

金属ストレス下で活性化される タンパク質フォールディング促進剤の開発に成功 —金属イオン捕捉とフォールディング促進の 二刀流による変性疾患治療への展開へ期待—

ポイント

- ・ タンパク質は細胞内でポリペプチド鎖として合成され、伸びきった変性状態から、球状などの特定の三次元構造（天然構造）へと折り畳まるフォールディング^{注1）}過程を経て固有の機能を獲得します。過剰な金属イオンの蓄積による金属ストレス^{注2）}はタンパク質のミスフォールディング^{注1）}を引き起こすため、神経変性疾患^{注3）}との関連が報告されています。本研究では、金属ストレス下でタンパク質フォールディングを効率的に促進する人工分子 cyclam-SS（サイクラム・エスエス）を開発しました。
- ・ 細胞内のタンパク質フォールディングは分子シャペロン^{注4）}や酵素によって制御されており、フォールディングを阻害する細胞ストレス^{注2）}が生じた際も、ストレスにตอบสนองして分子シャペロン・酵素が活性化されることで天然構造へのフォールディングが維持されます。この生体内のフォールディング機構から着想を得て、人工分子による「ストレス応答性フォールディング促進」を初めて実証しました。
- ・ 金属イオン結合部位とフォールディング促進部位を連結することで cyclam-SS を設計しました。cyclam-SS は、金属ストレス下で(i)金属イオン捕捉によるタンパク質ミスフォールディング抑制効果と(ii)反応性向上によるフォールディング促進効果を示す双機能性(bifunctional)^{注5）}分子であることを見出しました。
- ・ 金属ストレスの軽減には目的の金属イオンと強く結合して体外へ排出するキレート化合物^{注6）}が用いられますが、金属ストレス下でのタンパク質の天然構造への誘導は困難でした。本研究で開発した cyclam-SS は、金属ストレスやそれに伴うタンパク質ミスフォールディングに関連する疾患治療のための新たな技術基盤となります。

本研究成果は 2025 年 6 月 30 日(月)、「Angewandte Chemie」のオンライン版で公開されました。

論文タイトル : Metal-Responsive Up-regulation of Bifunctional Disulfides for Suppressing Protein Misfolding and Promoting Oxidative Folding

著者 : Keita Mori, Tsubura Kuramochi, Motonori Matsusaki, Yuki Hashiguchi, Masaki Okumura, Tomohide Saio, Yoshiaki Furukawa, Kenta Arai, Takahiro Muraoka

*責任著者 森圭太、村岡貴博

URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.202502187>

概要: 東京農工大学大学院工学研究院の森圭太特任助教 (JSPS-CPD)、同研究院応用化学部門の村岡貴博教授、東北大学学際科学フロンティア研究所の奥村正樹国際卓越准教授、倉持円来 (博士後期課程学生, JSPS-DC2)、徳島大学先端酵素学研究所の齋尾智英教授、松崎元紀助教、慶應義塾大学理工学部の古川良明教授、橋口佑喜 (博士前期課程修了)、東海大学理学部の荒井堅太准教授の研究グループは、金属ストレス下でタンパク質の酸化的フォールディングを促進する人工分子 **cyclam-SS** の開発に成功しました。金属イオンは生体機能に欠かせない一方で、過剰に蓄積するとタンパク質のミスフォールディングを引き起こすストレス因子になります。**cyclam-SS** はストレスとなる金属イオンを捕捉し、自身を活性化することで効率的にタンパク質フォールディングを促進することがわかりました。

多数のアミノ酸が連結した高分子であるタンパク質は、高分子鎖が伸びきった状態 (変性状態) から特定の三次元構造 (天然構造) へと折り畳まれることで固有の機能を発現します。この過程を「フォールディング」と呼び、アミノ酸同士の相互作用や結合形成によって進行します。銅 (Cu) イオンなどの金属イオンは生体内で重要な役割を果たす一方で、アミノ酸に対する結合形成や酸化還元反応を示すことが知られています。金属イオン代謝に異常をきたした金属ストレス条件下ではタンパク質のフォールディングが著しく阻害され、ミスフォールディングや凝集体形成に繋がります。金属ストレスによる構造異常タンパク質の形成は、ウィルソン病などの金属代謝異常症^{注7)}やパーキンソン病などの神経変性疾患の一因と考えられています。したがって、金属ストレス下でのタンパク質構造異常を抑制し、天然構造へのフォールディングを促進する技術の開発が求められています。

本研究では、システイン残基間でのジスルフィド (S-S) 結合^{注8)}形成を伴って進行する酸化的タンパク質フォールディングの促進材料として新規化合物 **cyclam-SS** を開発しました。**cyclam-SS** はストレス因子となる金属イオンを安定に捕捉することでタンパク質ミスフォールディングを抑制し、金属イオンとの結合によって自身の反応性を高めることで天然構造への酸化的フォールディングを効率的に促進することがわかりました。金属イオン捕捉とフォールディング促進の双機能性 (bifunctional) を有する分子材料を開発した本研究成果は、金属ストレス下でのタンパク質フォールディング制御を可能にする新しいアプローチであり、金属ストレスに関連する疾患の予防・治療に向けた新規基盤技術と位置づけられます。

背景: タンパク質は、多数のアミノ酸からなる高分子鎖が伸びきった変性状態から特定の三次元構造へと折り畳まるフォールディング過程を経て、固有の機能を獲得します。細胞内にはタンパク質のフォールディングを精密に制御するための機構が備わっており、分子シャペロンや酵素がその促進を担っています。フォールディングを阻害する細胞ストレスが生じた際には分子シャペロンや酵素がさらに活性化され、構造異常タンパク質の生成抑制・分解や天然構造へのフォールディング促進が誘導されます (図 1a)。一方で、アミノ酸の変異や過度なストレスによってフォールディングに異常が生じるとタンパク質のミスフォールド体や凝集体が形成し、様々な疾患の原因となります。フォールディング異常によって発病する疾患には未だ対処困難なものも多く、予防や治療のための新しい技術基盤が求められています。特に、細胞内の金属代謝異常によって生じる金属ストレスはタンパク質の酸化損傷や凝集を引き起こすため、ストレス因子となる金属イオンの蓄積を防ぐために金属イオンと強く結合するキレート化合物が開発されてきました。しかし、既存の分子材料は金属を体外へ排出する効果を持つ一方で、疾患の一因である構造異常タンパク質への対処は見過ごされていたと言えます。したがって、金属ストレスに起因するタンパク質ミスフォールド体の生成抑制と天然構造へのフォールディングを可能にする分子材料は未開拓でした。

研究体制:本研究は、東京農工大学大学院工学研究院応用化学部門の村岡貴博教授、東北大学学際科学フロンティア研究所の奥村正樹国際卓越准教授、徳島大学先端酵素学研究所の齋尾智英教授の研究グループが中心となって行われました。本成果は、日本学術振興会特別研究員奨励費(JP23KJ0851)、科学研究費助成事業 学術変革領域研究(B)「遅延制御超分子化学」(課題番号: JP21H05096、研究代表者:村岡貴博、課題番号: JP21H05095、研究代表者:奥村正樹、課題番号: JP21H05094、研究代表者:齋尾智英)、国際共同研究加速基金(海外連携研究)(課題番号: JP23KK0105、研究代表者:奥村正樹、研究分担者:村岡貴博、松崎元紀)、科学技術振興機構(JST) 創発的研究支援事業 FOREST (課題番号: JPMJFR2122、研究代表者:村岡貴博、課題番号: JPMJFR201F、研究代表者:奥村正樹、課題番号: JPMJFR204W、研究代表者:齋尾智英)、JST 戦略的創造研究推進事業 CREST (課題番号: JPMJCR19S4、研究分担者:村岡貴博)、KISTEC(村岡貴博)、一般財団法人キヤノン財団(村岡貴博)、公益財団法人旭硝子財団(村岡貴博)、公益財団法人 G-7 奨学財団(村岡貴博)の支援を受けて得られました。

研究の内容と成果:タンパク質フォールディングを自在に制御する目的で、人工のフォールディング促進材料が開発されています。特にジスルフィド(S-S)結合形成を伴う酸化的フォールディングは多くの分泌タンパク質の生成に関わっており、酸化剤として働くジスルフィド化合物によって促進されることがわかってきました。しかしながら、フォールディング促進人工材料の機能は未だ限定的で、特にフォールディングを阻害するストレス下での反応促進は困難です。一方、生体内のタンパク質フォールディングに目を向けると、フォールディングを阻害する細胞ストレスが生じた際は分子シャペロン・酵素が活性化されることで天然構造へのフォールディングが維持されます(図 1a)。この「ストレス応答性フォールディング促進」が、ストレス環境下でタンパク質の天然構造を効率的に維持するための鍵であると考えられます。本研究では、金属代謝異常症や神経変性疾患との関連が指摘されている金属ストレスに着目し、金属ストレス下で活性化される人工フォールディング促進化合物 cyclam-SS を開発しました(図 1b)。cyclam-SS は(i)金属ストレスによるミスフォールディングの抑制効果と(ii)金属ストレスに応答した酸化的フォールディング促進効果を併せ持つ双機能性(bifunctional)分子であることを突き止めました。

金属ストレスの軽減には、過剰な金属イオンに強く結合して体外に排出するキレート分子が利用されてきました。我々はこのキレート部位を S-S 結合で連結することで、金属イオンの結合に伴ってジスルフィドの反応性が変化し、金属ストレス下での効率的な酸化的フォールディング促進が可能になると考えました。金属キレート部位として、Cu(II)イオンをはじめとした遷移金属イオンと強く結合する 1,4,7,11-テトラアザシクロテトラデカン(cyclam)^{注9)}配位子を選択し、二つの cyclam が S-S 結合で繋がった cyclam-SS を設計しました(図 1c)。

金属ストレス条件下での cyclam-SS のフォールディング促進効果を、分子内に三つの S-S 結合を有するウシ膵臓トリプシンインヒビター(BPTI)を用いて評価しました。S-S 結合が切断された還元変性状態の BPTI に対して Cu(II)イオンを添加すると溶液が白濁し、BPTI がミスフォールディングによって凝集したことがわかりました。汎用の酸化的フォールディング促進分子であるグルタチオン存在下でも凝集が観測された一方で、cyclam-SS を加えると透明な溶液が維持され、cyclam-SS が Cu(II)による BPTI の凝集を抑制することが示されました(図 2a)。BPTI の天然構造へのフォールディング効率を調べると、cyclam-SS がグルタチオンよりも高効率で酸化的フォールディングを促進する結果が得られました(図 2b)。cyclam-SS のフォールディング促進効果は Cu(II)の添加によってさらに高まり、反応の初速度は Cu(II)非存在下と比べて約 2.4 倍向上しました。cyclam-SS はリボヌクレアーゼ A (RNase A)の酸化的フォールディングに対しても類似の効果を示したことから、cyclam-SS が金属ストレス下で(i)ミスフォールディング抑制効果と(ii)フォールディング促進効果を両立する双機能性分子であることを実証しました。

cyclam-SS が機能性タンパク質の天然構造形成や疾患関連タンパク質のミスフォールディング抑制に有効であることも確認しました。インスリン前駆体であるプロインスリンの酸化的フォールディングを行ったところ、Cu(II)存在下でグルタチオンを加えた場合は天然構造の収率が 8%にとどまった一方で、cyclam-SS を添加した場合は 70%の収率で天然構造が得られました(図 3a)。また、筋萎縮性側索硬化症(ALS)^{注10)}の原因タンパク質であるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD1)の天然構造形成に対する cyclam-SS の効果を検証しました。家族性 ALS に特徴的な G37R 変異を持つ還元型 SOD1 は Cu(II)存在下でミスフォールディングによるオリゴマー形成^{注11)}を示す一方で、cyclam-SS は SOD1 のオリゴマー形成を抑制しながら天然構造の酸化型 SOD1 の形成を促進することがわかりました(図 3b)。

さらに、cyclam-SS は Cu(II) による細胞毒性を軽減する効果も示しました。HeLa 細胞に対して Cu(II) を加えて 24 時間培養すると、Cu(II) の細胞毒性によって細胞生存率が顕著に低下しました。Cu(II) の添加後に cyclam-SS を加えると細胞生存率の低下は見られず、cyclam-SS が生細胞を Cu(II) イオンから保護することが示されました。グルタチオンはそのような細胞保護効果を示さなかったことから、cyclam 部位が Cu(II) イオンと強く結合することで Cu(II) の細胞毒性を軽減したと考えられます(図 3c)。

今後の展開: 生体内のタンパク質フォールディングでは、常に変化する細胞内環境に対応するための「ストレス応答性フォールディング促進」が鍵を握ります。本研究では、金属結合部位とフォールディング促進部位を連結した双機能性分子 cyclam-SS を設計することで、金属ストレスに応答する効率的な酸化的フォールディング促進を達成することができました。これまで、タンパク質フォールディングを促進する人工材料は活発に研究されてきましたが、化学的環境の変動に応答して機能を変化させる分子材料は例がありません。本研究は、従来の材料とは一線を画す新たなタンパク質フォールディング制御法を提供する成果であり、人工分子によるフォールディング制御と細胞内のフォールディングシステム、すなわち生体模倣化学とバイオロジーを繋ぐ架け橋になると考えられます。

細胞ストレスなどによって生体内でフォールディング異常が起こると、構造異常タンパク質の凝集によってアルツハイマー病やパーキンソン病、ALS などの神経変性疾患の発症に繋がると考えられています。金属ストレスもタンパク質のミスフォールディングと密接に関連しており、これらの疾患との関連が指摘されています。従来金属ストレスの軽減に利用されるキレート化合物は金属イオンの除去に特化しており、タンパク質の天然構造形成を促進する機能はありません。本研究で開発した cyclam-SS は金属イオンと結合してタンパク質凝集を防ぐだけでなく、自身が活性化されることで天然構造への酸化的タンパク質フォールディングを効率的に促進します。したがって、本研究は金属ストレスに関わる疾患の治療に向けた新たな技術基盤であり、従来の治療法の代替あるいは併用技術としての発展が期待されます。

