

機関番号：12301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21710225  
 研究課題名（和文） $\beta$ バレルタンパク質表面を分子認識場としたアミロイド性タンパク質の機能制御  
 研究課題名（英文）Control of amyloidogenic proteins using surface-engineered  $\beta$ -barrel proteins  
 研究代表者  
 高橋 剛（TAKAHASHI TSUYOSHI）  
 群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・准教授  
 研究者番号：90345380

研究成果の概要（和文）：研究代表者はこれまでに、 $\beta$ バレルタンパク質の分子表面にアミロイド様構造をもつように設計した改変タンパク質が、標的のアルツハイマー病アミロイド $\beta$ ペプチド（A $\beta$ ）と強く結合することを見出した。本研究では、このタンパク質設計手法を用いて、A $\beta$ の神経細胞毒性の抑制について評価した。またハンチントン病関連ポリグルタミンタンパク質を標的とした研究へと展開した。

研究成果の概要（英文）：The previous study demonstrated that the engineered  $\beta$ -barrel proteins presenting pseudo-amyloid structures on their surfaces can bind tightly to Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ). In this study, suppression of A $\beta$  toxicity using the engineered  $\beta$ -barrel proteins was evaluated. Moreover, the design strategy using  $\beta$ -barrel proteins was expanded for polyglutamine proteins that relate Huntington's disease.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生体分子科学

科研費の分科・細目：生体分子科学

キーワード：アミロイド $\beta$ ペプチド，ポリグルタミンタンパク質， $\beta$ バレルタンパク質，タンパク質工学，神経変性疾患，ミスフォールディング病

## 1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質のミスフォールディングに関連した疾患として、アルツハイマー病・パーキンソン病・ハンチントン病・狂牛病（プリオン病）等の神経変性疾患が知られるようになってきた。紐状の高分子であるタンパク

質は、生体内においてそれぞれ決まった立体構造へと折りたたむことで機能を発現している。しかし何らかの因子によりミスフォールディングしたタンパク質が自己集合し、その会合体が神経細胞を攻撃することで上記の病気の発症を引き起こす原因になっている。ま

たこれらミスフォールディングタンパク質の共通点として、自己集合とともにタンパク質の二次構造の一つである $\beta$ シート構造を形成し、分子間相互作用により $\beta$ シート構造が安定化することで、安定なアミロイド線維へと構造変換する。

研究代表者はこれまでに、アルツハイマー病発症を引き起こすとされるアミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )を標的分子として、その自己集合過程を阻害する人工分子の創製に取り組んできている。その一つとして、 $\beta$ バレル構造をもつ緑色蛍光タンパク質(GFP)表面のアミノ酸と A $\beta$ 配列の一部のアミノ酸を置換し、A $\beta$ 様アミロイドを分子表面に提示した GFP 変異体(擬 A $\beta$ 提示 GFP)が A $\beta$ と相互作用し、A $\beta$ の自己集合化を阻害できることを見いだした。またこの分子は A $\beta$ の毒性可溶性会合体に強く結合することも分かった。この原理は、 $\beta$ シート構造が筒状になった $\beta$ バレル型構造をもつ GFP 表面に擬似的に構築した A $\beta$ 様アミロイド表面が A $\beta$ の自己集合の際の分子認識場として機能し、A $\beta$ を認識・結合することで、結果 A $\beta$ の集合化を阻害するものである。興味深いことにこの設計タンパク質自身は、安定な $\beta$ バレル構造により保護されており、それ自身では集合化しない。このような特性をもつ擬アミロイド提示タンパク質は、 $\beta$ シート構造を形成しながら自己集合するアミロイド性タンパク質を認識する人工分子をデザインする戦略として非常に有効であると期待できる。

## 2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえ本研究の目的として、擬 A $\beta$ 提示タンパク質を用いて、A $\beta$ との相互作用による A $\beta$ の細胞毒性の制御について検討することとした。 $\beta$ バレルタンパク質表面を分子認識場とした A $\beta$ 集合体形成阻害分子が、細胞系においても有効に機能することを証明できれば、本手法の有用性がより高まると考えた。また、もう一つの研究目的として、ハンチントン病モデルとして異常伸張した polyQ タンパク質を構築し、GFP 表面に

polyQ 様アミロイドを提示した擬 polyQ 提示 GFP との相互作用について評価することとした。これにより、A $\beta$ 以外のミスフォールディング関連タンパク質の集合化阻害分子を構築する方法としても、 $\beta$ バレルタンパク質の表面を分子認識場とする手法が有用であることを証明できると期待した。

## 3. 研究の方法

### (1) 擬 A $\beta$ 提示 GFP を用いた A $\beta$ の集合化阻害とモデル神経細胞の細胞毒性への効果

研究代表者がこれまでに構築した擬 A $\beta$ 提示 GFP の中で、P13H および AP93Q と名付けた 2 つのタンパク質は、試験管内において A $\beta$ の集合体形成を強く抑制することを見出している。そこでこの 2 つの擬 A $\beta$ 提示 GFP を使って A $\beta$ の集合体形成の抑制効果とモデル培養細胞に対する A $\beta$ の細胞毒性誘導効果との相関について検討した。

タンパク質の調製は、大腸菌を用いた発現系により行い、C 末端に配置したヒスチジンタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。A $\beta$ は、会合しやすく、細胞毒性が高いとされる 42 残基の A $\beta$ 1-42 を用いた。ペプチドは、Fmoc 固相合成法により合成し、逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製した。凍結乾燥により得られた粉末を既報に従い、会合していない単量体 A $\beta$ 1-42 からなる溶液を調製した。まずタンパク質を含まない A $\beta$ 1-42 (10  $\mu$ M) だけをインキュベートして細胞毒性をもつ A $\beta$ 1-42 会合体を調製し、神経細胞モデルであるラット副腎褐色細胞腫 PC12 細胞に播種し、A $\beta$ 毒性会合体による細胞生存率の低下を MTT アッセイにより評価した。その結果、単量体の A $\beta$ 1-42 単独で約 10 時間インキュベートした溶液を PC12 細胞に加えると、細胞生存率が約 60%に低下した (図 1)。一方、構築した擬 A $\beta$ 提示 GFP である P13H および AP93Q を予め A $\beta$ 1-42 と混合してインキュベートし、その溶液を PC12 細胞に播種して MTT アッセイを行った。その結果、10  $\mu$ M の A $\beta$ 1-42 に対して、半分の濃度である 5  $\mu$ M のタンパク

質を加えた場合には、細胞生存率が90%以上にまで回復していることが分かった(図1)。また、より低濃度のタンパク質(1 $\mu$ M)を加えた場合でも細胞生存率は80%以上となった。この結果から、P13H、AP93QともにPC12細胞の細胞死を誘導するA $\beta$ 1-42の毒性会合体の形成を強く抑制していることが明らかとなった。

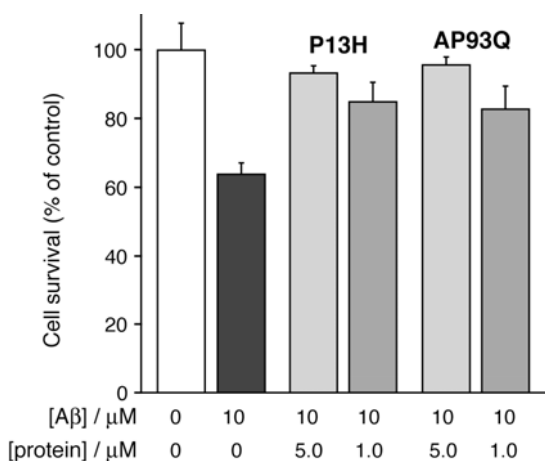


図1 A $\beta$ 1-42によるPC12細胞の生存率をMTT法で測定した結果。A $\beta$ 1-42 10 $\mu$ M単独またはP13H、AP93Qを混合した溶液を10時間インキュベートしPC12細胞に播種後測定。

(2) ハンチントン病モデルポリグルタミン (polyQ) タンパク質を標的とした擬polyQ提示GFPの構築と相互作用解析

ここでは、擬A $\beta$ 提示GFPで示すことができた $\beta$ バレルタンパク質表面を分子認識場として利用したA $\beta$ の集合化阻害の方法論を他のアミロイド性タンパク質へと展開することを目的とした。まず異常伸張したpolyQタンパク質のモデルとして、チオレドキシンのC末端側にグルタミン鎖長が14, 27, 51, 79からなるpolyQを融合したタンパク質(Trx-Q14, Trx-Q27, Trx-Q51, Trx-Q79)を構築した。各タンパク質は大腸菌を用いて発現し、グルタミン鎖長14, 27, 51のタンパク質はNi-NTAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。Trx-Q79は、非常に会合体を形成しやすいため、可溶化しやすいチオレドキシンの融合状態でも大腸菌内で封入体を形成した。そのため封

入体を種々の緩衝液で洗浄した後、タンパク質変性剤を用いて可溶化して回収した。調製したpolyQタンパク質は、グルタミン鎖長に依存してアミロイド様の会合体を形成することが分かった。

次に、GFP表面の $\beta$ シート構造部位にpolyQ様アミロイドを提示した擬polyQ提示GFPとして、GFPの $\beta$ ストランドI, IIにグルタミンを計10残基配置したapQ-GFPを設計した。大腸菌を用いて発現し、Ni-NTAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

種々のグルタミン鎖長からなるpolyQタンパク質とapQ-GFPとの相互作用について、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法により評価した。Langmuir型の吸着等温式を用いた解析から、apQ-GFPは、一定のグルタミン鎖長をもつTrx-Q51およびTrx-Q79に強く結合することが分かった(図2)。一方、グルタミン鎖長がより短いTrx-Q14, Trx-Q27とはほとんど相互作用しなかった。一般にハンチントン病の発症において、40残基以上のグルタミン鎖長が必要とされており、グルタミン40残基を境にしてpolyQタンパク質の凝集性が高まるとされる。おそらくapQ-GFPは、Trx-Q51やTrx-Q79で形成されたグルタミン鎖の $\beta$ シート構造を認識して結合していると推測される。

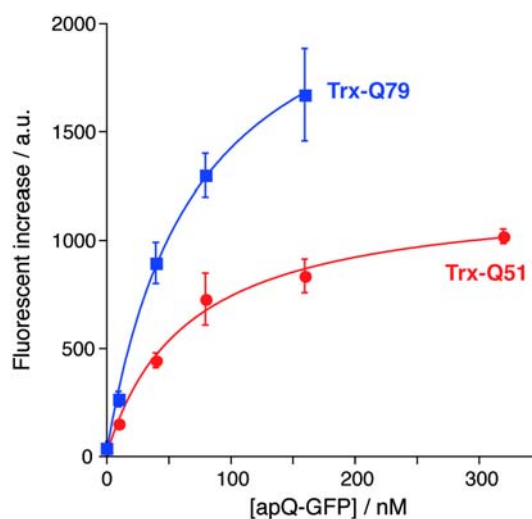


図2 ELISA法によるTrx-Q51およびTrx-Q79とapQ-GFPとの相互作用測定。96ウェルプレートに固定したTrx-Q51, Trx-Q79 (25 pmol)に対して種々の濃度のapQ-GFPを加え、抗GFP抗体とHRP結合抗マウス抗体を用いて測定。

続いて Trx-Q51, Trx-Q79 を 37° C でインキュベートし、そのサンプル中の polyQ と apQ-GFP との相互作用を解析した。その結果、apQ-GFP は適度に凝集した polyQ に強く結合することが明らかとなった。

#### 4. 研究成果

本研究では、βバレルタンパク質のβシート表面に Aβ様アミロイド構造を提示した擬 Aβ提示 GFP を構築し、Aβとの相互作用による Aβの毒性会合体の抑制に成功した。またハンチントン病モデルである polyQ タンパク質を標的として、polyQ 提示 GFP を構築し、設計したタンパク質が polyQ のグルタミン鎖長に依存した結合や、適度に凝集した polyQ 会合体を特異的に認識することを見出した。本研究により、βバレルタンパク質のβシート表面を分子認識場として利用する手法がアルツハイマー病 Aβだけでなく、他のミスフォールディング関連タンパク質にも適用できる可能性が示された。今後は polyQ タンパク質の系についてはより詳細な解析を行い、本手法のさらなる有用性を実証したいと考えている。

#### 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 1 件)

- ① Tsuyoshi Takahashi, Kenichi Ohta, Hisakazu Mihara  
Rational design of amyloid β peptide-binding proteins: Pseudo-Aβ β-sheet surface presented in green fluorescent protein binds tightly and preferentially to structured Aβ.  
*Proteins*, 査読有, 78, 336-347 (2010)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Tsuyoshi Takahashi  
Construction and characterization of artificial peptides and proteins that recognize specific biomolecules.  
*5th International Peptide Symposium, 47th Japanese Peptide Symposium*, 4-9 December, 2010, Kyoto
- ② Yuzuru Kokido, Tsuyoshi Takahashi, Hisakazu Mihara

Construction of proteins having pseudo-polyglutamine (polyQ) surfaces and interaction with polyQ proteins.  
*5th International Peptide Symposium, 47th Japanese Peptide Symposium*, 4-9 December, 2010, Kyoto

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 剛 (TAKAHASHI TSUYOSHI)  
群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・准教授  
研究者番号：90345380