

機関番号：12605  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20360369  
 研究課題名（和文） ピロロキノリンキノンによるアミロイド蛋白質の選択的構造形成制御  
 研究課題名（英文） Structural regulation of amyloid forming proteins with  
 pyrroloquinoline quinone

研究代表者  
 早出 広司 (Sode Koji)  
 東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
 研究者番号：10187883

研究成果の概要（和文）： パーキンソン病の原因蛋白質である $\alpha$ シヌクレインをはじめとするアミロイドを形成する蛋白質、アミロイド蛋白質のアミロイド線維形成を選択的に抑制する低分子化合物として、ピロロキノリンキノン（PQQ）で修飾されたそれらの蛋白質の特定の配列を含む部分ペプチドを見出した。例えばPQQで修飾された $\alpha$ シヌクレインのN末近辺の配列は $\alpha$ シヌクレインの線維化を阻害するが $\beta$ アミロイドやプリオンの線維形成は阻害せず、その選択性が示された。

研究成果の概要（英文）： The development of small molecules inhibiting amyloid formation of various proteins, such as alpha synuclein, the causative protein of Parkinson's disease, were investigated. The partial peptides modified with pyrroloquinoline quinone (PQQ) were found to specifically inhibit the amyloid formation of parental protein, but not other amyloid forming proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野： 工学

科研費の分科・細目： プロセス工学 ・ 生物機能・バイオプロセス

キーワード： 生物機能工学、アミロイド、 $\alpha$ シヌクレイン、 $A\beta$ 、プリオン、構造制御

#### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の異常なフォールディングにより様々な疾患が引きこされることが報告されてきた。アルツハイマー病、プリオン病あるいはパーキンソン病といった神経変性疾患においてはそれぞれの原因蛋白質のフォールディング異常によって形成される線維核ならびにアミロイド様線維が細胞毒性を示

す結果であると考えられている。したがって、これらの疾患の進行を阻止するためにこのようなアミロイド形成能力を有する蛋白質の線維核ならびにアミロイド線維形成を抑制する戦略開発が求められてきた。例えば、 $\alpha$ シヌクレインのフォールディング異常はパーキンソン病をはじめとする各種神経変性

疾患の原因となる。アメリカの Fink らが 2004 年にフラボノイド化合物が  $\alpha$  シヌクレインの凝集線維化を抑制することを報告したことがきっかけとなり、各国にて、アミロイド線維形成を抑制する化合物の検索が進められてきた。しかし、これまでの特定の化合物・ストラテジーが特定のアミロイド蛋白質の凝集線維化を選択的に抑制できたという報告はない。また、これらの化合物はアミノ酸側鎖、とくに Lys 残基などのアミノ基との反応性が高いことから、非選択的に蛋白質と結合することによる生体内での影響も課題となっている。すなわち、特定のアミロイド蛋白質を標的として選択的にそれらの高次構形成を制御し、凝集線維化を抑制する化合物の開発戦略が提案されることが今後の薬剤開発におけるブレークスルーであると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究で神経変性疾患の原因物質である 3 種の蛋白質、パーキンソン病の原因蛋白質である  $\alpha$  シヌクレイン、アルツハイマー病原因蛋白質である  $\beta$  アミロイドおよびプリオン病の原因蛋白質であるプリオンに対し、凝集線維化を選択的に抑制する PQQ 修飾ペプチドを開発することを目的としている。本研究のコンセプトは酸化還元酵素の補酵素であるピロロキノリンキノン (Pyrroquinoline quinone;PQQ) が  $\alpha$  シヌクレインの凝集線維化を阻害するという申請者らが発見した事実にもとづいており、抗凝集線維化薬剤開発、ひいては抗神経変性疾患薬剤開発への貢献を目指している。

## 3. 研究の方法

本研究ではこれまでの申請者の研究実績にもとづき、また情報が豊富である  $\alpha$  シヌクレイン対象とした研究を機軸として PQQ と結合した  $\alpha$  シヌクレイン部分ペプチドによる全長  $\alpha$  シヌクレインの凝集線維化抑制の評価を

通して本研究ストラテジーの骨格を形成する。さらに、本研究の特徴である選択的に凝集線維化を抑制することを PQQ 修飾  $\alpha$  シヌクレイン部分ペプチドを用いて  $\beta$  アミロイドおよびプリオン (マウス) を対象として評価する。その上で  $\beta$  アミロイドに対して選択的に凝集線維化を抑制する PQQ 修飾  $\beta$  アミロイド部分ペプチドおよびプリオン(マウス)に対して選択的に凝集線維化を抑制する PQQ 修飾プリオン部分ペプチドを開発し、設計した PQQ 修飾ペプチドを用いるアミロイド形成蛋白質に選択的な凝集線維化の抑制について総合的に評価する。

## 4. 研究成果

### (1) PQQ による $\alpha$ シヌクレイン線維化阻害と結合部位

当研究室では、アミロイド線維形成阻害物質として、PQQ を報告している。PQQ を  $\alpha$  シヌクレインに添加することでその線維形成を抑制し、PQQ 修飾した全長  $\alpha$  シヌクレインが、未修飾  $\alpha$  シヌクレインの線維形成を抑制することを示している。

そこでまず、 $\alpha$  シヌクレインの全長配列の中から、阻害能を有する PQQ 修飾部分ペプチド領域を見出すために、PQQ 修飾した全長  $\alpha$  シヌクレインをプロテアーゼ消化により断片化し、その中から阻害効果を有する PQQ 修飾ペプチド断片を探索することを目的とした。PQQ とともに一定時間インキュベーションした全長  $\alpha$  シヌクレイン試料および未修飾の全長  $\alpha$  シヌクレインをそれぞれプロテアーゼ (GluC) により限定加水分解し、得られた試料を逆相クロマトグラフィーにより分画した。得られた画分をそれぞれ全長  $\alpha$  シヌクレインとともにインキュベートすることで、阻害活性を示す PQQ で修飾された  $\alpha$  シヌクレインプロテアーゼ限定消化産物の同定を試みた。その結果、コントロール

である未修飾 $\alpha$ シヌクレイン限定加水分解画分と明らかに異なる高い線維形成阻害を示す3つの画分が見出された。得られた画分に相当する未修飾画分を質量分析機によって解析、その配列を求めた。これらの配列には複数のLys残基が含まれており、Lys残基がPQQとのシッフ塩基を形成することで修飾されていることが示唆された（これらの配列については現在論文を準備中であり、本報告書においては公開を控える）。

#### (2) PQQ修飾 $\alpha$ シヌクレインの限定加水分解産物による全長 $\alpha$ シヌクレイン線維化阻害

全長 $\alpha$ シヌクレインにおいてPQQによって修飾され、線維凝集能力を阻害している箇所が(1)において明らかにされたことを受けて、同配列に相当する合成ペプチドをPQQで修飾することで、全長 $\alpha$ シヌクレインの線維化阻害活性を検討した。本研究では前項で同定した3つの配列に相当する10残基程度のペプチドを合成し、これをPQQで修飾することでその活性を検討した。その結果、いずれのPQQ修飾ペプチドにおいても全長 $\alpha$ シヌクレインの線維化阻害が観察されたが、その中でも際立って高い活性を示す配列が $\alpha$ シヌクレインN末端近傍の領域に相当する配列において観察された。本PQQ修飾ペプチドが $\alpha$ シヌクレインに対して高い阻害活性を示し、かつ、選択的であることが期待された。

#### (3) PQQ結合 $\alpha$ シヌクレイン部分ペプチドによる全長 $\alpha$ シヌクレインの線維化阻害

(1)、(2)の検討とは別に、これまでの $\alpha$ シヌクレインに関する、研究者および他の研究者の知見から $\alpha$ シヌクレインの線維化に影響を及ぼしていると考えられているペプチド配列が報告されている。本研究ではその中でもNon-Amyloid  $\beta$  Component of

Alzheimer's disease amyloid 領域(NAC 領域)を対象とした。NAC 領域は $\alpha$ シヌクレインの中央部の非極性残基に富む領域であり、線維を形成する際に相互作用を司っていると予測されている。この領域を含む66~82番目までの残基を含むペプチドとして、野生型(WT)、我々が線維化能力を低下することを見出した2種の $\alpha$ シヌクレインから2変異を含むDM型、さらに繰り返し配列に変異が導入されたRep型の3種の合成ペプチドをPQQで修飾することにより、これらの全長 $\alpha$ シヌクレインの線維阻害能力を検討した。その結果、いずれの未修飾ペプチドでも全長 $\alpha$ シヌクレインの線維化阻害活性は観察されなかったのに対して、DM型およびRep型において顕著な阻害能力が観察された。このように線維化の中核を担う配列においてもそこに変異が導入されていることでPQQを修飾することで、線維化を抑制するペプチドとなることが明らかとなった。

#### (4) PQQ結合 $\alpha$ シヌクレイン部分ペプチドのアミロイド阻害能力の選択性

以上のように得られたPQQ結合 $\alpha$ シヌクレイン部分配列の $\alpha$ シヌクレイン線維化阻害能力についてその選択性を検討した。

まず、全長 $\alpha$ シヌクレインとともにBSAが試料に混在しているときのPQQによる阻害能力について検討した。PQQ単独では $\alpha$ シヌクレインと等モル程度でも十分な線維形成阻害能が観察されたが、BSAが存在することでPQQによる阻害が大幅に減少した。これはPQQ自身が $\alpha$ シヌクレインに対して阻害を示す機構を考察する上で大変重要な知見である。PQQは $\alpha$ シヌクレインとシッフ塩基を形成し、その修飾された場所が全長 $\alpha$ シヌクレインが相互作用を示す領域との相互作用に影響を与え、線維形成を阻害していると予測される。しかし、PQQのシッフ塩基形

成能は非選択的であり、 $\alpha$ シヌクレイン以外の蛋白質の Lys 残基が存在すれば、同様に結合するものと予想される。BSA の表面には Lys 残基が豊富であることから、試料液中に存在する PQQ が過剰に存在する BSA の Lys 残基とシッフ塩基を形成し結合したことで、 $\alpha$ シヌクレインに対する線維抑制活性が低下したものと考察される。これに対して、DM 型および Rep 型の PQQ 修飾  $\alpha$ シヌクレイン部分配列は BSA 存在下においてもその活性の抑制は少なく、顕著に線維化の抑制活性を示した。これは PQQ は既にこれらの部分配列ペプチドと結合しており、BSA によって競合することはないためと考えられる。この結果は、PQQ 等のアミロイド形成蛋白質の線維形成抑制効果を有する低分子化合物の非選択的な蛋白質に対する結合能力を、標的蛋白質と特異的に相互作用するペプチド配列に予め結合させておくことにより、その対象への抑制効果を選択的にすることを示した最初の例である。この知見は今後のアミロイド形成阻害剤開発において、選択的な阻害剤デザインの基盤となる指針を与える。

次に PQQ で修飾された  $\alpha$ シヌクレインおよび部分ペプチドの他のアミロイド形成蛋白質に対する選択性について検討した。まず、PQQ で修飾された全長  $\alpha$ シヌクレインの A $\beta$  の線維形成に与える影響を検討した。本研究の一貫として、PQQ が A $\beta$  の線維化を抑制することも見出している。本検討の結果、PQQ 修飾全長  $\alpha$ シヌクレインの濃度依存的に A $\beta$  の線維化を抑制していることが見出された。すなわち、PQQ 修飾全長  $\alpha$ シヌクレインの線維抑制効果は  $\alpha$ シヌクレイン選択的ではなく A $\beta$  に対しても効果があった。

この知見を踏まえ、PQQ 修飾  $\alpha$ シヌクレイン部分ペプチドの A $\beta$  線維化形成に与える影響を検討した。まず NAC 配列を含む DM 型

および Rep 型の PQQ 修飾ペプチドの効果を検討したところ、Rep 型は抑制するものの、DM 型は抑制効果がなかった。このことから、配列特異的に PQQ 修飾  $\alpha$ シヌクレイン部分ペプチドは A $\beta$  の線維化を阻害できることがわかった。

次に、PQQ 修飾全長  $\alpha$ シヌクレインのプロテアーゼ限定分解によって見出された、 $\alpha$ シヌクレインの線維化を阻害する PQQ 修飾部分配列についても A $\beta$  ならびにプリオンの線維化阻害を検討した。その結果、PQQ 修飾  $\alpha$ シヌクレイン部分ペプチドは全長  $\alpha$ シヌクレインの線維化を阻害するものの、A $\beta$  およびマウスプリオンの線維化 (in vitro conversion 系) のいずれも阻害しないことが観察された。すなわち、我々が見出した  $\alpha$ シヌクレインと PQQ のインキュベーションによって PQQ が結合する部位を含む合成ペプチドは、全長  $\alpha$ シヌクレインの線維化を選択的に阻害できることを示した。この結果は先の BSA による抑制効果の低減を回避する手段も含め、PQQ によって修飾された  $\alpha$ シヌクレインを選択的に認識する配列を用いることで、生体内で選択的に  $\alpha$ シヌクレインの線維化を阻害できることが示された。この結果は我々が提唱した研究戦略の正当性を示す最も重要な結果である。

#### (5) PQQ 結合プリオン部分ペプチドによる全長プリオン線維化阻害

本研究ではこれまでに当研究室にて検討を進めてきた大腸菌を用いて組み換え生産しているマウスプリオンを用いてきた。マウスプリオンは大腸菌において発現させることで不溶性の顆粒封入体として生産されるが、これをリフォールディングすることで、水溶性の正常型プリオンとして調製できる。これを特定の変性剤存在下でインキュベートすることでプリオンのアミロイド線維を

形成させる「in vitro conversion」系が報告されている。本研究でのマウスプリオンの線維形成はこの in vitro conversion 系での結果を示す。本研究において PQQ と予めインキュベートしたマウスプリオンは in vitro conversion 系において線維形成しないことが見出され、プリオンの線維形成能力も PQQ によって阻害できることが示された。そこで、プリオンの部分配列を PQQ で修飾することでその線維形成能力阻害活性を検討した。これまでの知見から線維形成に影響を与えると推察される 3 種のプリオン部分ペプチドを合成し、これらを PQQ で修飾することで全長プリオンへの阻害能力を in vitro conversion 系で検討した。しかし、いずれの PQQ 修飾プリオン部分ペプチドも線維形成阻害活性は観察されなかった。これはおそらく、線維形成を行う場の問題であると考えられた。すなわち本研究でのプリオンの線維形成は in vitro conversion 系でおこなっていることから、プリオン自身が高次構造を形成しておらず、また部分ペプチドが相互作用を行う場としても本来の相互作用が発揮できていないと推察された。本検討は今後、新たなプリオンの線維形成系が構築とともに再検討を行う予定である。

#### (6) PQQ 結合 A $\beta$ 部分ペプチドによる全長 A $\beta$ 線維化阻害

本研究では A $\beta$  の大腸菌での組み換え生産系の確立をまず試みた。種々の配列 (N 末) および宿主などを検討したが、A $\beta$  は顆粒封入体として生産され、その水溶化が極めて困難であった。その結果、PQQ で修飾した同部分ペプチドを用いた A $\beta$  の線維化阻害の実験系を構築することができなかった。今後、A $\beta$  調製系を再検討することで、本課題を推進していく予定である。

#### (7) アミロイド形成蛋白質細胞毒性評価系

これまで、アミロイド形成蛋白質に起因する神経変性疾患の治療薬開発に向け、アミロイド形成蛋白質の線維形成阻害剤の検索・開発が進められてきた。しかし、近年の研究成果からアミロイド形成蛋白質が神経変性疾患の原因蛋白質としての役割においてそれが形成するオリゴマ構造の細胞毒性が重要視されるようになった。すなわち、アミロイド形成蛋白質が構成するアミロイド線維ではなく、その途中段階で形成されるオリゴマ構造が細胞毒性を示すという考え方である。したがって、今後の医薬品開発においては線維形成をメルクマークとしてもその細胞毒性を評価することが重要であることが示唆された。本研究では多様な阻害剤を評価することが今後も想定されることから迅速な細胞毒性評価系を構築することとした。これまでのアミロイド形成蛋白質の細胞毒性評価は、これらのアミロイド形成蛋白質を一定期間インキュベートした試料を培養細胞に添加し、添加後数日の後の生細胞数を計測し、その細胞毒性を評価する方法である。この従来法に代わり、本研究ではアミロイド形成蛋白質が細胞毒性を示す初期の段階において形成が想定されるオリゴマが細胞膜で構成する非選択的なチャンネル構造による膜電位変化を蛍光色素で検出ことを考案した。本方法により試料添加後、1 時間以内でアミロイド形成蛋白質の細胞毒性が評価できるようになった。本方法を用いて、PQQ をはじめとするこれまでの線維形成阻害剤は線維形成だけでなく、細胞毒性も低減していることが示された。

#### 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 4 件)

1) “Pyrroloquinoline Quinone Inhibits the Fibrillation of Amyloid Proteins”, J.Kim,

M.Kobayashi, M.Fukuda, D.Ogasawara, N.Kobayashi, S.Han, C.Nakamura, M.Inada, C.Miyaura, K.Ikebukuro, K.Sode, Prion, 4(1), 26-31 (2010) (査読有)

2) “The inhibitory effect of pyrroloquinoline quinine on the amyloid formation and cytotoxicity of truncated alpha-synuclein”, J.Kim, R.Harada, M.Kobayashi, N.Kobayahi, K.Sode, Molecular Neurodegeneration, 20,Art 20(e-pub) 2010 (査読有)

3) “The inhibition of amyloid fibrillation using the proteolytic products of PQQ-modified  $\alpha$ -synuclein”, N.Kobayashi, J.Kim, K.Ikebukuro, K.Sode, The Open Biotechnology J., 3, 40-45 (2009) (査読有)

4) “The Effect of Amino Acid Substitution in the Imperfect Repeat Sequences of  $\alpha$ -Synuclein on Fibrillation” R.Harada, N.Kobayashi, J.Kim, C.Nakamura, S.Han, K.Ikebukuro, K.Sode “Biochim Biophys Acta. 1792(10):998-1003 (2009) (査読有)

[学会発表] (計6件)

1) 「アミロイド形成蛋白質細胞毒性用蛍光バイオセンシングの開発」『金志勲, 戸田礼, 佐々木泰彦, 早出広司, 電気化学会, 2010.9.2, 神奈川工科大学, 厚木』

2) “The development of a novel theranostic platform for cytotoxicity evaluation of amyloid-forming neurodegenerative disease causative proteins”, J Kim, R Harada, N Kobayashi, K Ikebukuro, K Sode, Biosensor 2010, 2010.5.26, Glasgo, UK

3) 「アミロイド蛋白質細胞毒性バイオセンシングのセラノスティクスへの応用」、金志勲、小林夏季、池袋一典、早出広司、日本化学会、2010.3. 26-30、近畿大学、(CSJ Student Presentation Award 2010)

4) 「膜蛋白質感受性色素を用いたアミロイド形成蛋白質の新規細胞毒性評価用バイオセンシングシステムの開発」、金志勲、小林夏季、池袋一典、早出広司、蛋白質科学会、2009.5.20-22、熊本 (ポスター賞)

5) 「蛍光偏向解消法を用いた  $\alpha$  シヌクレインオリゴマーの検出」、原田龍一、小林夏季、金志勲、池袋一典、早出広司、蛋白質科学会、2009.5.20-22、熊本

6) “The prevention of  $\alpha$ -synuclein amyloid formation using PQQ-modified partial peptide fragments: for target specific prevention of the amyloid formation”, N.Kobayashi, K.Sode, 9th International Conference AD/PD 2009, 2009.3.15, Prague (Czech Republic) (Best Poster Award)

[図書] (計1件)

Nanomedicine and the nervous system. 以下の章を分担 “Biomolecular engineering for the regulation of alpha-synuclein nanostructure ~toward the development of alpha-synuclein targeting nanomedicine~” N.Kobayashi, J.Kim, K. Sode, Science Publishers (in press) (査読有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

早出 広司 (Sode Koji)  
東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：10187883

(2)研究分担者

池袋 一典 (Ikebukuro Kazunori)  
東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：70251494

(3)研究分担者

津川 若子 (Tsugawa Wakako)  
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：80376871

(4)研究分担者

フェリ ステファノ (Ferri Stefano)  
東京農工大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号：90334474