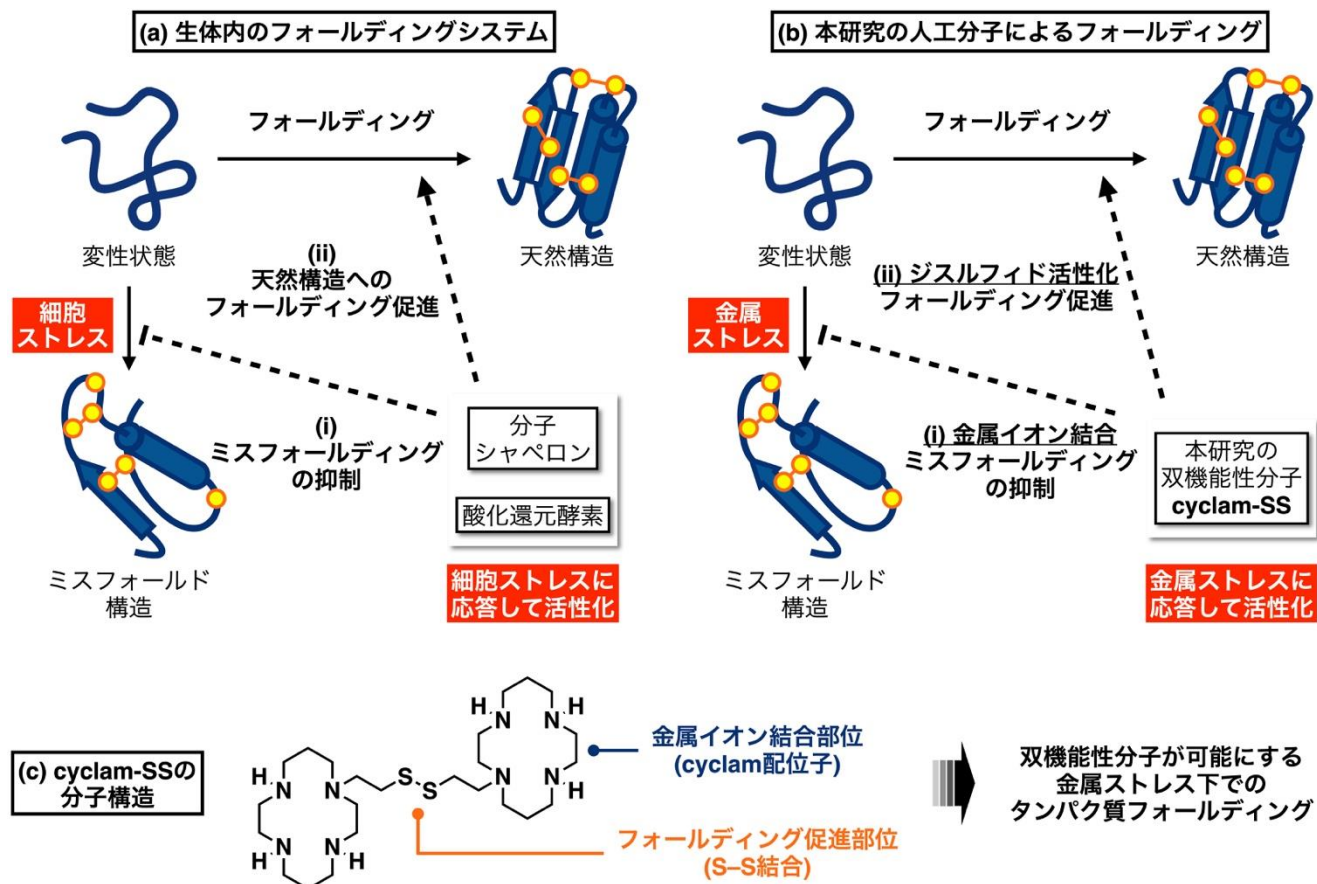


図 1 (a) 生体内のタンパク質フォールディングシステムの概念図、(b) 本研究で開発した双機能性分子 cyclam-SS によるタンパク質フォールディングの概念図、(c) cyclam-SS の分子構造

生体内では、タンパク質のミスフォールディングを誘発する細胞ストレスに反応してフォールディングシステムが活性化される。本研究で開発した cyclam-SS は金属イオン結合部位とフォールディング促進部位を併せ持つ双機能性分子であり、金属ストレス下でのタンパク質ミスフォールディング抑制と天然構造へのフォールディング促進を可能にした。

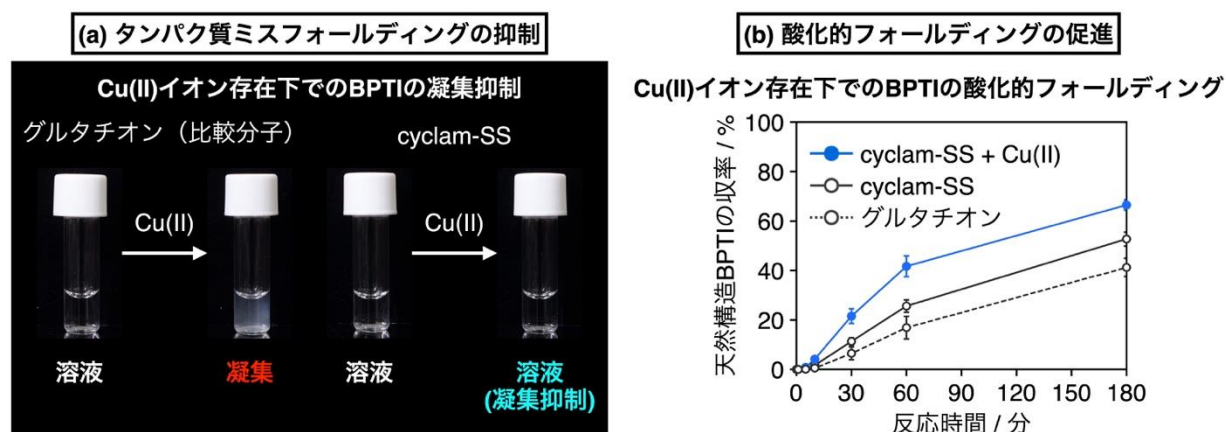
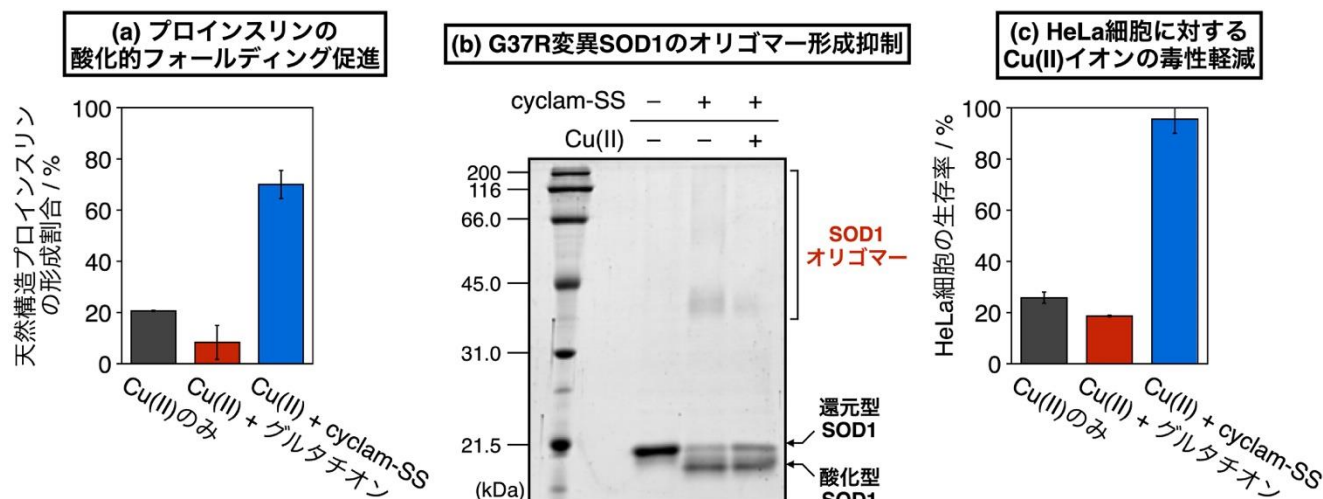


図 2 BPTI のフォールディング促進における cyclam-SS の双機能性

(a) cyclam-SS による Cu(II)イオン存在下での BPTI の凝集抑制。比較分子のグルタチオンは BPTI の凝集を防げない一方で、cyclam-SS は Cu(II)による BPTI の凝集を抑制した。(b) cyclam-SS による BPTI の酸化的フォールディング促進。cyclam-SS はグルタチオンよりも高いフォールディング促進効率を示した。BPTI のフォールディング速度は Cu(II)の添加によってさらに増大し、cyclam-SS が Cu(II)によって活性化されたことがわかった。



**図 3 (a) cyclam-SS による Cu(II)存在下でのプロインスリンの酸化的フォールディング促進、
(b) cyclam-SS による Cu(II)存在下での G37R 変異 SOD1 のオリゴマー形成抑制、
(c) cyclam-SS による Cu(II)存在下での HeLa 細胞の生存率向上**

