

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590066

研究課題名(和文)フラグメントペプチドを用いたプリオンタンパク質の凝集メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of prion protein aggregation mechanism by using that fragment peptides

研究代表者

秋澤 俊史(Akizawa, Toshifumi)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：30202526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、最初に、21種類の合成フラグメントペプチドの金属結合性をカラムスイッチHPLC法により検討した。続いて、CD解析により、銅イオンとの結合による立体構造変化を測定した。次に、MT1-MMP, MT3-MMP, MMP-7 およびヒト血清によるフラグメントペプチドの分解を解析し、その切断点をLC-MSにより決定した。最後に、ペプチド同士の分子間相互作用(AFFINIX QN)を測定し、hPrP150-159がプリオンタンパク質の凝集に関与している可能性を見出した。現在、プリオンタンパク質凝集の核となるアミノ酸配列の決定と立体構造解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：At first, we investigated the metal-binding ability of 21 synthetic peptides by column switch HPLC system composed of a metal chelate affinity column and an ODS reversed-phase column. Second, the conformational change by copper ion was analyzed by comparison of CD spectra. Third, each peptide was individually incubated with recombinant MT1-MMP, MT3-MMP, MMP-7 or human serum in the presence or absence of copper ion and the cleavage sites determined by LC-ESI-MS. The data obtained from this study suggest that MT-MMPs expressed in the brain might possess the degrading activity of prion protein. Finally, we analyzed the intermolecular interaction of hPrP fragment peptide by using a column switch HPLC system and AFFINIX QN system. The results obtained this experiment suggest that hPrP150-159 may play an important role for aggregation of hPrP. We are now continuously investigating the key amino acid sequence for aggregation of hPrP and NMR analysis.

研究分野：分析化学

キーワード：プリオンタンパク質 フラグメントペプチド 酵素耐性 凝集性 MT-MMP カラムスイッチHPLC

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、伝達性海綿状脳症としても知られる致死性の神経変性疾患であり、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・ストロイスラ・シャインカー症候群(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)およびクールー病、ウシの海綿状脳症(BSE)、ヒツジ・ヤギではスクレイピー、さらにシカの慢性消耗病(CWD)など複数のは乳動物で発症する。主な症状は痴呆、失調症、機能症状として視覚障害、運動障害などが挙げられる。病理所見としては、中枢神経系における脳の空洞化、脳神経細胞のアポトーシスが認められる。プリオン病はタンパク質が病因因子として働く伝染性の疾患と理解されており、脳膜の移植や牛肉の摂取に関して厳しい規制が定められている。

プリオン病の発症は脳内に発現する $\beta$ -ヘリックスに富んだ正常型プリオンタンパク質(PrP<sup>C</sup>)が、一次構造は全く変化せずに二次構造のみが変化し $\beta$ -シート構造が増加した異常型(PrP<sup>Sc</sup>)へと変換されることで発症することが明らかにされている(Prusiner SB, 1998, PNAS)。これらのことより、 $\beta$ -シート構造が PrP<sup>Sc</sup> の凝集性や酵素分解耐性に深く関連していることが予想されるが、立体構造変化のメカニズムは、未だ仮説の域を出ない。現在有力視されている PrP<sup>C</sup> の構造変化モデルとして、(i) PrP<sup>Sc</sup> が PrP<sup>C</sup> を直接構造変化させるとする説、(ii) 脳内に発現する何らかの細胞性タンパク質が関与することで構造が変化するというプロテイン X 説(Telling G, et al., 1995, Cell)などが提唱されているが、いずれも確証は得られていない。また、Cu<sup>2+</sup>などの生体内微量元素が PrP<sup>C</sup> に結合し、酵素分解抵抗性の立体構造へと変化することも報告されている(Quaglio E, 2001, JBC)が、金属とプリオン病発症の関連も不明である。

このようにプリオン病の発症メカニズムの解析が進まない理由として、研究試料としてのプリオンタンパク質の取り扱いの困難さが挙げられる。一般的な伝染性の疾患は、細菌やウイルスにより媒介されるが、プリオン病ではタンパク質である PrP<sup>Sc</sup> が病因因子として伝染するため、組み換え体のプリオンタンパク質を調製して使用することには感染などの危険が伴う。また、PrP<sup>Sc</sup> の立体構造の多様性に加え、難溶性や凝集性という性質が化学的・物理的解析を困難としており、凝集メカニズムの解析を妨げている。

## 2. 研究の目的

プリオン病は正常型プリオンタンパク質が酵素分解耐性の異常型へと構造変化し、脳内に蓄積することが発症原因となる。しかしながら、異常型プリオンタンパク質への構造変化とその凝集メカニズムは未だ不明である。本研究では、プリオンタンパク質の毒性を回避するとともに、その凝集メカニズムを

明らかにすることを目的として、以下の実験を行う。

- (1) ヒトプリオン病由来のフラグメントペプチドの合成と精製
- (2) Cu<sup>2+</sup>結合量の定量測定
- (3) Cu<sup>2+</sup>結合および pH 変化による立体構造変化の解析
- (4) 脳内に発現する膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMPs) による分解と Cu<sup>2+</sup>による酵素分解耐性の獲得
- (5) ペプチド-ペプチド間の結合性も検討
- (6) ペプチド-ペプチド間の重合度の解析
- (7) NMR による立体構造解析

