

研究種目	■奨励研究助成金	□研究成果刊行助成金
	□21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	□21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	選択的溶媒和を指標にしたタンパク質凝集抑制剤の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：理工学部 理学科 准教授 神山 匡 共同研究者：	

## 1. 研究目的・内容

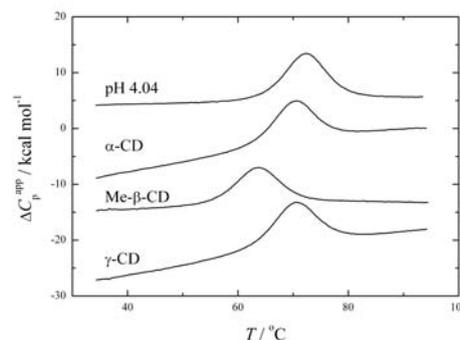
タンパク質の立体構造形成に大きな役割を果たす疎水性相互作用に着目し、水溶液中における疎水性相互作用に大きく影響を及ぼす環状オリゴ糖（シクロデキストリン、CD）がタンパク質の構造や安定性に与える影響を熱力学的に明らかにすることで、タンパク質の立体構造形成機構の解明と新規なタンパク質凝集抑制剤および安定性調整剤の開発指針の作成を目指す。

## 2. 研究経過及び成果

アルツハイマー病や狂牛病の発症の原因と考えられているアミロイドは、タンパク質が異常な会合体を形成して不溶線維化するものであり、その会合体形成には疎水性相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。環状オリゴ糖は環外部が親水性、環内部が疎水性であるため、いわば油を可溶化する界面活性剤のように、タンパク質の疎水性相互作用を弱化し、会合体形成を抑制する機能が期待される。そこで、タンパク質の構造や安定性に及ぼす環状オリゴ糖の効果を系統的に明らかにするために、可溶性で可逆性の高い球状タンパク質である Cytochrome *c*（以下 Cyto）をモデルタンパク質として、以下の系について測定を行った。

### 1. 異なる内径の環状オリゴ糖の比較

内径の異なる環状オリゴ糖3種（ $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD）の水溶液中における Cyto の熱安定性を示差走査熱量計（DSC）を用いて測定した（Fig. 1）。無添加時と比べると、いずれの系においても構造転移に伴う吸熱ピークの温度は低温側にシフトしており、Cyto が温度に対して不安定になっていることが明らかとなった。これは、温度増加によって変性し溶媒に露出した Cyto の疎水性残基の側鎖が CD によって包接されることにより、変性状態が安定化したため、より低温で変性が進行したものと考えられる。不安定化効果の大きさは $\beta$ -CD >  $\alpha$ -CD >  $\gamma$ -CD の順に大きく、疎水性残基の側鎖が包接するためには大きすぎず（ $\gamma$ -CD）、小さすぎない（ $\alpha$ -CD）、適度な内径（ $\beta$ -CD）を有する必要があることが明らかとなった。



**Fig. 1** DSC thermograms of cytochrome *c* in buffer (50 mM acetate, pH 4.04) with  $\alpha$ -, Me- $\beta$ -, and  $\gamma$ -CD at about 8 w/w%. The concentration of cytochrome *c* is 0.6 mg-cm<sup>-3</sup> corresponding to about 50  $\mu$ M.

### 2. 異なる修飾基を用いた環状オリゴ糖の比較

最も不安定化効果の大きかった $\beta$ -CDについて、親水基であるヒドロキシ基の水素をそれぞれ疎水性や大きさの異なる置換基で置換し、その効果を比較した。Fig. 2は置換基にメチル基（Me）、ヒドロキシプロピル基（HP）、アセチル基（Ac）を用いた $\beta$ -CDをCyto水溶液に添加した際のDSC測定の結果である。無添加時と比べると、いずれの系においても吸熱ピークの温度は低温側にシフトしており、1の結果と同様にCytoが温度に対して不安定になっていることが明らかとなった。不安定化効果の大きさはAc- $\beta$ -CD > Me- $\beta$ -CD > HP- $\beta$ -CDの順に大きく、これは以前の研究（モデルタンパク質に

Lysozyme を用いた系)と同様であった。立体障害の少ない Me は包接能が高いため不安定化効果が大いだが、水素結合能を持つ Ac 基は、タンパク質の二次構造形成などに重要なペプチド間や側鎖間の水素結合を阻害するため、包接能に付加的な作用が加わり、最も不安定化効果が大きくなったものと考えられる。一方、HP は立体障害が大きいため包接能が抑制され、不安定化効果が小さくなったと考えられる。

### 3. 環状オリゴ糖の濃度依存性の解明

包接による不安定化効果の影響を調べるため、置換基の影響が最も小さい Me- $\beta$ -CD 系を用いて CD 濃度と不安定化効果の依存性を DSC を用いて明らかにした。Fig. 3 は変性中点温度 ( $\equiv$ ピーク温度)の減少率の濃度依存性である。濃度が高いほど不安定化効果は大きく、その効果はタンパク質の種類によって異なることが明らかとなった。これは、タンパク質の疎水性や温度に対する安定性の違いを反映して、CD の不安定化効果に違いが表れたものと思われる。CD が変性状態に結合したことにより不安定化したと仮定すると、フィッティングより天然状態と変性状態の CD 結合数の差は  $5.0 \pm 1.0$  個、結合定数は  $10.3 \pm 2.9 \text{ M}^{-1}$  と求めた。この正の結合数は CD が選択的にタンパク質の変性状態に結合していることを示している。アルコールなどの疎水性物質と CD の結合定数と比較すると非常に小さい値であり、立体構造を有するタンパク質への CD の結合力は小さく、変性剤のような強い不安定化効果ではない緩やかな不安定化効果を実現できることを示唆している。

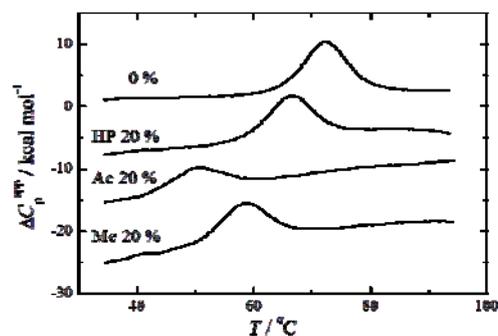


Fig. 2 DSC thermograms of cytochrome *c* in buffer (50 mM acetate, pH 4.04) with each modified  $\beta$ -CD at 20 w/w%.

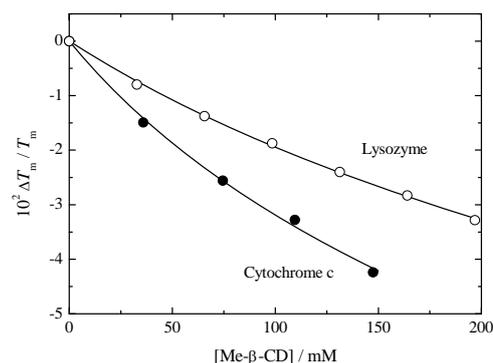


Fig. 3 Plots of  $\Delta T_m/T_m$  of cytochrome *c* and lysozyme against Me- $\beta$ -CD concentration..

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

現在、異なる修飾基の濃度依存性や分子量の異なるタンパク質に対する CD の添加効果を行っており、CD によるタンパク質の構造や安定性への影響が個別のタンパク質に特異的な現象ではないことを明らかにしている。今後、立体構造を持たず二次構造のみのポリペプチドやらせん構造のみの RNA を比較とすることで、タンパク質の立体構造 (三次構造) に与える CD の影響を分離することができ、タンパク質の立体構造形成における疎水性相互作用の効果の解明につながるものと思われる。また、DSC 測定時に昇降温を繰り返すことによって、タンパク質の可逆性に与える各種 CD の効果を比較し、会合のメカニズムと抑制機構の解明につなげる予定である。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
6 <sup>th</sup> International & 8 <sup>th</sup> Japan-China joint Symposium on Calorimetry and Thermal Analysis	ポスター	2011年8月1日~4日
6 <sup>th</sup> Asian Cyclodextrin Conference	ポスター	2011年8月28日~31日
第28回シクロデキストリンシンポジウム	ポスター	2011年9月8日~9日
第47回熱測定討論会	口頭	2011年10月21日~23日
15 <sup>th</sup> International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry	口頭	2012年8月20日~24日
<i>Netsu sokutei (Special Issue for CATS2011), W39, 1-5</i>	雑誌	2012年1月
<i>Netsu Sokutei 39, 47-53</i>	雑誌	2012年5月