

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20550111

研究課題名(和文) ナノ毒性を抑制するシャペロンペプチドビーズの開発

研究課題名(英文) Development of chaperone-peptide beads for control of toxic nano-particle

研究代表者

田中 直毅 (TANAKA NAOKI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：60243127

研究成果の概要(和文)：

近年アルツハイマー病・プリオン病などの脳神経障害疾患やアスベストによる健康被害は、ナノサイズの微粒子を共通の原因としていることが明らかにされている。本研究では、これらのポリペプチドが形成する毒性ナノ粒子と特異的に結合する蛋白質である $\alpha$ Aクリスタリンの基質結合部位を用いて、疾病の予防・診断に利用できる「シャペロン粒子」の開発を目的とした基礎研究を行なった。このペプチドが有する自己組織化能によって形成される集合体が毒性を有する蛋白質ナノ凝集体と特異的に結合する機構を調査した。

研究成果の概要(英文)：

To develop chaperone-bead for detecting toxic nano-particle, the property of the chaperone peptide derived from the substrate binding site of the molecular chaperone  $\alpha$ A-crystallin was studied. Chaperone peptide which corresponds to the residues 71-75 of  $\alpha$ A-crystallin self-assemble into nano-scale fibril to efficiently reduce the aggregation of the substrate model protein. The substrate recognition mechanism of a the chaperon-peptide was studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：生化学・高分子化学

科研費の分科・細目：複合化学 ・ 高分子化学

キーワード：環境分析、自己組織化、生体材料、脳・神経、ナノ毒性

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病などの神経変性疾患は、アミロイド線維と呼ばれる非天然の $\beta$ シート構造に富む蛋白質凝集体形成と関連しており、前駆体であるナノサイズの集合体が強い細胞毒性が原因であることが近年明らかにされている。さらにアスベストや排気ガスによる大気汚染にともなう健康被害も、気相に形成されるナノサイズの粒子が体内に蓄積することによる細胞毒性が原因であることが明らかにされている。

これらのナノ粒子の毒性は、生体内でストレスを防御に蛋白質である分子シャペロンによって抑制されていることが知られている。しかし、分子シャペロンは不安定な巨大分子であり、疾患の診断や治療に用いるのは困難である。一方大腸菌由来の分子シャペロン GroEL および Clp に関する詳細な構造研究により、基質結合部位の相互作用をオリゴマー構造によって集積してシャペロン活性が発現されることが明らかになっている (Tanaka N. *et al.* Biochemistry, 45, p. 8556 (2006); BBA 1748, p.1 (2005); Protein Science 13, p. 3214 (2004))。

一方、分子シャペロン $\alpha$ クリスタリンの基質結合部位に相当する 18 残基のペプチド FVIFLDVVKHFSPELDLVK ( $\alpha$ AC ペプチド, Fig. 1) は単独で蛋白質の熱凝集やアミロイド $\beta$ 蛋白質の線維形成抑制するシャペロン活性を有することが知られている。この $\alpha$ AC ペプチドから N 末端の Phe71 ないし C 末端の DTLVK を削除すると ADH に対するシャペロン活性が抑制されることも明らかにされている。以上の知見により、シャペロン活性有するペプチドを集積した微粒子を開発すれば、アミロイド線維形成の抑制、大気中の毒性ナノ粒子の検知など、生体内のナノ毒性の抑制に利用することができることが期待される。

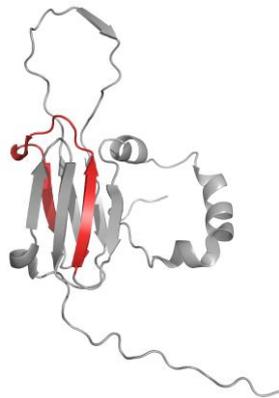


Fig. 1 Substrate binding site of  $\alpha$ A crystalline.

これまでの研究で $\alpha$ AC ペプチドは自己組織化によりアミロイド線維を形成することを見出した (Fig. 2, Tanaka N. *et al.* Biochemistry, 47, p. 2961 (2008))。さらにこの線維形成能は Phe71 を削除すると失われるため、線維形成は FVIFL の領域が核となっていることが示唆されている。以上の結果は Phe71 がシャペロン活性とアミロイド線維形成能の双方に影響する重要な残基であることを示している。

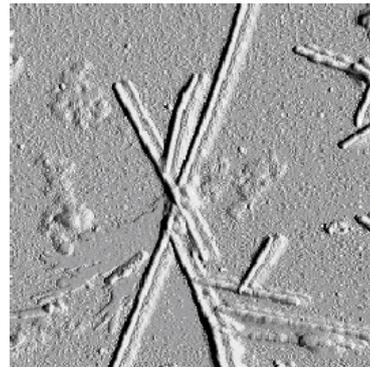


Fig. 2 Amide I band of FTIR of ADH heat-treated at 60 °C

## 2. 研究の目的

本研究ではこの自己組織化能を有するシャペロンペプチドにより、ナノ毒性を抑制効率が高い微粒子を簡便に調製する技術を開発する。 $\alpha$ AC ペプチドと ADH は高温下において複雑な状態変化を起こすことがわかる。そのため凝集を抑制する機構の解明には、ペプチドのタンパク質への影響を特定の条件で調査する必要がある。そこで凝集蛋白質モデルであるアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) と $\alpha$ AC ペプチドのコンフォメーションと会合状態を調査した上で、ペプチドの活性を正しく評価できる実験条件を明らかにする。さらに系統的に設計したペプチドフラグメントの凝集への効果を調査し、ペプチドの自己組織化と活性の相関を明らかにする。

## 3. 研究の方法

酵母由来 ADH はオリエンタル酵母から購入した。SDS-PAGE において純度は 100 % に近かった。ペプチドは Genescript から購入した。すべて 95 % 以上の純度であった。FTIR は  $\text{CaF}_2$  セルと Spectrum GX (Perkin-Elmer) を用いて測定した。光散乱測定に DLS2000 (大塚電子) を用いた。AFM 測定は Nanoscope IIIa (日本ビーコ) を、CD 測定には J-720 (日本電子) を用いた。

#### 4. 研究成果

##### $\alpha$ AC ペプチドと ADH のコンフォメーションの温度変化

基質である ADH は 48 °C の熱凝集は溶液の濁度変化によって容易に観測できるため多くの研究でシャペロン活性の評価に用いられてきている。しかし $\alpha$ AC ペプチドの蛋白質の熱凝集に対する効果を解析する場合、ペプチドの凝集が起こるとシャペロン活性の正確な評価ができない。 $\alpha$ AC ペプチドはランダム型の構造をとるが、48 °C において CD スペクトルを観測すると凝集してコンフォメーションが $\beta$ 型に転移することが明らかになった。さらに、凝集体の AFM 測定によりアミロイド線維を形成していることがわかった。

以上の結果によりこれまで ADH の熱凝集過程を観測する際にペプチド自体も構造転移を起こしていることを意味する。したがってアミロイド線維形成をしていないペプチドのシャペロン活性を評価するためにはより低い温度での実験が必要である。より低い温度で実験することにした。44°C においてペプチドはアミロイド線維を作らなかった。

ADH は 45°C 以下で数日かけたきわめてゆっくりと酵素活性を失うことが報告されている。この低い温度領域において濁度測定が可能な条件を探索すると、Fig. 3 に示すように ADH の凝集を 2 時間以内に観測できることが判った。

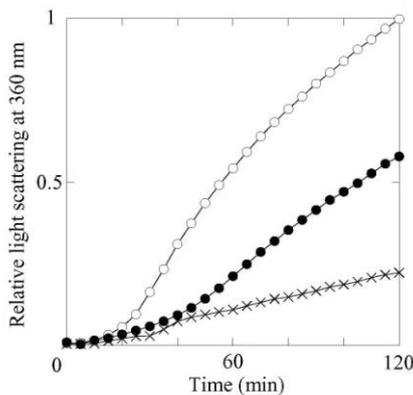


Fig. 3 Effects of  $\alpha$ AC(71-88) on the heat-induced aggregation of ADH at 44 °C. ○, ADH; ●, ADH +  $\alpha$ AC(71-88); X, ADH +  $\alpha$ AC(71-88) fibril

さらにこの温度で 44°C 2 時間加熱したのちに ADH の酵素活性を調べると、無処理の酵素と同じ活性がえられた。これは凝集体が天然の酵素活性を保つのではなく、凝集体の酵素活性測定時に溶液を希釈するため、凝集体が天然構造に戻ったためであると推測される。同じ条件で 1 日放置すると、活性

が低下しているのがわかった。このことは、ADH が失活するまえにかなり凝集をおこすことを意味する。また凝集体後の二次構造の変化を FTIR によって調べると天然蛋白質の構造と同一であった (Fig. 4)。以上の結果は 44 °C における ADH の凝集が活性および構造の変化をとまなわない可逆的な過程であることを示している。

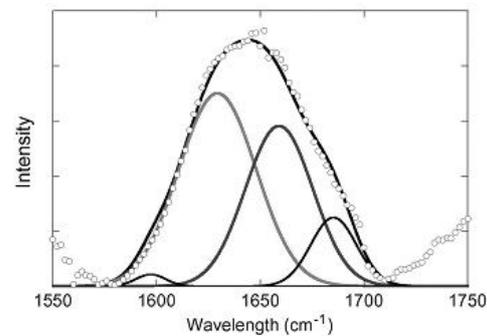


Fig. 4 Amide I band of FTIR of ADH heat-treated at 48 °C

ADH の凝集体のサイズを AFM によって観測すると、Fig. 5 に示すように ADH 単独の凝集体はかなり大きなものが生じていた。DLS 測定の結果も同様なので AFM の結果は溶液中の凝集体のサイズを反映したことになる。これは ADH が天然構造を保ちながら、44 °C で構造が揺らぎ、疎水性の領域が露出することで自己会合のための結合サイトが増えたためであるとかんがえられる。

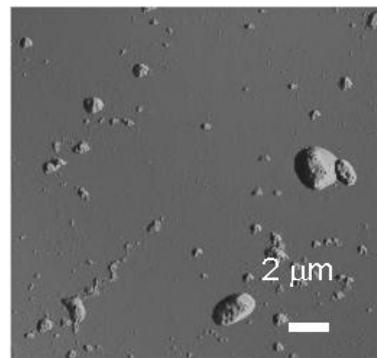


Fig. 5 AFM image of the aggregates of ADH heat-treated at 44 °C .

##### $\alpha$ AC ペプチドによる ADH の凝集抑制

ADH の会合に対する $\alpha$ AC ペプチドの効果を調べると、ADH の濁度上昇は抑制されることがわかった (Fig. 3)。このことは $\alpha$ AC ペプチドが自己会合しない単独の形で ADH の可逆凝集を抑制することを意味する。このことを確認するために $\alpha$ AC ペプチドの共存下で熱処理して得た ADH 凝集体 AFM を測定すると、Fig. 6 に示すようにペプチド共存下で凝集体のサ

イズが縮小されていた。

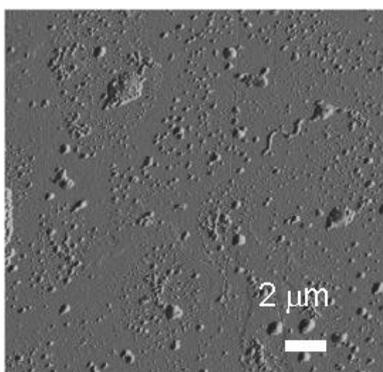


Fig. 6 AFM image of the aggregates of ADH ADH heat-treated at 44 °C in the presence of  $\alpha$ AC(71-88).

### 繊維化した $\alpha$ AC ペプチドによる ADH の凝集抑制

次に 60 °C で  $\alpha$ AC ペプチドを熱処理して繊維形成したペプチドの  $\alpha$ AC ペプチドのシャペロン活性を調べた。あらかじめ ADH の凝集に対する効果を調べると Fig. 3 に示すように凝集抑制効果はさらに促進していることが判った。このことは、線維形成によってシャペロン活性が増幅されることを意味する。以前 Phe71 を削除した  $\alpha$ AC ペプチドにおいて 48 °C における ADH の凝集に対するシャペロン活性が抑制されると報告されている。しかし 44 °C におけるこのペプチドの活性は繊維化していない  $\alpha$ AC ペプチドと比較してほぼ同じレベルであった。このことは Phe71 の削除によってペプチドの集合状態に影響を与えなければ、活性を損なうことはないということを示唆する。。

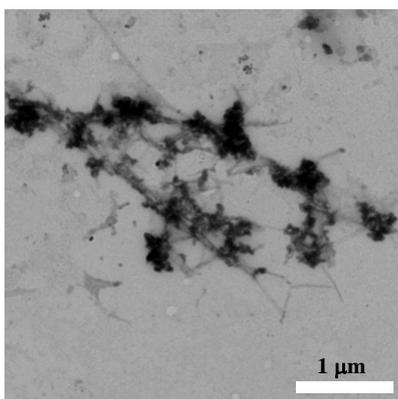


Fig. 7 TEM image of the aggregates of ADH and  $\alpha$ AC(71-88) in amyloid fibril form.

線維化  $\alpha$ AC ペプチドを共存させたとき ADH 凝集体を TEM で観測した。Fig. 7 に示すように、凝集した ADH は  $\alpha$ AC ペプチドが形成した

アミロイド繊維の表面に会合していることが分かった。これにより Fig. 3 に示した結果は ADH の凝集抑制によるものではなく、凝集体が繊維に結合することで見かけの ADH の凝集にともなう濁度上昇が抑制された結果であることが分かった。

一方、KFVIFLDVKHFSPEDLTVK は熱をかけるとアモルファスの凝集を起こす。この状態で ADH に対する効果を調べると、ADH の濁度を急激に増大させ、目に見える大きな凝集体を形成し始めた。蛍光標識 ADH の蛍光観測により、ADH の会合状態を観測した。すると大きな会合体が形成されていた。以上にペプチドは会合するだけではシャペロン活性が増幅せず、規則的なアミロイド線維ができなければならないことがわかった。

### 不可逆変性へのペプチドの影響

ADH を 60 °C で熱処理すると、Fig. 8 に示すように二次構造の変化をともなう凝集が起こすとともに、酵素活性は不可逆的に失活する。この条件において繊維化した  $\alpha$ AC ペプチドを混合すると、ADH の濁度上昇はかなり抑制されていた。しかし、熱処理後の熱失活にたいしてほとんど影響をあたえず、残存活性は 20% 以下程度でしかなかった。したがって、 $\alpha$ AC ペプチド共存下では、凝集体のサイズを小さいままで保持して不可逆凝集を引き起こされることになる。 $\alpha$ AC ペプチドは三次構造のアンフォールディングとそれにとまなう不可逆凝集には何の影響も与えないのであろう。

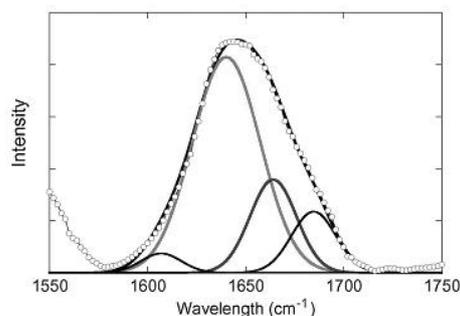


Fig. 8 Amide I band of FTIR of ADH heat-treated at 60 °C.

### 考察

分子シャペロンの多くは ATPase であるが、ATPase を切り出した基質結合ドメインだけでも活性はある。さらに  $\alpha$ クリスタリンが属する small HSP はファミリーは ATPase を有していない。これは、分子シャペロンが基質との弱い相互作用で蛋白質凝集を抑制している機構によって説明できる。したがって  $\alpha$  A クリスタリンの基質結合部位のペプチド

がシャペロン活性を有することはこれまでの結果とは矛盾しない。

$\alpha$ AC ペプチドがアミロイド線維を形成する現象が $\alpha$ クリスタリンの天然機能と関連しているか否かは不明であるが、ペプチドを医工学の分野に応用するときには重要な意味をもつ。熱凝集 ADH をモデル基質とした場合、 $\alpha$ AC ペプチドがアミロイド線維を形成すると活性があがり、N 末端の F70 を削除すると活性がなくなった。これは F70 が基質結合に寄与するだけでなく、アミロイド線維形成にも関与するためと考えられる。 $\alpha$ AC ペプチドがアミロイド線維を形成すると見かけ上活性が増幅するのは、基質結合部位が接近して並ぶため、基質の疎水部位と効率的に結合するためであると考えられる。

同様の現象は分子シャペロンの活性においてもみだされている関係する。GroEL と ClpB は ATP なしでも基質結合のみでシャペロン活性がある。基質結合部位単独での弱いシャペロン活性はオリゴマー構造によってかなり増幅される。これはアピカルドメイン基質結合が 7 員環における Avidity によって増幅されている。シャペロンペプチド集合体の活性はこれと同じ機構であるとおもわれる。 $\alpha$ AC ペプチドは高い温度において構造変性をともなう不可逆変性は抑制しなかった。この結果はこのペプチドの機構が従来の分子シャペロンミミックと異なることを意味する。

## 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. Tanaka N., Morimoto Y., Noguchi Y., Tada T., Waku T., Kunugi S., Morii T., Lee Y-F., Konno T., Takahashi N. "The mechanism of fibril formation of a non-inhibitory serpin ovalbumin revealed by the identification of amyloidogenic core regions" J. Biol. Chem. (査読有) 286, 5884-5889 (2011).

[学会発表] (計 10 件)

1. Morimoto Y., Kawachi Y., Waku, T., Kunugi S. Takahashi N., Tanaka N. "The mechanism of fibril formation of ovalbumin revealed by the identification of amyloidogenic core regions."

第 60 回高分子学会年次大会

2011 年 5 月 26 日 大阪国際会議場

2. 田中直毅、宮田慶亮、寺村加寿人、功刀滋「シャペロンペプチドの蛋白質凝集抑制におけるアミロイド線維形成の役割」第 58 回高分子討論会 2009 年 9 月 16 日 熊本大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.cis.kit.ac.jp/~bmebpc/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 直毅 (TANAKA NAOKI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・  
准教授

研究者番号：60243127

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：