

2022年6月30日

## 大阪大学・国際医工情報センター蛋白質凝集制御デバイス寄附研究部門 令和2-3(2020-2021)年度活動報告および寄附講座終了報告

寄附研究部門特任教授 後藤祐児

当寄附研究部門は、株式会社ダイセル、コロナ電気株式会社のご寄付により、2020年4月、大阪大学・国際医工情報センターに後藤を特任教授として発足しました。

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患をはじめとした高齢化に伴うさまざまな疾患はアミロイドシスと総称され、原因変性蛋白質が線維状で結晶性の凝集体であるアミロイド線維を形成することによって引き起こされることが明らかになっています。後藤は、2010年より、超音波を用いた凝集体形成誘導装置“HANABI (HANdai Amyloid Burst Inducer)”の開発に取り組むと共に、パーキンソン病の原因となる $\alpha$ シヌクレインを中心に、さまざまなアミロイド線維の形成機構、アミロイド線維沈着の早期検出に関する研究開発を進めてきました。なお、HANABIの研究開発には、医学系研究科(望月)、工学研究科(荻)、蛋白質研究所(後藤)が協力して取り組んできました。

本寄附研究部門では、溶解度や過飽和に制御された蛋白質のアミロイド線維形成の基本原理を研究すると共に、HANABIの研究開発をさらに加速し、高度化しました。これにより、蛋白質凝集体形成の制御技術の開発、関連する疾患発症の原理解明、疾患の予測と予防の達成、治療効果の検証を目指しました。

予定した寄附研究部門設置期間は2020年4月から3年でしたが、発足から2年で所期の目標を達成することができました。このため、2022年5月末日をもちまして、寄附研究部門を終了することになりました。これまでの研究活動をまとめ、ご紹介すると共に、皆様のご批判をいただきたく存じます。

なお、メンバーの一部は2022年6月に大阪大学工学研究科に新たに発足したマイクロソノケミストリー共同研究講座(株式会社ダイセル)において、新たな研究テーマのもとに研究開発を実施します。今後ともご指導、ご鞭撻のほど、よろしくお願い致します。

**【設置期間】令和2(2020)年4月1日—令和4(2022)年5月31日**

### **【寄附研究部門構成員】**

特任教授(非常勤)	後藤祐児	(2020年4月—2022年5月)
特任助教(常勤)	山口圭一	(2020年4月—2022年5月)
特任研究員(常勤)	中島吉太郎	(2020年4月—2022年5月)
特任研究員(非常勤)	笠井俊三	(2020年4月—2022年3月)
特任研究員(非常勤)	三間穰治	(2021年5月—2022年4月)
特任研究員(非常勤)	守山由喜子	(2020年4月—2022年5月)
事務補佐員(非常勤)	山元美和	(2020年4月—2022年5月)

**【主な共同研究者】\*学振拠点形成事業分担者、†蛋白質研究所共同研究員受入先**

**【学内】**

大学院医学系研究科神経内科学・教授	望月 秀樹*
大学院医学系研究科神経内科学・助教	池中 健介*
大学院医学系研究科神経内科学・研究員	AGUIRRE MARTINEZ, César*
大学院医学系研究科・教授	永井 義隆*
大学院工学研究科・教授	萩 博次*
大学院工学研究科・教授	内山 進*
蛋白質研究所・助教	宗 正智*
工学研究科・博士前期課程1年	戸田 元
蛋白質研究所・教授	藤原 敏道*,†
蛋白質研究所・准教授	松木 陽*
大阪大学・名誉教授、同・欧州拠点・センター長	長谷 俊治*

**【学外】**

福井大学・医学部・教授	内木 宏延*
量子科学技術研究開発機構・医長	徳田 隆彦*
神戸大学・大学院理学研究科・准教授	茶谷 絵理*
近畿大学・先端技術総合研究所・准教授	櫻井 一正*
京都大学・大学院薬学研究科・准教授	星野 大*
京都大学・大学院人間環境学研究科・特定研究員	野地 真広*
岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究科 教授	桑田 一夫*
信州大学・バイオメディカル研究所・教授	樋口 京一*
新潟大学・医歯学総合病院・准教授	山本 卓
鳥取大学・工学研究科・教授	河田 康志
鳥取大学・工学研究科・准教授	八木 寿梓

**【国外】学振拠点形成事業海外拠点コーディネーター**

国名	拠点機関名	所属部局・職名・氏名
ハンガリー	エトバッシュ ローランド大学	Institute of Biology, Associate Professor, KARDOS, Jozsef
オーストラリア	オーストラリア 国立大学	Research School of Chemistry, Professor, CARVER, John
英国	ユニバーシティ・ カレッジ・ロンドン	Centre for Amyloidosis, Professor, BELLOTTI, Vittorio
イタリア	ウディネ大学	Department of Mathematics, Informatics and Physics, Associate Professor, ESPOSITO, Gennaro/FOGOLARI, Federico
ドイツ	ミュンヘン工科 大学	Department of Chemistry, Professor, BUCHNER, Johannes
デンマーク	オーフス大学	Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), Professor, OTZEN, Daniel Erik
ポーランド	ワルシャワ大学	Department of Chemistry, Professor, DZWOLAK, Wojciech

## 【研究室所在地】

565-0871 吹田市山田丘 2 - 1 大阪大学・産学共創 D 棟 6 階 D131 (80m<sup>2</sup>), D132 (86m<sup>2</sup>)

HP:MEI センター <https://mei.osaka-u.ac.jp/> 研究室  
<https://supersaturation.sakura.ne.jp/>

Tel: 06-6879-4100 (後藤) , -4101 (研究室)

Email (後藤) : [gtyj8126@protein.osaka-u.ac.jp](mailto:gtyj8126@protein.osaka-u.ac.jp)

## 【研究の概要】

### 【研究目的】

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患をはじめとした高齢化に伴うさまざまな疾患はアミロイドーシスと総称され、原因変性蛋白質が線維状で結晶性の凝集体であるアミロイド線維を形成することによって引き起こされることが明らかになっている。既に我々は、超音波を用いた凝集体形成誘導装置 “HANABI (HANdai Amyloid Burst Inducer)” を用いて、パーキンソン病の原因となる $\alpha$ シヌクレインを中心に、さまざまなアミロイド線維の形成機構、アミロイド線維沈着の早期検出に関する研究開発を進めてきた。HANABIの研究開発は、医学系研究科(望月秀樹、池中建介)、工学研究科(荻博次)、蛋白質研究所(後藤)が協力して行ったものであり、全く独創的な装置を開発した。本研究部門ではこれをさらに発展させ、溶解度や過飽和に制御された蛋白質のアミロイド線維形成の基本原則を研究すると共に、HANABIの研究開発をさらに加速し、高度化する。これにより、蛋白質凝集体形成の制御技術の開発、関連する疾患発症の原理解明、疾患の予測と予防の達成、治療効果の検証を目指す。

