

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07908

研究課題名(和文) フラグメントペプチドを用いたプリオンタンパク質凝集メカニズムの物理・化学的解析

研究課題名(英文) Physical and chemical analyses of aggregation mechanism by using Prion fragment peptides

研究代表者

秋澤 俊史 (Akizawa, Toshifumi)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：30202526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン蛋白質由来のフラグメントペプチド(hPrP)を用いて、二次構造と凝集性の関連と Cu<sup>2+</sup>とpHの影響を検討した。

hPrP180-192 はCu<sup>2+</sup>非存在下で相互の結合量が多く、pH7.5において添加直後から経時的にシート構造へ変化するとともに結合性と凝集性を示すことが明らかとなった。さらに、変異体のhPrP180-192 V/I は、hPrP180-192と比較して凝集性が高く、Cu<sup>2+</sup>の非存在下で不可逆的にシートへ二次構造変化を起こすことが明らかとなった。本研究により、プリオン蛋白質の凝集にC-端領域、特にhPrP180-192が深く関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the correlation between secondary structure and aggregation, and effect of Cu<sup>2+</sup> and pH by using prion fragment peptides. As a result, hPrP180-192 bound each other in the absence of Cu<sup>2+</sup>. The secondary structure immediately changed to  $\beta$ -sheet in pH7.5 and binding affinity and aggregation ration were increased. In addition, point mutated peptide, hPrP180-192 V/I show the higher aggregation ratio than hPrP180-192 and irreversible conformational change. These results strongly suggest that C-terminal fragment takes part in aggregation of Prion Protein.

研究分野：分析化学

キーワード：プリオンタンパク 凝集 立体構造 CD フラグメントペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、ヒトプリオンタンパク質 (hPrP<sup>C</sup>) が凝集性の高い変異体 (hPrP<sup>Sc</sup>) に立体構造が変化することで発症し、感染性で致死的な神経変性疾患の一群である。ヒトプリオンタンパク質は、1分子あたり OP-repeat 領域に 4 原子、中間領域に 2 原子の銅が結合しており、銅の生体内における恒常性の維持に参与していることが報告されている。また、金属が凝集に参与しているとの仮説もある。しかしながら、その発症機構は解明されてはならず、その原因の一つにプリオンタンパク質の取り扱いの難しさがある。本研究室では、hPrP<sup>C</sup> から hPrP<sup>Sc</sup> への構造変化に銅などの生体内微量元素が参与しているという「金属関与説」に基づき研究を行っている。小嶋らは、取り扱いの容易なフラグメントペプチドを用いた実験により、C 末端領域も銅と結合することを見出し、さらに、C 末端領域である PrP180-192 は、Cu<sup>2+</sup> の添加、pH の変化により二次構造変化が認められることを報告している。これらの結果は、hPrP<sup>C</sup> から hPrP<sup>Sc</sup> への構造変化に C 末端領域が参与している可能性を示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究ではプリオンタンパク質の C-末端由来のフラグメントペプチドを用いてプリオンタンパク質の凝集メカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

フラグメントペプチドは固相法により合成を行い、HPLC を用いて精製した後、質量分析を用いて目的ペプチドの分子量を確認した。立体構造の解析には Tris 緩衝液を用いて CD スペクトルにより検討した。ペプチド同士の結合は PrP180-192 固定化レジンをを用いた Pull-down assay 及び PrP180-192 を固定化させ、分子間相互作用装置 (AFFINIX QN $\mu$ ) を用いて行った。また、凝集性の検討は Thioflavin T の蛍光強度の上昇を指標として評価した。

### 4. 研究成果

2015 年度の研究では、4 種類の hPrP の C-末端領域由来のフラグメントペプチド (hPrP169-192、hPrP169-183、hPrP175-183、hPrP180-192) (Fig. 1) を使用し、hPrP180-192 との相互作用を Pull down assay と分子間相互作用装置 (AFFINIX QN $\mu$ ) により検討を行った。その結果、Pull down assay では PrP180-192 の結合量が多いことが明らかとなった。また AFFINIX QN $\mu$  を用いた検討では、hPrP180-192 同士の結合について、Cu<sup>2+</sup> 非存在下では振動数が PrP180-192 を固定化していない (破線) と固定化したもの (実線) を比較すると固定化時で振動が低下しており、Cu<sup>2+</sup> 存在下では振動に差はなかった (Fig. 2)。これらの結果から、PrP180-192 は Cu<sup>2+</sup> 非存在下で相互作用を示し、非存在下では相互作用を示さないことが明らかとな

った。(日本薬学会第 136 年会発表済み)

hPrP169-192 YSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTT  
 hPrP169-183 YSNQNNFVHDCVNIT  
 hPrP175-183 FVHDCVNIT  
 hPrP180-192 VNITIKQHTVTTT

Fig. 1 フラグメントペプチドのアミノ酸配列

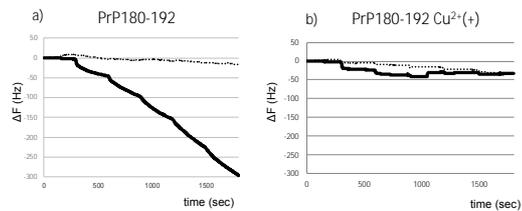


Fig. 2 分子間相互作用

2016 年度は、hPrP180-192 の二次構造と凝集性の関連と Cu<sup>2+</sup> の影響を検討した。その結果、hPrP180-192 は溶液調製直後では全ての pH5~9 において全てランダムコイル構造となっていることが判明した。引き続き、37 °C で 7 日間インキュベーションを行うと、pH7、8、9 でシート構造へ変化しており、pH7 においてその変化が顕著であった。さらに、Cu<sup>2+</sup> をペプチドに対して 2 等量添加し 37 °C で 7 日間インキュベーションを行うと、pH7 でのみランダムコイル構造へ戻ることが確認できた。このことから pH7 での PrP180-192 の凝集は可逆的であることが明らかとなった。一方、Cu<sup>2+</sup> 存在下では、溶液調製直後においては Cu<sup>2+</sup> 非存在下と同様に全てランダムコイル構造となっていたが、37 °C で 7 日間インキュベーションを行うと、pH9 の溶液のみシート構造へ変化した。そこで、生体内条件に近い pH7.5 で、hPrP180-192 の経時的な二次構造変化と Cu<sup>2+</sup> の影響を経時的に検討した結果、経過時にランダム構造からシート構造へ変化しすることが明らかとなった。49 時間以降に変化が見られなかったため、68 時間後に Cu<sup>2+</sup> を添加し同様に解析した結果、添加直後ではシート構造を保持していたが、Cu<sup>2+</sup> 添加 2 時間後、8 時間後とランダムコイル構造に戻る傾向が見られ 22 時間後では 8 時間後と同様のスペクトルを示した (Fig. 3)。これらの結果から PrP180-192 はシート構造への変化後 Cu<sup>2+</sup> 添加によりランダムコイル構造へと復帰することが明らかとなった。

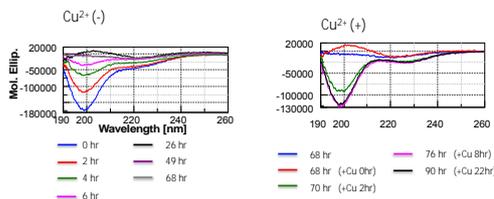


Fig. 3 CD スペクトルの経時的変化

Thioflavin T を用いた凝集性の検討 (pH7.5) では、 $\text{Cu}^{2+}$  の非存在下では、1 日目以降、経時的に蛍光強度の上昇がみられ、4 日目以降で一定となった。また、目視においても白色浮遊物が確認された。加えて、分子間相互作用の検討においても、 $\text{Cu}^{2+}$  非存在下で結合性が確認された。一方、 $\text{Cu}^{2+}$  の存在下ではこのような変化は観察されなかった (Fig. 4)。

PrP180-192 は、AFFINIX で相互作用を確認した溶液調製直後ではランダムコイル構造をとっており、その後 CD スペクトル測定において 1 日目で経時的に シート構造への変化と、HPLC において可溶性ペプチドの減少が確認できた。4 日目で Thioflavin T の蛍光強度が最大となった。以上より、PrP180-192 は、相互作用が起きた結果、経時的に シートへ構造変化し、凝集していると考えられた。(日本薬学会第 137 年会発表済み)

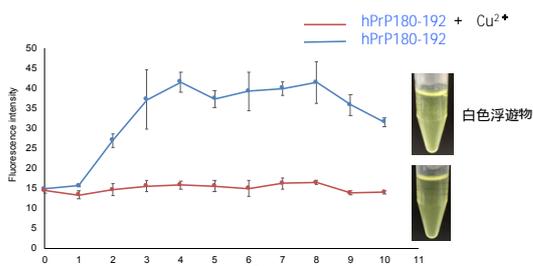


Fig. 4 凝集性の検討

2017 年度は、hPrP180-192 の凝集性に対する 1 アミノ酸変異の影響を検討した、hPrP180-192 と遺伝的変異として報告されている hPrP180-192 V180I (INITIKQHTTT) のフラグメントペプチドを合成し、二次構造変化と溶液中の hPrP180-192 の溶解量、相互作用、凝集性の違いを pH 7.5 で確認した (Fig. 5)。 $\text{Cu}^{2+}$  非存在下においては、CD スペクトル解析では、hPrP180-192 及び hPrP180-192/V180I とともに、ランダムコイル構造から経時的にシート構造へ変化し、HPLC 分析ではともに可溶性ペプチドが減少していることが判明した。この溶液に  $\text{Cu}^{2+}$  を添加すると、

hPrP180-192 はランダムコイル構造へ戻るとともに、可溶性 hPrP180-192 が増加したが、変異体の hPrP180-192/V180I ではランダムコイル構造へ戻らず シート構造を保持しており、可溶性 hPrP180-192/V180I の増加も認められなかった。分子間相互作用は PrP180-192 と同様に PrP180-192/V180I 同士においても認められた。また、hPrP180-192/V180I は hPrP180-192 と比較して、Thioflavin T で高い凝集性を示した。以上より、hPrP180-192 V/I は、hPrP180-192 と比較して凝集性が高く、 $\text{Cu}^{2+}$  の非存在下で シートへ二次構造変化を起こすと  $\text{Cu}^{2+}$  の添加によってもランダムコイルへ戻らないことが明らかとなった。hPrP180-192 V/I の凝集が、プリオン病の発症に関与している可能性がある。また、 $\text{Cu}^{2+}$  の非存在下で二次構造変化や凝集性がみとめられたことから、 $\text{Cu}^{2+}$  の不足がプリオン病発症の要因となっている可能性も示唆された。(日本薬学会第 138 年会発表済み)

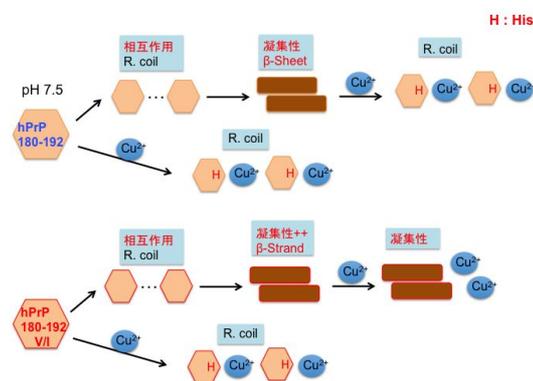


Fig. 5 hPrP180-192 の凝集メカニズム

次に、6 種類の生体内微量元素の hPrP180-192 凝集性に対する影響を検討した (Fig. 6)。その結果、 $\text{Cu}^{2+}$  のみが凝集抑制作用を示し、他の金属イオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) は抑制作用を示さなかった。

以上の検討により、プリオンタンパクの凝集には C-端側が関与している可能性が高いことが判明した。また、凝集に際しては、ランダム構造から シートへの構造変化が関与しており、 $\text{Cu}^{2+}$  による影響は少ないと考えられる。さらに、バリンがイソロイシンに変化することで凝集性が高まることが明らかとなった。

加えて、 $\text{Cu}^{2+}$  が凝集抑制作用を示すことより、生体内  $\text{Cu}^{2+}$  濃度がプリオンタンパク質の凝集性に関与していることが示唆されたことより、 $\text{Cu}^{2+}$  のホメオスタシスの維持が重要であることが推測される。

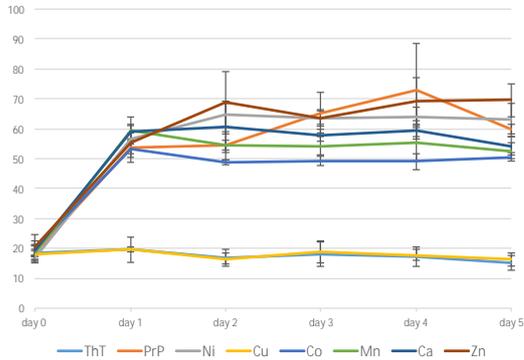


Fig. 6 生体内微量元素イオンのhPrP180-192に対する凝集抑制

我々は、本研究とは別のプロジェクトとして、Tob/BTG ファミリータンパク質由来の合成フラグメントペプチドが酵素活性を有することを見出し、Catalytide 呼ぶことを提唱している。構造活性相関を検討した結果、数十種類の catalytide を同定し、さらにその内の数種類はアミロイド- を切断することを明らかとしている。そこで、Catalytide の PrP180-192 に対する切断活性の検討及び凝集性への影響を検討した。まず、切断活性の検討では、反応液を HPLC により分析し MS により切断点の同定を行ったところ、数種類の Catalytide が PrP180-192 を分解することが明らかとなった。次に凝集性の検討では、35 種類の Catalytide 候補を用いて ThT の上昇を指標に行った。その結果、1 種類が PrP180-192 の凝集による単独と比較し、ThT の上昇を有意に抑制することが明らかとなった。この 1 種類について切断活性を検討したところ、PrP180-192 に対する切断活性は有していないことが明らかとなった。

以上の結果から、Catalytide はアミロイドの切断活性のみでなくプリオンに対する切断活性も有していることが明らかとなった。また切断活性のみでなく凝集抑制に働く低分子ペプチドの存在が明らかとなった。今後、Catalytide のプリオンタンパク質分解作用について詳細に検討していく予定である。

## 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 3 件)

Taniguchi Masanari, Matsuura Kazuya, Nakamura Rina, Kojima Aya, Konishi Motomi, Akizawa Toshifumi, MMP-7 cleaves amyloid fragment peptides and copper ion inhibits the

degradation, BioMetals, 査読あり。30 巻、2017、797-803、DOI:10.1007/s10534-017-0048-4

Yusuke Hatakawa, Rina Nakamura, Masanari Taniguchi, Motomi Konishi, Toshifumi Akizawa, Comparison of proteolytic activity of 5-mer peptides derived from BoxA domain in Tob/BTG family proteins, Peptide Science 2017, 査読有、102-103

Rina Nakamura, Yusuke Hatakawa, Masanari Taniguchi, Motomi Konishi, Toshifumi Akizawa,

Structure-activity relationship of 5-mer peptides derived from JAL-TA9, Peptide Science 2017, 査読有、40-41

[学会発表](計 4 件)

坂口裕子、ヒトプリオンタンパク質 C-端由来ペプチド hPrP180-192 の凝集性に対する 1 アミノ酸変異の影響、日本薬学会第 138 年会、2018

小西元美、In silico による アミロイドペプチドを加水分解する 5 残基 Catalytide の立体構造、日本薬学会第 138 年会、2018

Rina Nakamura, The Development of the novel 5-Mer Catalytide cleaving Amyloid beta peptide, 10<sup>th</sup> GENERAL MEETING OF THE INTERNATIONAL PROTEOLYSIS SOCIETY, 2017

Toshifumi Akizawa, Catalytides are the attractive hydrolase-peptide for the strategic development of new drugs for neurotoxic diseases prevention and treatment, 10<sup>th</sup> GENERAL MEETING OF THE INTERNATIONAL PROTEOLYSIS SOCIETY, 2017

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋澤 俊史 (Akizawa Toshifumi)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：30202526

### (2) 研究分担者

小西 元美 (Konishi Motomi)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：20229446

谷口 将済 (Taniguchi Masanari)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：50710696

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )