

## プリオンタンパク質天然構造の安定性を向上させるための一般的手法

研究分担者：桑田一夫 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

研究協力者：本田 諒 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

### 研究要旨

プリオンタンパク質天然構造の安定性を向上させるための一般的手法を、理論及び実験の両面から確立した。タンパク質の天然構造を安定化させる方法として、低分子化合物をリガンドとして結合させる方法があるが、まずこれを熱力学に従い一般的に理論づけた。次に、プリオンタンパク質の異常化は凝集体形成反応を伴っているが、この凝集体形成を抑える方法として、抗体を用いる方法はあったが、今回我々は、プリオンタンパク質のアミロイド形成反応を速度論的に調べることにより、プリオンタンパク質の天然構造がプリオンタンパク質の凝集体形成を抑制することをはじめて見出した。このことは、プリオンタンパク質の天然構造をミミックするペプチドが、抗プリオン作用を有することを示唆した。

### A. 研究目的

プリオンタンパク質天然構造の安定性を向上させるための一般的手法を、理論及び実験の両面から確立する。まず、低分子シャペロンの作動原理を確立する。さらに、プリオンタンパク質は、異常化すると凝集するため、その凝集反応を解析し、制御機転を解明する。これにより、抗体以外のペプチドであっても、凝集反応を制御できる可能性を突き止める。

### B. 研究方法

天然構造に結合するリガンドは、結合自由エネルギー分だけ天然構造を安定化するが、非天然構造（中間構造、変性構造）に結合する場合は、その分だけ天然構造が不安定化されることになる。これを、AKRを用いて実証する。実験的には、構造安定化に際して、エントロピーの寄与を評価する。また、リコンビナントプリオンタンパク質に超音波を照射

し、自己複製能力を持つアミロイド線維を試験管内で生成する。次にアミロイド線維と正常型プリオンを混合し、アミロイド線維の複製速度をThioflavinTを用いて測定する。さらに、平衡点と速度との相関を264点変化させ、それを酵素反応速度論を用いて解析する。

### （倫理面への配慮）

該当なし

### C. 研究結果

天然構造に結合するリガンドは、結合自由エネルギー分だけ天然構造を安定化するが、非天然構造（中間構造、変性構造）に結合する場合は、その分だけ天然構造を不安定化する。これを、AKRを用いて実証した。実験的には、構造安定化に際し、エントロピーの寄与が大きいことが分かった。また、リコンビナントプリオンタンパク質に超音波を照射し、

自己複製能力を持つアミロイド線維を試験管内で生成した。次にアミロイド線維と正常型プリオンを混合し、アミロイド線維の複製速度を ThioflavinT を用いて測定した。さらに、平衡点と速度との相関を 264 点変化させ、それを酵素反応速度論を用いて解析した。その結果、プリオンタンパク質の天然構造は、アミロイド形成を抑制することが分かった。

#### D. 考察

低分子シャペロンの設計方法として、天然構造に特異的に結合し、中間構造や変性構造に非特異的に結合するものを除外することが、戦略上重要である。また、凝集体形成を抑制するためには、これまで抗体のみが考えられていたが、天然構造をミミックするペプチドも凝集体形成を抑制する可能性があり、本知見は、今後の抗プリオンペプチドのデザインに応用可能である。

#### E. 結論

低分子シャペロンは、プリオンタンパク質の天然構造に特異的に結合し、中間構造や変性構造に非特異的に結合しないことが重要であり、その際にエントロピーが重要な役割を果たす。また、凝集反応を抑制するのは、抗体のみでなく、天然構造をミミックするペプチドでもよく、今後の治療薬開発の標的となるだろう。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ohhashi Y, Yamaguchi Y, Kurahashi H, Kamatari YO, Sugiyama S, Uluca B, Piechatzek T, Komi Y, Shida T, Müller H, Hanashima S, Heise H, Kuwata K, Tanaka M. Molecular basis for diversification of yeast prion strain conformation. Proc Natl Acad Sci U S A. 115(10): 2389-2394, 2018
- 2) Yamaguchi KI, Honda RP, Elhelaly AE, Kuwata K. Acceleration of nucleation of prion protein during continuous ultrasonication. J Biochem. 2018 Feb 2. doi: 10.1093/jb/mvy015. [Epub ahead of print]
- 3) Honda R, Kuwata K. Evidence for a central role of PrP helix 2 in the nucleation of amyloid fibrils. FASEB J. 1: fj201701183RR, 2018
- 4) Endo S, Xia S, Suyama M, Morikawa Y, Oguri H, Hu D, Ao Y, Takahara S, Horino Y, Hayakawa Y, Watanabe Y, Gouda H, Hara A, Kuwata K, Toyooka N, Matsunaga T, Ikari A. Correction to Synthesis of Potent and Selective Inhibitors of Aldo-Keto Reductase 1B10 and Their Efficacy against Proliferation, Metastasis, and Cisplatin Resistance of Lung Cancer Cells. J Med Chem. 61(3): 1380, 2018
- 5) Yamaguchi KI, Kuwata K. Formation and properties of amyloid fibrils of prion protein. Biophys Rev. 10(2): 517-525, 2017
- 6) Tran DP, Takemura K, Kuwata K, Kitao A. Protein-Ligand Dissociation Simulated by Parallel Cascade Selection Molecular Dynamic. J Chem Theory Comput. 14(1): 404-417, 2018
- 7) Endo S, Xia S, Suyama M, Morikawa Y, Oguri H, Hu D, Ao Y, Takahara S, Horino Y, Hayakawa Y, Watanabe Y,