### 【研究課題と実施状況】

#### ① 蛋白質のアミロイド線維形成の原理

- 蛋白質のアミロイド線維は、原因蛋白質が溶解度を越えた過飽和状態において、何らかの物理的的刺激によって過飽和が解消された場合、あるいは、シードとして作用するアミロイド線維が存在した時に形成する。これらの詳細を研究することによって、アミロイド線維形成の原理解明に迫る。
- 科研費新学術領域研究「細胞夾雑系」の計画研究「細胞夾雑系における蛋白質異常凝集の原理と制御、2017 - 2021 年度」を実施した。
- 学術振興会研究拠点形成事業 (A. 先端拠点型)、課題「蛋白質凝集の先端研究ネットワーク形成、2018-2022 年度」を、ハンガリー、オーストラリア、英国、イタリア、ドイツ、デンマーク、ポーランドの各拠点と実施した。コロナ禍によって、海外渡航による研究交流はできなかった。なお、2020 年度に行われた中間評価においては、最も高い A 評価であった。

#### ② HANABI の高度化

- HANABI2000 は超音波刺激によって過飽和を解消し、本来、アミロイド線維を形成しない溶媒条件において、アミロイド線維を強制的に誘導し、検出する装置である。また、微量のシードが存在する場合にはこれを増幅して検出することができる。超音波条件や溶媒条件、さらには装置構成を検討することによって、アミロイド線維形成の誘導や、シードの検出最適化することを目指した。
- コロナ電気の研究者が月 1 回、3 日程度来阪して、市販予定の装置 HANABI2000 の改良を行った。温度制御、操作性において改善を達成した。

③ αシヌクレインのアミロイド形成と疾患 :

- αシヌクレインのアミロイド線維形成は、パーキンソン病、レビー小体型認知症、および多系統萎縮症の患者脳で起こり、これらはαシヌルレオパチーと呼ばれる。望月、池中（本学医学系研究科）と連携して、HANABI2000を用いたこれらの疾患の早期発見や、区別、治療の効果検証の達成を目指した。

④ さまざまなアミロイドーシスを対象とした研究 :

- 新潟大学（山本卓）と透析アミロイドーシス（β2ミクログロブリン）の発症機構に関する研究を実施した。HANABI2000を用いて透析患者および対照者の血清を用いた評価を行った。透析アミロイドーシスの危険因子として、β2ミクログロブリンの濃度上昇、透析期間があげられている。今回、透析患者血中の血清アルブミンの濃度低下が新たな危険因子であることを明らかにした。
- さまざまなアミロイドーシスのアミロイド線維形成機構は共通しており、HANABI2000を用いた研究は、それらにも適用できる。特に対象とするのは、アルツハイマー病（アミロイドβ、タウ蛋白質）、老人性アミロイドーシス（Senile Systemic Amyloidosis）（トランスサイレチン）などである。（）内に示すこれらの疾患の原因蛋白質を用いて、アミロイド線維形成機構を研究すると共に、疾患の早期発見や予測、治療の効果検証の達成を目指した。

**【論文発表】 2020年4月以降に発表した論文等**

**2020年度**

269. Isoelectric point-amyloid formation of α-synuclein extends the generality of the solubility and supersaturation-limited mechanism. Koki Furukawa\*, Cesar Aguirre\*, Masatomo So\*, Kenji Sasahara, Yohei Miyanoiri, Kazumasa Sakurai, Keiichi Yamaguchi, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, Jozsef Kardos, Yasushi Kawata, and Yuji Goto \*equal contribution. *Current Research in Structural Biology* 2, 35-44 (2020). DOI: 10.1016/j.crstbi.2020.03.001. Available online: 05 Apr 2020.
270. Amyloid formation of α-synuclein based on the solubility- and supersaturation-dependent mechanism. Maya Sawada, Keiichi Yamaguchi, Miki Hirano, Masahiro Noji, Masatomo So, Daniel Otzen, Yasushi Kawata, and Yuji Goto. *Langmuir* 36 (17), 4671–4681 (2020). DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c00426. Publication date: 09 Apr 2020
271. Dialysis-related amyloidosis associated with a novel β2-microglobulin variant. Hiroki Mizuno, Junichi Hoshino, Masatomo So, Yuta Kogure, Takeshi Fujii, Yoshifumi Ubara, Kenmei Takaichi, Tetsuko Nakaniwa, Hideaki Tanaka, Genji Kurisu, Fuyuki Kametani, Mayuko Nakagawa, Tsuneaki Yoshinaga, Yoshiki Sekijima, Kei-ichi Higuchi, Yuji Goto, and Masahide Yazaki, *Amyloid* 1-8 (2020). DOI:10.1080/13506129.2020.1813097, Published online: 02 Sep 2020.
272. Inorganic polyphosphate potentiates lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response. Toru Ito, Suguru Yamamoto\*, Keiichi Yamaguchi, Mami Sato, Yoshikatsu Kaneko, Shin Goto, Yuji Goto, & Ichiei Narita, *J. Biol. Chem.* 295 (12), 4014-4023 (2020). DOI: 10.1074/jbc.RA119.011763, Publication date: 20 Mar 2020

273. Distinct residual and disordered structures of alpha-synuclein analyzed by amide-proton exchange and NMR signal intensity. Rina Okuwaki, Iori Shinmura, Shiki Morita, Akimasa Matsugami, Fumiaki Hayashi, Yuji Goto, Chiaki Nishimura. *BBA - Proteins and Proteomics* 1868 (9), DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140464 Epub: 02 Jun 2020.
274. Time-resolved observation of evolution of amyloid- $\beta$  oligomer with temporary salt crystals. Kichitaro Nakajima, Tomoya Yamazaki, Yuki Kimura, Masatomo So, Yuji Goto, Hirotsugu Ogi, *J. Phys. Chem. Lett.* 11, 6176–6184 (2020). 【プレスリリース 1】 DOI: 10.1021/acs.jpcclett.0c01487. Epub:20 Jul 2020.
275. Multistep Changes in Amyloid Structure Induced by Cross-Seeding on a Rugged Energy Landscape. Keisuke Yuzu, Naoki Yamamoto, Masahiro Noji, Masatomo So, Yuji Goto, Tetsushi Iwasaki, Motonari Tsubaki, Eri Chatani. *Biophysical Journal*, 120 (2), 284-295 (2021) DOI: 10.1016/j.bpj.2020.12.005. Published: 19 Jan 2021.
276. Breakdown of supersaturation barrier links protein folding to amyloid formation. Masahiro Noji, Tatsushi Samejima, Keiichi Yamaguchi, Masatomo So, Keisuke Yuzu, Eri Chatani, Yoko Akazawa-Ogawa, Yoshihisa Hagihara, Yasushi Kawata, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, József Kardos, Daniel Otzen, Vittorio Bellotti, Johannes Buchner, and Yuji Goto. *Communications Biology* 4, 120 (2021). DOI: 10.1038/s42003-020-01641-6. Published:26 Jan 2021. 【プレスリリース 2】
277. pH-Dependent protein binding properties of uremic toxins in vitro. Suguru Yamamoto, Kenichi Sasahara, Mio Domon, Keiichi Yamaguchi, Toru Ito, Shin Goto, Yuji Goto, Ichiei Narita. *Toxins* 2021, 13(2), 116; DOI: 10.3390/toxins13020116. Published: 4 Feb 2021.
278. Optimized sonoreactor for accelerative amyloid-fibril assays through enhancement of primary nucleation and fragmentation. Kichitaro Nakajima, Kentaro Noi, Keiichi Yamaguchi, Masatomo So, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, Hirotsugu Ogi, Yuji Goto. *Ultrasonics Sonochemistry* 73. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2021.105508.

#### 2021 年度

279. Polyphosphates induce amyloid fibril formation of  $\alpha$ -synuclein in  $\alpha$ concentration-dependent distinct manners. Keiichi Yamaguchi, Masatomo So, César Aguirre, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, Yasushi Kawata, Yuji Goto, *J. Biol. Chem.* (2021) 296 100510. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100510.
280. Review: Current understanding of structure, stability, and dynamic properties of amyloid fibrils. Eri Chatani, Keisuke Yuzu, Yumiko Ohhashi, and Yuji Goto. *Int. J. Mol. Sci.* (2021) 22, 4349. DOI: 10.3390/ijms22094349
281. Polyphenol-solubility alters amyloid fibril formation of  $\alpha$ -synuclein. Masatomo So†, Yuto Kimura‡, Keiichi Yamaguchi, Toshihiko Sugiki, Toshimichi Fujiwara, Cesar Aguirre, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, Yasushi Kawata, and Yuji Goto, † Equal contribution, *Protein Science* (2021) 30 (8), 1701-1713. DOI: 10.1002/pro.4130
282. Disaggregation behavior of amyloid  $\beta$  fibrils by anthocyanins studied by total-internal-reflection-fluorescence microscopy coupled with a wireless quartz-crystal microbalance biosensor. Kentaro Noi, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, Yuji Goto, and Hirotsugu Ogi. *Anal. Chem.* (2021), 93 (32), 11176-11183. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c01720

283. Strong acids induce amyloid fibril formation of  $\beta$ 2-microglobulin via an anion-binding mechanism. Keiichi Yamaguchi<sup>†</sup>, Kenshiro Hasuo<sup>†</sup>, Masatomo So, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, and Yuji Goto, <sup>†</sup>Equal contribution. *J. Biol. Chem.* 297 (5), 101286, (2021). DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101286
284. Pathogenic D76N variant of  $\beta$ 2-microglobulin: synergy of diverse effects both in the native and amyloid states. Éva Bulyáki, Judit Kun, Tamás Molnár, Alexandra Papp, András Micsonai, Henrietta Vadász, Borbála Márialigeti, Attila István Kovács, Gabriella Gellén, Keiichi Yamaguchi, Yuxi Lin, Masatomo So, Mihály Józsi, Gitta Schlosser, Young-Ho Lee, Károly Liliom, Yuji Goto, József Kardos, *Biology* (2021) 10(11), 1197. DOI: 10.3390/biology10111197
285. (Review) Development of HANABI, an ultrasonication-forced amyloid fibril inducer. Yuji Goto, Kichitaro Nakajima, Kei-ichi Yamaguchi, Masatomo So, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, and Hirotsugu Ogi, *Neurochemistry International* (2021) 105270. DOI: 10.1016/j.neuint.2021.105270
286. Macromolecular crowding and supersaturation protect hemodialysis patients from the onset of dialysis-related amyloidosis. Kichitaro Nakajima, Keiichi Yamaguchi, Masahiro Noji, César Aguirre, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, Lianjie Zhou, Hirotsugu Ogi, Ichiei Narita, Fumitake Gejyo, Hironobu Naiki, Suguru Yamamoto, and Yuji Goto, *bioRxiv*: DOI: 10.1101/2022.02.01.478730
287. BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. Andra's Micsonai, E' va Moussong, Frank Wien, Eszter Boros, Henrietta Vada'szi, Nikoletta Murvai, Young-Ho Lee, Tam'as Moln'ar, Matthieu R' efr 'egiers, Yuji Goto, A'gnes Tantos and Jo'zsef Kardos, *Nucleic Acids Research*, 2022 1–9. DOI: 10.1093/nar/gkac345
288. Pathway dependence of the formation and development of prefibrillar aggregates in insulin B chain. Yuki Yoshikawa, Keisuke Yuzu, Naoki Yamamoto, Ken Morishima, Rintaro Inoue, Masaaki Sugiyama, Tetsushi Iwasaki, Masatomo So, Yuji Goto, Atsuo Tamura, Eri Chatani. *Molecules*, 27 (13) 3964. DOI: 10.3390/molecules27133964
289. Two-step screening method to identify  $\alpha$ -synuclein aggregation inhibitors for Parkinson's disease. Makoto Hideshima, Yasuyoshi Kimura, César Aguirre, Keita Kakuda, Toshihide Takeuchi, Chi-Jing Choong, Junko Doi, Kei Nabekura, Keiichi Yamaguchi, Kichitaro Nakajima, Kousuke Baba, Seiichi Nagano, Yuji Goto, Yoshitaka Nagai, Hideki Mochizuki, and Kensuke Ikenaka. *Scientific Reports* 12, 351, (2022). DOI: 10.1038/s41598-021-04131-9
290. Acceleration of amyloid fibril formation by multichannel sonochemical reactor. Kentaro Noi, Kichitaro Nakajima, Keiichi Yamaguchi, Masatomo So, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, Yuji Goto, and Hirotsugu Ogi. *Jpn. J. Appl. Phys* 61, SG1002 (2022).

## 【その他の出版】

1. 野地真広・後藤祐児、「相転移、相分離と溶解度、過飽和」、pp 19–25、白木賢太郎編、現代化学増刊 4 6 「相分離生物学の全貌」、2020/11/16、ISBN:

9784807913466、東京化学同人

2. 中島吉太郎, 山口圭一, 荻 博次, 後藤祐児. 「超音波を利用した蛋白質アミロイド凝集誘導装置 HANABI」 超音波 TECHNO 2021. 9-10, 44-48.
3. 山口圭一, 中島吉太郎, 後藤祐児. 「ポリリン酸が引き起こすアミロイド線維形成機構」 細胞 53(9), (571)59-62(574), 2021.
4. 野地真広・後藤祐児、「解説：蛋白質フォールディングとミスフォールディングの統合」 生物物理 61 (6), 358-365 (2021) DOI: 10.2142/biophys.61.358

## 【学会発表等】

日時	場所	学会名	演題	著者	形式
<b>2020年度</b>					
7月28日	オンライン	第20回日本蛋白質科学会年会	Mechanism of polyphosphate-induced amyloid fibrillization of $\alpha$ -synuclein	Keiichi Yamaguchi, Masatomo So, Kenji Sasahara, Yasushi Kawata, Yuji Goto	ポスター発表 (要旨集にて)
7月28日	オンライン	第20回日本蛋白質科学会年会	Amyloid formation and breakdown of supersaturation.	Masahiro Noji, Keiichi Yamaguchi, Eri Chatani, Yuji Goto	ポスター発表 (要旨集にて)
9月14-16日	オンライン	第93回日本生化学会大会	Multi-step conformational changes via intermediate states induced by cross-seeding of human and bovine insulin amyloid fibrils	Keisuke Yuzu, Naoki Yamamoto, Masahiro Noji, Masatomo So, Yuji Goto, Tetsushi Iwasaki, Motonari Tsubaki, Eri Chatani	ポスター
9月16-18日	オンライン	第58回日本生物物理学会年会	Cross-seeding of human and bovine insulin amyloid fibrils induces stepwise conformational transition via intermediate states	Keisuke Yuzu, Naoki Yamamoto, Masahiro Noji, Masatomo So, Yuji Goto, Tetsushi Iwasaki, Motonari Tsubaki, Eri Chatani	ポスター
9月17日	オンライン	新学術領域研究「細胞夾雑系」オンラインセミナー	細胞夾雑系における蛋白質凝集の原理解明と制御を目指して	後藤祐児	口頭
11月25日	オンライン	第41回超音波シンポジウム USE2020	超音波照射による凝集加速反応を利用した $\beta$ 2m蛋白質の高感度なシード検出	松田 良太 押鐘 寧 野井 健太郎 宗 正智 中島 吉太郎 山口 圭一 後藤 祐児 荻 博次	ポスター
11月25日	オンライン	第41回超音波シンポジウム USE2020	超音波照射下におけるATP依存的 $\alpha$ シヌクレインのアミロイド線維形成	山口 圭一 澤田 眞弥 中島 吉太郎 宗 正智 荻 博次 後藤 祐児	ポスター



11月 25日	オンラ イン	第41回超音波シ ンポジウム USE2020	極微量アミロイド線維シー ドの加速的増幅のためのハ イスループット超音波化学 反応装置	中島 吉太郎 戸田 元 山口 圭一 宗 正智 荻 博次 後藤 祐児	口頭
11月 25日	オンラ イン	第41回超音波シ ンポジウム USE2020	せん断応力場によるアミロ イドβペプチドの凝集加速 効果の動特性研究	福田 靖丈 野井 健太 郎 宗 正智 中島 吉 太郎 山口 圭一 後 藤 祐児 荻 博次	ポスタ ー
11月 25日	オンラ イン	第41回超音波シ ンポジウム USE2020	無線水晶振動子マイクロバ ランスによるα2m凝集過程 における粘弾性と構造変化 の観察	羽尻 瞳子 周 連杰 中島 吉太郎 宗 正智 山口 圭一 後藤 祐児 荻 博次	ポスタ ー
11月 20日	オンラ イン	Amyloid School Budapest	Linking protein folding and amyloid formation by breaking the supersaturation barrier	Yuji Goto	セミナ ー (口頭)
2月 16日	オンラ イン	5th Ulm Meeting - Biophysics of Amyloid Formation. Ulm University, Germany	Linking protein folding and amyloid formation by breaking the supersaturation barrier	Yuji GOTO	学会 (口頭)
3月 20日	オンラ イン	ZOOMinar on "Molecular Bases of Proteinopathies ", University of Michigan, USA	Linking protein folding and amyloid formation by breaking the supersaturation barrier	Yuji GOTO	セミナ ー (口頭)
<b>2021年度</b>					
6月 18日	オンラ イン	第21回日本蛋白 質学会年会	同時多検体超音波照射シス テムを用いた加速的アミロ イド線維形成反応の研究	中島吉太郎, 戸田元, 山口圭一, 宗正智, 荻 博次, 後藤祐児	ポスタ ー
6月 18日	オンラ イン	第21回日本蛋白 質学会年会	超音波照射下におけるαシ ヌクレインのATP 依存的ア ミロイド形成	山口圭一, 澤田眞弥, 中島吉太郎, 宗正智, 荻博次, 河田康志, 後 藤祐児	ポスタ ー
8月 30日	オンラ イン	大阪大学蛋白質 研究所セミナー "Antibody engineering with AI towards next generation drug discovery"	"Linking protein folding and misfolding"	Yuji GOTO	セミナ ー (口頭)
9月 9日	オンラ イン	第5回LLPS研究会	蛋白質フォールディングと ミスフォールディングの統 合		セミナ ー (口頭)
10月 27日	オンラ イン	第42回超音波シ ンポジウム USE2021	Specific effect of ultrasonic irradiation on amyloid-fibril	中島吉太郎、戸田元、 山口圭一、荻博次、後 藤祐児	ポスタ ー

			formation reaction		
11月 3-5日	オンラ イン	第94回日本生化学大会	動的光散乱法によるタウのオリゴマー形成機構の解析	益井歩未, 柚佳祐, 山口圭一, 後藤祐児, 河田康志, 茶谷絵理	ポスター
11月 19日	東京・ 学術総合センター	第8回日本アミロイドーシス学会 学術集会	超音波照射下におけるATP 依存的な $\alpha$ シヌクレインの アミロイド線維形成	山口圭一, 澤田眞弥, 中島吉太郎, 後藤祐児	ポスター
11月 25日	オンラ イン	第59回 日本生物 物理学会年会	Analysis of Heparin- Induced Tau Oligomer Formation by Dynamic Light Scattering	Ayumi Masui, Keisuke Yuzu, Keiichi Yamaguchi, Yuji Goto, Yasushi Kawata, Eri Chatani	口頭発表
11月 26日	オンラ イン	第59回 日本生物 物理学会年会	アミロイド凝集反応における ダイナミクスと凝集形態 に及ぼす超音波キャビテー ション効果について	戸田元, 中島吉太郎, 山口圭一, 荻博次, 後 藤祐児	口頭発表
11月 27日	オンラ イン	第59回 日本生物 物理学会年会	超音波照射を利用した夾雑 物存在下における $\beta$ 2ミク ログロブリンのアミロイド 線維形成反応の研究	中島吉太郎, 山口圭 一, 山本卓, 荻博次, 後藤祐児	口頭発表
2022年 2月 23日	オンラ イン	6th Ulm Meeting- Biophysics of Amyloid formation	Mechanism of supersaturation-limited onset of dialysis- related amyloidosis by b2-microglobulin	Kichitaro Nakajima	口頭発表

## 【競争的研究経費】

プロジェクト名称	種類	期間 (年度)
(新学術_29-33_後藤 祐児)細胞夾雑系における蛋白質の異常凝集の原理と制御	科研費	2017-2021
後藤・JSPS 研究拠点形成事業(A. 先端拠点形成型)	受託事業費	2018-2022
国際医工情報センター・蛋白質凝集制御デバイス寄附研究部門寄附金 (株式会社ダイセル・コロナ電気株式会社)	使途特定寄附金	2020-2022
(預り個人交付補助金_20-20_山口 圭一) 高温によるアミロイド凝集反応の促進機器の開発	JKA 補助金	2020
中島吉太郎 産学共同によるイノベーション創出高度人材育成推進 (臨床医工学分野)	運営費交付金 (プロジェクト)	2020
山口圭一 国際的研究力強化事業⑥国際共著論文のオープンアクセスに係る支援	オープンアクセス支援経費	2020
(基盤研究(C)_20-24_山口 圭一) 多価の電荷をもつポリリン酸類縁体が引き起こす蛋白質凝集機構の解明	科研費	2020-2024
(基盤C (分担)_20-23_後藤) 新規リン代謝マーカー: ポリリン酸と腎臓病で増悪する感染症の関連	科研費	2020-2023
(基盤C (分担)_20-23_山口) 新規リン代謝マーカー: ポリリン酸と腎臓病で増悪する感染症の関連	科研費	2020-2023
(研スタ_20-21_中島 吉太郎) 超音波照射による神経変性疾患蛋白質の特異的増幅の研究	科研費	2020-2021
(挑戦的研究 (萌芽)_21-22_後藤 祐児) ポリリン酸に依存した蛋白質凝集とその生理的意義の探索	科研費	2020-2021
(預り個人交付補助金_21-21_山口 圭一) 高温によるアミロイド凝集反応のリアルタイム計測機器の開発	JKA 補助金	2021
(預り個人交付補助金_21-21_中島 吉太郎) 超小型超音波アミロイド生成・分析装置開発	JKA 補助金	2021
MEI 後藤(共同研究) ダイセル・ワンタイムエネルギーを用いた蛋白質凝集の制御	共同研究費	2021
(基盤B_22-25_後藤 祐児) 過飽和蛋白質科学の開拓	科研費	2022-2025
(若手研究_22-24_中島 吉太郎) 核形成反応に着目したアミロイド線維形成と関連生体因子の研究	科研費	2022-2024

## 【プレスリリース1】

# 溶けているはずの塩が析出・溶解を繰り返し、アルツハイマー病の原因物質を生成することを発見

2020年7月30日

分野：工学系 キーワード：塩の溶解、アルツハイマー病、電子顕微鏡、凝集反応

### 【研究成果のポイント】

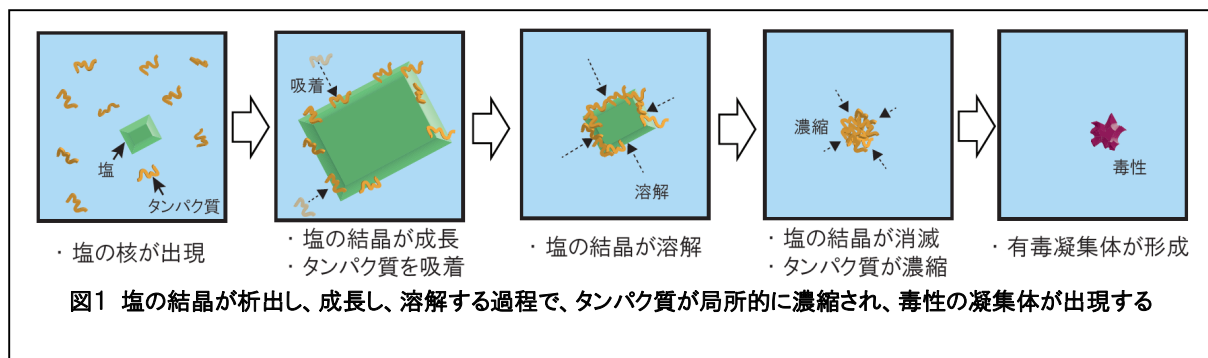
- ◆ 溶解度の50分の1という低濃度の塩水においても、ナノレベルでは塩の析出と溶解が繰り返されていることを発見
- ◆ この局所的・短時間に起こる塩の析出と溶解が、アルツハイマー病の原因蛋白質を毒性物質へと変貌させることを発見
- ◆ 液体からのタンパク質の析出という現象に対して新たなメカニズムが明らかとなり、同時に、アルツハイマー病の発症メカニズムの解明にも寄与することが期待される

### ❖ 概要

大阪大学国際医工情報センターの中島吉太郎特任研究員、工学研究科の荻博次教授らの研究グループは、北海道大学低温科学研究所木村勇氣准教授らとの共同研究により、溶液に溶けているはずの塩が局所的に析出と溶解を繰り返す現象を特殊な電子顕微鏡により直接観測することに成功し、この現象がアルツハイマー病の原因と考えられるタンパク質の凝集体の生成を加速する様子を世界で初めて直接観察することに成功しました。

今回の発見は、溶質が溶媒に「溶けている」という現象が、析出と溶解の動的平衡により成り立っていることを直接立証した成果であると同時に、タンパク質が溶けている溶液に塩を加えるとタンパク質が析出する「塩析」という現象の理解に新たな概念が加わることになります。アルツハイマー病の原因タンパク質が塩とともに溶解しているとき、塩が一時的に析出し成長すると、その表面に多くのタンパク質分子が吸着し、その後、その塩が再び溶ける時、吸着したタンパク質分子が塩の消滅点に集められ、局所濃縮され、通常では起こり得ない反応が起き、結果、タンパク質の凝集核を形成することがわかりました(図1)。この凝集核こそがアルツハイマー病の原因物質の起点となるものであり、こうした塩のナノレベルでの析出と溶解が、タンパク質の凝集を加速することが明らかとなったのです。これはタンパク質の凝集現象における全く新しいメカニズムであり、このメカニズムこそが、凝集反応を支配する可能性もあります。

本研究成果は、米国科学誌「The Journal of Physical Chemistry Letters」に、7月30日(木)＊時(日本時間)に公開されます。



## ❖ 研究の背景

水に少量の塩を加えてよくかき混ぜると塩は溶けます。温度を一定にしてどんどん塩を加えて溶かすと、溶液の塩の濃度がある値以上には溶けることができず、塩は析出します。この濃度が溶解度です。溶解度よりも低い濃度のとき、塩は溶けた状態を維持し、析出することはありません。血液や脳脊髄液といった体液には溶解度以下の塩分が含まれており、タンパク質の性質を研究する際には、塩を少量混ぜて実験を行うことが一般的です。今回の私たちの実験では、溶解度の50分の1程度の濃度の塩の溶液を使用しています。溶かす塩の量は少量ですから、見た目の溶液から塩は析出することがなく、溶けた状態が持たれており、何も起きていません。ところが、液体を直接観察することができる特殊な透過型電子顕微鏡(溶液 TEM)を用いて、溶液内のナノサイズの領域を観察すると、時折、**溶けているはずの塩が析出して成長し、そして、収縮し、再び溶解する**現象が観察されました。溶解度よりも低い濃度であっても、非常に小さい領域では、塩の析出と溶解が繰り返されていたのです。溶液内の塩分濃度は至るところ一定ではなく、つねに揺らいでいます。この「ゆらぎ」により、たまたま、濃度が高い箇所が出現すると、塩の結晶が生まれるのです。しかし、その寿命は短く、一定程度のサイズ(約 100 nm)までは成長するものの、成長により周りの塩濃度が急激に低下するため、再び収縮して消滅します(つまり溶けます)(**図 2**)。「ゆらぎ」により、局所的・短時間に塩の析出・溶解が繰り返されるのです。こういった現象を動画で直接撮影に成功したのは世界初です。

さらに**重要な発見がありました**。それは、この現象が、タンパク質の凝集を加速することです。アルツハイマー病の原因タンパク質は、アミロイドβであることが良く知られています。アミロイドβは本来水に溶けませんが、ある程度濃度が高くなったり、温度が上がったり、溶液の pH が変化したり、力学的刺激が加わったり、そして、塩濃度が上がったりすると、凝集して析出します。**このアミロイドβの凝集体こそがアルツハイマー病の原因**となります。最後に記した「塩によるタンパク質の析出」は、いわゆる「塩析」という現象として巨視的に理解されてきました。例えば、イオン化した塩分が電気的な接着剤のようにタンパク質どうしを結合させて析出させるとか、タンパク質を溶かすのに必要な水を塩が奪うために、タンパク質が析出するなど、巨視的に理解されてきました。ところが、今回の発見により、少なくともアミロイドβというタンパク質は、一時的に析出した塩の結晶の表面に吸着し、その後の、塩の溶解により塩の消滅点に集められ、過度の局所濃縮が起こることにより、凝集体を形成するという、**これまで全く知られていなかった現象が起こっていることが明らかになり**

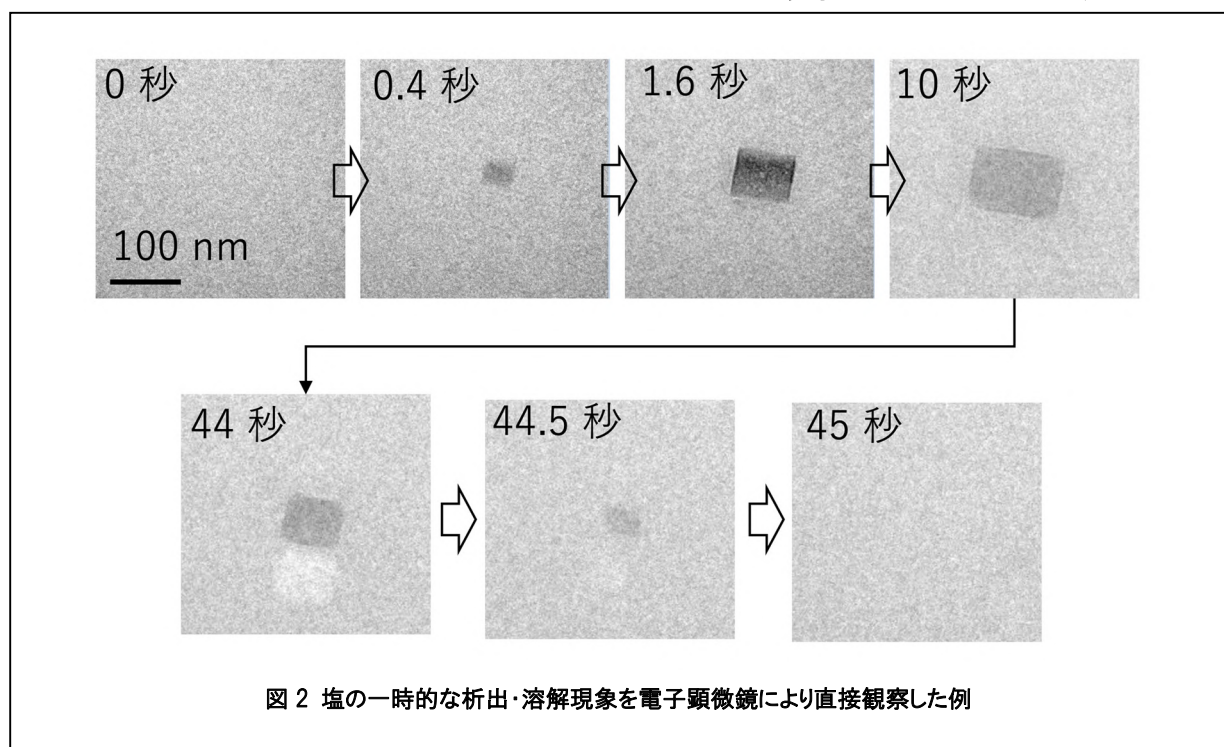
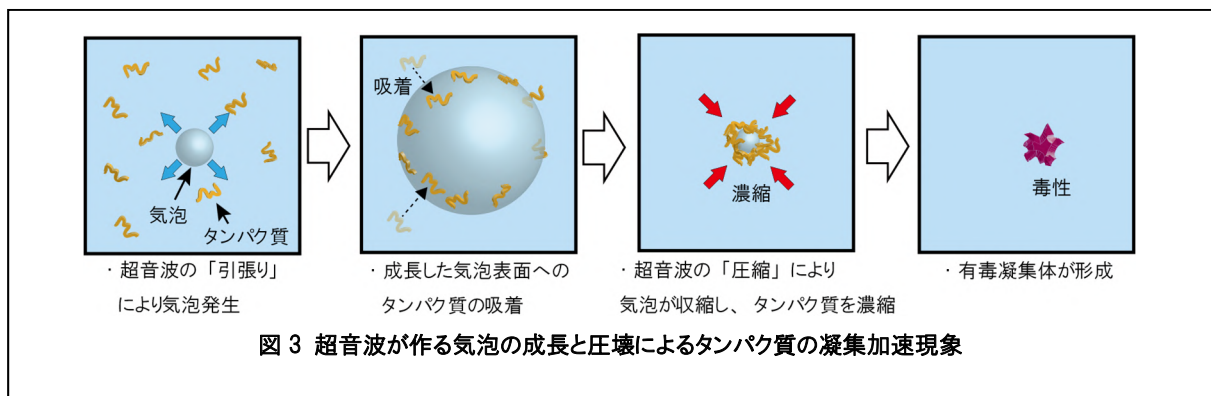


図 2 塩の一時的な析出・溶解現象を電子顕微鏡により直接観察した例

ました。疎水性(液体が苦手な)部位を有するアミロイドβは、固体である塩の結晶が出現すると、好んでその表面に吸着します。塩の成長とともに表面積は増え、吸着するアミロイドβの量も増えます。その後、溶解により、これらのタンパク質が1カ所に集められ、濃縮され、毒性の凝集体が出現するのです(図1)。

実は、私たちは、以前、超音波を照射することにより、アミロイドβの凝集が加速される現象を発見し、そのメカニズムを解明しました。超音波は圧縮・引張りの繰り返しの力を溶液に与えます。超音波の「引張り」により、溶液の圧力は低下して、小さな気泡が発生し、成長します(つまり局所的に沸騰します)。気泡は気体ですから、水が苦手なアミロイドβは好んで気泡の表面に吸着します。ところが、超音波の作用が「圧縮」に切り替わると、気泡は急激に押し縮められて圧壊します。このとき、表面に吸着したアミロイドβが気泡の運動に追従して、圧壊点に集められて、過度に濃縮されるために、毒性の凝集体が生まれるのです(図3)。

超音波は外部から我々が与える刺激ですが、実は、塩の一時的な析出と溶解という現象が、超音波と同じ作用を自然に起こしていたことになるのです。



#### ❖ 本研究成果が社会に与える影響（本研究成果の意義）

本研究成果により、神経変性疾患にかかわるタンパク質には、同様に疎水性の部位が存在しますから、この新たに明らかとなった凝集メカニズムは、神経変性疾患の発症に共通した現象であるとも考えられます。

#### ❖ 特記事項

本研究成果は、2020年7月30日(木)＊時(日本時間)に米国科学誌「The Journal of Physical Chemistry Letters」(オンライン)に掲載されます。

タイトル: “Time-Resolved Observation of Evolution of Amyloid-β Oligomer with Temporary Salt Crystals”

著者名: Kichitaro Nakajima, Tomoya, Yamazaki, Yuki Kimura, Masatomo So, Yuji Goto, and Hirotsugu Ogi

#### ❖ 本件に関する問い合わせ先

大阪大学 大学院工学研究科 教授 荻 博次(おぎ ひろつぐ)

TEL: 06-6879-7276; (携帯) 090-9284-9904

E-mail: [\\_ogi@prec.eng.osaka-u.ac.jp](mailto:_ogi@prec.eng.osaka-u.ac.jp)

# 過飽和によるアミロイド線維形成の抑制を解明

—高齢者に多いアミロイド病の予防に貢献する新概念—

【記者発表：1月26日（火）14時～オンライン】

2021年1月22日

分野： 生命科学・医学系

キーワード： 構造生物化学、生物物理学、タンパク質、変性とフォールディング

## 【研究成果のポイント】

- ◆蛋白質は機能的な「天然構造」を形成する一方、アミロイド病の原因となる「アミロイド線維」を形成します。これら2つの反応の分かれ目に「過飽和」現象があり、過飽和はアミロイド線維の形成を抑制していることを明らかにしました。
- ◆さまざまなアミロイド病の原因物質であるアミロイド線維の構造に関する研究は世界的に進展しています。しかしながら、蛋白質が何故アミロイド線維を形成するのか、その根本的な機構は不明でした。
- ◆自然界の基本的な現象である過飽和がアミロイド線維の形成を抑制しているという新たな概念は、アミロイド病に対する新たな予防や治療の発展に貢献すると期待できます。

## ❖ 概要

大阪大学国際医工情報センターの後藤祐児特任教授のグループは、大阪大学蛋白質研究所の大学院生の野地真広さん（令和2年3月理学研究科博士課程修了、現在、京都大学人間・環境学研究科、研究員）、神戸大学、鳥取大学、産業技術総合研究所、エトヴェシュ・ロラード大学（ハンガリー）、ユニバーシティ・カレッジ・ロンドン（イギリス）、ミュンヘン工科大学（ドイツ）、オーフス大学（デンマーク）と共同で、蛋白質が機能的な天然（ネイティブ）構造を形成するか、あるいはアミロイド病の原因となるアミロイド線維を形成するかの分かれ目が、何によって決まっているのかを蛋白質科学の手法で研究しました。

アミロイド線維は高齢化社会の深刻な問題であるアルツハイマー病やパーキンソン病など一連のアミロイド病の原因物質として世界で研究が進んでおり、特に最近クライオ電顕や固体 NMR などの構造解析によって原子レベルの立体構造が次々と明らかになってきています。他方、アミ

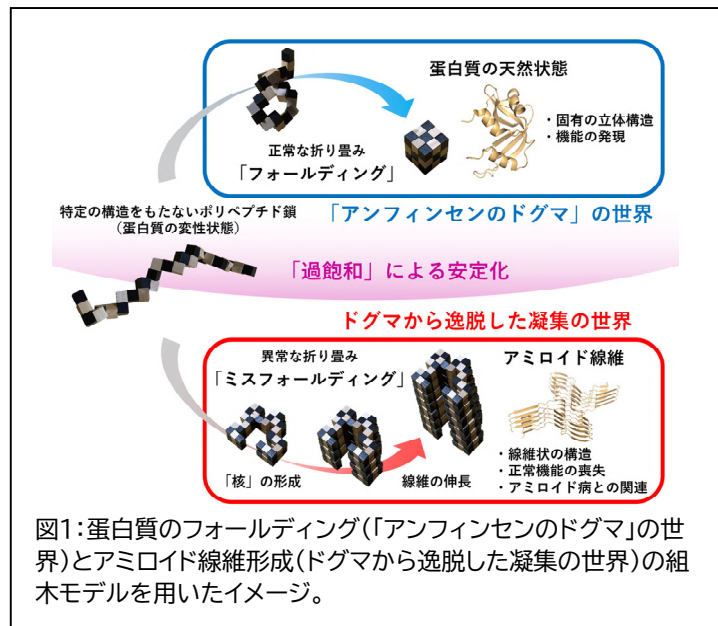


図1:蛋白質のフォールディング(「アンフィンセンのドグマ」の世界)とアミロイド線維形成(ドグマから逸脱した凝集の世界)の組木モデルを用いたイメージ。

ロイド線維の形成機構の詳細は不明です。

今回、後藤特任教授らのグループは、2つの反応が過飽和によって制御されていること、そして過飽和はアミロイド線維形成を抑制していることを明らかにしました。「過飽和はアミロイド線維の形成を抑制する」という新たな視点は、アミロイド病の予防や治療の発展に貢献すると期待できます。

本研究成果は、Nature Researchが提供するオープンアクセス・ジャーナル Communications Biology に2021年1月26日(火)19時(日本時間)にオンライン出版されます。本研究成果について、1月26日(火)14時からオンライン記者発表を行います。

### ❖ 研究の背景

アミノ酸が一次元につながった高分子鎖である蛋白質は、「アンフィンセンのドグマ※1」に従い、フォールディングして機能します。一方、蛋白質はアミロイド線維※2 と呼ばれる針状の凝集体を形成することがあります。アミロイド線維の形成は、フォールディングと対比して「ミスフォールディング」と呼ばれます(図1)。アミロイド線維は、アルツハイマー病やパーキンソン病、透析アミロイドーシスなどのアミロイド病※3の発症に関与します。また、病気と関係しない卵白リゾチームなどの蛋白質もアミロイド線維を形成します。

フォールディングとアミロイド線維形成の関係は組木パズルでうまく表現できます(図1)。現在、アミロイド線維の原子構造が次々と明らかになっています。しかし、フォールディングとミスフォールディングの分かれ目を何が決めるのかは不明でした。

### ❖ 本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)

本研究から、変性した蛋白質は過飽和状態※4にあり、過飽和が解消されるとアミロイド線維の形成に至ることが分かりました(図3)。

アミロイド線維の形成が、水に溶けた物質の結晶形成に似た現象であることは、長年にわた

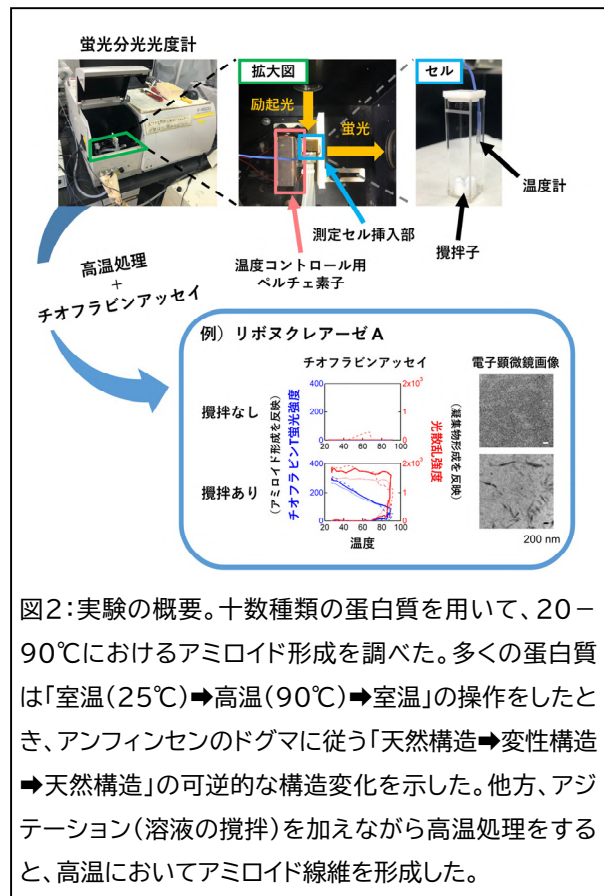


図2:実験の概要。十数種類の蛋白質を用いて、20-90℃におけるアミロイド形成を調べた。多くの蛋白質は「室温(25℃)→高温(90℃)→室温」の操作をしたとき、アンフィンセンのドグマに従う「天然構造→変性構造→天然構造」の可逆的な構造変化を示した。他方、アジテーション(溶液の攪拌)を加えながら高温処理をすると、高温においてアミロイド線維を形成した。

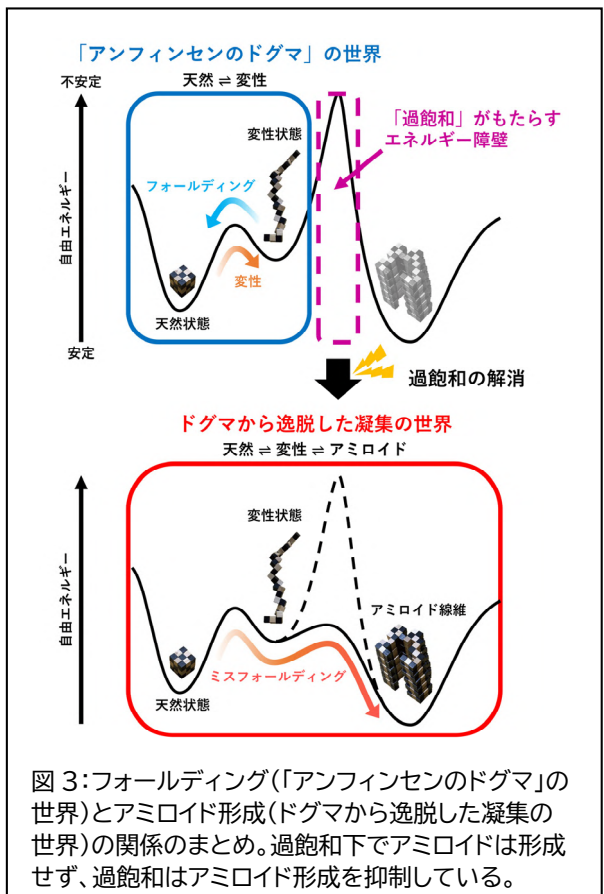


図3:フォールディング(「アンフィンセンのドグマ」の世界)とアミロイド形成(ドグマから逸脱した凝集の世界)の関係のまとめ。過飽和下でアミロイドは形成せず、過飽和はアミロイド形成を抑制している。



って知られていました。過飽和は結晶形成に必要不可欠です。水が氷になる反応も過飽和（過冷却とも呼ばれる）を経て起きます。別の見方をすると、過飽和がアミロイド線維形成を抑制しており、これが解消するとアミロイド線維が形成し、更にはアミロイド病の発症に至ることが示唆されました。

アミロイド病は高齢化社会の深刻な病気であり、その予防や治療は重要な研究課題です。本研究はアミロイド病の予防や治療の進展につながるるとともに、蛋白質の構造と物性の理解を大きく広げるものです。

#### ❖ 特記事項

本研究成果は、2021年1月26日（火）10時（英国時間）にNature Researchが提供するオープンアクセス・ジャーナルCommunications Biologyに掲載される予定であり、解禁日時は日本時間26日（火）19時です。

タイトル：“Breakdown of supersaturation barrier links protein folding to amyloid formation

（過飽和障壁の解消が蛋白質のフォールディングとアミロイド形成を結びつける）”

著者名：Masahiro Noji, Tatsushi Samejima, Keiichi Yamaguchi, Masatomo So, Keisuke Yuzu, Eri Chatani, Yoko Akazawa-Ogawa, Yoshihisa Hagihara, Yasushi Kawata, Kensuke Ikenaka, Hideki Mochizuki, József Kardos, Daniel E. Otzen, Vittorio Bellotti, Johannes Buchner, and Yuji Goto

（野地 真広、鮫島 立志、山口 圭一、宗 正智、柚 佳祐、茶谷 絵理、赤澤 陽子、萩原 義久、河田 康志、池中 健介、望月 秀樹、József Kardos、Daniel E. Otzen、Vittorio Bellotti、Johannes Buchner、後藤 祐児）

なお、本研究は、大阪大学蛋白質研究所共同研究(CR-19-02)、同国際共同研究(ICR-16-02)、科学研究費補助金新学術領域研究(17H06352)、日本学術振興会・研究拠点形成事業（A型）、AMED先端計測分析技術・機器開発プログラムの一環として行われました。

#### ❖ 本件に関する問い合わせ先

大阪大学国際医工情報センター 特任教授 後藤 祐児（ごとう ゆうじ）

TEL：06-6879-4100

E-mail: [gtyj8126@protein.osaka-u.ac.jp](mailto:gtyj8126@protein.osaka-u.ac.jp)

神戸大学大学院理学研究科化学専攻 准教授 茶谷 絵理（ちゃたに えり）

E-mail: [chatani@crystal.kobe-u.ac.jp](mailto:chatani@crystal.kobe-u.ac.jp)

鳥取大学 理事・副学長 河田 康志（かわた やすし）

E-mail: [kawata@tottori-u.ac.jp](mailto:kawata@tottori-u.ac.jp)

#### 【後藤特任教授のコメント】

アミロイド線維を理解することは、高齢化社会の特に重要な研究課題として、世界中で研究が進められています。中でもクライオ電顕を用いたアミロイド線維の構造解析が威力を発揮しています。他方、アミロイド線維の形成機構には多くの謎があり、「溶解度」や「過飽和」といった物質の基本的性質に基づく本研究は、新たな切り口からアミロイド線維研究の地平を開拓するものです。水が氷になる現象を支配する「過飽和」という古典的な物理化学の現象は、蛋白質科学、生命科学においても極めて重要な役割を担っています。