

平成23年4月27日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750172

研究課題名(和文) 多成分蛍光タグ技術によるアミロイドβ結合ペプチドの高効率な探索

研究課題名(英文) A search for peptides binding to assembly of amyloid-beta by novel fluorescence-screening

研究代表者

北松 瑞生 (KITAMATSU MIZUKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：60379716

研究成果の概要(和文)：私は、様々な光で励起することによって様々な光に発光するたくさんの色素(蛍光色素)を色々な配列のペプチドに連結させた。私は、そのペプチドをまとめてアルツハイマー病の原因と考えられているアミロイドβの集合体と水溶液中で混合させた。私は、そのペプチドの中からアミロイドβの集合体により強く結合するペプチドをそのペプチドに連結させた蛍光色素の蛍光発光から一度に見つけることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Many fluorescent dyes that fluoresces by exciting at light of various wavelength were connected to various peptides and these peptides were used as peptide library. These peptides were mixed with assembly of amyloid-beta in aqueous solution. Amyloid-beta is thought to be a causative agent of Alzheimer's disease. Of these fluorescent dye-modified peptides, the peptide bound to amyloid-beta strongly was found by fluorescence patterns of these fluorescent dyes modified to peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学(生体機能関連化学、ペプチド化学)

キーワード：ペプチド、蛍光、アミロイド、ペプチドライブラリー

1. 研究開始当初の背景

Aβ結合性化合物の探索は、アルツハイマー病の診断、治療に非常に重要である。これまで

にもAβ結合性化合物は報告されているが、これらは十分な種類からスクリーニングもしくは最適化されておらず、実用化には十分とは

いえない。(D. M. Skovronsky et al., PNAS, 97, 7609, 2000; C. A. Mathis et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, 295, 2002; M. Sato et al., Chem. Eur. J., 13, 7745, 2007)。これらはまた、開発までに時間がかかるという問題もある。そこで本研究ではA β 結合性化合物の候補としてペプチドを用いる。なぜならば、ペプチドは非常にバリエーションの高い化合物だからである(例えば、6量体ペプチドならば、天然アミノ酸だけで構成したとしても20⁶種類 (=6400万種類)の候補から選択できる)。一般的なペプチドのスクリーニング法としてはファージ法(G. P. Smith et al., Chem. Rev., 97, 411, 1997)があるが、これはスクリーニングの対象となるペプチドよりも極めて大きな担体(ファージ)を用いなければならない。大きな担体はペプチド本来の活性を保持してスクリーニングすることを困難にしており、スクリーニングの効率化、正確性の点で問題となる。またファージ法は、「合成ペプチド」を使用している。その点、本研究で用いた「合成ペプチド」は以下の点で有利である。

- ① D体のアミノ酸が使える。
- ② 非天然アミノ酸に置き換えることができる。
- ③ ペプチド固相合成で容易に合成できる。
- ④ バイアスのかからない完全なライブラリーを構築できる。

2. 研究の目的

本研究は、『種々の蛍光アミノ酸をタグとして持つペプチドを用いた新しい蛍光検出型ペプチドライブラリー法により、アミロイド β ペプチド(以下、A β)の集合体に結合し、A β 集合体の形成を阻害もしくは破壊するペプチドを高精度、高効率、迅速に探し当てる』ことを目的とする。本研究はアルツハイマー病(老人斑アミロイド)の治療薬や分子イメージング(診断)に使えるペプチドを開発す

る技術として非常に期待できる。

3. 研究の方法

A β (1-42)凝集体へのA β 結合ペプチドの結合評価を行った。今回は(A)および(B)の2種類の条件によってA β (1-42)凝集体に結合した蛍光アミノ酸修飾A β 結合ペプチドについて述べる。

(1) A β (1-42)凝集体を形成させた後、蛍光アミノ酸修飾A β 結合ペプチドを加えた場合。

① A β (1-42)溶液(14.4 μ M, 1200 μ L)を4日間、室温で放置した。これによりはじめ無色透明だった溶液内で、繊維状の白色析出物(A β (1-42)の凝集体)が目視できるほどにまで成長した。

② ①の溶液に8種類の全ての蛍光アミノ酸修飾A β 結合ペプチドの入った混合溶液(それぞれ144 μ M)を10 μ L加えた。(これにより終濃度、A β (1-42)が約14.4 μ M, 各蛍光アミノ酸修飾A β 結合ペプチドが約1.2 μ Mとなる。)

③ ②の溶液を4時間室温放置したものを、遠心分離によって沈殿物を回収し、さらに20 μ LのDMSOによって、その沈殿物を再溶解させた。

④ ③のDMSO(ジメチルスルホキシド)溶液のうち5 μ LをMeOH/HEPES(pH=7.4)=1/1v/v 2000 μ Lに加えて、蛍光スペクトルを測定した。

⑤ 測定した蛍光スペクトルを予め測定していたコンポーネントスペクトル(各蛍光アミノ酸修飾A β 結合ペプチドの蛍光スペクトル)によって最小二乗解析することで、④の溶液中の各蛍光アミノ酸修飾A β 結合ペプチドの濃度を求めた。

⑥ 全く同様の過程で0時間、1時間、2時間放置した②の溶液についても解析し、各蛍

光アミノ酸修飾Aβ結合ペプチドの濃度を求めた。

⑦ ⑥の濃度からAβ凝集体に結合した蛍光アミノ酸修飾Aβ結合ペプチドのモル量を算出した。

(2) Aβ(1-42)溶液に予め蛍光アミノ酸修飾Aβ結合ペプチドを加えた後、Aβ凝集体(1-42)を形成させた場合。

① Aβ(1-42)溶液(14.4 μM, 1200 μL)に8種類の全ての蛍光アミノ酸修飾Aβ結合ペプチドの入った混合溶液(それぞれ144 μM)を10 μL加え、4日間、室温で放置した。これによりはじめ桃色透明だった溶液内で、繊維状の桃色析出物(Aβ(1-42)と蛍光アミノ酸修飾Aβ結合ペプチドとの凝集体)が目視できるほどにまで成長した。(これにより終濃度、Aβ(1-42)が約14.4 μM, 各蛍光アミノ酸修飾Aβ結合ペプチドが約1.2 μMとなる。)

② ①の溶液を、遠心分離によって沈殿物を回収し、さらに20 μLのDMSOによって、その沈殿物を再溶解させた。

③ ②のDMSO溶液のうち5 μLをMeOH/HEPES(pH=7.4)=1/1v/v 2000 μLに加えて、蛍光スペクトルを測定した。

4. 研究成果

Aβ凝集体に結合する配列として、Aβ(14-23)(1次構造: HQKLVFFAED)が存在する。この配列のFの部分にPheアナログを導入し、本来の配列よりもAβ凝集体に強く結合するペプチドを探索した。これらのPheアナログが導入された蛍光基修飾ペプチドはペプチド固相合成法により作製し、それぞれのペプチドはMALDI-TOF Massより同定された。

多成分蛍光タグ法によるスクリーニングの結果、予想に反して、Aβ凝集体にペプチドが結合するためには蛍光基が重要であることが分

かった。塩の入っていない溶液中では、蛍光基としてDEAC(diethylaminocoumarin)が結合したペプチドが良く結合した。また、より生理条件に近い塩を加えた溶液中では、蛍光基としてBacd(Benzoacridinoylalanine)が結合したペプチドが良く結合した。しかし、決してペプチド配列が重要でないというわけではなく、Aβ(14-23)配列の配列がAβ凝集体への結合に重要であることもわかり、さらにPheアナログとしてBztを導入したペプチドが良く結合することが明らかになった。今回見つけたペプチドは従来のAβ結合物質であるチオフラビンTとは異なる様式で結合することも明らかとした。

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2件)

① Mizuki Kitamatsu, Kazumasa Akagi, Masahiko Sisido, Prevention of adsorption of fluorescent amino acids to gels by using a peptide containing dendritic amino acids, Chemistry Letters, 査読有, 39, 2010, 1240-1241

② Takamitsu Morikawa, Mizuki Kitamatsu and Masahiko Sisido, Prevention of adsorption of fluorescent amino acids to gels by using a peptide containing dendritic amino acids, Peptide Science 2009, 査読無, 2010, 369-370

[学会発表] (計1件)

① 北松瑞生, A Search for Peptides Binding to Assembly of Amyloid-Beta by Novel Fluorescence-Screening, 第46回ペプチド討論会、2009年11月4日、福岡・北九州国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称: 新規分岐状アミノ酸、新規分岐状ア

ミノ酸と蛍光性アミノ酸の複合体
発明者：北松瑞生
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：特願 2010-216789
取得年月日：2010年9月28日
国内外の別：国内

②名称：新規アミロイドβ凝集体結合性ペプチドおよび新規アミロイドβ凝集体結合性ペプチドを用いたアミロイド病の検査方法
発明者：北松瑞生
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：特願 2009-206771
取得年月日：2009年9月8日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.biotech.okayama-u.ac.jp/labs/ohtsuki/kitamatsu.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北松 瑞生 (KITAMATSU MIZUKI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号：60379716