

酸化還元状態と共役したタンパク質の液-液相分離の解析と制御を可能にする分子ツールの開発

池田 将^{*1} 吉田 紀生^{*2}
菅瀬 謙治^{*3}

Development of Molecular Tools to Analyze and Control the Liquid-liquid Phase Separation of Proteins Conjugated with Redox States

Masato IKEDA^{*1}, Norio YOSHIDA^{*2} and Kenji SUGASE^{*3}

¹Department of Chemistry and Biomolecular Science, Faculty of Engineering, Gifu University, ² Department of Complex Systems Science, Graduate School of Informatics, Nagoya University, ³Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

1. 研究背景

私たちは食品として取り込んだ栄養を細胞内で酸化することによりエネルギーを生産する。このエネルギー生産に伴い発生する活性酸素は健康を害する原因になるため、細胞内には活性酸素を除去する抗酸化（還元）システムが存在する。細胞内の酸化還元状態は食事や運動などにより大きく変動するが、近年 酸化還元状態の変動にตอบสนองしてタンパク質が液-液相分離し、エネルギー生産とオートファジー（生体分子の分解）をスイッチングすることが明らかにされた^{1,2)}。この報告を機に、細胞内で動的に変動する酸化還元状態とタンパク質の液-液相分離との関係が注目されるようになった。しかし、この関係を研究する上で肝となる、細胞内の酸化還元状態を解析するツールが乏しい。そこで、本研究では有機・分子集合化学（池田）、計算科学（吉田）、NMR（菅瀬）が異分野連携し、酸化還元状態の変動を分子の凝集/分散や化学シフト変化によりセンシングできる新しい分子ツールを開発する（図1）。

酸化還元状態の変化にตอบสนองする分子ツール開発

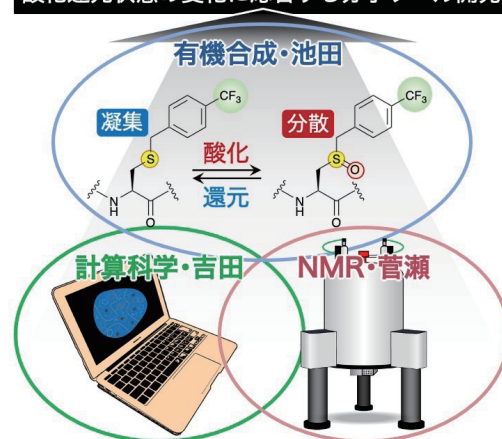


図1 本共同研究の目的と異分野連携。

2. 分子ツール (C^{CF_3Bzl}) の分子設計と合成

有機・分子集合化学を専門とする池田は、最近 ベンジルシステイン (C^{Bzl}) のスルフィド部位のスルホキシドへの酸化反応に基づき、水溶液中で酸化還元状態にตอบสนองして凝集状態が変化する分子を見出した³⁾。本研究では、図1に示す¹⁹Fを導入したベンジルシステイン (C^{CF_3Bzl}) を新たに設計し、この分子設計を基盤として、細胞内の酸化還元状態と共役したタンパク質の液-液相分離の解析と制御を可能にする分子ツールを開発することを目指した。

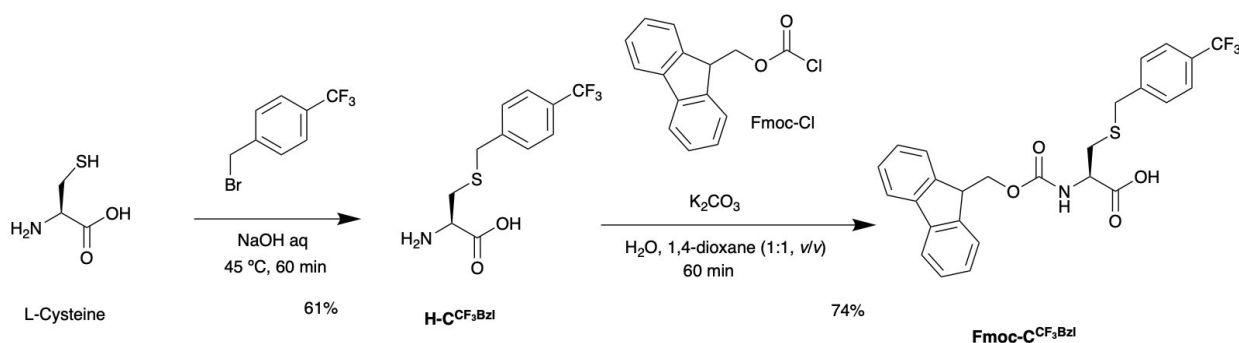
図2に示すスキームにしたがって、ペプチド固相合成にも用いることが可能なFmoc保護体 ($Fmoc-C^{CF_3Bzl}$) を、有機化学的に合成した。得られた $Fmoc-C^{CF_3Bzl}$ は、¹H NMR, ¹³C NMR, ¹⁹F NMRスペクトル、およびHRMS測定によって同定した。