(a) Cu(II)存在下ではプロインスリンの天然構造形成は限定的で、グルタチオンの添加はフォールディング促進効果を示さなかった。cyclam-SS を加えることで天然構造形成が顕著に促進された。(b) G37R 変異を持つ SOD1 は、Cu(II)存在下でオリゴマー形成を示した。cyclam-SS は Cu(II)存在下においてもオリゴマー形成を抑制しながら SOD1 を天然構造の酸化型 SOD1 へと誘導できることがわかった。(c) Cu(II)存在下では Cu(II)の毒性によって HeLa 細胞の生存率が低下した。グルタチオンの添加は細胞生存率に影響しない一方で、cyclam-SS を加えることで HeLa 細胞の生存率が向上し、cyclam-SS は Cu(II)の毒性から HeLa 細胞を保護することが示された。

用語解説：

注 1) フォールディング・ミスフォールディング

ポリペプチド鎖として合成されたタンパク質が伸びきった変性状態から、球状などの特定の三次元構造を持つ天然構造へと折り畳まる過程がフォールディングである。特にシステイン残基間でのジスルフィド結合形成を伴う過程は酸化的フォールディングと呼ばれる。アミノ酸変異や環境変化によって天然構造とは異なる構造へと折り畳まることをミスフォールディングと呼ぶ。

注 2) 金属ストレス・細胞ストレス

熱や酸化的環境など、細胞に内外からかかる種々の刺激や負荷のことを細胞ストレスと呼ぶ。特に金属ストレスは、細胞内外に金属イオンが過剰に蓄積した状態を指す。

注 3) 神経変性疾患

特定の神経細胞群が障害を受け発症する神経疾患の一つ。構造異常タンパク質の蓄積や沈着が、神経細胞群の障害を引き起こす主要因の一つと考えられている。

注 4) 分子シャペロン

細胞内でフォールディング途中のタンパク質や、熱や酸化などのストレスを受けて生じた変性タンパク質の凝集を抑制し、天然構造へのフォールディングを促進するタンパク質。

注 5) 双機能性(bifunctional)

一つの分子および材料が二つの異なる機能を持つこと。

注 6) キレート化合物

複数の配位結合によって金属イオンを包み込むように結合する化合物のこと。分子構造に応じて特定の金属イオンと強く相互作用することから、目的の金属イオンの捕捉や除去に利用される。

注7) 金属代謝異常症

生体内の必須金属元素の代謝に関わるタンパク質の遺伝的な異常により、金属イオンの吸収や運搬、排出がうまく調整できなくなる疾患のこと。

注8) ジスルフィド(S-S)結合

タンパク質の構成アミノ酸の一つであるシステインは、側鎖にチオール基(SH基)を持つ。二つのSH基が酸化されて形成する硫黄原子間の結合をジスルフィド(S-S)結合と呼ぶ。タンパク質の立体構造の安定化や機能調節に重要な役割を果たす。

注9) 1,4,7,11-テトラアザシクロテトラデカン(cyclam)

多くの遷移金属イオンと強く結合する環状のキレート化合物。環上の四つの窒素原子が中心の金属イオンと結合することで安定な金属錯体を形成する。

注10) 筋萎縮性側索硬化症(ALS)

脳や脊髄の運動ニューロンが選択的に変性する神経変性疾患で、筋力低下や筋萎縮、嚥下障害、呼吸不全などの症状が現れる。全症例のうち1割ほどが遺伝的要因による家族性ALSである。

注11) オリゴマー形成

複数のタンパク質が会合すること。一般に、タンパク質の会合は、フォールディングを阻害する。

◆研究に関する問い合わせ◆

東京農工大学大学院工学研究院

応用化学部門 教授

村岡 貴博 (むらおか たかひろ)

〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16

TEL: 042-388-7052

E-mail: muraoka@go.tuat.ac.jp

◆報道に関する問い合わせ◆

東京農工大学 総務課広報室

TEL: 042-367-5930

E-mail: koho2@cc.tuat.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

TEL: 03-5214-8404

E-mail: jstkoho@jst.go.jp

◆JST 事業に関する問い合わせ◆

科学技術振興機構 創発的研究推進部

加藤 豪 (かとう ごう)

TEL: 03-5214-7276

E-mail: souhatsu-inquiry@jst.go.jp