

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2010年～2011年

課題番号：22651079

研究課題名（和文）蛋白質メカニズムの階層的理解に関する研究

研究課題名（英文）Hierarchical Study on Protein Functional Mechanism

研究代表者：上條 俊介（KAMIJO SHUNSUKE）

東京大学・大学院情報学環・准教授

研究者番号：70334357

研究成果の概要（和文）：タンパク質の機能改変を行うタンパク質工学においては、従来、生化学的研究とインフォマティクス研究が独立に行われている場合が多く、タンパク質のメカニズム解明の新たなブレークスルーのためには、実験とインフォマティクスを相乗的に結びつけ新たな発見に導く融合的研究が必要である。本研究では、実験手法としてのファージディスプレイ法と、情報学的手法としての最適化を組み合わせることにより、アミロイドタンパクの凝集を阻害する新規ペプチドとそれを模倣する低分子化合物を見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：In general protein engineering studies for functional mechanism of biomolecules, experiments using wet materials and informatics using dry computers are independently performed. However, it will be necessary for breakthrough of understanding of protein functional mechanisms to combine the experiments with the informatics methods synergistically. In this study, by using a phage display method as an experiment and an optimization method as informatics, novel short peptides and a small compound were found to inhibit fibrillation and soluble oligomer formation of amyloid  $\beta$  protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,600,000	0	1,600,000
23年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：アミロイド線維、アルギニン、アルツハイマー病、低分子化合物、ファージディスプレイ、ペプチドライブラリー

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能改変を行うタンパク質工学においては、従来、大腸菌やファージを用いる生化学的実験と、コンピューターを用いるインフォマティクス研究が独立に行われている場合が多い。また、病気の原因タ

ンパク質の機能を阻害する阻害剤開発の研究においても、各手法が独立に行われているため、必ずしも効率的な薬剤の発見につながらない例が多い。アルツハイマー病は、高齢化社会における深刻な難病であり、発症機構について不明な点が多く、有効な治療薬はまだ無い。病気の発症原因の一つと考えられて

いるのが、アミロイド線維の生成であり、線維体の形成を阻害することが、病気の発症を抑える一つの手段になると期待されているが、これまで、効果的な薬剤は見出されていない。

## 2. 研究の目的

タンパク質のメカニズムは非常に複雑であり、メカニズム解明の新たなブレークスルーのためには、実験とインフォマティクスを相乗的に結びつけ新たな発見に導く融合的研究が必要である。アミロイド線維の形成を阻害する有効な薬剤の開発が困難である要因の一つとして、アミロイド線維の複雑性が考えられる。すなわち、アミロイド線維は、アミロイドモノマーが積み重なって形成されるが、形成途中の分子量の異なるいくつかのオリゴマーも存在する。それらオリゴマーの中でも、特に、可溶性の 12 量体である **globulomer** は、脳海馬に存在し記憶の長期増強を阻害する等、神経毒性が強いことが最近知られるようになった。この **globulomer** の形成を阻害する薬剤は、アルツハイマー病の治療薬のシードとして有用であると考えられるが、**globulomer** をターゲットとした薬剤開発はまだ報告がない。そこで本研究において、**globulomer** を阻害する化合物を発見することを目的として、以下に示すように、研究を実施した。

## 3. 研究の方法

7, 4, 3 残基のランダムペプチドに相当する DNA 配列 (NNK)<sub>n</sub> (N = A or U or G or C, K = U or G, n=7 or 4 or 3) を T7 ファージ上に構築し、T7 ファージディスプレイ法を用いて、アミロイドβ42 に対するパンニングを実施した。結合の評価は、抗ファージ抗体及び抗 IgG 抗体を用いる ELISA 法により実施した。アミロイドβ42 に結合したファージクローンを定法に従い単離し、DNA シークエンスを受託解析により決定した。DNA 配列から結合ペプチドの配列を明らかにし、受託合成により精製ペプチドを調整した。それらのペプチドとアミロイドβ42 を混合して、SDSPAGE (電気泳動法) を実施することにより、**globulomer** 形成に対する各ペプチドの阻害活性を調べた。

また、ペプチドの阻害活性を定量的に見積もるために、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを実施した。

アミロイド線維に対する阻害活性を調べるために、チオフラビン T (ThT) アッセイを実施した。

また、得られたペプチドの配列情報を基に、オンライン化合物検索システムである SciFinder を用いて、類似構造を有する低分子化合物を検索し、ペプチドの場合と同様に、阻害活性を調べた。

