JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	小分子添加によるタンパク質加熱凝集の制御
Author(s)	工藤，基徳
Citation	
Issue Date	2006-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2186
Rights	
Description	Supervisor:高木　昌宏，材料科学研究科，博士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

博士論文概要

小分子添加によるタンパク質加熱凝集の制御

高木研究室　学籍番号 340016　氏名　工藤基徳

【研究の背景・目的】

タンパク質は常に唯一の立体構造を持つのではなく、溶媒条件によってその構造が変化する。変性したタンパク質は会合して凝集体を形成する。特に、疎水性領域に富む膜結合型タンパク質や複合体を形成するタンパク質は凝集体を形成しやすい。タンパク質の凝集体はタンパク質本来の活性がないばかりでなく毒性を持つ場合もあるので、医療や工業の分野において重大な問題となっている。タンパク質の凝集体形成は立体構造に依存した会合反応なのでタンパク質濃度や pH、温度などの条件を制御するだけでも、ある程度制御することが可能である。しかし、産業レベルにスケールを拡大した場合には、より効果的でしかも簡便な凝集の抑制法が必要となる。特に、小分子の添加による凝集抑制法は、透析や脱塩カラム等で容易にタンパク質と小分子が分離できる利点があるが、これまでにアルギニンなど数種類の小分子だけが凝集抑制剤として利用されているにすぎず、その効果も十分でない。そこで本研究では小分子の添加によって凝集体形成を制御することを目的とした。

【結果】

凝集抑制小分子を探索するためのモデルタンパク質としてニワトリリゾチームを選択した。リゾチーム溶液に任意の濃度の小分子を添加した後、加熱することで凝集体を形成させた。上清に残るタンパク質濃度および残存活性を測定することで小分子の凝集抑制効果を評価した。芳香族と難溶性アミノ酸を除く 15 種類のアミノ酸の凝集抑制効果を網羅的に比較したところ、側鎖に電荷を持つアミノ酸、特に塩基性のアミノ酸は凝集抑制効果を持つことが明らかとなった(Fig. 1)。

次に、アミノ酸を改変し、さらに凝集抑制効果のある小分子について探索した。結果としてカルボキシル基をエステル化した化合物であるアミノ酸エステルには、アルギニンより高い凝集抑制効果をもつことを発見した。また、超好熱菌内に多く存在するアミノ基を多く持つ分子であるポリアミンについて凝集抑制効果を測定した。ポリアミンであるスペルミンやスペルミジンは、アルギニンより高い凝集抑制効果を持つことが分かった(Fig. 2)。

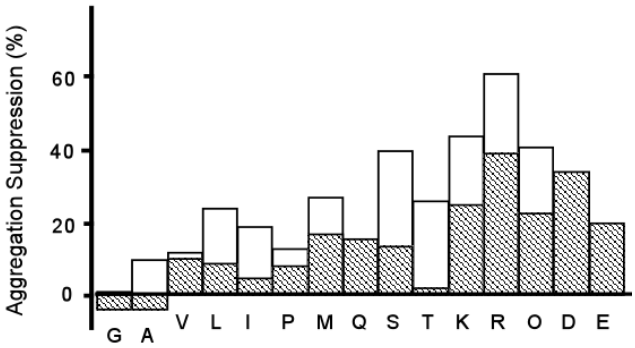

Figure 1. Preventive effect of amino acids on heat-induced aggregation of lysozyme. Inserted letters show the single letter code for amino acids as additives. Soluble lysozyme concentration after heat-induced denaturation at 98°C for 30 min with 200 mM (open bars) and 50 mM (shaded bars) of each amino acid. Data for Q, D, and E at 200 mM could not be determined because of the low solubility of the amino acids in the buffer. Q, D, and E at 200 mM could not be determined because of low

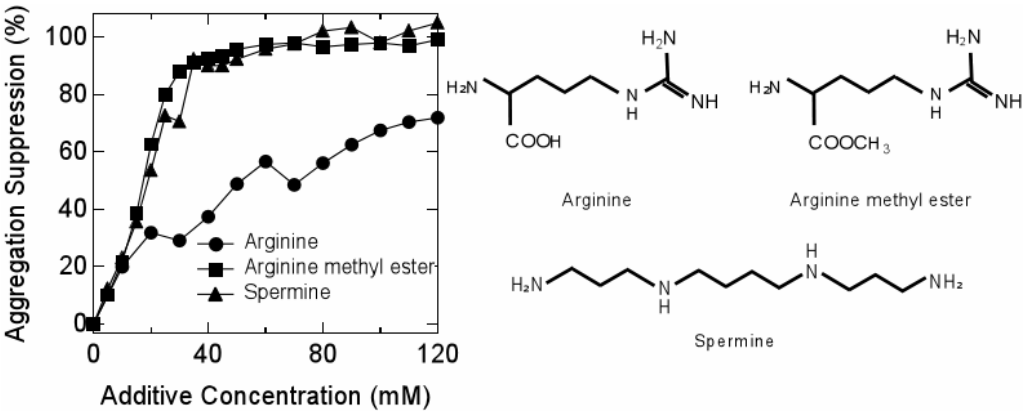

Figure 2. Aggregation suppression of lysozyme after the heat treatment at 98˚C for 30 min. The samples were 0.2 mg/ml lysozyme in 50 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5) with various concentrations of additives. Arg, closed circles; Arg methyl ester, closed squares, Spermine closed triangles.

超好熱菌におけるポリアミンの役割はまだ不明であるが、アミノ基が多いことからポリアミンにはタンパク質の凝集体形成を抑制する役割を担っていることが考えられた。アミノ酸エステルやポリアミンの添加はリゾチームの熱安定性を向上させなかったので、タンパク質の変性するプロセスを防ぐのではなく変性したタンパク質の会合を抑制することが考えられた。

タンパク質の凝集体形成の知見を得るためにはネイティブ構造の残存量を測定するだけでは不十分であり、凝集体形成のプロセスを理解することが必要である。そこで、ナタ豆コンカナバリンAをモデルタンパク質として選択し凝集体形成を動的に観察した。コンカナバリンAはアミノ酸配列にシステインがなく、アポ体にすることで凝集しやすいので凝集体形成の観察に都合が良い。

円偏光二色の観察から加熱によるコンカナバリンAの構造変化には中間体が存在することが明らかとなった。また、塩添加が凝集体形成に与える影響を分光光度計で調べたところ、可溶性のオリゴマーどうしが会合して凝集体が成長しただけではなく、可溶性のオリゴマーにモノマーが付加して凝集体が成長することが考えられた。

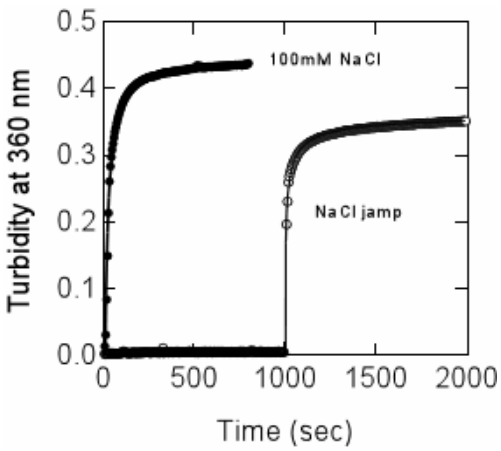

Figure 3. Salt-jump experiment monitored by turbidity at 360 nm. Representative data of the effect of salt jump on heat-induced aggregation monitored by turbidity at 360 nm. Control experiment (closed circles): The sample containing 4.7 μM aConA with 100 mM NaCl was subjected to the temperature jump from 20°C to 60°C. Salt-jump experiment (open circles):

コンカナバリンAの加熱凝集体の特徴を調べるために、タンパク質研究でよく用いられている疎水面を認識するプローブ（アニリノナフタレンスルホン酸）と分子間のβ構造を認識するプローブ（チオフラビンT）をそれぞれ添加した。どちらのプローブを添加しても蛍光を発したので、コンカナバリンAの凝集体はタンパク質の変性に伴って露出した疎水面どうしの会合と分子間β構造で形成されていることが分かった。これらプローブの凝集抑制効果を調査したところ、アニリノナフタレンスルホン酸は溶媒の塩濃度に関わらずコンカナバリンAの加熱凝集体の形成を抑制したが、チオフラビンTは塩濃度が低い場合には凝集体の形成を促進し、塩濃度が高い場合には凝集体

の形成を抑制した。これらのプローブの添加は十数μM の濃度でタンパク質の凝集体形成を抑制することができた。

【考察】

タンパク質の凝集を抑制する小分子の探索は、アルギニンの発見以降、広くは行われていない。今回、アミノ酸による凝集抑制効果は側鎖によるものと推定できたことは、より効果が高い凝集抑制剤を合成する上で非常に意義深い。また、アミノ酸の誘導体や類似構造を探索することでアミノ酸エステルやポリアミンに著しい凝集抑制効果があることを発見できた。今後、コンビナトリアルケミストリーを用いてアミノ酸エステルやポリアミンの化学構造を改変し、より凝集抑制効果が高い小分子を合成することが期待される。

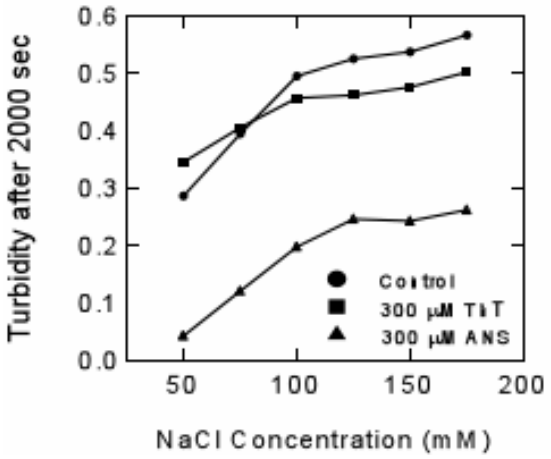

Figure 4. Turbidity dependence on NaCl concentration in presence of ANS and ThT. Turbidities after heating for 2000 seconds in the absence (closed circles), or presence of 300 μM ThT (closed squares), and ANS (closed triangles).

凝集体の形態は、モノマーであるタンパク質の変性の程度と凝集のプロセスによって決められている。これまでに凝集のプロセスが研究されている例にアミロイド線維がある。アミロイド線維とは直径 10nm 程度の細長い構造のタンパク質凝集体であり、約 20 種類の疾患の原因と知られている。アミロイド線維が形成する場合には、はじめに核が形成され、その後に核が伸長して線維になるという二段階形成モデルが考えられている。アミロイド線維のカギである核は、可溶性のオリゴマーと考えられている。核がどのような相互作用で形成されているのか、どのくらいの大きさなのか？ということはいまだに不明である。しかも、細胞毒性は線維よりもむしろ小さいオリゴマーが強いことが知られており、オリゴマーの形成が近年注目されている。

コンカナバリン A の加熱凝集体形成を動的に追跡したところ、可溶性のオリゴマの存在を確認できた。加熱凝集体形成のプロセスには、可溶性のオリゴマーどうしが単に会合するだけではなく、モノマーがオリゴマーに結合する反応も含まれていることが明らかとなった。つまり、加熱凝集体形成のプロセスにもアミロイド線維形成と同様の反応が含まれていることを示している。このオリゴマーがアミロイド線維の形成に関与するオリゴマーと同じか否かということは非常に興味深い点である。

コンカナバリンＡの加熱凝集体にもアミロイド様の構造が含まれていることが蛍光プローブによる観察から示唆された。アミロイド線維は凝集体内部にある分子間β構造によってアミロイド線維は安定化されており、界面活性剤による変性やプロテアーゼによる加水分解を受けにくい。アミロイド線維は多数のタンパク質が分子間β構造で規則的に結合した凝集体である。アミロイド線維と加熱凝集体の安定性の違いはβ構造の規則性によるものと考えられる。

【まとめ】

本研究は、タンパク質の凝集体形成を抑制する新規の凝集抑制分子であるポリアミンとアミノ酸エステルを発見した。これらの分子はタンパク質の熱安定性を向上させるのではなく、タンパク質どうしの会合を抑制すると考えられた。また、加熱凝集体の形成におけるプロセスを解析することで加熱凝集体でも可溶性のオリゴマーが観察できた。加熱凝集体の内部にもアミロイド線維と類似のβ構造が存在することを明らかにした。

【論文目次】

Chapter 1
General introduction **1**
Chapter 2
Effects of amino acids on the prevention of heat induced aggregation of HEL **9**
Chapter 3
Amino Acid Esters Prevent Thermal Inactivation and Aggregation of HEL **22**
Chapter 4
Prevention of thermal inactivation and aggregation of HEL by polyamines **33**
Chapter 5
Stretched-exponential analysis of heat-induced aggregation of aConA **44**
Chapter 6
Thioflavin T and 8-anilino-1-naphthalenesulfonate recognize the thermal aggregation of aCon A **62**
Chapter 7
General conclusion **78**

【業績】

Kentaro Shiraki, Motonori Kudou, Shinsuke Fujiwara, Tadayuki Imanaka, and Masahiro Takagi. Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation. J. Biochem., 132(2002)591-595.

Motonori Kudou, Kentaro Shiraki, Shinsuke Fujiwara,Tadayuki Imanaka, and Masahiro Takagi. Prevention of thermal inactivation and aggregation of lysozyme by polyamines. Eur. J. Biochem., 270(2003)4547-4554.

Kentaro Shiraki, Motonori Kudou, Shingo Nishikori, Harue Kitagawa, Tadayuki Imanaka, and Masahiro Takagi. Arginine ethylester prevent heat inactivation and aggregation of lysozyme. Eur. J. Biochem., 271(2004) 3242-3247.

Kentaro Shiraki, Motonori Kudou, Ryusuke Sakamoto, Itaru Yanagihara, and Masahiro Takagi. Amino acid ester prevent thermal inactivation and aggregation of lysozyme. Biotechnol. Prog., 21(2005) 640-643.

Motonori Kudou, Kentaro Shiraki, and Masahiro Takagi. Stretched-exponential analysis of heat-induced aggregation of apo-concanavalin A. Protein J., 24(2005)193-199.

Motonori Kudou, Kentaro Shiraki, and Masahiro Takagi. Thioflavin T and 8-anilino-1-naphthalenesulfonate recognize the thermal aggregation of apo-concanavalin A. in preparation