

平成22年 5月30日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870043

研究課題名（和文） 蛋白質デザインによる自己組織化ナノ繊維形成過程の解明

研究課題名（英文） Study of the self-assembling nano-fibrils by protein design approach

研究代表者

真壁 幸樹 (MAKABE KOKI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：20508072

研究成果の概要（和文）：

$\beta$ シート研究のモデル蛋白質 OspA を用いて変異体の X 線結晶構造解析に成功した。また、フォールディング反応の研究から経路上の中間体を経るまきもどり過程であることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

Using OspA as a model system for beta-sheet study, we successfully determined the X-ray crystal structure of the mutants. We also found that OspA folds through an on-pathway intermediate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：(1)蛋白質デザイン (2)  $\beta$ シート (3) アミロイド (4) フォールディング (5) 生物物理

## 1. 研究開始当初の背景

自己組織化によってペプチドや蛋白質は自己触媒的に高次の構造体を形成する。最も代表的な例はアミロイド様繊維と呼ばれる  $\beta$ シートに富んだ分岐のないナノ線維である。この自己集合体はアルツハイマー病、透析アミロイドーシスといった疾病に関与し、また、分岐を持たない微細な繊維であるため、

ナノマテリアルとしての応用も考えられている。このような高い社会的要請があるにも関わらず、立体構造に基づいた各残基の役割に関してはほとんど理解が進んでいない。その原因は、試料が①多様で不均一な会合状態を持ち、②不溶性の固体であり、従来の溶液論的測定法が適用困難であるためである。この様な状況の中、2005年に米国のグループが

酵母プリオン sup35 由来ペプチドの自己集合体の結晶構造を決定し、飛躍的に構造的な理解が進んだ。しかしながら、結晶という制約から、この構造はアミロイド様繊維が本来もつ繊維軸に沿った捻れを持たない。この結晶構造は高いエネルギー状態であり、分子動力学計算を行うと、捻れた状態へ構造変化することが報告されている。すなわち、実際のナノ繊維の詳細な構造を観察するためにはその捻れた状態のまま、構造を捕獲する必要がある。

これらの問題点を克服するため、これまでに、ペプチドの会合体を蛋白質内に取り込んだ人工分子（ペプチド会合体模倣; Peptide Self-Assembly Mimics, PSAMs）の作製に取り組んだ（図1）。これは(1)(2)自己組織化したナノ繊維を部分的に取り出し、(3)両端をリンクさせ、(4)さらなる会合を防ぐために両端を適当な蛋白質ドメインでキャップされた構造を持つ。これにより、不均一、不溶性の多分子系であるペプチドの会合体を分子レベルで均一かつ、可溶性単分子系である蛋白質内に取り込むことが出来る。ボレリア菌由来 Outer Surface Protein A (OspA) は、単層βシート (Single Layer β-sheet, SLB) が両末端ドメインでキャップされている構造を持ち、さらに、SLBを形成するβヘアピン単独ではアミロイド様繊維を形成することが既知であり、このシステムの土台として理想的である（図2）。

## 2. 研究の目的

ポリペプチド同士が自己組織化し、ナノ繊維などの高次構造体を形成する機構の解明には高い社会的要請があり重要な課題である。本課題では、上記の PSAMs システムを用いて、ペプチド自己組織化反応を蛋白質のフォールディングへと変換させるシステムに

より、これまで未踏であった、自己組織化によるナノ繊維形成の速度過程を残基レベルの分解能で明らかにする。

## 3. 研究の方法

**PSAMs** システムのフォールディングを解析することによって、ペプチド自己組織化における核形成およびβシート伸長反応を模倣し、その分子機構を明らかにする。

フォールディング反応の測定は急速混合法を用いて蛍光および円偏光二色性の時間変化を追跡して行った。また、様々な PSAMs 変異体の分子構造は X線結晶構造解析によって決定した。

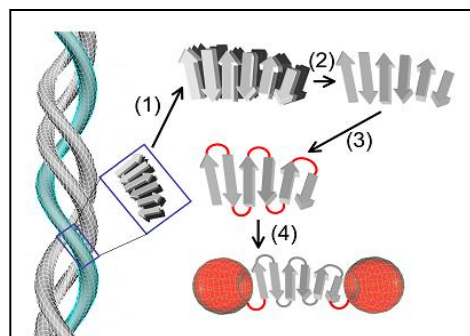


図1 PSAMs の模式図(1)(2)ナノ繊維を部分的に取りだし(3)適当なリンカーで繋ぎ(4)さらなる会合を防ぐため適当なドメインでキャップ



図2 PSAMs で用いる OspA の立体構造。赤で示した単層βシート (SLB) が二つの末端ドメインでキャップされている。

## 4. 研究成果

平成20年度では初めに各種変異体の発現・精製系を構築し、基礎的なデータの測定から行った。まず、PSAM のフ

フォールディング測定の解釈を容易にするため、C末端ドメインが欠落した変異体を構築した。この変異体は溶液中で単量体として安定であった。原子レベルの分解能で分子構造を決定するため、蛋白質の結晶化を行った。結晶化スクリーニングの結果、良好な結晶の生成に成功し、高エネルギー加速器研究機構 PF にて 2.2Å の反射データを得ることが出来た。結晶は非対称単位中に蛋白質を四分子含んでおり、これらの分子構造の間で単層 β シート領域に構造の違いが観察された。また、ストップフロー蛍光装置を用いて PSAM のフォールディング測定を行い、三状態の巻き戻り反応であることを見いだした。これは平衡測定において以前に報告された結果と一致しており、平衡測定の中間体と巻き戻り反応の中間体が類似の構造を持つことが予想される。PSAM の N 末端ドメインには蛍光プローブとなるトリプトファン残基が無いため、詳細な測定を目指してトリプトファン残基を N 末端ドメインに導入した変異体を構築した。

平成 21 年度では 20 年度に引き続き、OspA のフォールディング測定を進めた。巻き戻り過程における詳細なトリプトファン蛍光変化の解析から、蛍光変化に先立って蛍光変化の無い遅延相が存在することを確認した (図 3)。トリプトファン残基は C 末端ドメインに存在し、天然状態の形成によってのみ蛍光変化が観察されると考えられるので、この遅延相の観察は巻き戻り反応過程における経路上中間体の形成によるものと結論した。蛍光の時間変化によって得られた二つの速度定数は円偏光二色性を用いた測定結果

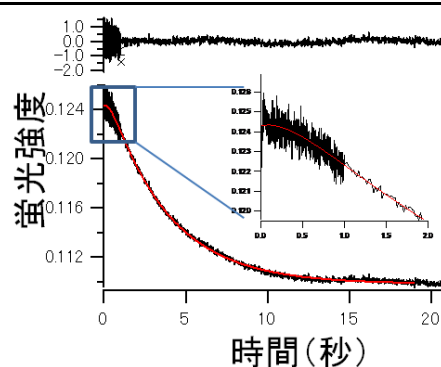


図 3 巻き戻り反応の蛍光強度変化 (25°C、2.4M 尿素)。遅延相が観察された時間領域を拡大してある。

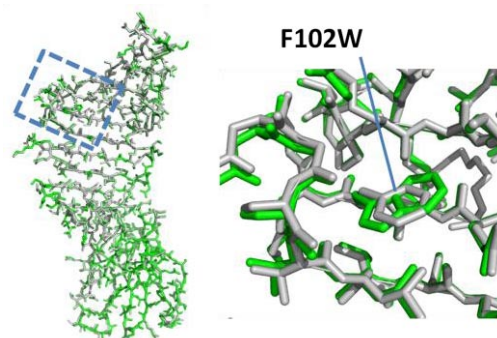


図 4 N 末端ドメインにトリプトファンを導入した変異体の X 線結晶構造

と一致した。さらに、N末端ドメインの形成を追跡するために N 末端ドメインにトリプトファン残基を導入した変異体を構築し、X線結晶構造の決定に成功した (分解能 1.86Å)。得られた構造から、トリプトファンへの変異導入は蛋白質構造にほとんど影響を与えていないことを明らかにした (図 4)。我々は最近、クロス β 構造を PSAM 中にモデル化することに成功した。これは PSAM の界面をフェニルアラニン-ロイシンの繰り返しに変異することで二量体化を誘導するものである。この二量体化を誘導するのに必要な最小の変異を明らかにするために、フェニルアラニン繰り返し部位に対してアラニンスキャニングを行った。この結果、

一つの芳香族残基あれば二量体化が誘導されることを見いだした。

## 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 6 件)  
すべて査読有り

- ① Biancalana M, Makabe K, Koide S.  
Minimalist design of water-soluble cross-beta architecture.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 3469-3474, 2010
- ② Nakamura T, Makabe K, Tomoyori K, Maki K, Mukaiyama A, Kuwajima K.  
Different Folding Pathways Taken by Highly Homologous Proteins, Goat alpha-Lactalbumin and Canine Milk Lysozyme.  
*J Mol Biol.* **396**, 1361-1378, 2010.
- ③ Ochi A, Makabe K, Kuwajima K, Hori H.  
Flexible recognition of the tRNA G18 methylation target site by TrmH methyltransferase through first binding and induced fit processes.  
*J Biol Chem.* **285**, 9018-9029, 2010.
- ④ Huang J, Makabe K, Biancalana M, Koide A, Koide S.  
Structural Basis for Exquisite Specificity of Affinity Clamps, Synthetic Binding Proteins Generated through Directed Domain-interface Evolution.  
*J Mol Biol.* **392**, 1221-1231, 2009
- ⑤ Biancalana M, Makabe K, Koide A, Koide S.  
Molecular Mechanism of Thioflavin-T

Binding to the Surface of beta-Rich Peptide Self-Assemblies.

*J Mol Biol.* **385**, 1052-1063, 2009

- ⑥ Makabe K, Koide S.  
The promiscuity of beta-strand pairing allows for rational design of beta-sheet face inversion.  
*J Am Chem Soc.* **130**, 14370-14371, 2008

[学会発表] (計 4 件)

- ① 2010 年 生物物理学会中部支部講演会,  $\beta$ シート蛋白質の構造形成機構, 真壁幸樹, 小出昌平, 桑島邦博
- ② 2009 年 蛋白質科学会 (熊本),  $\beta$ -シート形成における主鎖水素結合の役割, 真壁幸樹, 小出昌平, 桑島邦博
- ③ 2009 年 北海道大学-Mahidol 大学若手合同シンポジウム, Protein design approach for  $\beta$ -sheet characterization, Koki Makabe
- ④ 2009 年 Asia Core (韓国, ソウル), Structures of  $\beta$ -Sheet Self-Assembly Mimics, Koki Makabe, Shohei Koide, and Kunihiro Kuwajima

[その他]

桑島研究室ホームページ  
<http://gagliano.ims.ac.jp/>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
真壁 幸樹 (MAKABE KOKI)  
大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教  
研究者番号 : 20508072