## 4. 研究成果

7 残基ペプチドライブラリーから、これまで報告されたペプチドよりも阻害活性の高い新規ペプチドが見出された (Table 1)。

Table 1

RAPMGGR
RRPVGRA
RLPPKAG
RRPVVGR
RAPARRY
SRPGLRR
VGPRTLRL
RGPRGRV

これらは全て、**globulomer** を阻害することが SDSPAGE 並びにゲルろ過クロマトグラフィーによって明らかになった。

これまで報告されているアミロイド線維化阻害ペプチドの配列は、アミロイドβの内部配列からデザインされた、LPPFD 並びに KQKLLLFLEE であり、今回得られた 7 残基の配列とは相同性がほとんど無い。しかも、デザインされた既報のペプチドは、線維化を阻害するが、**globulomer** は阻害しないことから、今回の 7 残基ペプチドが **globulomer** を阻害する初めてのペプチドである。これらのペプチドは、薬剤としての利用が期待されるが、大きな問題が存在する。それは、分子量が大きすぎ (約 800-1000 Da)、血液脳関門を通過できない、という問題である。また、阻害の機構は不明である。

そこで次に、さらに分子量の小さいペプチドを見出すことと、阻害活性に必要な最低限の要素を導き出すために、3 残基及び 4 残基ライブラリーを構築した。7 残基の場合と同様に、T7 ファージディスプレイ法を用いて、アミロイドβ42 の **globulomer** に対する阻害ペプチドを探索した。

その結果、3 残基及び 4 残基ライブラリーから、どちらもアルギニンを多く含むペプチドが濃縮された。その中でも芳香族アミノ酸を含む 4 残基ペプチド R-F-R-K が、アミロイドβ42 に強く結合し、7 残基と同程度の阻害活性を有することが判明した (Table 2)。

Table 2

3 残基	4 残基
RGR	RRRA
RQR	RGKK
RRY	KAVR
TRR	<b>RFRK</b>
RPR	RRRL
RRA	RSKK
QRR	RRKV
RRG	KRAS

以上の結果から、アミロイド凝集阻害活性に必要な要素として、アルギニンと芳香族アミノ酸が必須であることが示された。

次に、SciFinder にログインし、アルギニンを含む、入手容易な低分子化合物を検索した。2,950 種類の化合物がヒットし、その中から、分子量 500 Da 前後の化合物を 2 種類絞り込んだ。それらの化合物を購入し、アミロイド線維と globulomer の両方の形成に対する阻害活性を調べた。

選択された化合物

1) Z-Arg-Arg-thiobenzyl ester

2) Arg-Arg-7-amino-4-trifluoromethyl-coumarin

いずれもアルギニンを含み、芳香環を分子内に有している分子量約 550 Da の化合物である。

電気泳動の結果、どちらの化合物も、globulomer 形成を阻害することが判明したが、2) の化合物 (RR-AFC) の方が強く阻害し、R-F-R-K と同程度であった。

また、RR-AFC は、分子内に、芳香族性の coumarin 骨格を有しているが、この coumarin は、アミロイド線維を阻害することが知られている。そこで、RR-AFC も、線維化を阻害するのではないかと予想し、ThT アッセイを用いて、線維化阻害について調べた。

その結果、予想通り、RR-AFC は、coumarin と同程度に、アミロイド線維化を阻害した。

以上の結果から、本研究で見出された RR-AFC

は、globulomer と線維の両方を阻害する化合物であることが判明した。この化合物は、アミロイドの毒性を強力に抑える薬剤のリード化合物として、有用であると期待される。

#### 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 Takayasu KAWASAKI and Shunsuke KAMIJO, Inhibition of Aggregation of Amyloid  $\beta$ 42 by Arginine-Containing Small Compounds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有 76 (4), 2012, 762-766, DOI: 10.1271/bbb.110879
- ② Takayasu KAWASAKI, Kenji Onodera, and Shunsuke KAMIJO, Identification of Novel Short Peptide Inhibitors of Soluble 37/48 kDa Oligomers of Amyloid  $\beta$ 42, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有 75 (8), 2011, 1496-1501, DOI: 10.1271/bbb.110198
- ③ Kenji Onodera, Takayasu Kawasaki, and Shunsuke Kamijo, Discovery of Novel Antimicrobial Agents Targeting the Bacterial RNA Polymerase by High-Throughput Virtual Screening, *Chem-Bio Informatics Journal*, 査読有 11, 2011, 52-62, DOI: 10.1273/cbij.11.52
- ④ Takayasu KAWASAKI, Kenji Onodera, and Shunsuke KAMIJO, Selection of Peptide Inhibitors of Soluble  $A\beta_{1-42}$  Oligomer Formation by Phage Display, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有 74 (11), 2010, 2214-2219, DOI: 10.1271/bbb.100388

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**上條 俊介 (KAMIJO SHUNSUKE)**  
東京大学・大学院情報学環・准教授  
研究者番号：70334357

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：