

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20810010

研究課題名（和文） 配座固定ペプチドを利用したポリグルタミン病の分子機構研究

研究課題名（英文） Structural study of the polyglutamine aggregates

研究代表者

松岡 茂 (MATSUOKA SHIGERU)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：60456184

研究成果の概要（和文）：長さの均一なポリグルタミンペプチドを固相法により合成し、アミロイド染色試薬チオフラビン T を用いた染色実験に供した結果、チオフラビン T 被染色性凝集体を形成する最短のポリグルタミンは 7 残基であることが明らかとなった。また、重水素標識チオフラビン T と ^{13}C および ^{15}N 標識グルタミンを合成し、固体 NMR によるポリグルタミン-チオフラビン T 複合体の構造解析を試みた。

研究成果の概要（英文）：Uniform length short polyglutamine peptides ($\text{Q}_5\sim\text{Q}_{10}$) were synthesized and subjected to thioflavin T (ThT) staining. Formation of ThT-stainable aggregate were observed for polyglutamines longer than 7 residues. Solid-state NMR showed short polyglutamine peptides adopts β -sheet structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	880,000	264,000	1,144,000
2009 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,280,000	384,000	1,664,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：核磁気共鳴、有機合成、ポリグルタミン病

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会への移行に伴い患者数が増加している神経変性疾患は、現在も有効な治療法がない不治の病であり、病理機構の解明と有効な医薬の開発が急務となっている。その中でハンチントン病に代表されるポリグルタミン病は、遺伝子上の CAG リピートの変異伸長により、コードされるタンパク質のポリグルタミン領域が異常延長することで発

症する。ポリグルタミン病の CAG リピート長には閾値があり、健常者では 30 前後であるが、患者では約 40 以上になっている。異常伸長したポリグルタミンを有する変異タンパク質は、正常なコンフォメーションを安定に取れなくなり、凝集して β シート構造の一種とされる封入体を生成する。封入体自体は細胞に害を及ぼさないが、その生成過程で強力な毒性を有する中間体が形成され、神経

細胞に障害を与えると考えられている。以上の特徴から、ポリグルタミン病はプリオン病と同様にコンフォメーション病の一つとされ、毒性コンフォマーの生成阻止および排除が治療の標的となる。

現在までに、ポリグルタミンペプチドはそれ自体がイオンチャネル活性を有することが報告されている。また、主に計算科学的手法によりポリグルタミンチャネルの推定構造が提案され、ポリグルタミンが形成するイオンチャネルが病理毒性の本体である可能性が指摘されている。しかし、i) 容易に凝集する毒性構造の不安定性と ii) X線結晶解析や溶液 NMR といった高分解能分光法の適用が難しい試料の不均一性から、分光学的手法による直接的な構造解析はほとんど手付かずの状態であった。

2. 研究の目的

本研究では、有機合成的にポリグルタミン凝集体を調製し、固体 NMR によりそれらの精密構造を解析することで、ポリグルタミン病の分子機構解を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

固体 NMR 測定には 10 mg 前後の非標識試料を調製する必要があるが、水、有機溶媒に不溶な凝集体を形成しやすいポリグルタミンを数十 mg スケールで合成、精製することは困難であった。そこで、まず初めに、ポリグルタミンの効率的合成と精製法を確立した。

次に、アミロイド凝集体蛍光染色試薬チオフラビン T (ThT) を用いた蛍光染色実験により、合成ポリグルタミンペプチド (5~10 残基) の中から、ThT 被染色凝集体形成能を有する最短のポリグルタミンペプチドを同定した。

精密な三次元構造を明らかにするために、短鎖ポリグルタミンペプチドを用いて、固体 NMR による構造研究を行った。

4. 研究成果

(1) ポリグルタミンペプチドの効率的合成

固体 NMR 測定には試料を約 10 mg 調製する必要があるが、水、有機溶媒に不溶な凝集体を形成しやすいポリグルタミンを数十 mg スケールで合成、精製することは困難であった。そこで、まず初めに、ポリグルタミンの効率的合成と精製の検討をおこなった。

ポリグルタミンの合成には自動固相合成法を用いた。5 から 20 残基のポリグルタミンの調製と、その精製法の検討を行なった。無保護のポリグルタミンは容易に凝集し、ほとんどの溶媒に溶解性を示さなくなるが、側鎖アミドをトリチル基、主鎖末端アミンを Fmoc

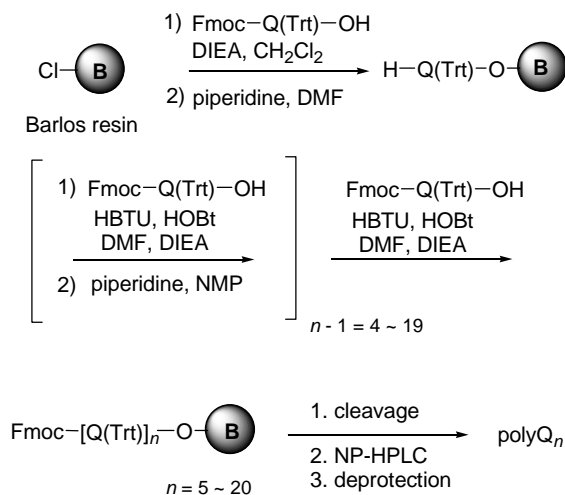


図1 縮合数の均一なポリグルタミンの調製

基で保護したポリグルタミン保護体は、クロロホルム-メタノールなどの有機溶媒に非常に良い溶解性を示す。この性質を利用し、順相高速液体クロマトグラフィーを用いて保護体を精製した。この条件により、長さの均一なポリグルタミン保護体の調製が容易に実現できるようになった。得られた保護体は、ピペリジンによる脱 Fmoc 化、続いてトリフルオロ酢酸による脱 Trt 化に供し、単一の長さを有するポリグルタミン試料とした。

(2) 合成ポリグルタミンの凝集体形成

合成ポリグルタミンペプチド (5~10 残基) とアミロイド蛍光染色試薬チオフラビン T (ThT) を用いた蛍光染色実験から、ThT 被染色凝集体形成能を有する最短のポリグルタミンペプチドは 7 残基であることを明らかにした。得られた知見をもとに、以降、短鎖ポリグルタミンペプチドを用いた凝集体構造解析を行った。

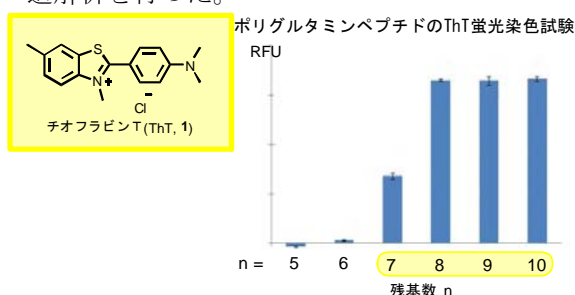


図2 ポリグルタミンペプチドの凝集体染色実験

(3) 天然存在比 ^{13}C NMR 測定

5~10 残基の合成ポリグルタミンの固体 ^{13}C NMR を図 1 に示す。 ^{13}C NMR の感度向上のため、CP-MAS 法を用いた。グルタミン残基 C_α の化学シフトは、ランダム構造 (54.0 ppm) とアミロイド凝集体中の β -sheet 構造 (52.3 ppm) の間で異なることが報告されている。この文献値と、本研究で調製したポリ

グルタミンの固体 ^{13}C NMR 化学シフトを比較したところ、全ての試料において β -sheet 構造に相当するシグナルが、50%以上の含有率で確認された。この結果から、短鎖ポリグルタミンは主に β -sheet 構造を取っていることが予想され、アミロイド凝集体構造の単純化モデルとして有用であると考えられた。以降の詳細な構造研究には、ThT 被染色構造を形成できる最短のペプチドである7残基ポリグルタミンを用いることとした。

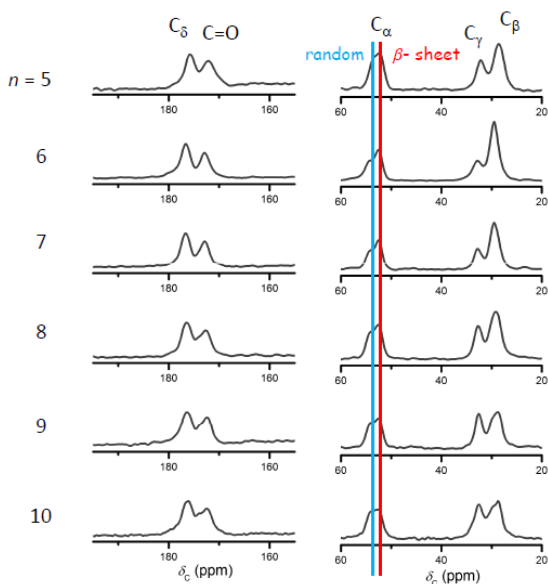


図3 ポリグルタミンペプチドの ^{13}C CPMAS

(4) $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$ REDOR 実験のための標識化合物の合成

我々が得たポリグルタミン凝集体は、非結晶性の不均一固体試料である。この中から、ThTにより認識されるアミロイド様構造を解析するためには、ThT結合部位周辺構造のみを抽出する固体NMRの方法論が必要となる。そこで ^2H 標識ThTを合成してポリグルタミンに結合させ、 $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$ REDORにより ^2H 標識ThT周辺部のポリグルタミン ^{13}C NMRシ

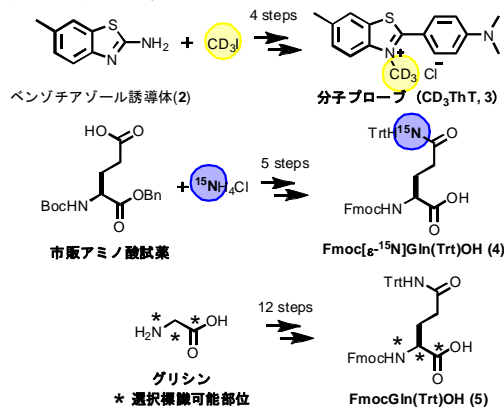


図4 標識化合物の合成

グナルのみを選択観測して、原子間距離測定に用いることを計画した。図4に示した標識化合物を合成した。ThT- d_3 と7残基ポリグルタミンを用いて複合体を形成し、 ^{13}C CP-MAS スペクトルを測定したところ、1.で得られたポリグルタミンのみの場合の ^{13}C CP-MAS と同じスペクトルの特徴が見られた。このことからThT- d_3 の添加によりポリグルタミンの立体構造は破壊されないことが分った。現在、チオフラビンとポリグルタミン分子間の ^2H - ^{13}C 原子間距離を蓄積している。

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11件) (査読あり)

1. Yuuki Ishihara, Nayoung Lee, Naomasa Oshiro, Shigeru Matsuoka, Shuji Yamashita, Masayuki Inoue, Masahiro Hirama, The First F-ring Modified Ciguatoxin Analogue Showing Significant Toxicity, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 2968-2970.
2. Tsy-Yan Yu, Manmilan Singh, Shigeru Matsuoka, Gary Patti, Gregory Potter, Jacob Schaefer, Variability in C_3 -Plant Cell-Wall Biosynthesis in a High- CO_2 Atmosphere by Solid-State NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 6335-6341.
3. Emmanuel Oluwadare Balogun, Daniel Ken Inaoka, Yasutoshi Kido, Tomoo Shiba, Takeshi Nara, Takashi Aoki, Teruki Honma, Akiko Tanaka, Masayuki Inoue, Shigeru Matsuoka, Paul A. M., Shigeharu Harada, Kiyoshi Kita, Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase, *Acta Cryst.* **2010**, F66, 304-308.
4. Yasutoshi Kido, Tomoo Shiba, Daniel Ken Inaoka, K. Sakamoto, Takeshi Nara, Takashi Aoki, Teruki Honma, Akiko Tanaka, Masayuki Inoue, Shigeru Matsuoka, Anthony Moore, Shigeharu Harada, Kiyoshi Kita, Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*, *Acta Cryst.* **2010**, F66, 275-278.
5. Masayuki Inoue, Naoki Shinohara, Shintaro Tanabe, Tomoaki Takahashi, Ken Okura, Hiroaki Ito, Yuki Mizoguchi, Maiko Iida, Nayoung Lee, Shigeru Matsuoka, Total Synthesis of the Large Non-Ribosomal Peptide Polytheonamide B, *Nature Chem.* **2010**, 2, 280-285.
6. Ken Okura, Shigeru Matsuoka, Ryosuke

- Goto, Masayuki Inoue, Importance of the Twisted Side-Chain of Antillatoxin for Potent Toxicity: Total Synthesis and Biological Evaluation of Antillatoxin and Analogues, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 329-332.
7. Shigeru Matsuoka, Masayuki Inoue, Application of REDOR NMR in natural product chemistry. *Chem. Commun.* **2009**, *38*, 5664-5675.
 8. Kazuaki Matoba, Takeshi Nara, Takashi Aoki, Teruki Homma, Akiko Tanaka, Masayuki Inoue, Shigeru Matsuoka, Daniel Ken Inaoka, Kiyoshi Kita, Shigeharu Harada, Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate carbamoyltransferase from a parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. *Acta Cryst.* **2009**, *F65*, 933-936.
 9. Masayuki Inoue, Nayoung Lee, Keisuke Miyazaki, Toyonobu Usuki, Shigeru Matsuoka, Masahiro Hiram, Critical importance of the nine-membered F ring of ciguatoxin for potent bioactivity: total synthesis and biological evaluation of F-ring-modified analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8611-8614.
 10. Sung Joon Kim, Shigeru Matsuoka, Gary J. Patti, Jacob Schaefer, Vancomycin Derivative with Damaged d-Ala-d-Ala Binding Cleft Binds to Cross-linked Peptidoglycan in the Cell Wall of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **2008**, *47*, 3822-3831.
 11. Yusuke Kasai, Nobuaki Matsumori, Yuichi Umegawa, Shigeru Matsuoka, Hiroyuki Ueno, Hiroki Ikeuchi, Tohru Oishi, and Michio Murata, Self-Assembly of Amphotericin B is Probably Surrounded by Ergosterol; Bimolecular Interactions as Evidenced by Solid State NMR and CD Spectra. *Chemistry Eur. J.* **2008**, *14*, 1178-1185.

[学会発表] (計 11 件)

1. 村井元紀, 松岡 茂, 井上将行, ポリグルタミン-チオフラビンT分子複合体の構造解析, 日本薬学会 第 130 年会 2010.3.28, 岡山.
2. 篠原直樹, 飯田真依子, 溝口友紀, 松岡 茂, 井上将行, 巨大ペプチド系天然物ポリセオナミドBの全合成と構造活性相関, 日本薬学会第 130 年会, 2010.3.29, 岡山.
3. 大倉 健, 後藤良祐, 松岡 茂, 井上将行, アンチラトキシンを構造基盤とした光スイッチ分子の開発, 日本薬学会第 130 年会, 2010.3.29, 岡山.
4. 松岡 茂, 天然低分子化合物への固体 NMR の応用, 平成 21 年度 NMR 外部利

用事業報告会, 2010.3.15, 横浜.

5. 伊藤寛晃, 松岡 茂, 井上将行, ポリセオナミドを構造基盤とした人工機能分子の合成研究, 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2009.11.25, 東京.
6. 飯田真依子, 李 羅榮, 上條 真, 松岡 茂, 井上将行, 本間光輝, 田中昭子, 稲岡ダニエル 健, 北 潔, トリパノソーマ DHOD の阻害剤の合成と複合体構造, 日本薬学会第 129 年会, 2009.3.28-16, 京都.
7. 大倉 健, 後藤良祐, 松岡 茂, 井上将行, アンチラトキシン側鎖部の構造と機能, 日本薬学会第 129 年会, 2009.3.26, 京都.
8. 後藤良祐, 菅原達也, 飯田真依子, 大倉 健, 松岡 茂, 井上将行, アンチラトキシン構造類縁体の網羅的合成, 日本薬学会第 129 年会, 2009.3.26, 京都.
9. 伊藤寛晃, 松岡 茂, 井上将行, ポリセオナミドを構造基盤とした人工機能分子の合成研究, 日本薬学会 第 129 年会, 2009.3.26, 京都.
10. 大倉 健, 後藤良祐, 飯田真依子, 李 羅榮, 松岡 茂, 井上将行, アンチラトキシン類縁体の網羅的全合成と機能解析, 第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2008.11.4-5, 京都.
11. 篠原直樹, 田名部真太郎, 高橋友章, 溝口友紀, 大倉 健, 伊藤寛晃, 飯田真依子, 李 羅榮, 平間正博, 松岡 茂, 井上将行, 巨大ペプチド系天然物ポリセオナミド B の全合成, 第 50 回天然有機化合物討論会, 2008.9.30-10.2, 福岡.

[図書] (計 1 件)

1. 村田道雄, 石橋正己, 木越英夫, 佐々木 誠 (監訳), 荒井孝義, 荒井 緑, 有本博一, 石橋正己, 及川雅人, 大石 徹, 木越英夫, 北 将樹, 此木敬一, 佐竹真幸, 佐々木 誠, 末永聖武, 早川一郎, 松岡 茂, 松森信明, 村田道雄 (共訳), "ソレル有機化学" 東京化学同人, 2009, 第 3 章.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 茂 (MATSUOKA SHIGERU)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 60456184

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

井上 将行 (INOUE MASAYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号: 70322998

山崎 俊夫 (YAMAZAKI TOSHIO)
理化学研究所・SSBC・チームリーダー
研究者番号：60273710