2024年2月10日 受理

^{*1} 岐阜大学工学部化学・生命工学科

^{*2} 名古屋大学大学院情報科学研究科複雑系科学専攻

^{*3} 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

図2 システインを原料としたFmoc-C^{CF₃Bzl}の合成スキーム.

3.1. Fmoc-C^{CF₃Bzl}の水溶液中における分子集合挙動の評価

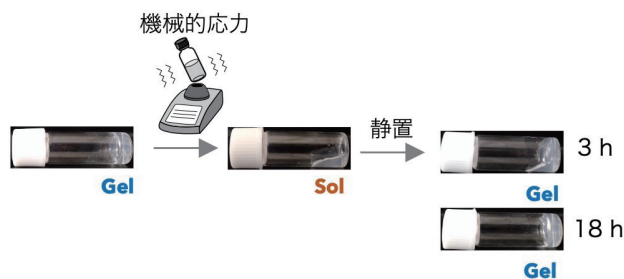
Fmoc-C^{CF₃Bzl}の100 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) 水溶液における分子集合挙動を評価した. 具体的には, Fmoc-C^{CF₃Bzl}のdimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液 (200 mg/mL) を調製し, 2 mL ガラスバイアル瓶 (No. 0.2, 11.7 × 35 mm, Maruemu) に所定量 (2.0–10 L) を入れた. そこに, 合計10 LになるようにDMSOを追加した後, 100 mM HEPES-NaOH buffer (190 L) を加え混合した. このように調製したサンプルを, 超音波・加熱処理後, 室温で24時間静置し, 一定時間ごとに状態を目視によって評価し, その様子をWeb camera (logicool, C920 Pro) で撮像した.

いずれの濃度においても超音波・加熱処理によって溶解した. さらに, 図3に示すように, 2.4 mM以上では, 少なくとも24 h後にはヒドロゲルを形成することが明らかになった. 一方で, 1.6 mMでは, 24 h後にもゲルを形成しなかった. この結果から, この実験条件におけるFmoc-C^{CF₃Bzl}の最低ゲル化濃度 (cgc) は, 2.4 mMと見積もられた. 以上の結果は, Fmoc-C^{CF₃Bzl}が水溶液中において, ある濃度以上で分子集合し, ネットワーク化した構造体を形成することを示唆している.

図3 ヒドロゲル形成能から評価したFmoc-C^{CF₃Bzl}の水溶液中における分子集合挙動.

3.2. Fmoc-C^{CF₃Bzl} ヒドロゲルの機械的応力に対する応答

上記の検討から得られたFmoc-C^{CF₃Bzl}ヒドロゲルの物性を評価したところ, 機械的応力に応答してゾル化し, 解除後のゲル化する, チキソトロピー性を示すことを発見した (図4).

図4 Fmoc-C^{CF₃Bzl}ヒドロゲルが示すチキソトロピー性.

そこで直ちに, NMRを専門とする菅瀬と池田が連携し, Fmoc-C^{CF₃Bzl}ヒドロゲルを試料とした高感度Rheo-(¹⁹F)NMR測定⁴⁾を行った. 当該装置は, 菅瀬によって開発された世界的にも独自性の高いもので, せん断応力を印加させながら, 高感度かつリアルタイムに¹⁹F NMRスペクトル (すなわち, 原子レベルの情報) を得ることを可能とする (図5). 今回は, Fmoc-C^{CF₃Bzl}ヒドロゲルをNMR試験管に導入し, せん断応力を印加させるためのガラススティックを挿入し, その同

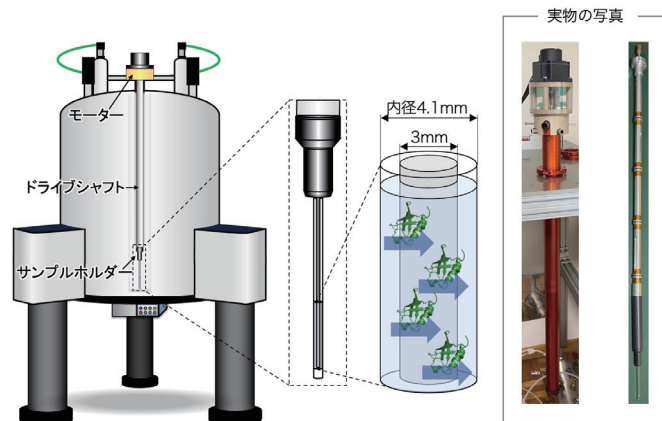


図5 高感度Rheo- ^{19}F NMR測定装置.

軸回転速度を変化させながら、 ^{19}F NMRスペクトルを取得した。その結果、せん断流れ（応力）を印加すると、 CF_3 基由来の ^{19}F シグナル (ca. -62 ppm) がブロードニング化することが明らかになった。また、ブロード化したピークには複数のピークが含まれていると考えられ、複数の状態が混在していることが示唆された。

3.3. 全原子分子動力場 (MD) 計算による $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}$ の水溶液中における分子集合挙動の解析

以上の実験と並行して、計算科学を専門とする吉田によって、全原子分子動力場 (MD) 計算による $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}$ の水溶液中における分子集合挙動の解析が進められた。これまでに、スルフィド体である $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}$ および、その酸化体であるスルホキシド $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}\text{-O}$ およびスルホン $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}\text{-O}_2$ の 300 K, 1 bar における MD 計算 (200 ns) が行われた。その結果を解析したところ、時間経過に伴い生成する分子クラスターの形成速度がそれぞれの化合物で異なることが示唆された。この結果も踏まえて、池田は、 $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}$ の酸化体の合成を進め、 ^{19}F NMR スペクトルを取得し、 $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}$ と $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}\text{-O}_2$ で、 CF_3 基由来の ^{19}F シグナルが顕著に異なることを見出した。今後、それぞれの分子の集合挙動の評価を含めたさらなる検討を進める必要がある。また、MD 計算の結果得られた構造から ^{19}F シグナルの計算し、実験結果との検証をさらに進めることを計画している。さらに、吉田が得意とする水和構造に関する解析も進めることで、実験結果および材料物性との相関を見出すことも可能になると期待している。

4. 結論と今後の方針

以上のように、本スカラー共同研究では3名の研究者（池田・吉田・菅瀬）が異分野連携し、酸化還元状態の変動を分子の凝集/分散や化学シフト変化によりセンシングできる分子ツールの創製を目的として、 $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}$ を新たに設計・合成し、水溶液中における分子集合挙動に関する評価を進めた。その実験過程で、 $\text{Fmoc-C}^{\text{CF}_3\text{Bzl}}$ が形成するヒドロゲルの興味深い物性（チキソトロピー性）を見出した。この物性に関して、それぞれの研究者の専門性を融合することで、個々の研究者では踏み込むことが難しい領域での研究と実験を進めることが可能になり、分子集合材料に関する新たな知見を得つつある。このことは、本スカラー共同研究を進めた大きな意義と捉えている。今後、新たな分子集合材料としての応用を開拓するとともに、物性発現のメカニズムやその普遍性の検証などを進めることを計画している。また、酸化還元状態の変動の追跡の開発を目指した分子ツール開発に関する実験を着実に進め、目的としている分子ツールの開発およびそのための学理の構築を目指して研究を進めている。

REFERENCES

- 1) Y. S. Yang, M. Kato, X. Wu, A. Litsios, B. M. Sutter, Y. Wang, C. H. Hsu, N. E. Wood, A. Lemoff, H. Mirzaei, M. Heinemann and B. P. Tu, *Cell*, **177** (2019) 697-710.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.043>.
- 2) M. Kato, Y. S. Yang, B. M. Sutter, Y. Wang, S. L. McKnight and B. P. Tu, *Cell*, **177** (2019), 711-721.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.044>.
- 3) Y. Shintani, H. Katagiri and M. Ikeda, *Adv. Funct. Mater.* (2024) *in press*. <https://doi.org/10.1002/adfm.202312999>.
- 4) D. Morimoto, E. Walinda, N. Iwakawa, M. Nishizawa, Y. Kawata, A. Yamamoto, M. Shirakawa, U. Scheler and K. Sugase, *Anal. Chem.*, **89** (2017) 7286-7290. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01816>.