

京都大学複合原子力科学研究所 専門研究会

第 15 回 タンパク質の異常凝集と その防御・修復機構に関する研究会

講演要旨集



2024 年 8 月 27 日（火） - 28 日（水）

京都大学複合原子力科学研究所—事務棟大会議室—（Zoom 開催）

第 15 回 タンパク質の異常凝集とその防御・ 修復機構に関する研究会の開催にあたって

白内障、加齢性黄斑変性症、アルツハイマー病、動脈硬化、皮膚硬化等のいわゆるフォールディング病はその組織に含まれるタンパク質の異常凝集が原因であり、これらの疾病は放射線、紫外線照射、酸化ストレスによって進行することが知られています。しかし、タンパク質が、なぜ異常凝集するのか、その原因は全く解明されておらず、高齢化社会で患者の急増に伴い、問題は深刻化しております。

本研究会では生化学、生物物理化学、構造生物学、放射線生物影響学、分子生物学、医学、薬学などを専門とし、上記研究において最先端の研究を行っている研究者をお招きし、タンパク質異常凝集のメカニズムに迫ります。多くの皆様のご参集をお願い申し上げます。

主催：京都大学複合原子力科学研究所 放射線生命科学研究部門 放射線生化学研究分野
准教授 高田 匠

■■ご案内■■

■日 時：2024 年 8 月 27 日（火） 13：30～17：00。28 日（水） 9：00～12：00。

■場 所：京都大学複合原子力科学研究所—事務棟大会議室 Zoom

■懇親会：~~図書棟会議室 8 月 27 日 17：20—会費 2,000 円（学生：1,000 円）~~

■主催者連絡先：京都大学複合原子力科学研究所 放射線生命科学研究部門 放射線生化学研究分野
准教授 高田 匠

〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西 2

Tel:072-451-2496 （携帯：080-3134-6072）

E-mail: takumi@rri.kyoto-u.ac.jp または takumi.iphone@gmail.com

■■ 講演要領 ■■

以下、敬称略となります。ご容赦ください。

■■ プログラム ■■

8月27日(火)

13:30-13:35 ごあいさつ 京都大学複合原子力科学研究所 所長 黒崎 健

〈座長：山崎 正幸〉

1. 13:35 – 14:05 ○茶谷絵理¹、柚佳祐¹²、Ching-Yang Lin²、Po-Wei Yi²、

Chih-Hao Huang²、増原宏²

¹神戸大学大学院理学研究科、²台湾国立陽明交通大学応用化学系

光圧による α シヌクレイン液滴の時空間的な形成と老化の誘導

2. 14:05 – 14:35 ○太田朝貴、後藤祐児、荻博次

大阪大学大学院工学研究科

ペリスタポンプのせん断力によるアミロイド線維形成

----- 休憩 (5 分) -----

〈座長：茶竹 俊行〉

3. 14 : 40–15 : 20

○千葉 かおり

茨城工業高等専門学校 国際創造工学科

中性子結晶構造解析で観測された水素による

ペプチド結合の部位特異的緩和が「正常な」 β シートの形成を促進する

4. 15 : 20–15 : 50

○日比野絵美¹、土方礼嗣¹、山口真稔¹、廣明秀一¹²³

¹名古屋大学大学院創薬科学研究科、²合同会社 BeCellBar、³名大 COMIT

p53 および SARS-CoV2 における異常凝集体の分析

----- 休憩 (5 分) -----

〈座長：後藤 祐児〉

5. 15：55－16：25 ○ 矢埜 杏果、藤原 範子

兵庫医科大学医学部生化学講座

SOD1 の 35 番目のアミノ酸残基「I35」は凝集体形成に寄与する

6. 16：25－16：55 ○藤原 範子¹、矢埜杏果¹、福島和明²

¹兵庫医科大学医学部生化学講座, ²兵庫医科大学医学部化学講座

ALS 変異 SOD1 の凝集体形成の理由を分子動力学シミュレーションで説明できるか？

〈一日目一旦終了の挨拶－ 17：00－高田〉

~~各自今後の共同利用打ち合せなど（図書棟会議室：17:00-18:00 予定）~~

~~懇親会（図書棟会議室：18:00-予定）~~

8月28日(水)

9:00-9:30 今後の研究会についての意見交換会(近畿地区)。

テーマ: 共同研究の展開についての討論

〈座長: 高田 匠〉

7. 9:30-10:00 ○Sun Jiayue^{1,2}、守島健²、井上倫太郎²、杉山正明²、高田 匠²

¹ 京都大学理学研究科 ² 京都大学複合原子力科学研究所

Go beyond the characterization of β B2 oxidation model

8. 10:00-11:00 ○Kirsten Lampi

Oregon Health & Science University

Deamidation increases oxidation of lens crystallins

----- 休憩 (5分) -----

〈座長：八木 寿梓〉

9. 11：05-11：35

○村上一馬

京都大学大学院農学研究科

メタアグリゲートと病態蛋白の学術変革

10. 11：35-12：05 ○茶竹俊行¹、田中伊知朗²、日下勝弘²³、角南智子⁴、藤原悟⁴

¹京都大学複合原子力科学研究所、²茨城大学理工学研究科、

³フロンティア応用原子科学研究センター、⁴量子科学技術研究開発機構

納豆菌が生産する水溶性ビタミン K2 複合体の構造構築

＜閉会のあいさつと帰りの御案内 12：05- 高田 匠＞

光圧による α シヌクレイン液滴の時空間的な形成と老化の誘導

Induction of spatiotemporal formation and aging of a single liquid-like condensate of α -synuclein by optical trapping

茶谷絵理¹、柚佳祐^{1,2}、Ching-Yang Lin²、Po-Wei Yi²、

Chih-Hao Huang²、増原宏²

¹神戸大学大学院理学研究科、²台湾国立陽明交通大学応用化学系

Eri Chatani¹, Keisuke Yuzu^{1,2}, Ching-Yang Lin², Po-Wei Yi², Chih-Hao Huang², and Hiroshi Masuhara²

¹Graduate School of Science, Kobe University

²Department of Applied Chemistry, National Yang Ming Chiao Tung University, Taiwan

e-mail: chatani@crystal.kobe-u.ac.jp

近年、タンパク質や核酸などの生体高分子が生体内で濃縮し、液滴状の集合体（液滴）を形成する現象に注目が集まっている。液滴は様々な生理機能を担う傍ら、その老化に伴う固相転移は疾患の発症に関わるアミロイド線維の生成原因となるため、異常凝集の分野においても注目すべき構造状態である。液滴が老化しながらアミロイド線維を生成する機構を解明するためには、一つの液滴に注目し、液滴の形成と同時に内部変化を経時観察することが有益である。しかしこれに適した方法は無く、高い時空間分解能での観察は達成されていない。

そこで本研究では、液滴からアミロイド線維を生成することが判明している α シヌクレインを対象に、

レーザー集光による光圧を用いた液滴形成を試みた。光圧とは、光が誘電体と相互作用するときが発生する力学的な力である。従来、マイクロメートルサイズの粒子は光圧によって容易に捕捉が可能であるが、タンパク質分子はナノメートルサイズであるうえ屈折率が周囲の水系溶媒に近いと、十分な光圧が得られないとされてきた。ところが、ポリエチレングリコールを少量加えた α シヌクレイン重水溶液の気液界面に 1064 nm の近赤外レーザーを集光すると、 α シヌクレイン分子が捕捉され、液滴を形成することが分かった。これは気液界面の特性および α シヌクレインの多価的な分子間相互作用が絶妙に組み合わせることで見られた現象であり、光圧によって α シヌクレイン液滴形成を時空間制御できることを見出した。

また興味深いことに、レーザー集光を継続することによって液滴が集光領域の外にまで成長する現象も見られた。さらには、固体化による液滴の変形が起こり、棒状の凝集体が伸長した。この観察結果は、レーザー光圧が液滴形成だけでなく、老化も誘導することを強く示唆しており、液滴からの異常凝集研究にブレイクスルーをもたらすことが期待される。

ペリスタポンプのせん断力によるアミロイド線維形成

Amyloid formation by shear stress of peristaltic pump

太田朝貴、後藤祐児、荻博次

大阪大学 大学院工学研究科

Tomoki Ota, Yuji Goto and Hirotugu Ogi

Graduate School of Engineering, Osaka University

e-mail: ota@qm.prec.eng.osaka-u.ac.jp

アミロイド線維は、規則正しい構造と針状の形態を持つ不溶性の蛋白質性凝集体であり、アルツハイマー病やパーキンソン病といったアミロイドーシスという疾患を引き起こす。アミロイド線維形成過程は変性した蛋白質の過飽和溶液からの結晶成長と類似しており、溶解度に制御された相転移現象である。*In vitro*においては、過飽和解消のトリガーとして攪拌や超音波照射が広く用いられるが、*in vivo*におけるトリガーの詳細は依然として未解明である。

今回、我々はペリスタポンプ流がニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)のアミロイド線維を形成することを発見した。ペリスタポンプ流によるアミロイド線維形成を詳細に観察するために、ペリスタポンプ、フローセルを備えた蛍光光度計、蛍光顕微鏡から成るループシステムを構築し、チオフラビン T(ThT)を混合した HEWL 溶液を 0.1 mL/min の流速でフローした。ペリスタポンプを通過した HEWL 溶液は蛍光顕微鏡によって、クラスター状で綿毛のような形態を持つ大きさ数十 μm の ThT 陽性凝集体を形成していることが明らかとなった。また、蛍光光度計によってモニターした ThT 蛍光強度は、HEWL 溶液が光度計に到達した際に増加した。回

収した溶液は電子顕微鏡によってアミロイド線維が形成されていることを確認した。さらに、ペリスタポンプによるアミロイド形成の促進は HEWL に加え、 α -シヌクレイン、アミロイド β 1-40、 β 2-ミクログロブリンといった様々なアミロイド生成蛋白質に共通していることも明らかとなった。また、ペリスタポンプ流中の溶液に誘起される力学的刺激を評価するために、数値シミュレーションを行った。その結果、ペリスタポンプのチューブに接触するローターの蠕動(ぜんどう)運動によって液体中に極めて大きなせん断応力が生じることが明らかとなった。

せん断応力は、*in vivo*において様々なレベルで発生する。そのため、せん断応力が *in vivo*での過飽和を解消しアミロイド形成へのきっかけとなり、最終的にアミロイドーシスへ繋がることが示唆される。

中性子結晶構造解析で観測された水素による

ペプチド結合の部位特異的緩和が「正常な」 β シートの形成を促進する

Site-specific relaxation of peptide bonds by hydrogen observed in neutron crystallography promotes “normal”

β -sheet formation

千葉 かおり

茨城工業高等専門学校 国際創造工学科

Kaori Chiba

Department of Industrial Engineering, National Institute of Technology (KOSEN), Ibaraki College

e-mail: kaori-chiba@gm.ibaraki-ct.ac.jp

タンパク質の異常凝集がどのような条件で起こるのかを明らかにするためには、タンパク質の「正常な」立体構造形成にどのような物理化学的な条件が必要かを知ることが重要である。なかでも、野生型とは異なる構造をもつ制御不能な β シートの形成は、アルツハイマー病など、多くの疾患の原因となる。我々は、タンパク質の一次構造上に配置された酸性アミノ酸が、 β バレル型タンパク質の「正常な」立体構造形成の鍵になっていると考え、研究を進めている。

タンパク質の主鎖のペプチド結合は従来、Pauling らが提案した硬い平面構造をとると考えられてきた。これに対して我々は昨年、中性子結晶構造解析でヒトリゾチームの主鎖カルボニル酸素近傍に観測した水素（重水素）が、ペプチド結合の平面性を部位特異的に軟化するという新たなモデルを提案した¹³。一般に、タンパク質の主鎖の形は、ラマチャンドラプロットに使われる ϕ ψ の角で調整されると考えられており、結晶構造解析でもペプチド結合には一様な硬さがデフォルトで導入されている。我々のモデルでは、タンパク質自身が作る低い静電ポテンシャルにより、この部位にあるペプチド結合が柔らかくなることが示唆された。さらにその後の実験により、2本の β シート間に酸性アミノ酸を配置することで、この部分のペプチド結合が柔らかな「折り目」となり、 β タンパク質の生合成収量が増加することがわかった⁴。本発表では、ペプチド結合の部位特異的緩和の原理と、この原理を用いた β タンパク質のデザイン、また、やわらかなペプチド結合がタンパク質の機能に及ぼす影響についても考察したい。

参考文献

1. Chiba, K. et al., “Site-specific relaxation of peptide bond planarity induced by electrically attracted proton/deuteron observed by neutron crystallography” *Protein Science* (2023) DOI : 10.1002/pro.4765
2. プレスリリース <https://www.ibaraki-ct.ac.jp/info/archives/69201>
3. 千葉薫「生命科学の常識を変える！中性子でしか見えない水」 *CROSS T&T* No.76, 46-50 (2024)

4. Chiba, K. et al., "Role of "relaxed" peptide bond in protein structure and function" IUPAB (2024)

p53 および SARS-CoV2 における異常凝集体の分析

Analysis of the abnormal aggregates of p53 and SARS-CoV2

日比野絵美¹、土方礼嗣¹、山口真稔¹、廣明秀一¹²³

¹名古屋大学大学院創薬科学研究科、²合同会社 BeCellBar、³名大 COMIT

Emi Hibino¹, Reiji Hijikata¹, Manami Yamaguchi¹ and Hidekazu Hiroaki¹²³

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University,

²BeCellBar, ³NU-COMIT

e-mail: hibino.emi.r3@f.mail.nagoya-u.ac.jp

タンパク質の異常凝集が疾患につながる例は多く報告されている。今回、異常凝集が疾患につながると考えられている2つの研究対象について発表する。

1つ目は、がん抑制タンパク質 p53 の異常凝集である。p53 の有する DNA 結合ドメイン (p53-DBD) はアミロイド凝集およびアモルファス凝集することが報告されており、この凝集が p53 の機能低下を引き起こしがん化につながると考えられている。そこで我々は、p53-DBD の凝集を抑制する化合物の同定を試みた。まず、p53-DBD のアモルファス凝集体形成と相関のある ANS 蛍光を指標としてスクリーニング系を構築し、フラボノイド 15 種類に対してスクリーニングを実施した。結果、抗がん活性を持つことが知られている Baicalein をヒット化合物として得た。詳細な解析により、Baicalein は p53-DBD のアモルファス凝集ならびにアミロイド凝集を抑制するが、別の異常凝集を誘導することが判明した。発表ではさらに細胞内での Baicalein の作用について考察する。

2つ目は、SARS-CoV2 のスパイクタンパク質由来のペプチド断片の異常凝集である。ペプチド断片の中でも特に S192 [192-211] はアミロイド線維形成能が高く、そのアミロイド線維は赤血球の凝集を誘導する。こうして作られた微小血栓は、long-COVID 発症の鍵と考えられている。我々は、S192 アミロイドのクライオ電子顕微鏡構造解析を見据えた均質な S192 アミロイド線維の調製を試みた。S192 溶液を先行研究に倣いインキュベートしたところ、5-11 nm の幅のアミロイド線維の形成が確認された。また、S192 を溶解する溶媒によってラグタイムならびに観察されるアミロイド線維の形態が異なることが判明した。さらに S192 モノマー溶液に少量のシードを添加することにより、線維形成のラグタイムが短縮し、約 6 nm 幅に揃ったアミロイド線維が観察された。発表ではさらに溶媒の影響について考察する。

SOD1 の 35 番目のアミノ酸残基「I35」は凝集体形成に寄与する

The 35th amino acid residue of SOD1, “I35”, contributes to aggregate formation

矢埜杏果、藤原範子

兵庫医科大学 医学部 生化学講座

Kyoka Yano, Noriko Fujiwara

Department of Biochemistry, School of Medicine, Hyogo Medical University

e-mail: ikm05428@kwansei.ac.jp

目的：筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こす Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1)の変異は現在までに 200 個以上報告されているが、その発症機構は未だ解明されていない。近年、SOD1 の部分ペプチドのアミロイド化実験やコンピューター解析からアミロイド形成に寄与する配列の特定が進められている[1]。しかし、これらの配列が細胞内で凝集体を形成するのかは不明であった。我々は BioID2 を SOD1-EGFP の N 末端側に融合した発現系を用いると、野生型より ALS 変異 SOD1 で細胞内凝集が顕著に増大することを見出した。そこで、この発現系を用いてアミロイド化配列が細胞内で凝集体を形成するのかを検証し、SOD1 の凝集体形成に関与するアミノ酸配列とアミノ酸残基を特定することを本研究の目的とした。

方法：アミロイド化実験に用いられた配列および SOD1 アミノ酸配列を部分的に欠失させた配列 (BioID2-SOD1 部分配列-EGFP) を上記発現系 (BioID2-SOD1-EGFP)に挿入して HEK293A 細胞に発現させ、48 時間後に蛍光顕微鏡で凝集体形成の有無を観察した。凝集体形成率は、凝集体を有する細胞数/EGFP を発現している細胞数の割合で算出した。

結果：アミロイド化実験[1]でアミロイド化した配列「1-55」「80-153」とアミロイド化しなかった配列「24-79」「56-118」のうち、「1-55」と「56-118」は凝集体を形成したが、「24-79」と「80-153」は凝集体を形成せず、必ずしも一致しなかった。また、SOD1 の C 末端側を順次欠失させた部分配列を発現させたところ、「1-34」は凝集体を形成しなかったが、「1-35」よりも長いアミノ酸配列では凝集体を形成した。また、ALS 変異 SOD1 (A4V, G93A)の I35 を親水性アミノ酸であるセリン(I35S)との二重変異にすると、凝集体の形成が著しく抑制された。次に、30 アミノ酸ずつに分けた SOD1 部分配列を発現させたところ、「90-120」のみ細胞内で凝集体を形成した。

結論：「1-35」が凝集体形成に必要な N 末端側の最小アミノ酸配列であり、I35 が ALS 変異 SOD1 の凝集体形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした[2]。現在「90-120」など C 末端側の配列について検討中である。

[1] Furukawa Y, *et al*, *J Biol Chem*, **29** 22221-31. (2010).

[2] Asai Y, Yano K, Fujiwara N, *et al*, *Mol Neurobiol* 2024 in press

ALS 変異 SOD1 の凝集体形成の理由を分子動力学シミュレーションで説明できるか？

Can molecular dynamics simulations explain why ALS mutant SOD1 forms aggregates?

藤原範子¹、矢埜杏果¹、福島和明²

¹兵庫医科大学 医学部 生化学講座, ²兵庫医科大学 医学部 化学講座

Noriko Fujiwara¹, Kyoka Yano¹, Kazuaki Fukushima²

¹Department of Biochemistry, ²Department of Chemistry, School of Medicine,

Hyogo Medical University

e-mail: noriko-f@hyo-med.ac.jp

目的：抗酸化酵素の1つである Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1)の変異は家族性の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こすことが明らかになっている。SOD1 はサブユニットあたり 153 個のアミノ酸から構成されるホモダイマーで安定な構造を有している。点変異により 1 つのアミノ酸残基が変化すると SOD1 の構造は不安定になり凝集しやすくなることが報告されているが、ALS 発症に至る機構は未だ解明されていない。我々は、I35 が ALS 変異 SOD1 の凝集体形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした[1]。そこで、凝集体形成と SOD1 構造の揺らぎが関連するかどうかを検証するために、野生型 (WT) と凝集体を形成する ALS 変異体「G93A」および凝集体を形成しない「G93A/I35S」について分子動力学シミュレーション解析 (MD 解析) を行った。

方法：コンピュータによる計算には X 線結晶構造解析で明らかにした SOD1 モノマーの原子座標 (PDB:3T5W) [2]を用い、銅イオンと亜鉛イオンを配位させた状態での WT および G93A と G93A/I35S について、圧力 1.0 bar、温度 310 K で、300 ns のシミュレーションを 5 回ずつ行った。

結果：WT と G93A の二乗平均平方根偏差 (RMSD : root-mean-square deviation of atomic positions) や回転半径に大きな差は認められず、両タンパク質ともに球状構造を保っていることを確認した。各アミノ酸残基の平均二乗揺らぎ(RMSF: root-mean-square fluctuation)の解析およびループ部分の RMSD から、WT では金属結合ループ (Loop IV) の方が静電ループ (Loop VII) よりも大きな揺らぎがあり、G93A では逆に金属ループよりも静電ループの方が著しく大きくなっていた。また静電ループの後ろに続く β ストランド 8 の RMSD 値が WT と比べて著しく大きくなっていた。しかし、G93A/I35S では金属結合ループの方が静電ループよりも揺らぎが大きくなっており、WT と似た結果になった。 β ストランド 8 の揺らぎも G93A よりも抑制されたが、静電ループの抑制よりも小さいものであった。詳細な解析から、G93A では A93 と隣接する疎

水領域の構造が変化し、V119-CO と L144-NH との水素結合が起こりにくくなっていた。一方、WT では V119-CO と L144-NH との水素結合が起こる時間が長くなり、水素結合の形成に伴って金属結合ループの揺らぎが静電ループよりも大きくなることがわかった。

結論：MD 解析から、G93A に変異させた SOD1 では A93 と隣接する疎水領域の構造変化が起こり、WT よりも静電ループと β ストランド 8 が動きやすくなることがわかった。G93A/I35S では WT 同様、静電ループよりも金属ループの揺らぎが大きくなった。以上の結果から、静電ループの揺らぎが大きくなることで、分子同士の相互作用が大きくなり凝集体形成が起こりやすくなる可能性が示唆された。

[1] Asai Y, Yano K, Fujiwara N et al., *Mol. Neurobiol.* 2024 in press

[2] Ihara K., Fujiwara N, et al., *Biosci. Rep.* **32**, 539–548 (2012)

Go beyond the characterization of β B2 oxidation models

Jiayue Sun¹, Ken Morishima², Rintaro Inoue², Masaaki Sugiyama², Takumi Takata²

¹Chemistry Department, Graduate School of Science, Kyoto University

²Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University

E-mail: takumi@ri.kyoto-u.ac.jp

In lenses of vertebrates, three types of proteins named α -, β -, γ -crystallin consist of 90% of lens proteins. α -crystallins are known for their chaperone activity to maintain the solubility of other lens proteins and they majorly exist in large-sized multimers. β / γ -crystallins are known as structural lens proteins. Although β / γ -crystallins share similar primary sequences and tertiary structures, their dispersity is completely different in that γ -crystallins exist only in monomer whereas β -crystallins display a wide range of oligomer size (dimer to decamer) in solution.

Tryptophan residues are conserved in β / γ -crystallins, and they have shown their vitality towards the structure and stability of γ -crystallins. As UV filter, tryptophan can quench high energy by electron transferring mechanism. The consequences of tryptophan residues being oxidized in β -crystallins are still elusive. In our study, we used phenylalanine to replace tryptophan respectively in β B2-crystallin to mimic kynurenine which is the oxidized product in the early stage of β B2-crystallin tryptophan oxidation.

Phenylalanine and kynurenine share the same aromatic side chains with π bonds which are critical to UV

irradiation. For this reason, we generated five β B2 oxidation models, W59/82/85/151/196F and used for analysis.

Our oxidation models showed different biochemical properties from the wild type. Among all mutants, W59F and W151F displayed distinct traits. W59F dramatically decreased heat stability, altered the secondary structure compared to WT, and exposed the hydrophobic region in the Greek Key Motif. W59F promoted tetramerization whereas W151F blocked β B2 oligomerization. Our results support that W59 and W151 are two susceptible positions affecting β B2 stability and oligomerization. These results are consistent with cases in which two tryptophan mutations (W59 and W151) cause congenital cataracts.

Special polymerization traits of our oxidation models let us question the structures of these different-sized oligomers. We extracted the tetramer from W59F, and dimer from W151F and compared them with WT using SAXS. W59F/WT tetramer, W151F/WT dimer possessed identical structures (hereafter named β B2 dimer and β B2 tetramer). Surprisingly, in-solution β B2 dimer fit β B1 dimer crystal structure (face-en-face) whereas β B2 tetramer fit β B2 tetramer crystal structure (two domain-swapped dimers). Our results turned over many hypotheses of the origin of the domain-swapped feature in β B2 dimer, and enlightened on the novel folding pathway of β B2 higher order oligomers. Here we propose that during the folding process, β B2 first forms a face-en-face compact dimer, and then this compact dimer opens and reassociates into domain-swapped dimer as an intermediate in β B2 oligomerization, stacking of domain-swapped dimers forms β B2 tetramer and other higher-order oligomers.

Deamidation increases oxidation of lens crystallins.

Kirsten Lampi, David Thorn, Kate Halverson-Kolkind, Constance Kraay, Samuel Wheeler, Martin Tovar-

Ramirez, Eugene Shakhnovich and Larry David

Oregon Health & Science University, Portland, OR.

E-mail: lampik@ohsu.edu

Purpose: To determine whether deamidation of gS-crystallin increases the susceptibility of its 7 cysteines to glutathionylation and disulfide bond formation.

Methods: Recombinantly expressed wild type (WT) human gS-crystallin and a triple mutant (TM) containing D14, D76, and D143 (sites undergoing extensive deamidation in cataractous lenses) were incubated in oxidized glutathione (GSSG). Following incubation, samples were fully alkylated with iodoacetamide, the overall amount of glutathionylation and disulfide bond formation determined by whole mass measurement. Trypsin digestions were then performed to support parallel reaction monitoring (PRM) and Skyline software analysis to detect specific sites of glutathionylation and disulfide bond formation.

Results: Following incubation, WT and TM gS underwent glutathionylation and formed disulfide bonds. PRM analysis of tryptic digests of WT and TM gS indicated that a disulfide bond in the peptide 19-34 (the

peptide containing C22, C24, and C26) with and was a site of glutathionylation. Furthermore, this peptide contained increased disulfide bonding with the two peptides containing C36 and C129. Additional increased disulfide formation in TM gS between C36-C114, C82-C114, and C114-C129 also occurred compared to WT. PRM analysis further indicated that the major oxidized form of WT gS containing a single disulfide was due to a mixture of one disulfide between C22 and C26, and another between C24 and C36.

Conclusions: Deamidation increased the susceptibility of gS to oxidation through disulfide exchange reaction with GSSG. This presumably was due to increased conformational dynamics allowing increased exposure and proximity of normally buried cysteines. The locking of TM gS into non-native conformations due to the resultant disulfide bonds may contribute to increased light scatter. The results support that deamidation and elevation of GSSG in aged lenses may act synergistically to cause cataract.

Acknowledgements: NIH grants R01EY027768 (LD and KL), R01EY027012 (KL), P30EY010572, and S10OD012246.

メタアグリゲートと病態蛋白の学術変革

Transformative researches of meta-aggregates and pathological proteins

村上 一馬

京都大学大学院農学研究科

Kazuma Murakami

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

e-mail: murakami.kazuma.4v@kyoto-u.ac.jp

アミロイド蛋白質の凝集は、単一あるいは複数の神経変性疾患の病因に関与している。試験管内では、生体分子の凝集はテンプレート依存的なメカニズムで説明される一方で、生体内では他の生体分子（異種アミロイド、核酸、タンパク質）と共凝集する。¹⁾ 形成された凝集体（メタアグリゲート）やその凝集中間体（オリゴマー）を標的とした創薬戦略は、新薬の出現によって加速しつつある異常凝集研究の次代の中心になる可能性がある。²⁾ 本講演では、天然物を起点とした凝集阻害剤に関する演者らの最近の取り組みを紹介する。

一般に、コバレントドラッグ（共有結合標的型阻害剤）は分子内に求電子的な反応基を有していることから、標的タンパク質がもつ求核的アミノ酸残基（システインやリシン）と共有結合することによって、不可逆的にタンパク質機能を阻害する。システイン残基をもつアミロイドは意外にも少ないことから、リシン残基はアミロイド凝集の阻害標的として指摘されている。標的以外のタンパク質との非特異的な反応（オフターゲット効果）は副作用の原因になるため、コバレントドラッグ創薬における標的選択性の制御は重要である。演者らのグループは、青ジソに含まれる 2',3'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (DDC) に着目し、DDC は A β 42 のオリゴマー形成を阻害したことから、この作用機構を解析した。LC-MS とイオンモビリティ質量分析から、DDC の代謝物と A β 42 がシッフ塩基を形成し、A β 42 の 2 量体以上の形成が阻害されていること、MS/MS と ¹H-¹⁵N SOFAST-HMQC 測定からその結合残基は Lys16,28 であることが判明した。Lys16,28 におけるシッフ塩基形成は、DDC を経口投与したアルツハイマー病 (AD) モデルマウス脳においても確認された。Flavonoid search (かずさ DNA 研) から DDC に対する水による求核置換反応、それに続くカルコンの環化によって 3 つの酸化体が生成していると推定された。これらをすべて合成することで DDC の活性本体を明らかにした。³⁾ さらに、DDC を経口投与した野生型マウス脳内において DDC の検出に UPLC-MS/MS によって初めて成功し、その多くは抱合体として脳に移行されていた。抱合化されても DDC の凝集阻害活性は維持されていたことから、DDC による AD 予防の可能性の一端を明らかにした。⁴⁾

[References] 1) *FASEB J.* 2022, *36*, e22493; 2) *実験医学増刊*, 2023, *41*, 1868-1875; 3) *RSC Chem Biol* 2022, *3*, 1380-1396; 4) *J Agric Food Chem* 2023, *71*, 14289-14299

納豆菌が生産する水溶性ビタミン K₂ 複合体の構造構築

Three-dimensional structure of water-soluble vitamin K₂ produced by *Bacillus subtilis natto*.

茶竹俊行¹、柳澤泰任²、高田匠¹、奥田綾¹、守島健¹、井上倫太郎¹、

杉山正明¹

¹京都大学複合原子力科学研究所、²千葉科学大学薬学部

Toshiyuki Chatake¹, Yasuhide Yanagisawa², Takumi Takata¹, Aya Okuda¹, Ken Morishima¹, Rintaro Inoue¹ and

Masaaki Sugiyama¹,

¹Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University, ²Faculty of Pharmaceutical

Sciences, Chiba Institutes of Sciences,

e-mail: chatake.toshiyuki.6x@kyoto-u.ac.jp

目的 血液凝固因子として発見されたビタミン K は、続いて骨形成の促進や動脈石灰化の防止が報告された。現在、骨粗鬆症や心血管疾患に対する予防や治療の応用研究が行われている。一方、日本人の主なビタミン K 摂取源は日本の伝統的な発酵食品である納豆であることが知られている。納豆にはビタミン K₂ の一つであるメナキノ-7 (MK-7) が豊富に含まれており、納豆を食べる若い日本人女性の場合、ビタミン K の摂取源の 45.1% が納豆であることが報告されている。ビタミン K は脂溶性であることに対して、納豆菌はメナキノ-7 と K-binding factor (KBF) と呼ばれるペプチドから構成される大型の水溶性複合体 (*natto*-MK-7) を生産する。この水溶性はビタミン K の応用に有利に働く。今回、我々は *natto*-MK-7 の立体構造と可溶化の機構を明らかにした。

方法 納豆菌を数日間培養した液体培地を濃縮して、その濃縮液から FPLC を繰り返して *natto*-MK-7 の抽出と精製を行った。*natto*-MK-7 の構造の単一性と凝集を動的光散乱で調べた。さらにペプチド成分である KBF を HPLC で抽出した。KBF のアミノ酸組成と分子量をそれぞれアミノ酸分析と TOF-MS で調べた。

結果 精製した *natto*-MK-7 の流体力学的半径 (R_h) は $27.1 \pm 0.3 \text{ \AA}$ であり、溶液中で凝集体を形成することが明らかとなった。KBF の構成アミノ酸は疎水アミノ酸 Val、Leu、Met と親水アミノ酸 Asx (Asn or Asp)、Glx (Gln or Glu) であり、これは過去の解析結果と類似している。一方で分子量は過去に電気泳動から約 3,000 と見積もられていたが、TOF-MS から約 1,050 であることが明らかとなった。

結論 以上の解析結果から、KBF は 5 種類のアミノ酸からなる分子量が約 1050 のペプチドであり、これが 3 本集まって分子量約 3,000 の三量体を形成して、これが集まって分子量約 100,000 ($R_h = 27.1 \text{ \AA}$) 内部に MK-7 を含む水溶性ミセルを形

成することを結論できる。