

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710183
 研究課題名 (和文) アミロイドβペプチド (Aβ) 埋込蛍光タンパク質の構築と Aβ 集合体の FRET 検出
 研究課題名 (英文) Construction of fluorescent proteins having amyloid b-peptide (Ab) sequence and FRET detection of Ab aggregates

研究代表者 高橋 剛 (TAKAHASHI TSUYOSHI)
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
 研究者番号：90345380

研究成果の概要：

アミロイドβペプチド (Aβ) の集合化・オリゴマー生成は、アルツハイマー病の発症と密接に関連している。本研究では、バレル構造を有する緑色蛍光タンパク質 (GFP) 中のβシート上にAβ配列を挿入したGFP変異体 (Aβ埋込GFP) を基に蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 型センサータンパク質を構築した。この構築したセンサータンパク質を用いることで、試験管内においてAβの集合体形成過程をFRETにより検出できることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：生物分子科学

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：アミロイドβペプチド, 緑色蛍光タンパク質, 蛍光共鳴エネルギー移動, βシート, タンパク質工学, オリゴマー, アルツハイマー病, アミロイド線維

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のミスフォールディングは様々な疾患の発症に関与している。アルツハイマー病はアミロイドβペプチド(Aβ)のミスフォールディングがその発症に強く関連していると考えられている。特に42残基からなるAβ1-42は凝集性が高く、試験管内において容易に不溶性のアミロイド線維を形成する。このAβが10～数10分子程度に会合した可溶性

オリゴマーが最も高い細胞毒性を示すことが分かってきており、現在アルツハイマー病を引き起こす原因物質として最も有力視されている。しかしながら生体内におけるAβの毒性発現のメカニズムは、Aβの可溶性オリゴマーの生成を含めて未だ完全には理解されていない。

一方申請者はこれまでに、A・に結合する人工分子として、 β -バレル構造から構成される緑色蛍光タンパク質 (GFP) の表面にA・の一部を提示した人工タンパク質 (A・埋込GFP) を構築してきている。A・の集合化・凝集体形成は、自己の配列認識に基づいており、かつ β -シート構造の形成が鍵となっている。申請者が構築したA・埋込GFPは、その表面にA・様アミロイド構造を模倣した部位をもつため、この部分を認識場としてA・と相互作用すると考えている。さらにこのタンパク質はGFP様の蛍光特性も保持している。このような背景から、このA・埋込GFPを土台として、A・の集合化・凝集体形成を検出できる分子を構築できると考えた。

2. 研究の目的

アルツハイマー病の発症に強く関係しているA・の集合化・凝集体形成を検出できる系の構築を目的として、申請者がこれまでに構築したタンパク質表面にA・様アミロイド構造をもつA・埋込GFPを改変し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 型センサータンパク質を構築した。緑色の蛍光を発するGFPの発色団およびその近傍のアミノ酸置換を施し、シアン色および黄色蛍光を発するA・埋込蛍光タンパク質を構築し、それらをリンカー配列で連結することで、FRET型センサーが構築できると考えた。構築したセンサータンパク質を用いて、試験管内でA・の集合体形成に対する検出能力を解析した。

3. 研究の方法

(1) 4本の擬A・ β -シートを提示したA・埋込GFPの構築

申請者はこれまでに、安定な β -バレル構造をもつGFPの表面上にA・由来のアミノ酸配列を2本挿入したA・埋込GFPを複数構築し、それとA・との相互作用について評価してきた。その結果、GFP中の平行 β -シートを形成しているストランドI, VIにA・由来のアミノ酸配列を挿入したA・埋込GFP P13HはA・に対して解離定数260 nMで結合することが

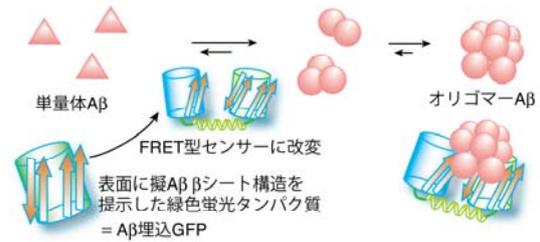


図1 本研究の方法。 β -バレル構造をもつGFPの表面に擬A β β -シートを提示したA β 埋込GFPはA β と相互作用する。これに基づき蛍光特性をシアン色および黄色に変化したA β 埋込蛍光タンパク質を連結したFRET型センサータンパク質を用いることで、A β 集合体と結合してFRET効率が変化することを期待した。

分かった。また逆平行 β -シートを形成しているストランドIX, IVにA・由来のアミノ酸配列を挿入したAP93QはA・に解離定数420 nMで結合した。そこで、この2つのA・埋込タンパク質を組み合わせ、GFPバレル表面に4本の擬A・ β -シートを提示した新規A・埋込GFP SFAB4タンパク質を構築した(図1)。この構築したSFAB4は、表面プラズモン共鳴法による実験から、A・に対して強く結合し、その解離定数が100 nMと見積もられた。この結果は、P13HとAP93Q変異体を組み合わせることで、A・に対する結合能が向上したことを示している。また構築したSFAB4タンパク質は、集合化していない単量体のA・よりもある程度集合化したオリゴマーA・により強く結合することも明らかとなった。

(2) A・埋込GFP P13HおよびSFAB4の発色団の改変

P13Hおよび上記で作成したSFAB4タンパク質中の発色団およびその近傍のアミノ酸置換を施し、シアン色蛍光を発するA・埋込CFP P13Hおよび黄色蛍光を発するA・埋込YFP SFAB4を構築した。構築したタンパク質はそれぞれ大腸菌を用いて発現を行い、純度よく精製できることを確認した。

次に、N末端側にCFP P13Hを配置し、20残基程度の α -ヘリックスをとるよう設計したリンカー配列を介してYFP SFAB4をC末端側に配置したFRET型センサータンパク質CYAB6を設計した(図1)。CYAB6中のP13H部位とSFAB4部位がそれぞれA・と相互作用できるため、ある程度集合化したオリゴマーA・が系内に存在すると、それにCYAB6が結合し、

2つのドメイン間の距離が変化する。FRET 効率は蛍光共鳴エネルギードナーとアクセプター間距離に鋭敏に反応するため、オリゴマーA・の大きさまで検出すると期待した。構築したCYAB6は大腸菌を用いて発現し、C末端に配置したHisタグ配列を使って、Ni-NTAカラムによるアフィニティー精製を行った。獲得したタンパク質の純度や会合状態についてSDS-PAGEやゲル濾過クロマトグラフィー法により確認したところ、CYAB6が純度良く単量体として獲得できたことが分かった。(3) CYAB6を用いたA・の集合化・凝集体形成の検出

構築したCFAB6タンパク質の蛍光特性を評価した。比較として構築したAβ配列を挿入していない蛍光タンパク質に対して若干蛍光強度が低いものの、CYAB6中のCFP部位からYFP部位への効率的なFRETが観測された。次に、CFAB6存在下にてAβをインキュベートし、A・の集合化に伴うFRET効率の変化について評価した。実験は凝集化能の高いA・1-42を用い、数10μMの濃度に調製し、その溶液中にCYAB6を50nMの低濃度で混在させてインキュベートし、一定時間ごとにCYAB6の蛍光スペクトル測定を行った。その結果、A・の集合化に伴いFRET効率がわずかながら上昇し、さらにインキュベートするこ

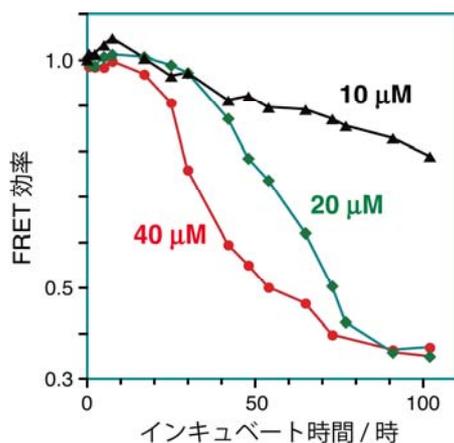


図2 CYAB6 共存下で Aβ をインキュベートした際の CYAB6 の FRET 効率の変化。インキュベート開始時を 1 とした相対値で示す。[Aβ1-42] = 10, 20, 40 μM, [CYAB6] = 50 nM

とで、FRET 効率が劇的に減少することが分か

った(図2)。透過型電子顕微鏡観察やアミロイド線維を特異的に染色する蛍光色素を用いたアッセイ等と合わせた議論から、このFRETの変化は、Aβのオリゴマー形成(FRET効率の上昇)とAβのアミロイド線維形成(FRET効率の減少)に対応している可能性が示唆された。

4. 研究成果

本研究では、アルツハイマー病発症に強く関連しているA・の集合化・凝集体形成に着目し、A・と相互作用する人工タンパク質として構築したA・埋込GFPを基にA・の集合化を検出できるFRET型センサータンパク質を構築した。構築したタンパク質CYAB6を用いた蛍光測定から、A・が単量体から可溶性オリゴマーを経て不溶性のアミロイド線維へと集合化する過程において、CYAB6のFRET効率が変化することが明らかとなった。今後はこのFRET変化の詳細を明らかにし、より鋭敏にAβの集合体の大きさに依存してFRETシグナルが変化するセンサータンパク質の構築に繋げるとともに、試験管内だけでなく生物内でも使えるようなセンサータンパク質構築につなげる。

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 4件)

① M. T. Jumawid, T. Takahashi, T. Yamazaki, H. Ashigai, H. Mihara
Selection and structural analysis of de novo proteins from an a3b3 genetic library
Protein Science, **18**, 384-398 (2009) 査読有

② T. Takahashi, H. Mihara
Peptide and protein mimetics inhibiting the amyloid b-peptide aggregation
Accounts of Chemical Research, **41**, 1309-1318 (2008) 査読有

③ J. Sato, T. Takahashi, H. Oshima, S. Matsumura, H. Mihara

Design of peptides that form amyloid-like fibrils capturing amyloid b1-42 peptides
Chem. Eur. J., **13**, 7745-7752 (2007) 査読有

④ T. Takahashi, K. Ohta, H. Mihara
Embedding the amyloid b-peptide (Ab) sequence in green fluorescent protein (GFP) inhibits Ab oligomerization
ChemBioChem, **8**, 985-988 (2007) 査読有

[学会発表] (計 3件)

① 高橋 剛, 太田健一, 三原久和
アミロイドbペプチド (Ab) 配列を挿入した蛍光タンパク質によるAb集合化阻害と検出
第3回バイオ関連化学合同シンポジウム,
2008年9月18日-20日, 横浜

② 高橋 剛, 鈴木美穂, 村越祐子, 太田健一, 三重正和, 小島英理, 三原久和
設計ペプチド・タンパク質を用いたアルツハイマー病アミロイドbペプチド (Ab) の凝集制御と細胞毒性
第18回バイオ・高分子シンポジウム, 2008年7月25日-26日, 東京

③ 高橋 剛, 太田健一, 三原久和
アミロイドbペプチド (Ab) 配列を挿入した新規タンパク質の設計とAb集合化阻害
第17回バイオ・高分子シンポジウム, 2007年7月30日-31日, 東京

[図書] (計 1件)

① 高橋 剛, 三原久和 (分担執筆)
酵素・タンパク質をはかる・とらえる・利用する」(岡畑恵雄、三原久和編)第5章 アミロイドタンパク質をはかる
工学図書株式会社, pp. 54-64, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 剛 (TAKAHASHI TSUYOSHI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号: 90345380

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし