

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K13740

研究課題名(和文)変性蛋白質の自己集合状態を利用する新規機能性蛋白質の開発

研究課題名(英文)Development of functional proteins based on self-assembly of denatured proteins

研究代表者

荘司 長三(Shoji, Osami)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90379587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌の線毛を構成する蛋白質の一つであるFimGが、変性状態で自己集合し、変性蛋白質集合体を形成し、この変性蛋白質集合体が、様々な疎水性のゲスト分子を取り込むことを明らかにした。さらに、FimGが逆平行シート構造を主構成要素とする蛋白質であることに着目し、変性FimGのシート構造形成ドメインが、シート構造を形成するペプチドと強く相互作用する可能性が高いことに期待して、アルツハイマー病の原因として知られるアミロイド線維形成の阻害を試みたところ、この変性蛋白質集合体の存在下でアミロイド線維の形成が阻害されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The pilus part of Type I fimbria found on the surface of Gram-negative bacteria is composed of multiple copies of FimA and the last piece of FimA is linked to FimH via FimF and FimG. Each structural unit has an immunoglobulin (Ig)-like fold, which is formed from two-layered β -sheets. We have found that a soluble but denatured form of FimG protein can accommodate various hydrophobic molecules. Inhibiting the self-assembly of β -amyloid (A β) is considered to be one of the strategies through which to treat Alzheimer's disease. Thus, we have tried to inhibit the self-assembly of A β using the denatured form of FimG and demonstrated that the denatured form of FimG prevents A β oligomerization.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：変性蛋白質 自己集合 繊維 ベータシート構造 アミロイド繊維 アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

大腸菌の線毛(Type 1)の先端部分は、FimH, FimG, FimF, FimA の四つの蛋白質から成る蛋白質超分子組織体で、それぞれの蛋白質は非共有結合的に連結されている。FimF と FimG は、FimF の DsF (ドナーstrand F) が FimG の溝に挟み込まれることで連結され、同様の相互作用により四つの構成要素が連結されているが(図1)、FimG と DsF の結合は最も安定で、蛋白質精製のタグとしての利用などが報告されていた。

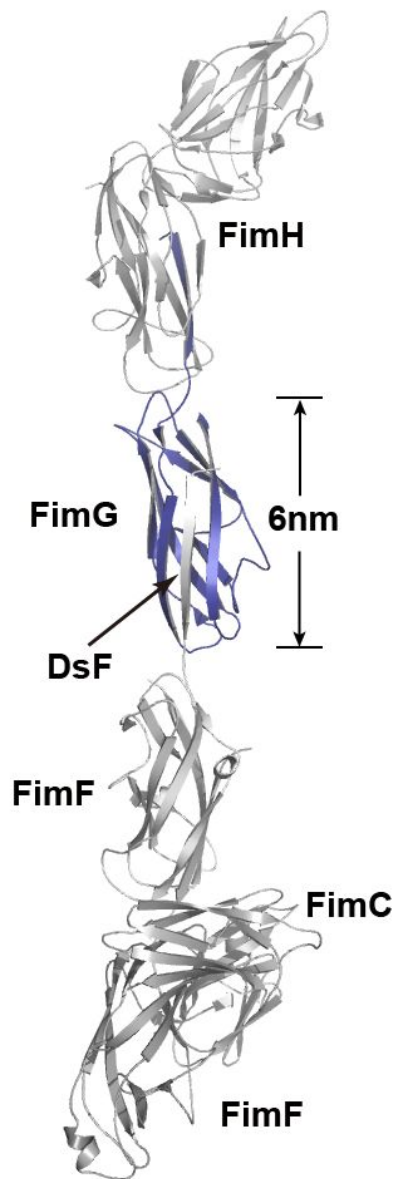


図1 大腸菌の線毛の先端部位を構成する蛋白質の結晶構造

大腸菌に FimG を過剰発現させると、そのほとんどが不溶性画分として得られるため、不溶性画分にある FimG を塩酸グアニジンによって可溶化したのち、リフォールディ

ングすることで、蛋白質超分子組織体形成に利用可能な DsF と強く結合する蛋白質を得られると考えて、FimG のリフォールディング条件を検討していたところ、FimG のリフォールディングは FimG 単体では難しく、正しく折りたたまれた構造はほとんど得られないことが分かった。大腸菌の線毛の形成過程では、FimC が FimG のシャペロンとして機能するため、FimC 無しではリフォールディングしにくいと考えられる。しかし、興味深いことに、変性剤の塩酸グアニジンを透析により完全に除去した後も、FimG は沈殿することなく水溶性を維持し、ゲル濾過(サイズ排除クロマトグラフィー)により精製することができ、FimG の分子量よりも遥かに大きな分子量の自己組織体を得た(図2)。

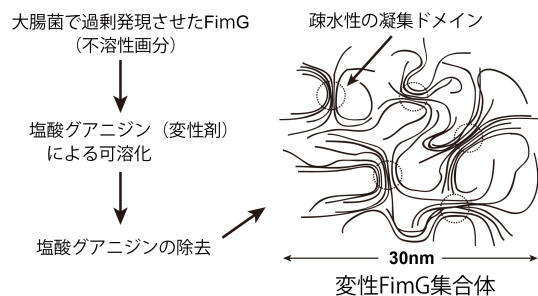


図2 FimG の変性蛋白質集合体の模式図と調整法

2. 研究の目的

大腸菌の線毛を構成する蛋白質の一つである FimG が変性状態で形成する安定な自己集合体を薬剤キャリアーならびにアミロイド線維形成阻害剤としての利用法を開発することを目的として、変性 FimG が形成する自己組織体に関して以下に示す3つの課題について研究を進めた。

- 1) 変性蛋白質集合体の構造制御と組織化の機構解明
- 2) 変性蛋白質集合体への薬剤分子の取り込みと薬剤の放出機構の開発
- 3) 変性蛋白質集合体によるアミロイド線維形成阻害。

3. 研究の方法

変性蛋白質自己集合体の二次構造は、円二色性スペクトル測定、組織体のサイズは、

動的光散乱 (DLS)測定, 薬剤分子の取り込みに関しては, 可視紫外光吸収スペクトルと蛍光スペクトル測定により評価した. また, アミロイド繊維形成阻害は, 群馬大学の高橋剛准教授との共同研究により, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA, サンドイッチ法)より評価した.

4. 研究成果

動的光散乱 (DLS)測定により, 自己組織体のサイズを測定したところ, 粒径が 30nm の大きさの比較的均一なサイズ分布を持つ組織体が形成されていることが明らかになった. FimG の長軸の長さは 6nm であるので, 相当数の FimG が自己集合して, 安定で水溶性の変性蛋白質集合体を形成していると考えている. 円二色性スペクトルは, 変性蛋白質集合体が FimG の本来の β シート構造をまったく形成していないことを示した. 本来の正しいフォールディングの FimG は逆平行 β シート構造を主構成要素として有する蛋白質であるため, 変性状態では, 本来 β シート構造を形成する領域がランダム構造で存在していると考えられた. 変性蛋白質集合体には, 様々な疎水性の分子が取り込まれることから (図 3), 内部は疎水場となっていると考えられる.

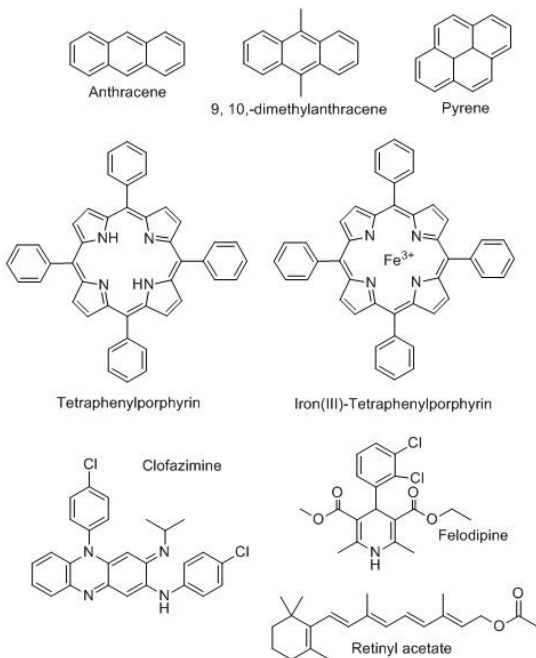


図 3 FimG の変性蛋白質集合体に取り込まれることが確認された化合物

本来 β シート構造を形成する領域は, β シート構造を形成するペプチドやその多量体と相互作用することが期待でき, 連続した β シート構造を形成するアミロイド線維形成を阻害できるのではないかと考え, A β ペプチド (Alzheimer's amyloid β -peptide (A β))の線維形成阻害実験を行った. FimG の溝に対応するペプチド断片を取り込ませて正しいフォールディング状態をとった

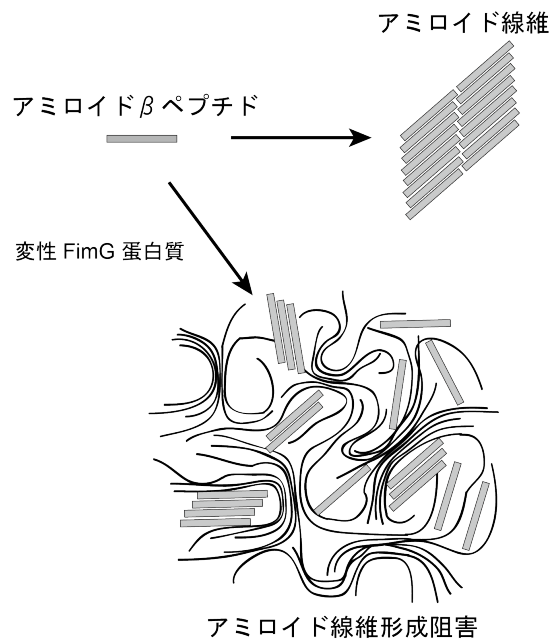


図 4 FimG の変性蛋白質集合体による A β ペプチドの線維形成阻害の模式図

FimG や BSA と比較することで, 変性蛋白質集合体の線維形成阻害効果を調べた. 同じ蛋白質量 (mg/L) で比較すると, 正しいフォールディング状態をとった FimG よりも変性蛋白質集合体が高い線維形成阻害効果を示した. 同じ蛋白でありながら, フォールディング状態によって A β ペプチドの線維形成阻害に大きな違いができることを明らかにした. 変性蛋白質集合体中には, 本来 β シート構造を形成するドメインが β シート構造を形成できずに準安定状態でランダムな二次構造をとっていると考えられ, A β ペプチドは, このようなドメインに取り込まれるのではないかと考えている (図 4). 正しいフォールディング状態の FimG では, 蛋白表面のみで A β ペプチドと相互作用するだけであるため, A β ペプチドとは強く相互作用できなかつたと考えられる. 変性蛋

白質集合体は、蛋白表面は親水的な残基が露出することで、その水溶性を保持し、かつ、内部には、疎水的でベータシート構造を取りやすいペプチドを捕捉できるような空間となっていると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

学会発表)(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

荘司 長三 (SHOJI, Osami)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：90379587