

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19790091  
 研究課題名（和文） プリオンのアミロイド線維に選択的に結合する低分子化合物の探索とその作用機構の解明  
 研究課題名（英文） Search of a low molecular compound selectively binding to amyloid fibrils of prion and the elucidation of its binding mechanism  
 研究代表者  
 山口 圭一 (YAMAGUCHI KEIICHI)  
 岐阜大学・人獣感染防御研究センター・学術研究補佐員  
 研究者番号：90432187

研究成果の概要：本研究では、全長マウスプリオン mPrP(23-231)とプリオンの部分ペプチド Helix2 と Helix3 のアミロイド線維形成条件を確立した。次に、アミロイド線維に結合する芳香族環を含む化合物の探索を行った。しかし現時点では、mPrP(23-231)線維に強く結合する化合物は見つかっていない。また、化合物の結合には線維の形態が関与している可能性が示唆された。芳香族環を複数含む化合物に注目して、今後も引き続き研究を行う必要がある。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：プリオン、検出試薬、アミロイド線維、狂牛病

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン病には、孤発性、遺伝性、そして感染によるものがある。感染によるものとして、英国で大発生した狂牛病に汚染された牛肉をヒトが食したことが原因で、変異型ヤコブ病が発生した。このようにプリオン病はウシからヒトへ、種を越えて感染する。プリオン病の感染物質の高感度な検出試薬の開発は、食生活を守るうえで重要な研究課題である。

ウシの伝達性海綿状脳症を引き起こす物質は、当初はウイルスではないかと考えられ

ていた。しかし現在のところ、プリオン病の感染機構においては、プルシナー博士らが提唱した核酸を媒介としない蛋白質オンリー仮説が支流となりつつある。その分子機構としては、 $\beta$ シート構造に富んだ異常プリオン蛋白質が鋳型となり、 $\alpha$ ヘリックスに富む正常プリオンを $\beta$ シート構造に変換して異常型にしていくというモデルである。近年、プリオン病が $\beta$ シート構造に富むアミロイド線維によって引き起こされることが示された。よって、アミロイド線維はプリオン病の感染物質の一つであり、アミロイド線維によるプリ

オン病の伝播が受け入れられつつある。

アミロイド線維とは、プリオン蛋白質の他、アルツハイマー $\beta$ ペプチドや $\alpha$ シヌクレインをはじめ数多くの蛋白質やペプチドで知られており、それらが関連する疾患の原因と考えられている。また、アミロイド線維では大部分が $\beta$ シート構造を形成しており、高いプロテアーゼ耐性があるなど天然構造とは状態が大きく異なる。しかし、この特殊な性質を認識してアミロイド線維に選択的に結合する化合物の開発はほとんどなされていない。通常、アミロイド線維は長い年月をかけて、体内の様々な場所に沈着していく。よって、アミロイド線維の検出試薬の開発は、プリオン病や他のアミロイド病の早期発見につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

プリオン病はウシからヒトへ、種を越えて感染する。プリオン病の感染物質の高感度な検出試薬の開発は、食生活を守るうえで重要な研究課題である。本研究では、プリオン病の感染物質の一つであるアミロイド線維や $\beta$ オリゴマーなどの凝集体に選択的に結合する低分子化合物の探索とその作用機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 全長プリオンと部分ペプチドのアミロイド線維形成

全長プリオン蛋白質mPrP(23-231)またはプリオンの部分ペプチドを用いて、アミロイド線維と $\beta$ オリゴマーの作製を行う。プリオン蛋白質としては、種の障壁がありヒトへの感染性が低いマウス由来のプリオンを用いる。また、部分ペプチドとしては、約20アミノ酸残基のペプチドをプリオン蛋白質の全領域にわたって作製し、アミロイド線維形成について調べる。

作製したアミロイド線維は、円二色性や赤外吸収、電子顕微鏡を用いて二次構造や形態について調べる。プリオン蛋白質は様々な形態の凝集体を形成する。また、その形態の違いにより、毒性や感染性が異なると考えられている。よって、アミロイド線維だけでなく、 $\beta$ オリゴマーなど形態の異なる凝集体も作製する。

### (2) 芳香族環をもつ低分子化合物の探索

アミロイド線維に結合する既知化合物に

は、染料として使われ芳香族環を含むものが多い。よって、芳香族環などの蛍光団に注目して低分子化合物の探索を行う。化合物の検出は蛍光で行い、高感度な検出試薬の開発を目指す。

### (3) 他のアミロイド線維への応用

低分子化合物がプリオン以外のアミロイド線維に結合するか調べる。アルツハイマー病の原因蛋白質であるアルツハイマー $\beta$ ペプチドや透析アミロイド病の原因蛋白質である $\beta$ 2ミクログロブリンが形成するアミロイド線維との結合について調べる。

### (4) 低分子化合物とアミロイド線維の結合様式の解明

蛍光測定により、化合物とアミロイド線維の結合について調べる。線維表面は水溶液中とは環境が異なり、線維に結合することにより蛍光スペクトルならびその量子収率が変化すると考えられる。

また、流れによりアミロイド線維を配向させ、直線偏光二色性を測定してアミロイド線維と低分子化合物の結合様式を調べる。

## 4. 研究成果

### (1) 全長プリオンと部分ペプチドのアミロイド線維形成

組み換えマウスプリオン蛋白質mPrP(23-231)を用いてアミロイド線維形成実験を行った。線維形成は超音波照射または攪拌下で行った。その結果、強力な超音波照射により、mPrP(23-231)は効率良くアミロイド線維を形成した(図1(a))。攪拌下では線維ではなく凝集体様の線維が多数形成された(図1(b))。また、シーディングによって線維形成は促進され、mPrP(23-231)はより剛直な線維を形成した(図1(c))。

一方、N末を削除したmPrP(120-231)は全長プリオンmPrP(23-231)線維によるシーディングによって速やかにアモルファス状の凝集体を形成した。mPrP(120-231)については剛直な線維作製のため、今後さらに条件検討が必要である。

また、プリオンの部分ペプチドについては、プリオンの全領域のうちC末側のHelix2とHelix3領域の部分ペプチドがアミロイド線維を形成することが分かった。特に、Helix2ペプチドはアミロイド線維を形成しやすく、mPrP(23-231)の線維形成において重要な領域であると考えられる。

以上の研究により、全長プリオンまたは部

分ペプチドのアミロイド線維形成条件を制御することにより、形態の異なる様々なアミロイド線維作製が可能になった。

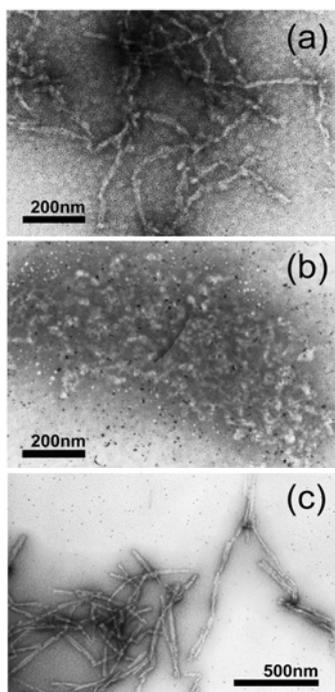


図1 (a)超音波照射, (b)攪拌, (c)シーディングによって形成された mPrP(23-231) アミロイド線維の電子顕微鏡画像.

### (2) 芳香族環をもつ低分子化合物の探索

まず、既知の化合物であるチオフラビンTを用いてmPrP(23-231)アミロイド線維との結合実験を行った。その結果、線維への結合に伴い蛍光強度の増加が見られた(図2)。

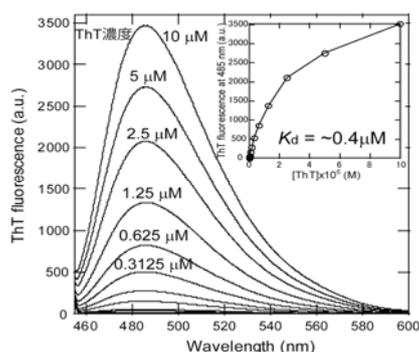


図2 蛍光によるチオフラビン T (ThT) とアミロイド線維の結合実験.

アミロイド線維に結合する既知の化合物には、染料として使われ芳香族環を含むものがいくつか知られている。そこで、Acid Red 52, Allura Red, Amaranth (Bordeaux S), Brilliant Blue FCF, Carmine, (+)-Catechin-Hydrate, CBB G-250, CBB R-250, Curcumin,

Erythrosine B, Indigo Carmine, Methyl Orange, Methyl Red, New Coccine, Quercetin Dihydrate, Sunset Yellow FCF, Tartrazineなどの芳香族環を含む化合物を購入し、アミロイド線維との結合実験を行った。しかし現在のところ、mPrP(23-231)線維と強く結合するか化合物は見つかっていない。今後、結合実験の条件検討と詳細な解析が必要である。

### (3) 他のアミロイド線維への応用

アミロイド線維は蛋白質の種類によらず、共通した構造をもつ。よって、プリオンのアミロイド線維に結合する化合物は、他のアミロイド線維にも結合する可能性が高い。そこで、透析アミロイド病の原因蛋白質である $\beta$ 2ミクログロブリン( $\beta$ 2m)を用いて剛直な線維を作製して、既知の化合物である1-Bromo-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene (BSB)との結合実験を行った(図3)。その結果、アミロイド線維との結合によって、化合物BSBの蛍光強度が増加した。

