

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19143

研究課題名(和文) タンパク質ケージによるアミロイドオリゴマーの精密構造決定

研究課題名(英文) Structure characterization of beta-Amyloid oligomer in protein cage

研究代表者

上野 隆史 (Unoe, Takafumi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：70332179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病発症の鍵をにぎるアミロイドファイバーの形成過程は、国内外の研究者によって精力的に研究が進められている。最近では、少数のアミロイドベータペプチド単量体(Ab)からなるAbオリゴマーが、Abファイバー形成時に比べ高い毒性を持つことが報告されており、単量体からファイバー形成への中間反応となるオリゴマー形成プロセスの理解が重要かつ緊急な課題となっている。本研究では、オリゴマー形成過程の全容解明に向けた革新的な手法として蛋白質ケージへの内包を利用したAb42オリゴマーの孤立化手法を確立し、様々なフラグメントをタンパク質ケージ内に集合させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病やパーキンソン病の克服は高齢化問題の重要な解決策となることから、ベータアミロイドに加え、それらの原因となるシヌクレイン、タウ蛋白質の凝集過程の研究は盛んに進められている。特に、凝集体の高分解能構造決定は機構解明には不可欠であるが、高い凝集性を有するサンプルの調製は困難である。本研究のオリゴマーの単離・精製と結晶化に蛋白質ケージ機能化を利用する全く新しい発想に基づく手法は、ウイルス等のサイズや形状の異なる蛋白質ケージに展開することによって、様々なターゲット蛋白質に適用できるばかりでなく、単一蛋白質の内包等にも発展する。

研究成果の概要(英文)：The formation process of amyloid fibers holds the key to the onset of Alzheimer's disease. It has been reported that Ab oligomers consisting of a small number of amyloid-beta peptide monomers (Ab) have higher toxicity than Ab fiber. In this study, we established a method for isolating an Ab-oligomer by using encapsulation in a protein cage.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ベータアミロイド タンパク質工学 タンパク質ケージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は超高齢化社会の大きな問題の一つとなっており、生体分子化学分野でも国内外問わず盛んに研究が進められている。最近では、少数のアミロイドβペプチド単量体(Aβ)からなるAβオリゴマーが、Aβファイバー形成時に比べ高い毒性を持つと報告されており、単量体からファイバー形成への中間反応となるオリゴマー形成過程の理解が重要かつ緊急な課題となっている。そこで、有限個のAβ42を孤立化し、かつ構造解析可能な環境を作り出すことができれば、金属イオンや有機分子の添加、アミノ酸置換によって誘起されるオリゴマー形成の変化を精密に追跡できると考えた。本研究では、Aβ42の凝集化や溶解性の問題を解決するため、蛋白質ケージへの内包を利用したAβ42オリゴマーの孤立化手法確立の実現を目指す。

2. 研究の目的

アミロイドβ線維はタンパク質の規則的な超分子重合体であり、その沈着はアルツハイマー病に関与している。しかし、アミロイドβ線維は、難溶性かつ非結晶性の巨大分子であるため、従来の手法を用いた解析が困難である。なかでも近年、線維核が形成される以前の可溶性オリゴマー状態が強い細胞毒性を有するというオリゴマー仮説に注目が集まっており、線維形成の初期段階である核

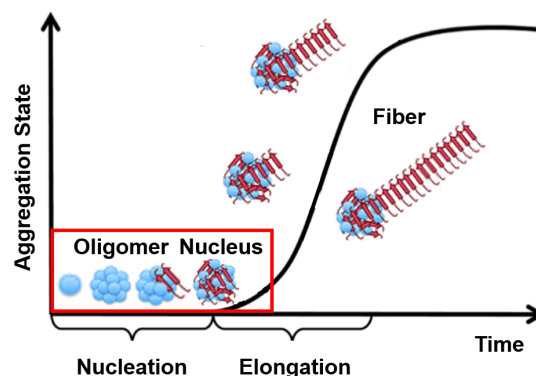


Fig.1 Schematic image of nucleation-dependent fibril formation process.

形成反応の解明が強く望まれている (Fig.1)。しかしながら、核形成反応では、生じる核の量が少ないため解析が遅れている。またオリゴマーのサイズ制御も困難であり、一旦線維核が形成されると核の持つ構造伝播性により自己触媒的に線維が増殖してしまうという難点も存在する。そこで、本研究では内部に空洞を有する 24 量体の球状タンパク質フェリチンに着目し、フェリチンの末端に遺伝子工学的にアミロイドβを融合することにより、フェリチンの内部空間に 24 本のアミロイドβを孤立化させた。本手法により、アミロイドβの数を 24 個と制御し、アミロイドβの線維形成を防ぎ、かつ局所的に高濃度のアミロイドβオリゴマーを得ることが可能となる。更に、フェリチンの pH 2.0 以下の強い酸性条件下で解離する性質を利用することで、球状構造の内部に存在するアミロイドβの構造を追跡することができる。

3. 研究の方法

遺伝子工学的手法の一つであるギブソン-アセンブリ法を用いて、組み換えウマ由来 L鎖フェリチンの遺伝子を持つ pMK-2 ベクターのフェリチン末端部分にリンカーを介してアミロイドβの全長フラグメントをクローニングした。このプラスミドにより形質転換した大腸菌を大量培養した後、陰イオン交換カラムおよびゲル濾過カラムを用いて、アミロイドβとフェリチンの融合体 (Fr-Aβ) を単離精製した。透過電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM) 観察により、目的とするケージ構造の確認を行った。続いて、アミロイド線維形成評価に用いられるチオフラビン T (ThT) との反

応を分光蛍光光度計で測定することによって、**Fr-A β** 内のアミロイド β による ThT 蛍光の確認を行った (ThT アッセイ)。これに加えて、フーリエ変換赤外分光光度計 (以下 Fourier Transform Infrared Spectrometer: FTIR) 測定により、**Fr-A β** の二次構造評価を行った。融合体 **Fr-A β** の同定を行った後、高速原子間力顕微鏡 (High Speed Atomic Force Microscope: HS-AFM) を用いてアミロイド β の挙動を追跡した。

4. 研究成果

TEM 観察と X 線結晶構造解析から、得られた融合体 (**Fr-A β**) は野生型フェリチン (Fr WT) と同様に 24 量体から成る球状構造を保持していることが示唆された。また、ThT アッセイの結果からは、Fr WT では観察されなかった 485 nm 付近のアミロイド線維結合に特有の蛍光が観測された。**Fr-A β** の FTIR 測定結果では、Fr WT には存在しない β シート由来のピークが確認できた。以上のことから、設計通りフェリチンの内部で 24 本のアミロイド β が β シート構造を形成していると考えられる。HS-AFM でフェリチンの解離反応を追跡することにより、ケージ内部に孤立化させたアミロイド β オリゴマーの直接観察に成功した。今後は線維形成の条件の最適化を進めながら HS-AFM でアミロイド β オリゴマーが伸長していく様子を直接観察していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Tsubasa, Ye Yuxin, Matsuno Asuka, Ohnishi Yuki, Kitamura Akira, Kinjo Masataka, Abe Satoshi, Ueno Takafumi, Yao Min, Ogawa Tomohisa, Matsui Takashi, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 509
2. 論文標題 Encapsulation of biomacromolecules by soaking and co-crystallization into porous protein crystals of hemocyanin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 577 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.12.096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nguyen Tien Khanh, Negishi Hashiru, Abe Satoshi, Ueno Takafumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Construction of supramolecular nanotubes from protein crystals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 1046 ~ 1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8SC04167A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hyodo Fuminori, Sho Takeya, Maity Basudev, Fujita Kenta, Tachibana Yoko, Akashi Satoko, Mano Megumi, Hishikawa Yuki, Matsuo Masayuki, Ueno Takafumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Photoinduced in?Vivo Magnetic Resonance Imaging (MRI) with Rapid CO Release from an MnCO-Protein Needle Composite	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 11578 ~ 11583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201802445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Hajime, Oda Naoki, Abe Satoshi, Ueno Takafumi, Zhu Wenliang, Pernstich Chris, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 203
2. 論文標題 Raman spectroscopy insight into Norovirus encapsulation in Bombyx mori cypovirus cubic microcrystals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 19 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.saa.2018.05.066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Negishi Hashiru, Abe Satoshi, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Niwase Kento, Boudes Marion, Coulibaly Fass?li, Mori Hajime, Ueno Takafumi	4. 巻 54
2. 論文標題 Supramolecular protein cages constructed from a crystalline protein matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 1988 ~ 1991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7CC08689J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tabe Hiroyasu, Takahashi Hikaru, Shimoi Takuya, Abe Satoshi, Ueno Takafumi, Yamada Yusuke	4. 巻 237
2. 論文標題 Photocatalytic hydrogen evolution systems constructed in cross-linked porous protein crystals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Catalysis B: Environmental	6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apcatb.2018.01.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Satoshi, Maity Basudev, Ueno Takafumi	4. 巻 43
2. 論文標題 Functionalization of protein crystals with metal ions, complexes and nanoparticles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 68 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2017.11.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Satoshi, Ito Nozomi, Maity Basudev, Lu Chenlin, Lu Diannan, Ueno Takafumi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Coordination design of cadmium ions at the 4-fold axis channel of the apo-ferritin cage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9DT00609E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Maity Basudev, Hishikawa Yuki, Lu Diannan, Ueno Takafumi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Recent progresses in the accumulation of metal ions into the apo-ferritin cage: Experimental and theoretical perspectives	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polyhedron	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.poly.2019.03.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 T. K. Nguyen, T. T. Pham, and T Ueno	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Engineering of protein crystals for development of bionanomaterials	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn. J. Appl. Phys.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Metal Coordination Functions Designed in Protein Cage
3. 学会等名 3rd Japan-UK Joint Symposium on Coordination Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Metal Coordination and Function Designed in Protein Assembly
3. 学会等名 2018 Korea-Taiwan-Japan Bioinorganic Chemistry Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Functional Design of Protein Cage for Sustainable Bionanomaterial
3. 学会等名 ASPIRE League forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Functions designed in Crystalline Protein Assembly?
3. 学会等名 JST Fujita ACCEL International Symposium Coordination Chemistry for Structural Elucidation ICC2018? (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Dynamic Process of Proteins Observed in Crystalline Cages
3. 学会等名 The 79th Okazaki Conference Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Dynamic Function of Crystalline Protein Assembly
3. 学会等名 ACSPIN-14 & ICSPM26, Nanobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Artificial metalloproteins constructed with protein assemblies for bioinorganic materials
3. 学会等名 The 18th Japan-Korea Joint Symposium on Organometallic and Coordination Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Artificial metalloproteins constructed with protein assemblies for bionano applications
3. 学会等名 The 9th Asian Biological Inorganic Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Protein crystals for designing biosupramolecular materials
3. 学会等名 Tokyo Tech NCCR Molecular Systems Engineering Joint Symposium, Basel, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takafumi Ueno
2. 発表標題 Bioinorganic Design of Protein Assembly
3. 学会等名 2019 KAIST School of Molecular Science BK21 Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 B. Maity, S. Abe, T. Ueno	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 472
3. 書名 Advances in Bioorganometallic Chemistry	

1. 著者名 上野隆史	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 204
3. 書名 生命機能に迫る分子化学	

1. 著者名 安部 聡、上野隆史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 印刷中
3. 書名 光エネルギー変換における分子触媒の新展開	

1. 著者名 安部 聡、上野隆史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 三共出版	5. 総ページ数 印刷中
3. 書名 機能性高分子金属錯体	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 融合タンパク質及びその使用	発明者 上野隆史、亀山詩織	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-088420	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Ueno Lab
<http://www.ueno.bio.titech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----