

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750375

研究課題名(和文) アミロイドペプチドの凝集を規格化した細胞アッセイシステムの構築

研究課題名(英文) Construction of novel methods for monomerization and aggregation of amyloid peptides

研究代表者

臼井 健二 (Usui, Kenji)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号：70543792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会に突入した我が国において、アミロイド病の原因物質といわれるアミロイドペプチド・タンパク質(アミロイド)に関する研究は、各方面で重要になってきている。アミロイドは自己で集合した凝集体が毒性を示したり、線維などのナノ構造体を形成したりするため、凝集体に関する研究が数多く行われている。しかしながら、凝集体の形成条件が各研究で異なっているのが現状で、アミロイド研究の進展を妨げている。本研究では、従来の手法では難しかったアミロイドの凝集プロトコルを規格化することで、いつでも誰でも同条件で、物理化学的アッセイや細胞アッセイが行えるシステムの構築を行った。

研究成果の概要(英文)：Protein misfolding diseases are increasingly common in aging populations. These diseases involve the systematic or tissue-localized deposition of fibrillar, β -sheet rich protein assemblies (amyloids). To date, many scientists have investigated amyloid aggregation, but their monomerization protocols and aggregation protocols for amyloids have not been unified nor standardized. Consequently, we attempted to establish an effective method for monomerization and aggregation of amyloid peptides using peptide-immobilized microbeads. This system would be one of the most promising method for monomerization and aggregation of amyloids toward medicinal and biochemical research fields.

研究分野：生体高分子工学

キーワード：アミロイド モノマー化 凝集化 細胞毒性 バイオ関連機器

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に突入した我が国において、アルツハイマー病やパーキンソン病といったペプチド・タンパク質のミスフォールディングであるアミロイドによる重大疾病(アミロイド病)が社会問題化しており、様々な方面で研究がなされている。しかしながら、未だにどのようなペプチド配列が凝集し、細胞毒性を示すのか、さらにどのような毒性発現機構なのか、といった根本的かつ基礎的な知見は見出されていない。また、治療や診断に役立つと考えられるアミロイド凝集を促進・抑制するようなペプチド配列も体系的には見出せていない。以上のような知見が体系的・網羅的に得られれば、これら疾病の原因究明や診断薬、治療薬の開発につながるだけでなく、タンパク質の構造予測や、線維という構造特徴を生かした材料応用など、バイオからナノに至るまでの幅広い分野での応用開発の基礎となり、その学術的意義は大きい。しかしながら、現在のアミロイド研究では、単発的成果は多数得られるものの、遅々として統一かつ体系的な成果による大きな進展が見られないのが現状である。その最大の要因として、アミロイド研究において最も基本かつ重要な段階過程である、凝集体調製の難しさが挙げられる。これらペプチド・タンパク質が毒性を示す状態は、凝集過程の途上である分子がオリゴマーを形成している段階といわれ、まず分子をその状態に維持することが難しい。さらに、その過程の出発点である均一な一分子状態、モノマー状態を作成する方法が統一されておらず、各研究で様々となっている(Fezoui Y, et al. (2000) Amyloid 7, 166, Hoshino, M, et al. (2002) Nat. Struct. Biol. 9, 332, J. Sato, et al. (2007) Chem. Eur. J. 13, 7745, K. Usui, et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106, 18563 など)。このモノマー化条件が研究により異なることが致命的で、それに付随してモノマー化後の凝集条件も多種多様となってしまう、他人が同実験を行うと再現性がとれない事象が多く、結果としてアミロイド研究の停滞を生み出している。そこで、本研究ではアミロイドペプチド・タンパク質の凝集プロトコルを統一(規格化)でき、その上で一連の細胞アッセイをいつでも誰でも同条件で、網羅的体系的に行えるシステムの構築を目指すことにした。

2. 研究の目的

本研究では、従来の手法では難しかったこれらペプチド・タンパク質の凝集プロトコルを規格化することで、いつでも誰でも、同条件で、物理化学的アッセイや細胞アッセイなどが行えるシステムの構築を目指す。本研究で解決しようとする課題は以下のとおりである(図1)。

(1)モノマー化されたペプチドを基板上に簡便に配置する方法の確立

(2)測定時に、(1)で配置したペプチドをいつでも誰でも同条件で凝集できる方法の確立

(3)(1)で作成した基板上で細胞培養が可能で、測定時に細胞存在下で(2)が行えることの検証

(4)以上で構築できたシステムを用いたアミロイド凝集の挙動解析と有用性の証明

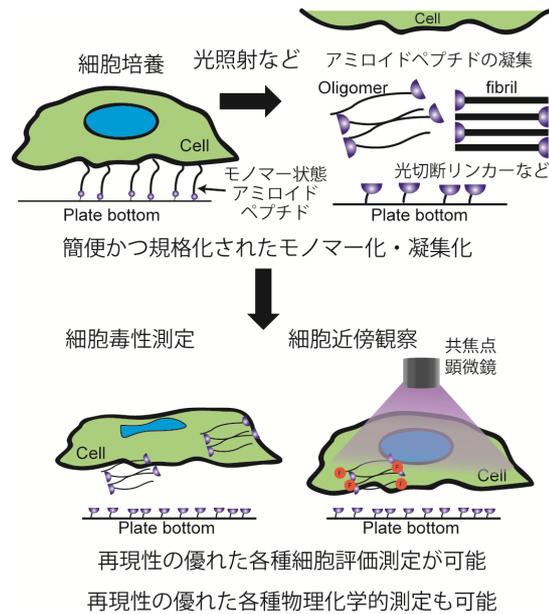


図1 本研究の概要

3. 研究の方法

(1)において、これまで、タンパク質や細胞などを検出・解析できるペプチドアレイの構築において使用してきた、96-well マイクロプレートを用いた構築を検討した。またポリスチレン樹脂ビーズを用いた本システムの構築も試みた。

次に、(2)の固相担体からの遊離方法を検討した。まずは照射による遊離方法を行い、最適な条件を見出した。さらにより簡便な方法として、塩基処理で遊離する方法を検討した。

(3)においては、照射による遊離方法にて、樹脂自体の毒性評価や、細胞と樹脂共存下での照射などを行った。

(4)においては、照射による遊離方法を用いて、DMSO法との比較を詳細に行った。

4. 研究成果

(1)モノマー化されたペプチドを基板上に簡便に配置する方法の確立

光切断リンカーにはこれまでと同様のものを用いて96-well マイクロプレート上に構築をまず行った。この際のペプチドの固定化方法は、方法論としてMethods in Molecular Biology 誌の招待論文としてまとめ、発表した(雑誌論文)。さらに、ポリスチレン樹脂を用いた構築も行った。本法はペプチド合成用のマイクロビーズをそのまま用いる方法であり、ペプチド合成の要領で、直接ペプチドを配置する手法である。その際、光切断

リンカー人工アミノ酸もペプチド合成と同様の手法で導入しておく。こうすれば高純度合成が必要ではあるものの、ペプチドの精製・固定化を省略でき、合成し脱保護をしたペプチドは全て必ずモノマー化されていることになる。その後、ビーズに光を照射することにより、ビーズからペプチドを遊離（脱樹脂）させ、線維化を起こさせる。ビーズの細胞への添加量や、ペプチドのビーズへの導入率は容易にコントロールできるために、プレート上で行う方法よりも数段、効果的かつ簡便な方法となることが判明し、以降、ポリスチレン樹脂ビーズを利用することにした。以上の成果は、特許出願（産業財産権、）などに大きく貢献している。

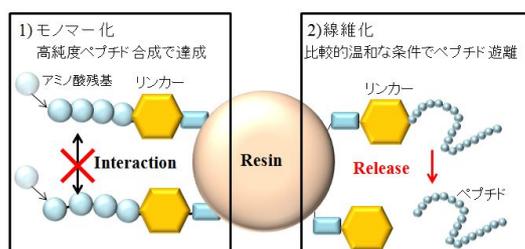


図2 ポリスチレン樹脂ビーズを用いる本手法の概要

(2) 測定時に、(1)で配置したペプチドをいつでも誰でも同条件で凝集できる方法の確立

樹脂を用いた構築法において、光照射による遊離方法を行い、最適な条件を見出した。この際の条件は、前述の *Methods in Molecular Biology* 誌の論文にも一部まとめている（雑誌論文）。

さらにより確実かつ簡便な方法として、塩基条件で遊離する方法を検討した。塩基による化学処理ならば、反応効率の向上や反応時間の短縮を図れるほか、アミロイドペプチドなどは、塩基性条件下ではモノマー状態を維持しやすいことなどが利点として挙げられ、実際非常に収率よく簡便にペプチドが遊離できる方法であることを見出した。以上の成果も特許出願（産業財産権、）に大きく貢献している。

(3) (1)で作成した基板上で細胞培養が可能で、測定時に細胞存在下で(2)が行えることの検証

細胞毒性を有するペプチドを固定化したプレートでの培養は通常培養と同じように細胞が生育することがこれまでの我々の見解で明らかになっているが、アミロイドペプチドを固定化したマイクロビーズを共存させた状態で、HeLa細胞を用いて、通常培養と同様の培養が可能であることも今回の研究で明らかとなった。この成果は、学会発表などで発表を行っている。

また、ビーズを共存させた状態で光照射を行い、リアルタイムの線維化毒性実験を試み

たが、今回の条件では照射した光の強度が強すぎて、細胞が死んでしまうことが判明した。今後は、照射する光の強度を下げて実験を行う必要があり、その条件でも効率的にペプチドが遊離できるようにマイクロビーズへのペプチドの導入率などをここでも検討する必要がある。また、塩基処理での遊離方法では細胞存在下で樹脂を共存させる方法は不可能であるため、別バッチでモノマー化、オリゴマー化、線維化して細胞に加える方法がシンプルでよいと考えた。さらにアミロイドの細胞毒性の最適な評価方法の確立も目指し検討を行っている。

4) 以上で構築できたシステムを用いたアミロイド凝集の挙動解析と有用性の証明

光切断リンカーとマイクロビーズを利用した方法において、遊離した直後のペプチドが完全にモノマー化されている状態であることを確認した。比較のために、DMSO法によるモノマー化を行ったが、完全にはモノマー化されていないことが分かった。さらに、DMSO法においてはDMSOを取り除くために測定前に簡易のゲルろ過も行わなければならないことから、簡便さにおいても本法は優れているといえる。次に遊離したペプチドのオリゴマー化、線維化を観察することにした。その結果、本法においては、モノマー化からオリゴマー化までには時間がかかりそこから一気に線維化がはじまる、理想的な線維化過程であるシグモイダルな経時変化の線維化反応が見られた。一方、DMSO法では、すでに、一部凝集が始まってしまっている結果が得られた。このことから、本法は、モノマー化が簡便に行え、かつ線維化測定の調製も容易であり、線維化過程も理想的な挙動を示すことがわかった。以上の成果は、学会発表（学会発表、）を行っており、現在論文にまとめている。

以上のように、本研究期間において研究の目的の大半において成果が得られたことから、十分に目標の達成ができたと考えられる。今後、本研究成果が広く関連研究で用いられるよう、さらなる最適化を行っていく。

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4件)

K. Usui*, K.-y. Tomizaki, H. Mihara, “A cell microarray format: A peptide release system using a photo-cleavable linker for cell toxicity and cell uptake analysis”, *Methods. Mol. Biol.*, 査読有, Vol. 1352, 2016, pp. 199-210, DOI: 10.1007/978-1-4939-3037-1_15

A. Syahir, K. Usui*, K.-y. Tomizaki, K. Kajikawa, H. Mihara, “Label and label-free detection techniques for protein microarrays”、

Microarrays、査読有、Vol. 4、No. 2、2015、pp.228-244、DOI: 10.3390/microarrays4020228
K. Usui*, "Development of designed peptides with secondary structure for use in nanobiotechnology", *Peptide Science 2015*、査読有、2016、pp.5-8

K. Usui*, T. Kikuchi, M. Mie, E. Kobatake, H. Mihara, "Cellular differentiation assessments by measuring the degree of cellular internalization and membrane adsorption using designed peptides", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*、査読有、Vol. 24、No. 17、2014、pp.4129-4131、DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.07.053

〔学会発表〕(計9件)

疋田晋也、南野祐槻、岡平理湖、臼井健二、「ペプチド固定化ビーズを用いた線維化ペプチドの新規モノマー化法及び線維化開始法の確立」、日本化学会第96回春季年会、京都府京田辺市、同志社大京田辺キャンパス、2016年3月26日

下岡正幸、岡田亜梨沙、柳原太志、臼井健二、「ペプチド-核酸複合ナノ構造体を形成する線維化ペプチドと二次構造形成 DNA の探索」、日本化学会第96回春季年会、京都府京田辺市、同志社大京田辺キャンパス、2016年3月26日

Masayuki Shimooka, Arisa Okada, Kenji Usui, "Novel Ribbon-Like Nano Structures by Combination of Amyloid-beta Peptides with Guanine-Rich DNAs", 第52回ペプチド討論会、神奈川県平塚市、平塚中央公民館、2015年11月16日-17日

Kenji Usui, "Development of Designed Peptides with a Secondary Structure for Use in Nanobiotechnology", 第52回ペプチド討論会、神奈川県平塚市、平塚中央公民館、2015年11月18日、ペプチド学会奨励賞受賞講演

下岡正幸、岡田亜梨沙、柳原太志、臼井健二、「アミロイド線維形成ペプチドと G-wire 形成 DNA の複合による新規リボン状ナノ構造体の構築」、第9回バイオ関連化学シンポジウム、熊本県熊本市、熊本大学工学部黒髪南地区キャンパス、2015年9月11日

疋田晋也、岡平理湖、臼井健二、「光切断リンカーを介した固定化によるアミロイドペプチドの新規モノマー化法及び線維化アッセイ法の構築」、日本化学会第95回春季年会(2015)、千葉県船橋市、日本大学船橋キャンパス、2015年3月26日

臼井健二、「プロテインフィンガープリント法における統計学的解析の基礎」、2014年ハイペップ研究所紅葉ワークショップ、ハイペップ研究所、京都府京都市、2014年12月29日 招待講演

岡平理湖、疋田晋也、臼井健二、「光切断リンカーを用いた検出システムの構築」、2014年ハイペップ研究所紅葉ワークショップ、ハイペップ研究所、京都府京都市、2014年12月29日

臼井健二、「光科学とペプチド工学によるナノバイオへの展開」、第13回光科学若手研究会、大阪府立大学 I-site なんば、大阪府大阪市、2014年11月29日 招待講演

〔図書〕(計1件)

臼井健二*、堤浩、三原久和、「生体分子解析・細胞解析に向けた設計ペプチドチップ」、シーエムシー出版、バイオチップの基礎と応用、2015、143-152.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：樹脂固定ペプチド

発明者：臼井健二・目片秀明・宮崎洋・山下邦彦

権利者：学校法人甲南学園・株式会社マンダム・株式会社ダイセル

種類：特許

番号：特願 2016-092094

出願年月日：平成28年4月28日

国内外の別：国内

名称：被験物質の皮膚感作性の検定方法

発明者：臼井健二・目片秀明・宮崎洋・山下邦彦

権利者：株式会社マンダム・株式会社ダイセル

種類：特許

番号：特願 2016-092094

出願年月日：平成28年4月28日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

受賞等

2015年ペプチド学会奨励賞を受賞した。
(2015年11月17日)

ホームページ等

<http://www.usui-lab.com/>

および

http://www.konan-first.jp/database/search.php?keyword=&author=2&from_year=0&to_year=0&searchEssay=Search&hideInfo=essay#resultList

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 健二 (USUI, Kenji)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号：70543792