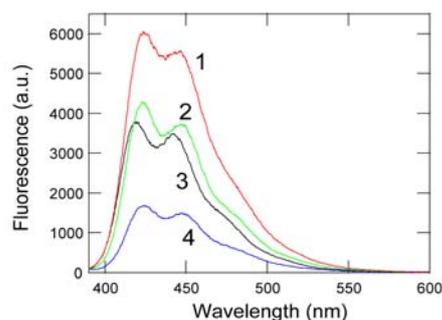


図3 アミロイド線維との結合に伴うBSBの蛍光スペクトル変化。(1) $\beta$ 2m線維, (2)mPrP線維, (3)線維なし, (4)mPrP凝集体様線維.

BSBは $\beta$ 2m線維とmPrP線維の両方に結合している可能性が高い(図3)。しかし、化合物の蛍光変化には線維の形態が関与しており、剛直な線維に結合すると蛍光強度が高くなる傾向にあると考えられる。今後、mPrP(23-231)またはmPrP(120-231)を用いて剛直な線維を作製して、化合物の解離定数、そして線維の形態との関連を調べる必要がある。

### (4) 低分子化合物とアミロイド線維の結合様式の解明

コンゴーレッドやチオフラビンTは、アミロイド線維に選択的に結合することが知られている。しかし、これらの化合物が、どのようにアミロイド線維に結合しているのか、その結合様式についてはよく分かっていな

い。結合様式を明らかにすることで、新規化合物の構造最適化、またはアミロイド線維の特性理解につながると考えられる。

アミロイド線維との結合により化合物の蛍光強度が増加した場合(図3(1))、化合物の環境はより疎水的になったと考えられる。蛍光強度が減少した場合(図3(4))、化合物は線維に結合しているが、その結合状態の詳細について理解するのは難しい。

また、流れによりアミロイド線維を配向させ、直線偏光二色性によりアミロイド線維と化合物の結合様式を調べるため、予備実験として以下の実験を行った。プリオンの部分ペプチド Helix1 は界面活性剤である SDS 溶液中で、アミロイド線維を形成した。Helix1 線維溶液を流しながら、円二色性 (CD) スペクトルを測定すると、アミロイド線維の配向によって、CD スペクトルが大きく変化した(図4)。現在のところ、アミロイド線維に結合した化合物の直線偏光二色性測定は行っていない。今後、線維を流しながら直線偏光二色性を測定して、アミロイド線維の内部構造や化合物との結合様式を明らかにしていきたい。

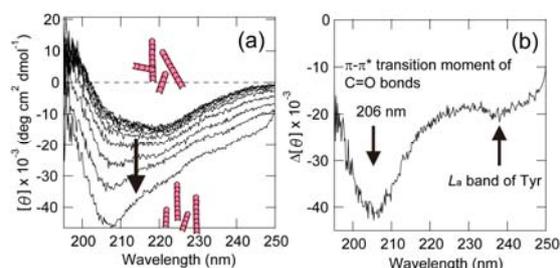


図4 プリオンの Helix1 線維の配向. (a) 流しながら測定した Helix1 線維の CD スペクトル. (b) 流した条件から静置条件を差し引いた差 CD スペクトル.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kei-ichi Yamaguchi, Tomoharu Matsumoto, Kazuo Kuwata. 「Critical region for amyloid fibril formation of mouse prion protein: unusual amyloidogenic properties of the helix2 peptide」, 『Biochemistry』, 47 巻, pp13242-13251, 2008 年, 査読有り.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山口圭一. 「シーディングによるマウス

PrP アミロイド線維の伝播」, 『第 46 回 日本生物物理学会年会』, 2008 年 12 月 3 日～5 日, 福岡国際会議場 (福岡県).

- ② 山口圭一. 「部分ペプチドを用いたマウスプリオン蛋白質のアミロイド線維形成部位の研究」, 『第 8 回 日本蛋白質科学会年会』, 2008 年 6 月 10 日～12 日, タワーホール船堀 (東京都江戸川区).
- ③ 山口圭一. 「部分ペプチドを用いたプリオンのアミロイド線維形成部位の系統的スクリーニング」, 『第 72 回 日本生化学会中部支部例会』, 2008 年 5 月 24 日, 岐阜大学医学部記念会館 (岐阜県).
- ④ 山口圭一. 「マウスプリオン蛋白質のアミロイド原性ペプチドに関する研究」, 『第 45 回 日本生物物理学会年会』, 2007 年 12 月 21 日～23 日, パシフィコ横浜 (神奈川県).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 圭一 (YAMAGUCHI KEIICHI)

岐阜大学・人獣感染防御研究センター・学術研究補佐員

研究者番号: 90432187

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。