

平成 22年 5月28日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19570155
 研究課題名 (和文) コンフォメーション病病原蛋白質の凝集を抑制する低分子化合物の作用機構
 研究課題名 (英文) The mechanism of the inhibition of protein aggregation that causes conformational diseases by low-molecular compounds
 研究代表者
 恩田 真紀 (ONDA MAKI)
 大阪府立大学・理学系研究科・助教
 研究者番号：60311916

研究成果の概要 (和文)：ニューロセルピンは脳で分泌される蛋白質で、凝集すると認知症を引き起こす。今回、ニューロセルピンの凝集を抑制する化合物を数種見出し、これを利用して、ヒト・ニューロセルピンのX線結晶構造解析に世界で初めて成功した。得られた結晶構造から、凝集抑制に有効な相互作用を明らかにした。見出した凝集抑制物質はニューロセルピンのフォールディング中間体の安定化にも有効で、治療薬デザインの標的分子となる中間体の単離精製にも成功した。

研究成果の概要 (英文)：Neuroserpin is a neuronal protein predominantly expressed in the brain, and its mutants readily form aggregates that cause dementia. Several compounds that prevent aggregation of neuroserpin were found, and crystals of human neuroserpin were successfully obtained using them. The crystal structure was determined at 2.1 Å, and interactions between the protein and the compound were analyzed. Furthermore, the compounds were effective in stabilizing a refolding intermediate of neuroserpin, which is promising for a target molecule in therapeutic drug design. Using the compounds, the intermediate was purified and characterized.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2008年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：応用構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：セルピン、コンフォメーション病、認知症、神経変性、フォールディング

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、プリオン病、パーキンソン病など、蛋白質が異常凝集して起こる疾患を総じてコンフォメーション病と呼び、これらは人類にとって大きな脅威となっている

る。セルピン病は、セルピン族 (Serine protease inhibitor superfamily) の蛋白質が凝集して起こるコンフォメーション病で、若年性認知症、肝硬変、肺気腫、汎発性血栓症などが良く知られている。セルピン病は病

原性変異体保有者のみが発病する遺伝病であるが、罹患者数が多く（推定患者数 340 万人、キャリアー 1 億 1600 万人）、治療薬の開発が急がれる疾患群の 1 つである。

2. 研究の目的

若年性認知症を引き起こすニューロセルピンをモデル蛋白質とし、その凝集を抑制する物質の作用機構を解明することで、コンフォメーション病の根源である蛋白質の異常凝集を防ぐ戦略の提案を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 蛋白質凝集抑制物質の探索

野生型のセルピン蛋白質は通常、生理条件下では凝集体を形成しないが、ニューロセルピンは他のセルピンとは異なり、野生型でも生理条件下で容易に凝集体を形成する。そこで、まず野生型ニューロセルピンを様々な低分子化合物存在下でインキュベーションし、凝集抑制効果を調べて、有望な凝集抑制物質のスクリーニングを行った。そしてある程度候補を絞り込んだ後、病原性変異体に対する凝集抑制効果を調べた。凝集抑制効果の有無は、動的光散乱法、チオフラビン T 蛍光測定、Native-PAGE 等により調べた。

(2) X線結晶構造解析によるニューロセルピンと凝集抑制物質との相互作用の分析

上記(1)で見出した有望な凝集抑制物質を添加する事により、これまで困難とされてきたニューロセルピンの結晶化を行い、X線構造解析を実施した。得られた結晶構造から、ニューロセルピンと凝集抑制物質との相互作用の分析を行った。

(3) フォールディング解析による凝集抑制物質の作用の分析

セルピンは凝集しやすい変異体ほどフォールディング効率が悪く、フォールディング中間体がセルピン凝集体の前駆物質であるという説もある (Yamasaki *et al.*, *Nature* 2008)。そこで、上記(1)で見出した有望な凝集抑制物質存在下、野生型ニューロセルピンおよび病原性変異体のアンフォールディング/リフォールディング実験を実施し、凝集抑制物質がフォールディングに及ぼす影響を調べた。フォールディング解析は、ペプチドマッピング法、蛍光プローブ、円偏光二色性などにより行った。

(4) 治療薬デザインのターゲット分子となるリフォールディング中間体の単離精製
上記(3)の結果から、病原性ニューロセルピン変異体がリフォールディング中間体の状態で安定に存在できる条件を見出し、アフィニティクロマトグラフィを利用して、リフォールディング中間体の単離精製を行った。

(5) 他のセルピン蛋白質やコンフォメーション病病原蛋白質に対する凝集抑止効果
以下の蛋白質に対して、上記(1)で見出した凝集抑制物質の効果を調べた。

- ①最も罹患者数が多いセルピン病の病原蛋白質である α_1 -アンチトリプシン
- ②セルピン特有の凝集反応（ポリマー化）が起こらないセルピン蛋白質であるオボアルブミン
- ③家族性アミロイドーシスの病原蛋白質であるリゾチーム

4. 研究成果

(1) 蛋白質凝集抑制物質の探索

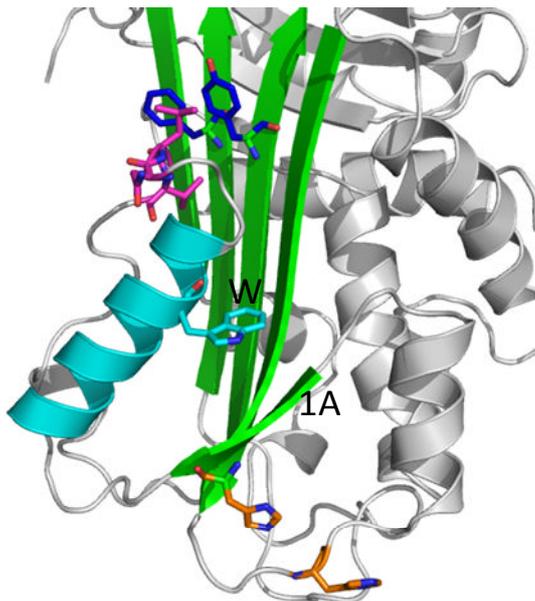
水溶性で分子量 500 未満の市販試薬の中から探索を行った結果、多価アルコール（グリセロールやトレハロース）およびその誘導体、ジアミノエタン、アルギニンアミド類が有効であることが明らかとなった。

(2) X線結晶構造解析によるニューロセルピンと凝集抑制物質との相互作用の分析

上記(1)で見出した凝集抑制物質存在下で野生型ニューロセルピンの結晶化を行ったところ、良好な結晶がいくつか得られ、2.1 Å 分解能での解析に成功した (Protein Data Bank Code: 3FGQ)。ヒト・ニューロセルピンの結晶構造はこれまで報告が無く、本成果が世界で初めての成功例である。得られた結晶構造から、ニューロセルピンの凝集を抑制するには、以下のいずれかの作用を有する化合物が有効である事が明らかとなった。

- ①ヘリックス F (図 1 水色) 直後のループにある 3 残基 (図 1 桃色: アスパラギン、ロイシン、バリン) とストランド A (図 1 緑色) の上部、特に青色で示したフェニルアラニンとチロシンの相互作用を安定化させる。
- ②ヘリックス F (図 1 水色) にあるトルプトファン残基 (W) とストランド 1 A 間の相互作用を補強する。
- ③分子の下極の 2 つのヒスチジン残基 (図 1 橙色) の動きを固定する。
- ④ストランド A (図 1 緑色) 中央にある水素

結合ネットワークを安定させる。



【図1】ニューロセルピンの立体構造：
凝集抑制に関与する領域

(3) フォールディング解析による凝集抑制物質の作用の分析

ニューロセルピンを6 M グアニジン塩酸条件下でアンフォールディングさせ、上記(1)で見出した凝集抑制物質を含む緩衝液で希釈することでリフォールディングさせた。その結果、多価アルコールに関してはリフォールディング中間体の凝集を抑制する効果があったが、リフォールディング速度を遅くする効果も見られ、添加によりリフォールディング効率は低下した。一方、アルギニンアミドとジアミノエタンに関しては、リフォールディング速度および効率にはほとんど影響を及ぼさなかった。

次に、凝集抑制物質のアンフォールディング速度に対する影響を調べたところ、いずれもアンフォールディング速度を遅くする効果がみられ、アルギニンアミド類>ジアミノエタン>多価アルコールの順に効果が大きかった。

(4) 治療薬デザインのターゲット分子となる

リフォールディング中間体の単離精製病原性ニューロセルピン変異体は、添加剤無しの条件下でも野生型よりリフォールディング速度10~200倍程度遅いが、多価アルコールを添加すると、更にもその速度は2~5倍遅くなった。また、多価アルコールの添加により、中間体の凝集が抑制され、数時間リフォールディング中間体が安定に存在するこ

とが分かった。そこで、様々な条件を検討した結果、病原性変異体H338Rを0.5℃の条件下、5%トレハロースを含む緩衝液でリフォールディングさせる事で、安定な中間体を得、これをアフィニティクロマトグラフィーで単離精製することに成功した。そして、この中間体を生理条件下でインキュベーションすると、セルピン特有の直線的に伸長するポリマー状の凝集体を形成する事を明らかにした。この結果は、フォールディング中間体がセルピン凝集体の前駆物質であるという説(Yamasaki *et al.*, *Nature* 2008)を裏づけるものであり、セルピン病治療薬をデザインする際のターゲット分子となるリフォールディング中間体の単離精製の初の成功例である。

(5) 他のセルピン蛋白質やコンフォメーション病原蛋白質に対する凝集抑止効果

① α_1 -アンチトリプシン

凝集すると肝硬変や肺気腫を引き起こす α_1 -アンチトリプシンZ変異体(Glu342Lys変異体)について、ニューロセルピンと同様の試験を行った。その結果、ニューロセルピンと同様の凝集抑制効果が見られた。このことから、今回明らかとなった凝集抑制に有効な手段(研究成果(2)参照)は、 α_1 -アンチトリプシンにも応用できることが示唆された。

② オボアルブミン

オボアルブミンは生理条件下では凝集反応が起こらないので、加熱(55℃)または変性剤存在下(2 M 尿素)で凝集反応を引き起こし、これに対する凝集抑制物質の効果を調べた。その結果、アルギニンアミド類>ジアミノエタン>多価アルコールの順に抑制効果が見られた。このことから、今回見出した凝集抑制物質は、セルピン特有の凝集反応(ポリマー化)だけではなく、蛋白質が部分的にアンフォールディングした結果起こる無秩序な凝集も抑制することが分かった。

③ リゾチーム

家族性アミロイドーシスを引き起こす変異体Ile56Thrを、凝集体を形成しやすい条件下(加熱または低pH)でインキュベーションし、凝集抑制物質の効果を調べた。その結果、加熱条件下での凝集抑制はオボアルブミンと似た傾向の結果を得た。これに対し、低pH条件下での凝集抑制は、アルギニンアミド類とジアミノエタンについては効果が見られたが、多価アルコールについては明確な効果が見られなかった。

(6) 研究成果の総括

- ① 効果的なニューロセルピンの凝集抑制物質を数種類見出した。
- ② 凝集抑制物質を利用し、ヒト・ニューロセルピンのX線結晶構造解析に世界で初めて成功した。
- ③ 得られたニューロセルピンの結晶構造から、凝集抑制に有効な相互作用を明らかにした。
- ④ 凝集抑制物質を利用し、ニューロセルピンのリフォールディング中間体の単離精製に世界で初めて成功した。この中間体は、セルピン病治療薬をデザインする際のターゲット分子となるものである。
- ⑤ 本研究で見出した凝集抑制に有効な手段は、最も罹患者数が多いセルピン病の病原蛋白質である α_1 -アンチトリプシンに対しても有効であることが明らかとなった。

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5件)

- ① 恩田真紀, 中谷和代, 竹原清日, 西山美香, 三上文三, D. A. Lomas
「The 2.1Å crystal structure of native neuroserpin reveals unique structural elements that contribute to conformational instability.」 査読あり
Journal of Molecular Biology, **388** 巻, pp11-20 (2009)
- ② Didier Belorgey, Peter Hägglöf, 恩田真紀, David A. Lomas
「pH dependent stability of neuroserpin is mediated by Histidines 119 and 138; implications for the control of beta-sheet A and polymerisation.」 査読あり
Protein Science, **19** 巻, pp220-228 (2009)
- ③ 恩田真紀, 中谷和代, 竹原清日, 西山美香, 高橋延行, 廣瀬正明
「Cleaved serpin refolds into the relaxed state via a stressed conformer.」 査読あり
The Journal of Biological Chemistry, **283** 巻, pp17568-17578 (2008)

[学会発表] (計16件)

- ① 張娟, 竹原清日, 多田俊治, 恩田真紀
「ニューロセルピンのヘリックスF末端はポリマー化を制御する」 第82回日本生化学会大会, 神戸国際会議場, 2009年10月22日
- ② 恩田真紀, 竹原清日, 高橋延行, 廣瀬正明
「P1-P1' cleaved serpin peptide refolds to the relaxed structure after undergoing a stressed conformation」
The 5th International Symposium on Serpin Biology, Structure and Function, ルーベン大学(ベルギー), 2008年7月15日
- ③ 恩田真紀
「セルピファミリー蛋白質のポリマー化とコンフォメーション病」
大阪大学蛋白質研究所セミナー 蛋白質の会合と凝集—機能、病気、利用—(招待講演)
大阪大学, 2007年6月22日

[その他]

本研究課題に関連する総説
恩田真紀「解明されたミステリー：セルピン病の発症機構」
http://www.pssj.jp/archives/Art_Lec/Serpin_01/Serpin_01_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恩田 真紀 (ONDA MAKI)
大阪府立大学・理学系研究科・助教
研究者番号：60311916

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：