

整理番号	2023-J-024	報告者氏名	藤田 恭子
------	------------	-------	-------

研究課題名

凝集タンパク質の溶解とリフォールディングを誘起する水和イオン液体の設計

<代表研究者> 機関名：東京薬科大学 職名：講師 氏名：藤田 恭子

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

本課題では、パーキンソン病の原因となる線維化 α シヌクレインをターゲットとして、脱凝集化を促進する水和イオン液体の設計と関与するパラメータの探索を行いました。

α シヌクレインのモノマーを用いてオリゴマー化を進め、線維化 α シヌクレインを得ました。線維化 α シヌクレインを水和イオン液体と混合し、脱凝集化への影響を線維化 α シヌクレインと相互作用するチオフラビン蛍光測定で評価しました。用いるイオン液体のイオン構造として、カチオンのアルキル鎖長を変化させた疎水性の影響や、アニオンのイオンサイズやコスモトロピシティを変化させ、これらの因子が脱凝集に及ぼす影響について検討しました。

線維化 α シヌクレインの脱凝集の進行がイオン液体との混合によって明らかとなりました。構成イオンの選択が脱凝集に重要な役割を果たしました。長鎖アルキル鎖を有するカチオンとコスモトロピシティの高いアニオンからなる組み合わせのイオン液体で高い脱凝集能が確認されました。イオンの存在によって変化する水分子の特性や、水素結合形成能力が脱凝集に影響を与えることが示唆されました。さらに、非対称なカチオン構造の有効性も示され、脱凝集に有効なイオン液体は低濃度に希釈しても脱凝集が可能であることが示されました。得られた研究成果は、パーキンソン病など線維化タンパク質が原因となる疾患の新たな治療法開発への寄与が期待されます。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

「口頭」

1. M. Koyakkat, 藤田恭子、城田秀明、Water Concentration Dependence of Low-Frequency Spectrum in Hydrated Ionic Liquids Having Different Kosmotropicity、第17回分子科学討論会、2023年9月12日
2. 藤田 恭子、Solubility and Structural Changes of Biomolecules as a Function of Water Content in Hydrated Ionic Liquids、第61回生物物理学会、2023年11月14日
3. 藤田 恭子、小林 和音、伊藤 杏奈、柳澤 峻、市田 公美、武田 康太、中村 暢文、大野 弘幸、水和イオン液体を場としたリコンビナントタンパク質凝集体の再生、第13回イオン液体討論会、2023年11月20日
4. 藤田 恭子、筑肱 秀紀、稲葉 真太郎、池袋 一典、イオン液体中における DNA アプタマーと標的分子の結合検出、電気化学会第91回大会、2023年3月14日
5. 藤田 恭子、バイオサイエンス分野における水和イオン液体の可能性、第1回日本カンナビノイド学会学術総会、2024年9月29日
6. K. Fujita, K. Ikebukuro, Binding of DNA Aptamers to Target Molecules in Hydrated Ionic Liquids, PRiME 2024, 2024年10月6日
7. 藤田 恭子、石井 佳穂、小林 和音、武部 豊、溝端 栄一、古谷 祐詞、膜タンパク質の構造を保持した水和イオン液体への溶解と熱安定性の向上、第14回イオン液体討論会、2024年11月13日
8. 藤田 恭子、水和イオン液体中の水分子の特性と生体分子溶媒としての可能性、電気化学会第92回大会、2025年3月18日

