

## 凝集抑制剤としての ATP の機能を解明

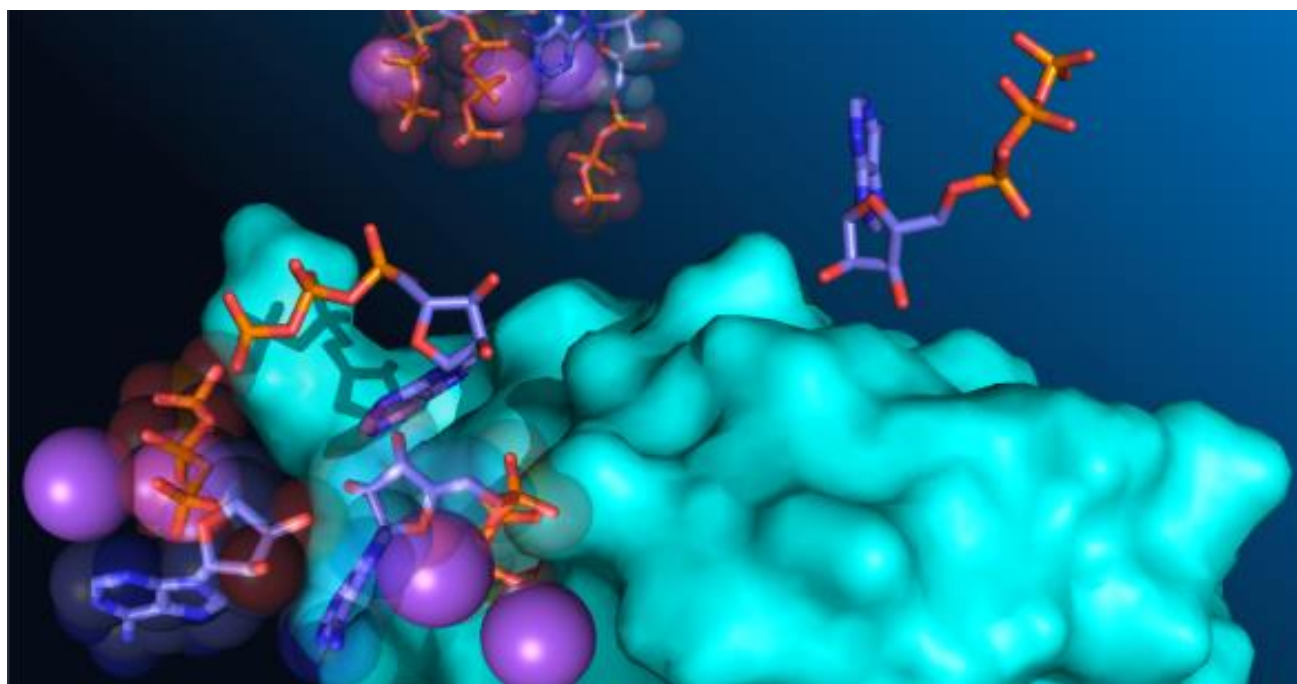
—ATP が神経変性疾患の発症を抑制する—

### 概要

京都大学大学院工学研究科 西澤茉由 博士課程学生（研究当時）、森本大智 同助教、白川昌宏 同教授、菅瀬謙治 同准教授、Erik Walinda 同医学研究科助教、ライプニッツ・ポリマー研究所（ドイツ） Benjamin Kohn 研究員、Ulrich Scheler 同部門長の研究グループは、アデノシン三リン酸（ATP）とタンパク質との非特異的な弱い相互作用を原子レベルで検出することに世界で初めて成功しました。

ATP は、従来 生命活動に必要なエネルギーの貯蔵や利用に関わる分子と考えられています。興味深いことに、近年、ATP にはタンパク質のアミロイド線維化を抑制するという別の作用があることが同定されました。しかし、どのように ATP がタンパク質を安定化するのかは不明でした。本研究では主に NMR（核磁気共鳴）を用いて、細胞内と同程度の濃度の ATP が、タンパク質と弱く非特異的に相互作用すること、および自己会合することを明らかにしました。タンパク質のアミロイド線維化はパーキンソン病などの神経変性疾患と関わるため本成果は将来的に神経変性疾患の新たな治療法の開発に繋がることが期待されます。

本成果は、2021 年 8 月 3 日（日本時間）に国際学術誌「*Journal of the American Chemical Society*」にオンライン掲載されました。



図： ATP がわずかに自己会合し、タンパク質と相互作用することを明らかにしました。ATP 分子をスティック、イオンを球で表し、タンパク質の表面を水色で表示。

## 1. 背景

アデノシン三リン酸 (ATP) は、細胞内に 5~10 mM (1 L 中に 2.5~5.1 g) の濃度で存在する分子です。細胞内に存在する個々のタンパク質の濃度が高々 0.01 mM のオーダーですので、この ATP の濃度が飛び抜けて高いことが分かります。ATP はしばしば生命エネルギーの通貨と呼ばれますが、その所以は生命活動のエネルギーが ATP 分子内の共有結合のエネルギーとして貯蔵されるからです。一方、近年 ATP にはタンパク質を安定化し、アミロイド線維化を抑制する別の機能があることが明らかにされました (図1)。タンパク質の アミロイド線維化<sup>注1</sup> はパーキンソン病などの神経変性疾患の発症と関連するため、この ATP の機能は一躍注目を浴びるようになりました。しかし、ATP がどのようにタンパク質と相互作用してタンパク質を安定化させるのかは不明でした。

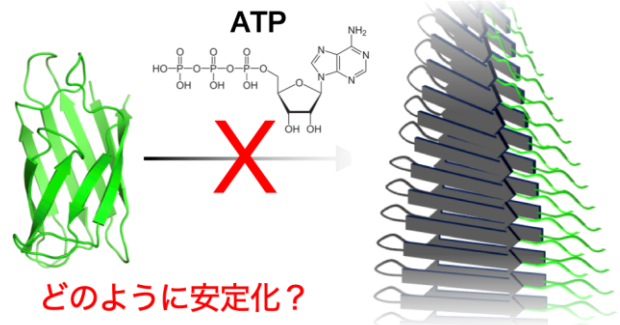


図1. ATPによるタンパク質の安定化

## 2. 研究手法・成果

私たちは、ATP がタンパク質を安定化させる際の相互作用が弱すぎるためこれまで見落とされていたと考え、非常に弱い相互作用でも原子レベルで検出できる NMR<sup>注2</sup> を用いて ATP とタンパク質の相互作用を解析することにしました。解析対象には、アミロイド線維化する  $\alpha$  シヌクレイン (パーキンソン病発症に関連)、非常に安定なユビキチン、自己二量体を形成する p62 を選択しました。まずは細胞内と同程度の濃度 (50  $\mu$ M) のタンパク質に ATP を徐々に添加し、その都度、二次元  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関 NMR スペクトルを測定しました (図2)。その結果、タンパク質の NMR シグナルがわずかに移動しました。これは ATP がタンパク質と非常に弱く相互作用することを意味します。興味深いことに、化学シフトの変化の仕方は従来観測されるものとは異なり、シグモイド関数のようでした (図2右)。すなわち、 $^1\text{H}$  の化学シフトは低濃度の ATP ではあまり変化せず、濃度が高くなると顕著に変化しました。ATP がタンパク質を安定化させる効果は、ATP の細胞内濃度である 5 mM 程度から現れることが分かっています。そのため、この化学シフト変化の結果から、5 mM 程度の濃度から ATP に何かしらの変化があることが示唆されます。

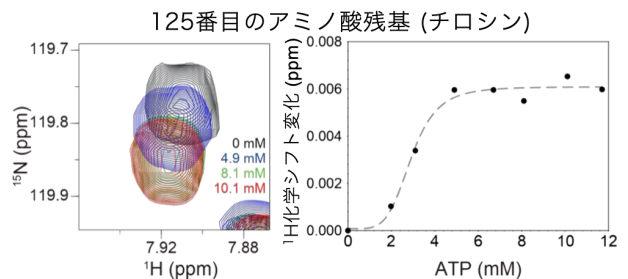


図2. ATP添加による化学シフト変化

(左)  $\alpha$  シヌクレインの NMR スペクトル. Tyr125 のシグナルを拡大表示. (右) ATP 添加による  $^1\text{H}$  化学シフトの変化.

ここで私たちは ATP の濃度が高くなると自己会合すると考え、動的光散乱測定・拡散係数測定・熱量測定を行いました。動的光散乱では ATP の濃度が濃くなると見かけの分子サイズが大きくなることが分かりました。拡散係数測定では ATP 溶液の中に自己会合して拡散が遅くなった成分がわずかにあることが分かりました。熱量測定では自己会合がほどける際に吸収される熱を検出しました。また分子動力学計算により、どのように ATP が自己会合するのかを調べました。その結果、様々な会合体が存在することが分かりました。図3は五量体の例です。

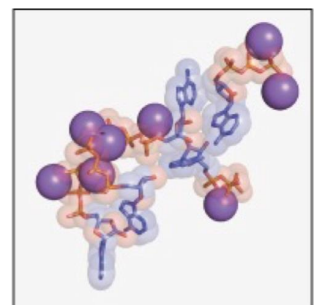


図3. ATP自己会合体モデル  
ATP分子をスティック、  
Na<sup>+</sup>イオンを球で表示.

ここまでの実験から ATP は濃度が濃いとわずかに自己会合することが分かりました。では、どのように ATP がタンパク質を安定化するのでしょうか？ここに

において、私たちは ATP が存在するとタンパク質のいくつかの NMR シグナルが大きくなることに着目しました(図 4 左点線)。観測している NMR シグナルはタンパク質のアミド基 (-NH) のものですが、アミド基の水素原子は水の水素原子と容易に入れ替わります。一般に、この水素交換があると NMR シグナルが小さくなります。そこで、私たちは ATP がアミド基と水の水素交換速度を遅くしていると考え、実際にその解析を行いました。図 4 右はユビキチンの Gly75 の結果を示しますが、ATP が存在するとグラフの立ち上がりが緩やかになっています。このことは ATP が存在すると水素交換速度が遅いことを示します。すなわち、ATP がタンパク質を取り囲み、水分子がタンパク質に近づきにくくなったと解釈できます。

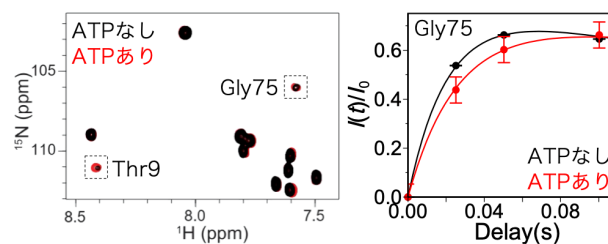


図4. ATP添加によるタンパク質の水和状態の変化 (左) ATP添加によるシグナル強度の増大. ユビキチンのThr9とGly75のシグナル近辺を拡大表示. (右) ATP添加によるGly75の水素交換速度の低下.

タンパク質は部分的に他の分子と吸着しやすい領域が存在するため、そのような領域を含めて ATP がタンパク質を取り囲むことによって、タンパク質を安定化させていると考えられます。なお、ここで示した結果は解析した3つのタンパク質に共通していたため、本研究により ATP の一般的な性質が明らかになったと言えます。

### 3. 波及効果、今後の予定

生体内の ATP 濃度は加齢とともに低下していきます。一方、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患は加齢とともに罹患率が高くなります。このことは、神経変性疾患の発症には生体内の ATP 濃度の低下が関わっている可能性があることを示唆します。当研究室では神経変性疾患の発症原因と言われているタンパク質のアミロイド線維化のメカニズムも研究していますので、今後は、ATP の濃度低下がタンパク質のアミロイド線維化にどのように作用するのかを詳細に研究することを計画しています。このような研究が発展すれば、将来的に神経変性疾患の新たな治療法の開発に繋がるのが期待されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、JSPS 科研費の支援を受けて行われました。

#### <用語解説>

- 注1 タンパク質が重合し、線維状の超分子複合体を形成すること。  
注2 磁場中に置かれた試料に含まれる水素原子などの核スピンの共鳴現象を観測することによって試料の構造や運動性などを原子レベルで解析するための装置。

#### <研究者のコメント>

本研究は濃度依存的に ATP の存在形態やその作用が変わることを示したものです。実際に生体内の ATP 濃度は大きく変動します。例えば、局所貧血では 6.9%、コールドショックでは 60%以下まで ATP 濃度が低下します。そのため本プレスリリースでは、生体の機能を理解するためにはタンパク質だけでなく ATP のように動的に変動する溶液環境まで研究する必要がある、というメッセージを一般の人にも届けたいと思います。