- Gouda H, Hara A, Kuwata K, Toyooka N, Matsunaga T, Ikari A. Synthesis of Potent and Selective Inhibitors of Aldo-Keto Reductase 1B10 and Their Efficacy against Proliferation, Metastasis, and Cisplatin Resistance of Lung Cancer Cells. *J Med Chem.* 60(20): 8441-8455, 2017
- 8) Tahoun A, Masutani H, El-Sharkawy H, Gillespie T, Honda RP, Kuwata K, Inagaki M, Yabe T, Nomura I, Suzuki T. Capsular polysaccharide inhibits adhesion of *Bifidobacterium longum* 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages. *Gut Pathog.* 9:27, 2017
- 9) Honda RP, Kuwata K. The native state of prion protein (PrP) directly inhibits formation of PrP-amyloid fibrils in vitro. *Sci Rep.* 7(1):562, 2017
- 10) Endo S, Takada S, Honda RP, Müller K, Weishaupt JH, Andersen PM, Ludolph AC, Kamatari YO, Matsunaga T, Kuwata K, El-Kabbani O, Ikari A. Instability of C154Y variant of aldo-keto reductase 1C3. *Chem Biol Interact.* 276: 194-202, 2017
- 11) Kabir A, Endo S, Toyooka N, Fukuoka M, Kuwata K, Kamatari YO. Evaluation of compound selectivity of aldo-keto reductases using differential scanning fluorimetry. *J Biochem.* 161(2): 215-222, 2017
- 12) Kabir A, Honda RP, Kamatari YO, Endo S, Fukuoka M, Kuwata K. Effects of ligand binding on the stability of aldo-keto reductases: Implications for stabilizer or destabilizer chaperones. *Protein Sci.* 25(12): 2132-2141, 2016
- 13) Mizusawa H, Kuwata K PRION 2016 Tokyo Declaration. *Prion.* 10(4): 265-6, 2016
- 14) Ali F, Yamaguchi K, Fukuoka M, Elhelaly AE, Kuwata K. Logical design of an anti-cancer agent targeting the plant homeodomain in *Pygopus*. *Cancer Sci.* 107(9): 1321-8, 2016
- 15) Sriwilaijaroen N, Magesh S, Imamura A, Ando H, Ishida H, Sakai M, Ishitsubo E, Hori T, Moriya S, Ishikawa T, Kuwata K, Odagiri T, Tashiro M, Hiramatsu H, Tsukamoto K, Miyagi T, Tokiwa H, Kiso M, Suzuki Y. A Novel Potent and Highly Specific Inhibitor against Influenza Viral N1-N9 Neuraminidases: Insight into Neuraminidase-Inhibitor Interactions. *J Med Chem.* 59(10): 4563-77, 2016

## 2. 学会発表

- 1) Kuwata K. A quantum clinic to revolutionize the internal medicine and surgery based on the thermodynamical principles, The 9<sup>th</sup> International Meeting on Biomolecules under Pressure(IMBP 2017), 青蓮会館 Kyoto, Japan. August 21-24, 2017
- 2) 桑田一夫、プリオン病治療薬の開発、日本アミロイドーシス研究会学術集会、2016年8月19日、東京

- 3) Yamaguchi K, Honda R, Elhelaly AE, Kuwata K. Continuous ultrasonic irradiation induces rapid aggregations of MoPrP depending on pH 第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 7-9 日、福岡〈ポスター発表〉
- 4) Kuwata K, Logical design of a therapeutic agent for prion diseases, PRION 2016 Tokyo, Tokyo, May 10-13, 2016
- 5) Honda RP, Yamaguchi K, Kuwata K, Folding and misfolding pathways of prion protein, PRION 2016 Tokyo, Tokyo, May 10-13, 2016
- 6) Shida T, Kamatari YO, Kuwata K, Tanaka M. A local conformation of natively disordered yeast prion monomer determines interspecies prion transmissibility, PRION 2016 Tokyo, Tokyo, May 10-13, 2016
- 7) Yamaguchi K, Hosokawa-Muto J, Kamatari YO, Kuwata K. Calibration of ultrasonic power and conformational analysis of MoPrP amyloid fibrils, PRION 2016, Tokyo, May 10-13, 2016 〈ポスター発表〉
- 8) Ma B, Yamaguchi K, Fukuoka M, Kuwata K. Discovery of anti-prion agents using PyMOL plugin-based logical drug design platform NAGARA, PRION 2016, Tokyo, May 10-13, 2016 〈ポスター発表〉
- 9) Kamatari YO, Kuwata K. Classification of anti-prion compounds based on the binding properties to prion proteins, PRION 2016, Tokyo, May 10-13, 2016 〈ポスター発表〉
- 10) Tanaka M, Ohhashi Y, Yamaguchi Y, Kamatari YO, Kuwata K. Latent structural variation in a yeast prion monomer determines strain phenotypes, PRION 2016, Tokyo, May 10-13, 2016 〈ポスター発表〉
- 11) Endo S, Takada S, Honda R, Müller K, Kamatari YO, Matsunaga T, Kuwata K, Weishaupt J, Ikari A. Instability of C154Y variant of aldo-keto reductase 1C3 found in familial amyotrophic lateral sclerosis, 18th International Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Costa Brava, July 12-17, 2016 〈ポスター発表〉
- 12) Yamaguchi K, Kamatari YO, Honda RP, Kuwata K. Real-Time In vitro Conversion of Prion Protein Detected by NMR, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Kyoto, August 21-26, 2016 〈ポスター発表〉

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

Kazuo Kuwata: MALEIC ACID SALT OF ANTI-PRION COMPOUND, METHOD FOR PRODUCING THE SAME AND PHAMACEUTICAL COMPOSITION OF THE SAME ; Nov. 7, 2017(US 9,809,563 B2)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし