

解説

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

早乙女 友規

長岡技術科学大学 物質生物系

(受取日: 2023年5月2日, 受理日: 2023年6月2日)

The Reversible Oligomerization (RO) of Small Globular Proteins at High-Temperature and the Inhibition of Their Amyloidogenesis

Tomonori Saotome

Department of Materials Science and Bioengineering, Nagaoka University of Technology

(Received May 2, 2023; Accepted June 2, 2023)

Small globular proteins have a compact structure; therefore, their thermal denaturation is described using a two-state model ($N \rightleftharpoons D$). However, some protein structures exhibited an exception to the two-state mode as implied by the two endothermic peaks in the DSC thermograms, indicating the occurrence of a complicated thermal transition ($nN \rightleftharpoons l_r \rightleftharpoons nD$) at high temperatures. The detailed analysis of DSC results indicated that this irregular phenomenon in the thermal denaturation of small globular proteins could be attributed to a reversible oligomerization (RO) at high temperature. RO was significantly destabilized by a single mutation in the hydrophobic amino acid at the interface of the crystallographic oligomer in the native state. The destabilization of the RO of PSD95-PDZ3 resulted in the inhibition of the amyloid fibrils generated by the incubation at 60°C for 1 week. Therefore, RO was hypothesized as the precursor of protein thermal aggregation, and this observation would enable us artificially control the thermal aggregation tendency of proteins.

Keywords: protein thermal aggregation, reversible oligomerization, differential scanning calorimetry, hydrophobic amino acid, amyloid fibrillation.

1. はじめに

蛋白質はアミノ酸が直鎖状に重合してできる生体高分子で、ポリペプチド鎖が折り畳まれて特定の立体構造を形成することで様々な生理活性を発揮する。このとき蛋白質が固有の立体構造を形成していれば天然 (N; Native) 状態、立体構造が崩壊すれば変性 (D; Denatured) 状態と呼ばれる。蛋白質の立体構造の安定性は、N 状態と D 状態のギブスエネルギー差 (ΔG) で表されるが、その値は非常に小さい ($\Delta G = 5 \sim 10 \text{ kJ mol}^{-1}$ 程度)。すなわち蛋白質は、pH・温度・変性剤濃度などの影響を受けやすく、僅かな環境の変化によって容易に変性してしまう。したがって本来の生理活性が維持される溶媒条件を検討するため、蛋白質の構造安定性が調べられてきた。

蛋白質の構造安定性を評価するにあたって、主な実験手法として熱測定と分光学的測定の2種類が挙げられる。示差走査熱量計 (DSC) は熱測定の中でも代表的な実験装置であり、蛋白質の熱容量の温度変化をプロットすることで、蛋白質が熱変性して N 状態から D 状態へと構造転移した時、シャープな1本の吸熱ピークが観測される。この吸熱ピークの面積などを解析することで、変性中点温度 (T_m) や構造転移に伴うエンタルピー変化 (ΔH) など熱力学的パラメーターを算出し、蛋白質の熱安定性を定量的に評価す

ることが可能となる。²⁾

特に低分子量 (約 20~30 kDa) の小型球状蛋白質の場合、DSC サーモグラムでは1本の吸熱ピークが観測されることが多い。^{1,2)} これはコンパクトな立体構造をもつため、N 状態から D 状態へと協同的な構造転移が起きたものと考えられる。したがって小型球状蛋白質の熱変性過程は、シンプルな2状態モデル ($N \rightleftharpoons D$) で表されるのが一般的だとみなされてきた。

ところが最近の研究では、コンパクトな立体構造を有する小型球状蛋白質でも、DSC サーモグラムで2本の吸熱ピークが観測されるなど、複雑な熱変性が起きていると判明した。このような熱転移は従来の2状態モデル ($N \rightleftharpoons D$) で説明することが出来ず、フォールディングの中間 (I; Intermediate) 状態の存在が示唆された。そこで本稿では、複雑な熱変性過程の原因である「高温での可逆的なオリゴマー (RO; Reversible Oligomer) 形成」という珍しい現象について、2種類のモデル蛋白質 (DEN4 ED3 と PSD95-PDZ3) で得られた知見を紹介していく。

2. 高温での RO 形成と DSC サーモグラム

DEN4 ED3 は4型 Dengue Virus の外殻を構成するエン

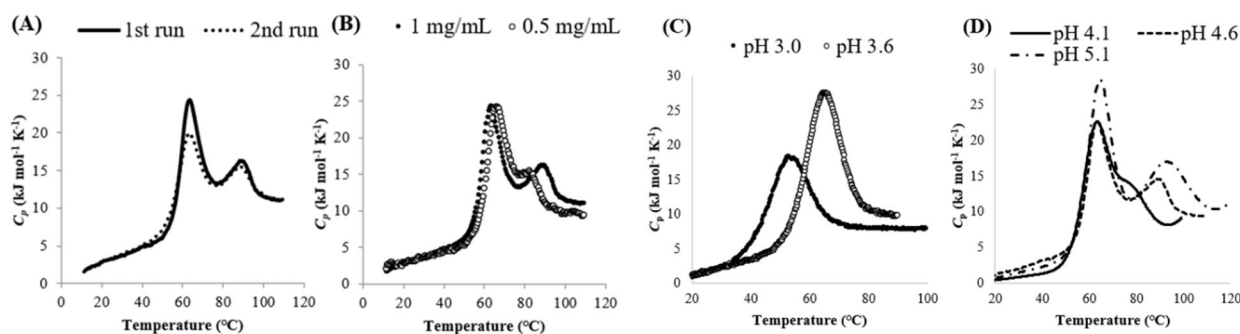


Fig.1 The DSC thermograms of wild-type DEN4 ED3 at the scan rate of $+1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. 50 mM Na-acetate buffer (pH 4.6) was used for the sample preparation and the blank measurements. (A) The reversibility check of DSC thermogram; 1st scan (solid line) and 2nd scan (dashed line). (B) The protein concentration dependence of DSC thermogram; 1.0 mg/mL (closed circle) and 0.50 mg mL⁻¹ (open circle). (C-D) The pH dependence of DSC thermogram at pH 3.0-5.1; (C) one endothermic peak at pH 3.0 (closed circle) and pH 3.6 (open circle). (D) two endothermic peaks at pH 4.1 (solid line), pH 4.6 (dashed line) and pH 5.1 (dashed dotted line).

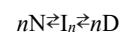
ベロープ蛋白質の第3ドメイン断片であり、2つのエピトープ（抗体認識部位）が存在するため、デングウイルス感染症の免疫研究にも使用されてきた。³⁾ 分子量は約 11.4 kDa と比較的小さく、8本の β -strandから成る免疫グロブリンフォールドと呼ばれるコンパクトな立体構造を形成している。ところが pH 4.6 で DEN4 ED3 の DSC 測定を行ったところ、サーモグラムに2本の吸熱ピークが見られ、2状態モデル ($N \rightleftharpoons D$) にあてはまらない複雑な熱変性が起きていた。⁴⁾ そこで低温側の吸熱ピークは N 状態から I 状態の構造転移、高温側の吸熱ピークは I 状態から D 状態への構造転移とみなし、多状態モデル ($N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons D$) を用いることで、DEN4 ED3 の熱変性過程で何が起きているのか検証することにした。

第一の特徴として、熱変性過程の可逆性が非常に高い点が挙げられる。DSC 測定では昇温速度 $+1.0^{\circ}\text{C min}^{-1}$ に設定し、1回目のスキャンで 25°C から 100°C まで加熱したあと、再び 25°C に下げてから2回目のスキャンを行った。その結果、1回目と比較してやや小さくなったが、2回目でも2本の吸熱ピークが観測された (Fig.1(A))。もし熱変性過程が不可逆であった場合、ピークそのものが見られない。また蛋白質凝集であれば急激な発熱ピークが観測されるはずである。よって DEN4 ED3 の熱変性は、どちらにもあてはまらない可逆的な過程だと推測される。

第二の特徴として、熱力学的パラメーターが蛋白質濃度に大きく依存している点が挙げられる。2種類の蛋白質濃度 (1.0 mg mL^{-1} と 0.50 mg mL^{-1}) で DSC サーモグラムを比較すると、蛋白質濃度が高いほど2本の吸熱ピークは互いに離れていた (Fig.1(B))。また T_m に注目すると、蛋白質濃度が高くなると低温側の吸熱ピークの T_m は低下し、逆に高温側の吸熱ピークの T_m は上昇した (Table 1)。これは DEN4 ED3 の熱変性過程においてオリゴマーの形成・解離が起きており、蛋白質濃度が変化することでモノマーとオリゴマーの平衡に影響したのが原因と考えられる。

例えば低温側の吸熱ピークは、蛋白質濃度が増加したことで、さらに低温側へとシフトした。通常、蛋白質濃度が高いほどモノマー同士が会合しやすくなり、オリゴマーの割合は増加する。このときモノマー (N 状態) とオリゴマー (I 状態) の化学平衡が、オリゴマーを形成する方向に移動する。その結果、 $nN \rightleftharpoons I_n$ の構造転移 (低温側の吸熱ピークに相当する) がより低い温度で起きたものと考えられる。同様に高温側の吸熱ピークでは、蛋白質濃度が増加したときに I 状態 (オリゴマー) と D 状態 (モノマー) の化学平衡がオリゴマーを形成する方向に移動する。すなわち $I_n \rightleftharpoons nD$ の構造転移 (高温側の吸熱ピークに相当する) がより高い温度で起きたと考えられる。

以上の結果をまとめると、DEN4 ED3 の熱変性過程では、高温で可逆的なオリゴマー (RO) が形成されたことで、熱転移が複雑になったと推測される。その RO を I 状態として捉えると、DEN4 ED3 の熱転移モデルは以下のような形で説明できる。



このとき常温ではモノマーとして存在していた n 個の蛋白質分子 (nN) が、熱変性したことで n 量体のオリゴマーを形成し ($nN \rightleftharpoons I_n$)、さらに加熱を続けると再びモノマーへと解離する ($I_n \rightleftharpoons nD$)。通常、蛋白質が高温で熱変性した時は不可逆的に熱凝集することが多く、会合体のサイズは急激に増加していくため、温度を下げてモノマーへと解離することは殆ど無い。したがって高温での RO 形成は、熱凝集とは似て非なる珍しい現象といえる。

また蛋白質の凝集は、発熱反応として一般的に知られているが、高温での RO 形成は吸熱反応という明確な違いがある。実際に DEN4 ED3 の DSC サーモグラムでは2本の吸熱ピークが観測されており、このうち低温側の吸熱ピークでは、蛋白質の構造転移とオリゴマー化の両方が同時に起きたと考えられる ($nN \rightleftharpoons I_n$)。通常、蛋白質の DSC サーモグラムで吸熱ピークが観測された場合、蛋白質の構造転移に伴う吸熱反応の影響が最も大きいとされる。したがって

Table 1 Thermodynamic parameters of wild-type DEN4 ED3 and its single mutated variants determined by DSC measurements and DDCL3 analysis.⁴⁾ For example, V380A meant that 380th valine (V) residue was substituted with alanine (A). The samples were prepared at pH 4.6, and the protein concentration of 0.50-1.0 mg mL⁻¹. DSC measurements were performed at the scan rate of $+1^{\circ}\text{C/min}$ by using VP-DSC (MicroCal, USA).

Name	Protein conc. (mg mL ⁻¹)	Model	T_m (°C)	$\Delta H_{cal}(T_m)$ (kJ mol ⁻¹)
wt	1.0	4N-I ₄	63.63±0.16	190.01±3.14
		4N-I ₄ -4D	69.27±0.46	249.68±7.13
	0.50	4N-I ₄	66.31±0.13	195.73±4.00
		4N-I ₄ -4D	68.83±0.31	255.19±3.92
V380A	1.0	N-D	67.08±0.28	269.36±3.70
V380S	1.0	N-D	67.90±0.13	277.90±2.75
V380T	1.0	N-D	69.23±0.12	285.89±2.56
V380N	1.0	N-D	66.05±0.36	240.85±3.54
V380K	1.0	N-D	66.34±0.22	275.08±3.30
	0.50	N-D	65.97±0.17	271.38±2.96

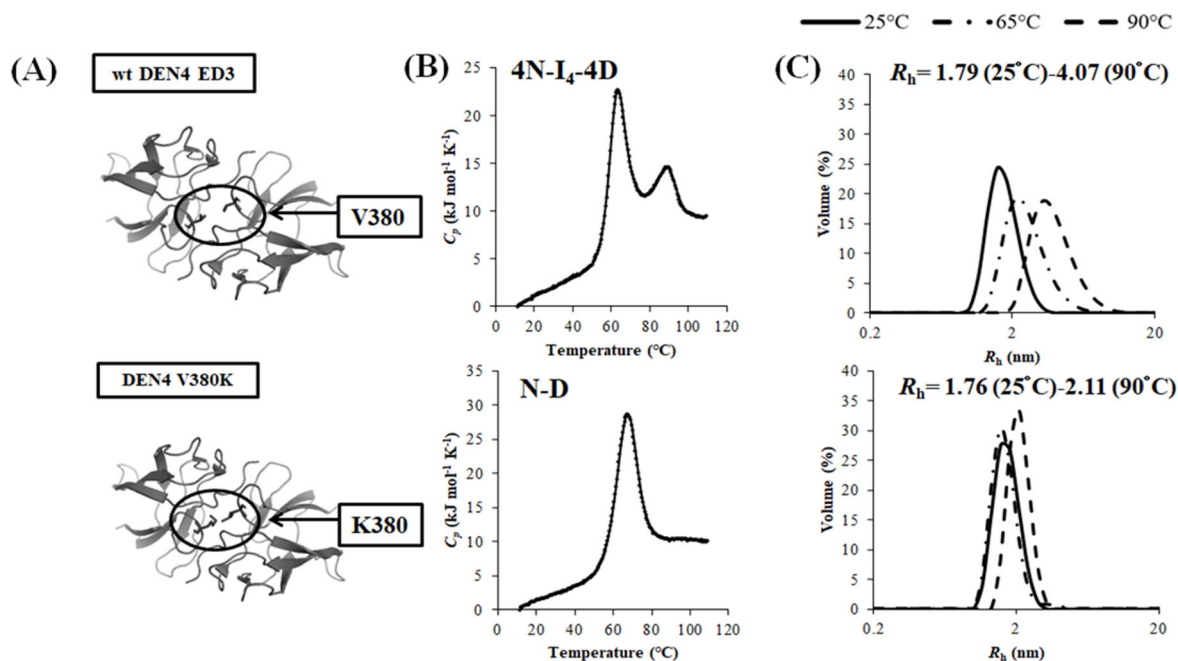


Fig.2 The physicochemical properties of wild-type DEN4 ED3 and its single mutated variants (DEN4 V380K).⁴⁾ 50 mM Na-acetate buffer (pH 4.6) was used for the sample preparation, and the protein concentration was adjusted to 1.0 mg mL⁻¹. (A) The ribbon model of wild-type DEN4 ED3 and DEN4 V380K designed by Pymol. They were generated by using the crystallographic structure of wild-type DEN4 ED3 (PDB ID: 3WE1), and single mutation (V380K) was artificially induced by COOT analysis. (B) The DSC thermogram at the scan rate of +1 °C min⁻¹ and its fitted curve by DDCL3 analysis; DSC raw data (closed square) and fitting curve (gray line). (C) The DLS graphs indicated the particle volume distribution of protein molecules. The R_h (Hydrodynamic Radius) values were calculated by the Stokes-Einstein equation. The sample was heated from 25 °C to 90 °C; 25 °C (solid line), 65 °C (dashed dotted line) and 90 °C (dashed line). For example, DEN4 ED3 formed the native monomer (N) at 25 °C, and it turned into the intermediate tetramer (I₄) at 90 °C.

現時点での仮説としては、蛋白質の構造転移 (N 状態から I 状態) による ΔH の増加分が、蛋白質のオリゴマー形成による ΔH の減少分を上回った結果、RO 形成反応は DSC サーマグラムの吸熱ピークとして観測されたと推測している。

さらに DSC 測定で 2 本の吸熱ピークが観測されるのは、DEN4 ED3 以外の小型球状蛋白質 (PSD95-PDZ3⁹⁾ Che Y⁹⁾ Cro repressor¹⁰⁾) でも報告されてきた。いずれの場合も、小型球状蛋白質に典型的な 2 状態モデル (N \rightleftharpoons D) にあてはめるのは難しく、I 状態を含めた多状態モデルでの解析が進められてきた。もしかすると高温での RO 形成は、幅広い種類の小型球状蛋白質で起こりうる普遍的な現象であり、これまでは DSC サーマグラムの高温のベースラインにおける異常として見落とされてきたかもしれない。

ちなみに DEN4 ED3 の DSC サーマグラムは、pH 3.0-3.6 では 1 本の吸熱ピークが観測されるのに対し、pH 4.1 では肩ピークが現れ、pH 4.6-5.1 では 2 本の吸熱ピークが観測された。興味深いことに、サンプルの pH が上昇しても低温側のピークは殆ど同じ温度で現れるのに対して、高温側のピークは明らかに高温側へシフトしている。DEN4 ED3 の等電点が約 7.9 であることから、サンプルの pH が等電点に近づくほど蛋白質分子間における静電的な反発が弱まったことが影響し、RO が安定化されたことで、RO の解離はより高温で起こるようになったと予想される。

3. 一残基置換による RO の阻害

DEN4 ED3 の複雑な熱変性の原因が RO であると判明したが、どのような種類の相互作用で形成されるのか、また RO の立体構造については不明な部分が多かった。DEN4

ED3 の X 線結晶構造解析では、結晶中では 2 本のポリペプチド鎖が集合し、ダイマーを形成すると分かった (PDB ID: 3WE1) (Fig.2(A)).³⁾ さらに DSSP や PDBE/PISA などのソフトウェアを利用し、PDB に登録された DEN4 ED3 の立体構造情報を解析して、各アミノ酸残基の ASA (Accessible Surface Area) および BSA (Buried Surface Area) を算出した。このとき ASA はモノマーのときに溶媒の水分子が接触可能な表面積、BSA は ASA のうちオリゴマーを形成することで埋もれてしまう表面積を意味する。すなわち ASA に対する BSA (%BSA/ASA) の値が大きいほど、分子表面の大部分がオリゴマー接触面に埋もれているため、オリゴマー形成に重要なアミノ酸残基と考えられる。DEN4 ED3 の場合、%BSA/ASA の値が最も高いのは 380 番目のバリン残基 (Val380) であった。したがって DEN4 ED3 の結晶中のダイマー形成において、Val 380 を介した疎水性相互作用が駆動力になっていると推測される。

そこで DEN4 ED3 の Val 380 に注目し、疎水性の低い 5 種類のアミノ酸 (アラニン (A), セリン (S), トレオニン (T), アスパラギン (N), リシン (K)) に一残基置換した変異体を設計した。⁴⁾ その結果、N 状態での二次構造や会合状態など、常温での物性には殆ど影響しなかった。ところが DSC 測定を行ったところ、野生型では 2 本の吸熱ピークが観測されたのに対し、5 種類の変異体全てで 1 本の吸熱ピークが観測され (Fig.2(B)), DDCL3 を用いた非線形最小 2 乗フィッティングの結果、^{5,7)} I 状態が存在しない 2 状態モデル (N \rightleftharpoons D) で解析可能であった。特に DEN4 V380K では、蛋白質濃度を変えても熱力学的パラメーター (T_m , $\Delta H_{cal}(T_m)$) に有意な差は見られなかった (Table 1)。すなわち熱変性過程に蛋白質濃度依存性が見られなかったため、DEN4 V380K

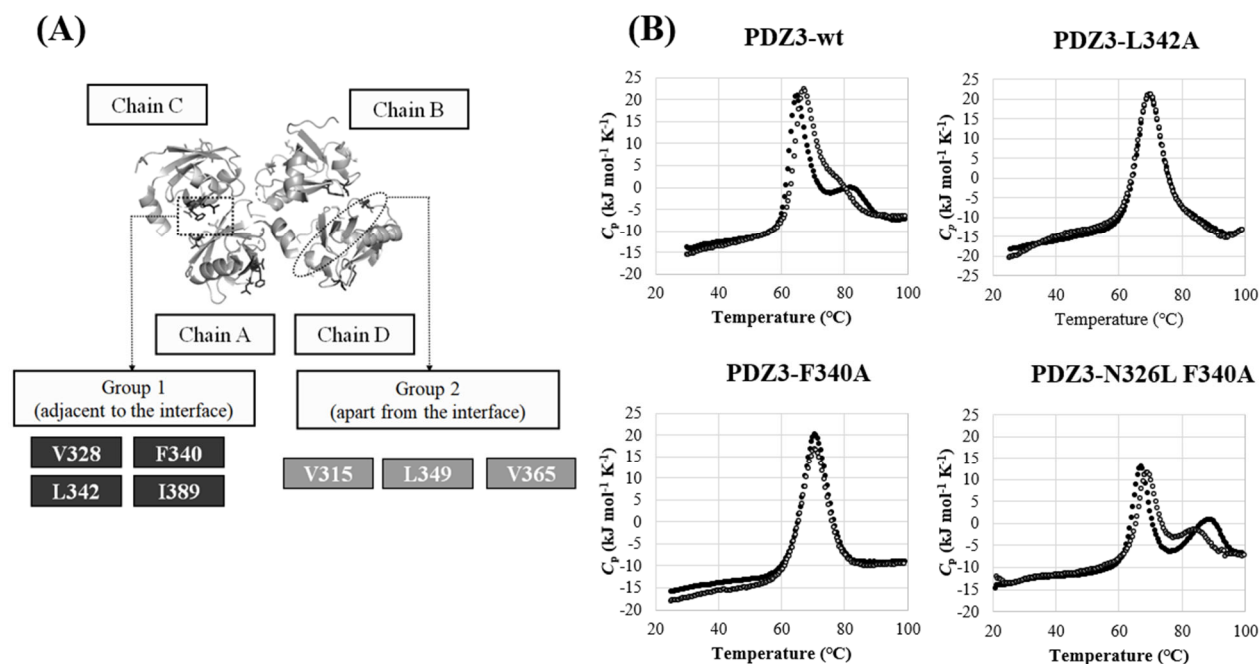


Fig.3 (A) Design of single-mutated variants of PSD95-PDZ3 by alanine scanning.¹²⁾ Based on X-ray crystal structure data (PDB ID: 3I4W), seven hydrophobic amino acids exposed on the molecular surface were targeted and classified into two groups: present on the oligomer contact surface (Group 1) or far from its interface (Group 2). (B) The DSC thermograms of wild-type PSD95-PDZ3 and its single-mutated variants at the scan rate of +1 °C min⁻¹.¹²⁻¹⁴⁾ 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.5) was used for the sample preparation and the blank measurements. The protein concentration dependence of DSC thermogram were confirmed at 1.0 mg mL⁻¹ (closed circle) and 0.50 mg mL⁻¹ (open circle). The DSC thermograms of PDZ3-wt,¹²⁾ PDZ3-L342A,¹³⁾ PDZ3-F340A¹⁴⁾ and PDZ3-N326L F340A¹⁴⁾ were reported in previous articles.

では高温での RO 形成が阻害されたと考えられる。したがって、それぞれの熱転移モデルは野生型で 4N₂I₄2D, 変異体で N₂D となっており, Val 380 の一残基置換によって I 状態のテトラマーが阻害されたと結論付けた。

また動的光散乱 (DLS) 測定で R_h (流体力学的半径) を算出し, 溶液中の粒子サイズを調べた (Fig.2(C))。すると野生型では 25 °C から 90 °C まで加熱すると R_h の値が 2 倍以上増加しており, 25 °C (N 状態) でモノマー (1.79 nm) から 90 °C (I 状態~D 状態) でオリゴマー (4.07 nm) へ成長したと考えられる。一方, 疎水性のバリン (V) を親水性のリシン (K) に置換した変異体 (V380K) では, R_h の値が殆ど増加しておらず, 90 °C でもモノマーとして存在することから, DSC 測定と DLS 測定の結果が一致したとみなせる。したがって DEN4 ED3 の場合, N 状態のオリゴマー接触面に存在する疎水性アミノ酸 (Val 380) が, 高温での RO 形成に大きく寄与していたと推測される。さらに原因である疎水性アミノ酸を一残基置換するだけで, 高温の RO 形成を効果的に阻害でき, 熱転移モデルの単純化に成功した。

4. RO 形成における疎水性相互作用の寄与

つづいて他の種類の小型球状蛋白質でも, 高温での RO 形成が一残基置換で阻害されるのか確認するため, 同様の実験を行った。PSD95-PDZ3 はシナプス後肥厚の足場蛋白質 (PSD95) を由来とするドメイン断片 (PDZ3) であり, 分子量は 11.0 kDa, 5 本の α-helix と 3 本の β-strand から成る立体構造を形成していた (PDB ID: 3I4W)。¹¹⁾ はじめに pH 7.5 で PDZ3 野生型の DSC サーモグラムを測定したところ, 2 本の吸熱ピークが観測され, nN₂I₄2nD の熱転移モデルでフィッティング残差が十分に小さくなった。^{8, 12)} したがって DEN4 ED3 と同様に PDZ3 でも, DSC 測定によって高温での RO 形成が確認された。

次に PDZ3 野生型の X 線結晶構造解析データを確認したところ, 結晶構造中で 4 本のポリペプチド鎖が集合しており, テトラマーを形成していた。そこでモノマーの分子表面に露出した 7 種類の疎水性アミノ酸に注目し, オリゴマー接触面に埋もれているアミノ酸を Group 1 (V328, F340, L342, I389), 離れているアミノ酸を Group 2 (V310, L349, V365) とそれぞれ分類した (Fig.3(A))。¹³⁾ これらの中から任意のアミノ酸を疎水性の低い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。

DSC 測定の結果, Group 1 のアミノ酸を一残基置換した 2 種類の変異体 (PDZ3-F340A, PDZ3-L342A) で, 1 本の吸熱ピークが観測された (Fig.3(B))。¹²⁻¹³⁾ 一方, Group 2 のアミノ酸を一残基置換しても, DSC サーモグラムで 2 本目の吸熱ピークが見られ, 野生型と大きな違いは見られなかった。したがって PDZ3 の高温での RO 形成には, N 状態のオリゴマー接触面に存在する疎水性残基が重要な役割を果たすと考えられる。このとき単に分子表面に露出しただけでなく, オリゴマー接触面に近接している疎水性アミノ酸を狙って一残基置換することで, 高温での RO 形成はより効果的に阻害されたと考えられる。

また逆転の発想から, RO の阻害に成功した変異体 (PDZ3-F340A) を鋳型とし, その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置換することで, 高温での RO 形成を人工的に促進できるか挑戦してみた。¹⁴⁾ このとき, BSA の値が大きい 3 種類の親水性アミノ酸 (R309, E310, N326) をターゲットとし, 疎水性の高いロイシンに一残基置換した。その結果, DSC サーモグラムでは鋳型 (PDZ3-F340A) で 1 本の吸熱ピークが見られたのに対して, 1 種類の変異体 (PDZ3-N326L) で 2 本の吸熱ピークが観測された (Fig.3(B))。このとき蛋白質濃度を増加させると, 2 本の吸熱ピークは互いに離れたことから, PDZ3 野生型と同様に高温での RO 形成が起きたと考えられる。

さらに DSC 測定の結果から、N 状態から D 状態の構造転移 (N-D) に注目して、PDZ3 変異体の熱力学的パラメーターを算出した (Table 2)。はじめに N 状態と D 状態のモル分率が等しくなる T_m を比較したところ、PDZ3 野生型、PDZ3-L342A および PDZ3-F340A では約 70 °C と殆ど同じ値であったが、PDZ3-N326L F340A は約 73 °C で、 T_m の値が僅かに増加していた。次に T_m におけるエンタルピー変化 ($\Delta H_{cal}(T_m)$) を比較すると、PDZ3-L342A、PDZ3-F340A、PDZ3 野生型、PDZ3-N326L F340A の順に高い値を示した。したがって高温での RO 形成が促進されるほど、 $\Delta H_{cal}(T_m)$ は減少するという傾向が見られた。

また 3 状態モデルで解析された PDZ3 野生型と PDZ3-N326L F340A について、N 状態から I 状態の構造転移 ($nN \rightleftharpoons I_n$) を比較すると、 T_m の値は後者の方が約 2.7 °C 上昇しており、 $\Delta H_{cal}(T_m)$ の値は殆ど同じであった。通常、エンタルピーには温度依存性があり、高温になるほどエンタルピーの値は増加する。その点を考慮すると、PDZ3-N326L F340A ではエンタルピーの値が相対的に低下しており、やはり高温での RO 形成が影響したと考えられる。

以上の結果をまとめると、PDZ3 の複雑な熱変性過程の原因は高温での RO 形成であり、N 状態のオリゴマー接触面に存在する僅か一残基のアミノ酸を置換するだけで、人工的な制御に成功した。具体的には親水性アミノ酸に置換すると RO は阻害され、逆に疎水性アミノ酸に置換すると RO は促進される。よって N 状態のオリゴマー接触面に存在する疎水性アミノ酸が、高温での RO 形成の駆動力になっていると推測される。その一方で、高温での RO 形成が促進されるとエンタルピーの値が低下するなど、蛋白質分子の熱安定性低下が示唆された。

5. RO の立体構造

ここまで 2 種類の小型球状蛋白質で、高温での RO 形成の阻害に成功し、N 状態の結晶構造からオリゴマー接触面に存在する疎水性アミノ酸を探索するのが有効だとわかった。ところが N 状態のオリゴマーを基に設計した一残基置換が、なぜ I 状態の RO 形成に影響を及ぼしたのか、疑問は未だに解消されていない。そもそも RO は高温 (約 60~70 °C) で形成されるため、熱変性がある程度進行していると考えるのが自然である。ゆえに RO の立体構造が N 状態と D 状態のどちらに近い性質をもつのか、明確な答えが見つからなかった。

Table 2 Thermodynamic parameters of wild-type PSD95-PDZ3 and its single or double mutated variants determined by DSC measurements and DDCL3 analysis.¹²⁻¹⁴⁾ The samples were prepared at pH 7.5, and the protein concentration of 1.0 mg/mL. DSC measurements were performed at the scan rate of +1°C/min by using VP-DSC (MicroCal, USA). The thermodynamic parameters of PDZ3-wt,¹²⁾ PDZ3-L342A,¹³⁾ PDZ3-F340A,¹⁴⁾ and PDZ3-N326L F340A¹⁴⁾ were reported in previous articles.

Name	Model	T_m (°C)	$\Delta H_{cal}(T_m)$ (kJ/mol)
wt	6N-I6	65.41 ± 0.07	237.65 ± 3.08
	6N-I6-6D	69.99 ± 0.33	327.26 ± 5.29
L342A	N-D	69.56 ± 0.10	346.11 ± 1.93
F340A	N-D	69.95 ± 0.11	369.01 ± 2.59
N326L	4N-I4	68.11 ± 0.24	233.41 ± 10.10
F340A	4N-I4-4D	73.39 ± 1.15	250.78 ± 16.80

そこで仮説の一つとして、PDZ3 の N 状態と I 状態ではオリゴマー接触面の疎水性残基を介した相互作用のパターンが殆ど同じである可能性が挙げられる。もちろん両者の立体構造は厳密には異なっており、I 状態の方が熱変性はある程度進行したものと考えられ、分子内部の疎水性コアのパッキングが緩く、側鎖の揺らぎが大きいと推測される。しかし蛋白質科学の分野では、モルテン・グロビュール (MG) 状態と呼ばれるフォールディング中間体が発見されており、過酷な溶媒条件下で部分変性しながらも N 状態の二次構造 (α -helix や β -strand) が維持されることが判明している。¹⁵⁻¹⁷⁾ したがって PDZ3 の場合、RO の立体構造は MG 状態、またはそれに準ずるものと仮説を立てた。

この仮説を支持するために、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸 (ANS) を用いた蛍光スペクトルについて解説していく。ANS は両親媒性の蛍光分子であり、部分変性した蛋白質と結合して強い蛍光を発するため、MG 状態の検出に利用されてきた。実際に PDZ3 野生型および変異体の ANS 蛍光強度を測定したところ、野生型では 80 °C で蛍光強度が最大となったが、PDZ3-F340A および L342A では約 4 分の 1 の値に減少していた。¹²⁻¹³⁾ したがって RO 形成が阻害された変異体で ANS 蛍光が有意に低下したことから、PDZ3 の RO は MG 状態に近い立体構造をもつと推測される。したがってオリゴマー接触面における疎水性残基の相互作用は、N 状態と I 状態で非常によく似ている可能性が示唆された。