「ポスター」

9. 小柳 峰人、川邊 瑠璃子、吉崎 歩、藤田 恭子、繊維化 α -synuclein の脱凝集に及ぼすイオン液体の影響、日本薬学会第144回年会、2024年3月28日
10. 筑肱 秀紀、稲葉 真太郎、菅田 拓也、塚越 かおり、大野 弘幸、池袋 一典、藤田 恭子、水和イオン液体中における DNA アプタマーと標的分子の結合解析、日本薬学会第144回年会、2024年3月28日
11. 須賀 陸翔、佐藤 星、塚越 かおり、降幡 知巳、藤田 恭子、繊維化 α -synuclein の脱凝集に及ぼすイオン液体の影響、日本薬学会第145回年会、2025年3月26日
12. 酒井 大翼、山本 将大、瀧塚 寛音、伊藤 明子、古谷 祐詞、降幡 知巳、藤田 恭子、光駆動型イオンポンプとして機能する膜タンパク質の水和イオン液体による安定化、日本薬学会第145回年会、2025年3月26日
13. 杉浦 正浩、浅野 竜太郎、降幡 知巳、藤田 恭子、IgG モノクローナル抗体のイオン液体を用いた安定性・保存性の向上、日本薬学会第145回年会、2025年3月26日
14. 坂本 優衣、池袋 一典、降幡 知巳、藤田 恭子、水和イオン液体を反応場とする DNA アプタマーセンサーの構築、日本薬学会第145回年会、2025年3月26日

「誌上」

- 1... M. Koyakkat, T. Ishida, K. Fujita, H. Shirota, Low-Frequency Spectra of Hydrated Ionic Liquids with Kosmotropic and Chaotropic Anions, *J Phys Chem B*, 128, 4171, 2024
2. K. Fujita, 生命科学用の場としての水和イオン液体, *The Chemical Times*, 272, 2-6, 2024

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

[目的]

有機塩であるイオン液体にわずかな水を混合して調整する「水和イオン液体」を用いて、凝集タンパク質を溶解するイオン構造と、存在する水分子の影響について探索する。系統的なイオン選択や、含水率を連続的に変化させて得られる知見から、凝集タンパク質の溶解（脱凝集化）に関与する溶媒パラメータを明らかにする。具体的には、パーキンソン病の原因となる α シヌクレイン凝集体をターゲットとして、脱凝集化を実現する水和イオン液体の設計を目的とし、関与するパラメータを明らかにする。

[経過]

パーキンソン病の原因となる線維化 α シヌクレインをターゲットとして、水和イオン液体による脱凝集化を行うため、 α シヌクレインモノマーから線維化 α シヌクレインの形成を進めた。37°C条件下で振とうを行い、線維化の進行をチオフラビンT (TfT) の蛍光測定により確認した。経時的にTfTの蛍光強度を測定し、蛍光強度が十分に上昇した線維化サンプルを用いて、各種水和イオン液体と混合した。混合後の蛍光強度変化から脱凝集への影響を検討した。

検討に用いるイオン液体は、先行研究で熱凝集タンパク質や大腸菌を宿主とする発現で形成した封入体をターゲットとして、溶解性への影響検討で得られたイオン構造の知見を基に選択を進めた。イオン液体の毒性も考慮して、カチオンにはコリニウムカチオンを用いてアニオン構造による影響を検討し (Fig.1)、得られた結果から脱凝集に効果的なアニオン構造の知見を集積した。また、カチオンの影響について検討を行うため、アニオンをBrあるいはClに固定化して、アルキル鎖長の異なるアンモニウムカチオンを用いて、線維化 α シヌクレインの脱凝集に及ぼす影響について検討を行った (Fig.2)。効果的な線維化 α シヌク

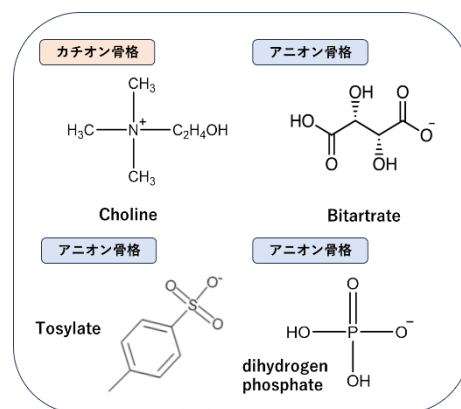


Fig.1 検討に用いたコリニウムカチオンを有するイオン液体構造

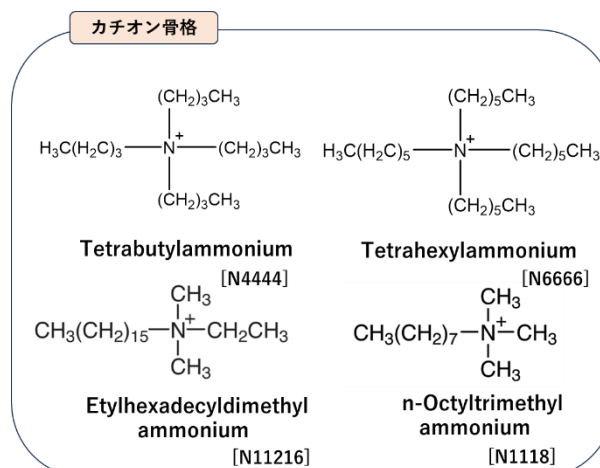


Fig.2 検討に用いた異なるアルキル鎖を有するカチオン構造

レインの脱凝集が確認されたイオン液体については、イオン液体濃度を変化させながら脱凝集に及ぼす影響を解析し、脱凝集に必要なイオン液体濃度を算出した。

[結果]

コリニウムカチオンと異なるアニオン構造の組み合わせからなる水和イオン液体と線維化 α シヌクレインを混合後、TfT 蛍光強度を測定した (Fig.3)。その結果、アニオン構造によって混合後の蛍光強度は異なった。Br、Cl といったハロゲンアニオンに比べて、[dhp]、[Bit]のようにイオンサイズが大きく且つコスモトロピシティの高い (水の構造形成能が高い) アニオンを有するイオンの方が脱凝集効果は大きいことが明らかとなった。[dhp]、[Bit]に比べてコスモトロピシティの低い[Tos]アニオンでは、脱凝集効果も低下した。

鎖長の異なるアンモニウムカチオンからなるイオン液体を用いて線維化 α シヌクレインの脱凝集への影響について検討を行った結果、鎖長が長いほど脱凝集を促進させる結果が得られた。また、アルキル鎖長が一致したカチオンよりも、異なる鎖長のアルキル鎖が存在するカチオンの方が高い脱凝集効果を示した。また、アニオンはコスモトロピシティの高いものがハロゲンアニオンに比べて脱凝集を促進することが明らかとなった。この結果は、コリニウムカチオンを用いて検討を行って得られた傾向と一致した。

線維化 α シヌクレインの高い脱凝集能を示した[N11216][Bit]を用いて、異なるイオン液体濃度における脱凝集効果について検討を行った。1 イオンペアに対して 4 分子の水で調整を行った水和 [N11216][Bit]を 1/10、1/100、1/1000、1/10000、1/100000、1/1000000 に希釈を行い、線維化 α シヌクレインと混合したサンプルの TfT 蛍光強度を測定した。その結果、線維化 α シヌクレイ

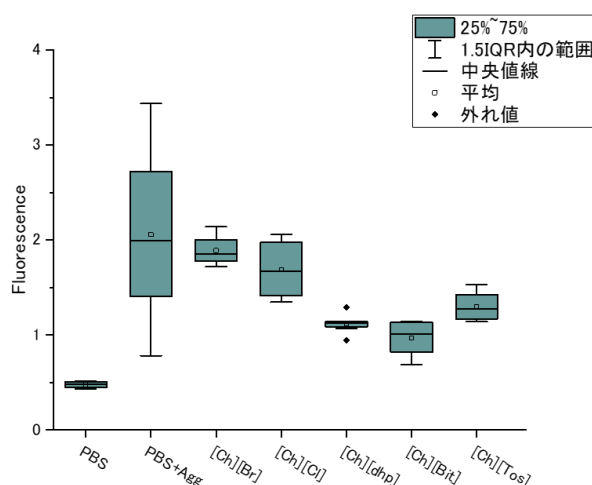


Fig.3 コリニウムカチオンと各種アニオンからなるイオン液体を用いた線維化 α シヌクレインの脱凝集効果

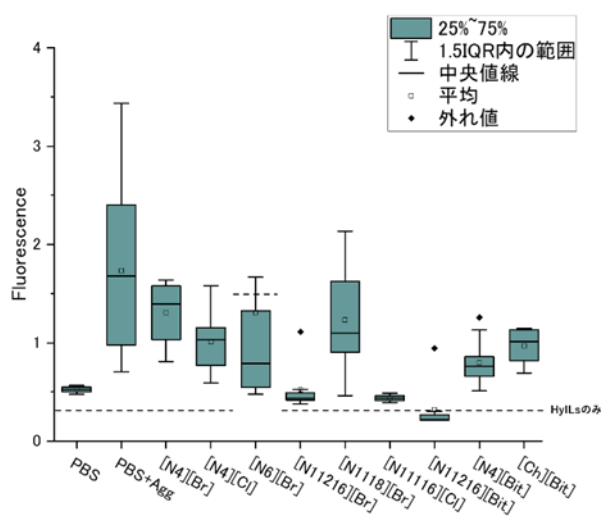


Fig.4 鎖長の異なるアンモニウムカチオンからなるイオン液体を用いた線維化 α シヌクレインの脱凝集効果

ンの脱凝集に[N11216][Bit]の濃度依存性が観測された (Fig.5)。線維化 α シヌクレインの脱凝集を示す Tft 蛍光強度の低下は、1/1000 希釈した[N11216][Bit] (0.13mg/mL) まで確認できた。

[考察]

構成イオンを選択したイオン液体と線維化 α シヌクレインの混合により、脱凝集の進行を確認した。構成イオンによってその効果は異なり、アニオンはコスモトロピシティの順列に従った脱凝集が観測されたことから、線維化 α シヌクレインの周囲の水分子の特性あるいは水素結合形成能が脱凝集に影響を及ぼすことが示唆された。また、カチオン構造の検討結果から、疎水性が脱凝集の進行に影響を及ぼすことを示した。また、同じ長さのアルキル鎖が存在するカチオンよりも、異なる長さのアルキル鎖を有するカチオンが脱凝集に効果的であったことから、非対称なカチオン構造の有効性が示唆された。

脱凝集効果はイオン液体の濃度に依存した。より高い濃度でのイオン液体の使用が脱凝集に効果的ではあるが、比較的低い濃度でも脱凝集の進行が確認された。このことから細胞毒性を示さない低い濃度での脱凝集への利用も期待できる。

以上のように、疎水性やコスモトロピシティを考慮してイオン構造を選択することで、比較的低濃度でも線維化 α シヌクレインの脱凝集を可能にするイオン液体を設計可能であることが明らかとなった。パーキンソン病など線維化タンパク質が原因となる疾患の新たな治療法開発への寄与が期待できる。

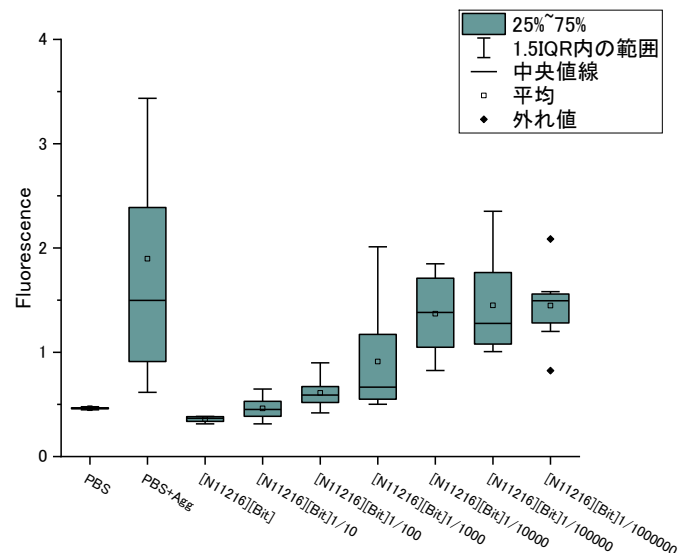


Fig.5 濃度の異なる[N11216][Bit]との混合による線維化 α シヌクレインの脱凝集効果