< 論文タイトルと著者 >

タイトル : Effects of weak non-specific interactions with ATP on proteins

(ATP との弱い非特異的相互作用がタンパク質に与える影響)

著 者 : Mayu Nishizawa, Erik Walinda, Daichi Morimoto, Benjamin Kohn, Ulrich Scheler, Masahiro Shirakawa, and Kenji Sugase

掲 載 誌 : Journal of the American Chemical Society

DOI : 10.1021/jacs.0c13118

< 参考図表 >

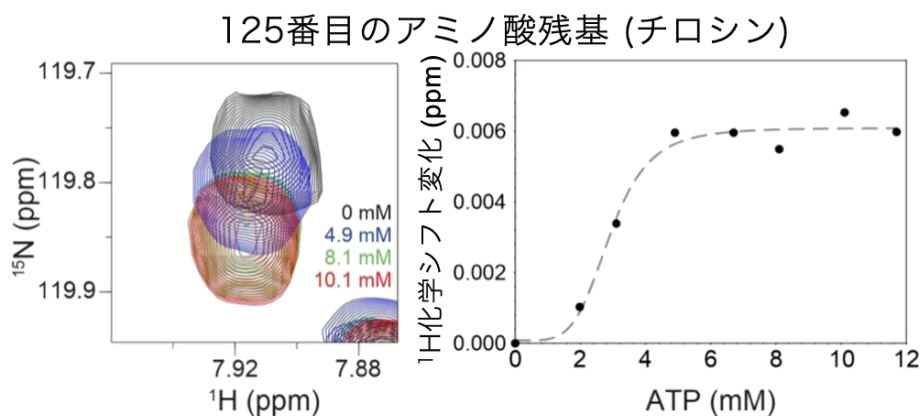


図2. ATP添加による化学シフト変化

(左)  $\alpha$ シヌクレインのNMRスペクトル. Tyr125のシグナルを拡大表示. (右) ATP添加による $^1\text{H}$ 化学シフトの変化.

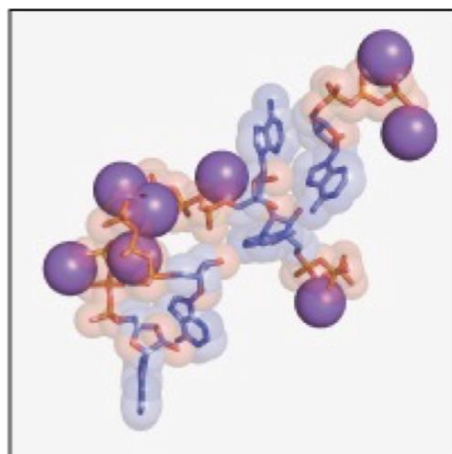


図3. ATP自己会合体モデル

ATP分子をスティック,  
 $\text{Na}^+$ イオンを球で表示.

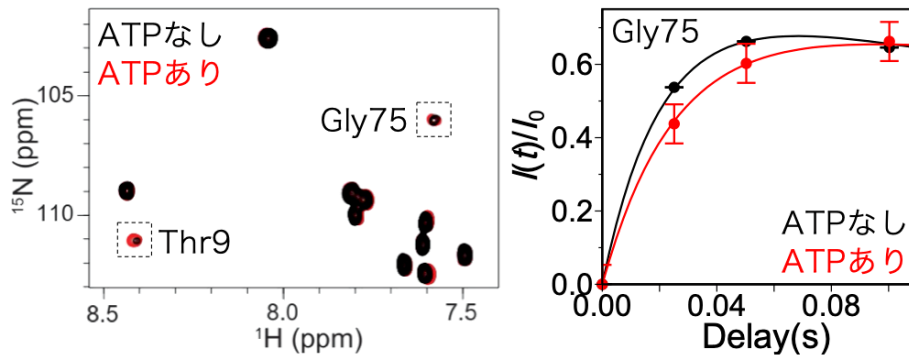


図4. ATP添加によるタンパク質の水和状態の変化  
 (左) ATP添加によるシグナル強度の増大. ユビキチンのThr9とGly75のシグナル近辺を拡大表示.  
 (右) ATP添加によるGly75の水素交換速度の低下.