しかしながら、RO が形成される高温 (60~70 °C) で蛋白質の立体構造解析は難しい。ゆえに N 状態のオリゴマー接触面で形成された疎水性相互作用が、I 状態でもそのまま保存されていると結論付けるには、RO の立体構造に関する情報が不十分である。あくまで現時点の実験データで主張できるのは、N 状態のオリゴマー接触面に存在するアミノ酸の疎水性が高いほど、高温での RO 形成が促進されるという傾向だけである。

6. RO とアミロイド線維の相関

これまで高温での RO 形成は可逆的な現象であり、不可逆的な熱凝集とは異なると説明してきた。ところが RO は殆ど報告されてこなかったため、そもそも RO と蛋白質凝集の相関については不明な点が多い。一方、蛋白質凝集は構造・物性・形成メカニズムなど様々な知見が集められており、基本的には「アモルファス凝集」と「アミロイド線維」の 2 種類に大別される。アモルファス凝集は不定形でありふれた現象なのに対して、アミロイド線維は cross- β と呼ばれる規則的な立体構造をもち、アルツハイマー病・パーキンソン病など神経変性疾患を引き起こす原因とされている。¹⁸⁻¹⁹⁾

PSD95-PDZ3 の場合、DSC 測定で 2 本の吸熱ピークが観測され、低温側の吸熱ピークが現れた 60 °C 付近で RO が形成されていた。一方、同じサンプルを 60 °C で 2 週間インキュベートし続けると、透過型電子顕微鏡 (TEM) で繊維状の蛋白質凝集が観察され、熱変性した蛋白質はアミロイド線維を形成したと考えられる。¹³⁾ すなわち、サンプルを 60 °C でインキュベートした初期段階で RO が形成され、最終段階ではアミロイド線維に成長したと考えられる。したがって RO はアミロイド線維の前駆体として生じた可能性があり、これまで似て非なる現象とされてきた「高温での RO 形成」と「不可逆的な熱凝集」に関する共通の経路が存在するかと示唆された。

そこで RO とアミロイド線維の相関を調べるため、RO の阻害に成功した 2 種類の変異体 (PDZ3-F340A および PDZ3-L342A) に注目し、アミロイド線維と特異的に結合する

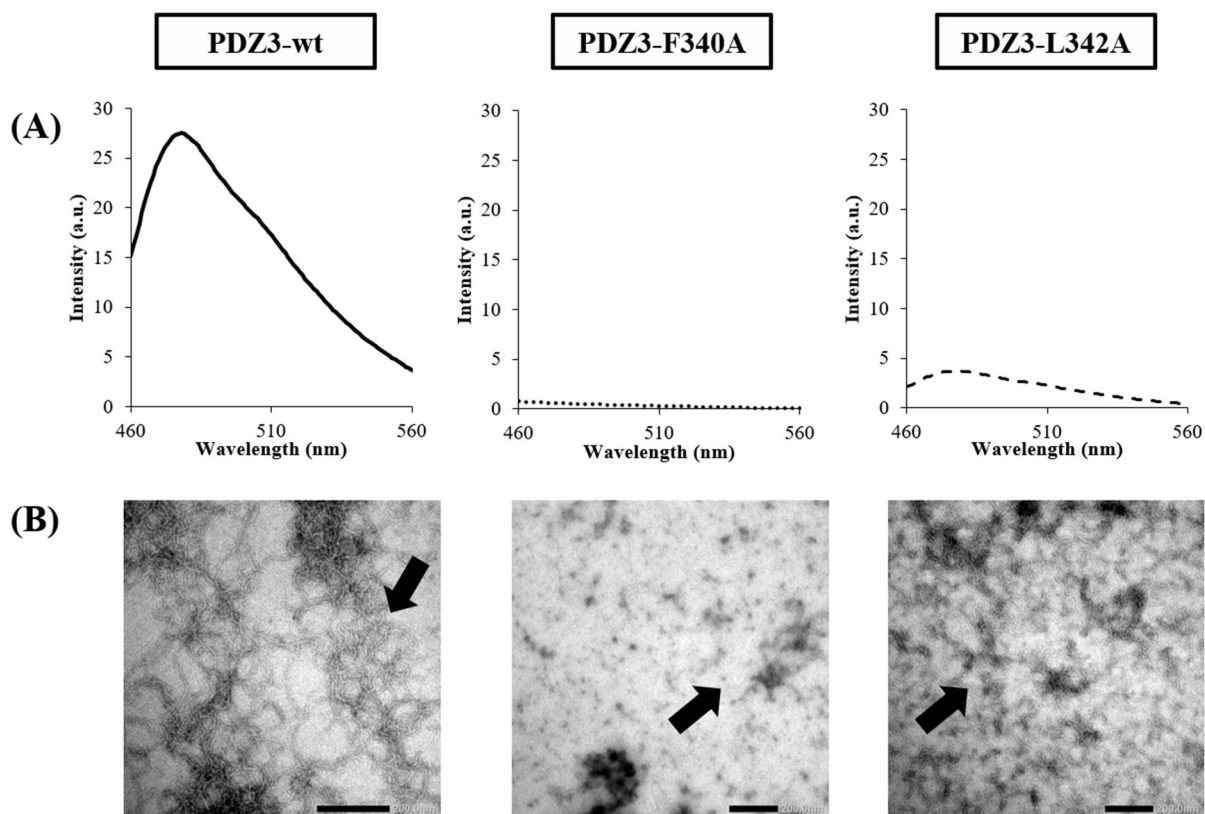


Fig.4 The physicochemical properties of wild-type PSD95-PDZ3 and its single-mutated variants (PDZ3-F340A and PDZ3-L342A) in 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.5).¹³⁾ The samples were previously incubated at 60°C for 1 week, 10-times diluted by Milli-Q water, and the final protein concentration of samples was adjusted to 0.8 mg/mL. (A) Thioflavin T (ThT) fluorescence spectra of PDZ3-wt and PDZ3-L342A with 12 μM of ThT. (B) Photographs of PDZ3-wt and PDZ3-L342A taken by transmission electron microscopy (TEM) at the magnification of 2000x. The negative staining of TEM samples was performed with 2% uranyl acetate. The scale bar in the lower right corner was 200 nm are shown in black.

Thioflavin T (ThT)の蛍光強度を測定した。¹³⁾ それぞれのサンプルを60°Cで1週間インキュベートしたところ、PDZ3野生型と比較して、2種類の変異体ではThT蛍光強度が5分の1未満に低下していた(Fig.4(A))。ゆえに一残基置換によって、高温で形成されたアミロイド線維の量は大幅に低下したと考えられる。またTEMの画像から蛋白質凝集の形状を観察したところ、野生型では成熟したアミロイド線維が見られたのに対し、変異体ではアミロイド線維が断片化されていた(Fig.4(B))。以上の実験結果から、PDZ3のROとアミロイド線維には正の相関が見られ、高温でのRO形成を阻害したことで、アミロイド線維も抑制されたものと考えられる。

しかし上記の実験結果から、PDZ3のROがアミロイド線維の前駆体であると主張するのは、現時点では時期尚早だと考えている。なぜならPDZ3の高温でのRO形成に関する先行研究は、可逆的な熱変性を仮定した平衡論的な解析が中心となっており、不可逆的な熱変性を仮定した速度論的な解析は殆ど行われていないからである。今後はDSC測定で昇温過程と降温過程を繰り返し、不可逆的な発熱反応を解析することで、RO形成の速度定数や反応次数を算出し、パスウェイに関する議論を進める予定である。

7. 今後の展望について

本稿では2種類の小型球状蛋白質(DEN4 ED3 および PSD95-PDZ3)における高温でのRO形成について解説した。これらの実験結果から、ROの立体構造にはMG状態との共通点が見られ、特にオリゴマー接触面における疎水

性残基の相互作用は、N状態と似ている可能性が考えられる。実際に円偏光二色性(CD)スペクトルから蛋白質の二次構造含量を調べたところ、I状態の二次構造はN状態に似ていると判明している。^{4,13)}

したがって蛋白質工学の手法を用いてROを阻害する場合、N状態の立体構造情報を参考にするのも一つの作戦といえる。そして本研究のコンセプトとして、オリゴマー接触面に存在する疎水性アミノ酸を一残基置換することで、元の立体構造・機能・他の物性への影響は最小限にし、高温でのROおよび不可逆的な熱凝集(アミロイド線維など)の抑制を目指している。

今後は幅広い種類の小型球状蛋白質で同様の実験を行い、高温でのRO形成が普遍的な現象であることを証明していく。また一残基置換によって高温でのRO形成を効果的に阻害できることを示せば、将来的には僅かなアミノ酸変異によって蛋白質凝集を人工的に制御できる画期的な分子設計法として確立されると期待される。

謝 辞

本研究を進めるにあたって、長岡技術科学大学・城所俊一教授(DSC装置を用いた熱測定)、東京農工大学・黒田裕教授(組換え蛋白質の発現・精製と分光学的測定)ならびに御二方の研究室各位には大変お世話になりました。この場をお借りして、厚く御礼申し上げます。また本研究は、JSPS科研費(15H04359, 18H02385, 21K05288, 21K15049)の助成を受けて進めました。

文 献

- 1) P. L. Privalov, *FEBS Letters* **40**, 133–139 (1974).
- 2) P. L. Privalov, *Adv Protein Chem* **33**, 167–241 (1979).
- 3) M. Elahi *et al.*, *Biochim Biophys Acta* **1844**, 585–592 (2014).
- 4) T. Saotome *et al.*, *Biochemistry* **55**, 4469–4475 (2016).
- 5) S. Kidokoro *et al.*, *Biopolymers* **26**, 213–229 (1987).
- 6) S. Kidokoro *et al.*, *Biopolymers* **27**, 271–297 (1988).
- 7) T. Nakagawa *et al.*, "Program System 'SALS' for Nonlinear Least Squares Fitting in Experimental Sciences," *North Holland Pub. Co.* (1980).
- 8) J. Murciano-Calles, *Biophys J* **99**, 263–272 (2010).
- 9) V. V. Filimonov *et al.*, *Biochemistry* **32**, 12906–12921 (1993).
- 10) V. V. Filimonov *et al.*, *J Mol Biol* **255**, 767–777 (1996).
- 11) A. Cámara-Artigas, *J Struct Biol* **170**, 565–569 (2010).
- 12) T. Saotome *et al.*, *BioPhys J* **119**, 4469–4475 (2020).
- 13) T. Saotome *et al.*, *FEBS J* **289**, 3205–3216 (2022).
- 14) S. Onchaiya *et al.*, *Molecules* **27**, 2813 (2022).
- 15) M. Ohgushi and A. Wada, *FEBS Lett* **164**, 21–24 (1983).
- 16) K. Kuwajima, *Proteins* **6**, 87–103 (1989).
- 17) O. Ptitsyn, *Adv. Protein Chem* **47**, 83–229 (1995).
- 18) C. M. Dobson, *Nature* **426**, 884–890 (2003).
- 19) V. N. Uversky and A. L. Fink, *Biochim. Biophys. Acta* **1698**, 131–153 (2004).



早乙女 友規
Tomonori Saotome
E-mail: t_saotome@vos.nagaokaut.ac.jp