Matter. 2023;19(25):4642-4650.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 Nobeyama Tomohiro, Furuki Tomohiro, Shiraki Kentaro	4. 巻 39
2. 論文標題 Phase-Diagram Observation of Liquid-Liquid Phase Separation in the Poly(L-lysine)/ATP System and a Proposal for Diagram-Based Application Strategy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 17043 ~ 17049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.3c01640	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 Sakakibara Nanako, Ura Tomoto, Mikawa Tsutomu, Sugai Hiroka, Shiraki Kentaro	4. 巻 19
2. 論文標題 Transient formation of multi-phase droplets caused by the addition of a folded protein into complex coacervates with an oppositely charged surface relative to the protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 4642 ~ 4650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2sm01422j	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 Fukuyama Mao, Nishinami Suguru, Maruyama Yoko, Ozawa Taiki, Tomita Shunsuke, Ohhashi Yumiko, Kasuya Motohiro, Gen Masao, Chatani Eri, Shiraki Kentaro, Hibara Akihide	4. 巻 95
2. 論文標題 Detection of Fibril Nucleation in Micrometer-Sized Protein Condensates and Suppression of Sup35NM Fibril Nucleation by Liquid-Liquid Phase Separation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 9855 ~ 9862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c00766	査読の有無 無
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 Nobeyama Tomohiro, Yoshida Toya, Shiraki Kentaro	4. 巻 254
2. 論文標題 Interfacial and intrinsic molecular effects on the phase separation/transition of heteroprotein condensates	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 128095 ~ 128095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2023.128095	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Shiraki
2. 発表標題 Control of protein aggregation by small additives
3. 学会等名 International Powder and Nanotechnology Forum 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白木賢太郎
2. 発表標題 相分離生物学の基礎としてのタンパク質の凝集や相分離
3. 学会等名 関東高分子若手研究会2023（招待講演）
4. 発表年 2023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	菅井 祥加  (Sugai Hiroka)  (10905566)	東京工業大学・国際先駆研究機構・特任助教    (12608)	

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