## 3. 研究の方法

本研究では以下の方法を用いる。

- (1) ヒトプリオン病由来のフラグメントペプチドの合成と精製  
ヒトプリオンタンパク質由来の合成ペプチドを、ペプチド合成機を用いて固相法で合成した後、逆相 HPLC により精製する。各ペプチドの分子量は質量分析法により確認する。
- (2) Cu<sup>2+</sup>結合量の定量測定  
第一カラムに金属キレートカラムを第二カラムに ODS カラムを用いたカラムスイッチ HPLC システムを用いて、各フラグメントペプチドの Cu<sup>2+</sup>結合性を定量する。
- (3) Cu<sup>2+</sup>結合および pH 変化による立体構造変化の解析  
各ペプチドに存在するヒスチジンの 2 等量の Cu<sup>2+</sup>を加えて CD により立体構造の変化を確認する。また、様々な pH における立体構造の変化も測定する。
- (4) 脳内に発現する膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMPs) による分解と Cu<sup>2+</sup>による酵素分解耐性の獲得  
脳内に発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MT1-MMP および MT3-MMP) の組換え体を用いて、これらの酵素による分解と Cu<sup>2+</sup>添加による耐性獲得を HPLC により解析する。切断の見られたペプチドについては、質量分析により切断点を同定する。比較酵素として、可溶性の MMP-7 とヒト血清を用いる。
- (5) ペプチド-ペプチド間の結合性も検討  
上記の(1)~(4)の検討より、プリオンタン

パク質の凝集に最も関与していると思われるフラグメントペプチド担体に固定化後、カラムスイッチ HPLC 法により分析することで固定化ペプチドへの他のフラグメントペプチドの結合能を定量測定する。

#### (6) ペプチド-ペプチド間の重合度の解析

プリオンタンパク質凝集の分子メカニズムは、現在のところ、正常型と異常型が 1:1 で凝集するヘテロダイマーモデルと、複数の異常型の凝集体に 1 分子の正常型が結合する核依存性重合モデルが提唱されている。そこで本研究では、(5)で明らかにした分子間結合性を示すフラグメントペプチド同士の重合度を分子間相互作用測定装置 (AFFINIX QN)を用いて解析し、プリオンタンパク質の凝集メカニズムがヘテロダイマーモデルあるいは核依存性重合モデルのうち、どちらのモデルを反映するかを明らかとする。

#### (7) NMR による立体構造解析

上記の(5)及び(6)の結果をもとに、ペプチド単独時の立体構造と  $\text{Cu}^{2+}$  結合時の立体構造変化を NMR 測定により決定する。両者を詳細に比較検討することで、凝集性に直接関与するアミノ酸配列の同定と特徴的な立体構造を見出す。

### 4. 研究成果

本研究において以下のことを明らかにした。

#### (1) ヒトプリオン病由来のフラグメントペプチドの合成と精製

合計 21 種類のフラグメントペプチドを合成・精製した。

#### (2) $\text{Cu}^{2+}$ 結合量の定量測定

従来、微量金属の結合には OP リピート領域が重要であることが知られていたが、中間領域および C 端領域中にも多くの  $\text{Cu}^{2+}$  結合部位が存在することを見出した。

#### (3) $\text{Cu}^{2+}$ 結合および pH 変化による立体構造変化の解析

CD スペクトル法を用いた解析から、中間領域の hPrP150-159 は  $\text{Cu}^{2+}$  により  $\beta$ -ターン構造を形成することが明らかとなった。また、C 端領域中の hPrP175-189 と hPrP193-230 は、 $\text{Cu}^{2+}$  との結合により  $\beta$ -シート構造へと変化することを見出した。加えて、同領域中の hPrP180-192 は、 $\text{Cu}^{2+}$  に関係なく pH6.5~8.0 で  $\beta$ -シート構造を形成することが明らかとなった。

#### (4) 脳内に発現する膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMPs) による分解と $\text{Cu}^{2+}$ による酵素分解耐性の獲得

フラグメントペプチドの酵素分解性と  $\text{Cu}^{2+}$  による酵素分解耐性の獲得を検討した結果、OP リピート領域は MT-MMPs により分解されないことが明らかとなった。

一方、中間領域は MT-MMPs により多くの部位で分解され、かつ  $\text{Cu}^{2+}$  により酵素分解耐性を獲得することが判明した。さらに、C 端領域は MT-MMPs により分解され難く、切断箇所は少なく、かつ  $\text{Cu}^{2+}$  により酵素分解耐性を獲得することを見出した。

以上の結果をもとに、PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への構造変化と神経毒性発現の凝集メカニズムを提案した。

#### (5) ペプチド-ペプチド間の結合性の検討

上記の結果より、これらのフラグメントペプチドがプリオンタンパク質の凝集に関与すると考え、hPrP150-159 を固定化したアフィニティカラムを用いて、カラムスイッチ HPLC 法により、 $\text{Cu}^{2+}$  存在下 / 非存在下で hPrP150-159 と結合するフラグメントペプチドを検討した結果、hPrP169-179、hPrP175-189 および hPrP18-192 のヒスチジンをアラニンに置換した hPrP180-192/HA が結合することが判明した。

#### (6) ペプチド-ペプチド間の重合度の解析

上記(5)の結果より、hPrP150-159 を AFFINIX QN の基盤に固定化して、hPrP180-192/HA と OP-リピート領域のペプチドとの結合性を検討した結果、hPrP180-192/HA が最も強く結合することが確認された。結合様式に関しては現在検討中である。

#### (7)

上記(6)で確認したペプチドに関して、NMR 測定は終了した。今後詳細な NMR 解析を行う予定である。

本研究で得られた結果より、フラグメントペプチドの利用はプリオンタンパク質の凝集メカニズム解析に極めて有用な手段となることが確認できた。また、凝集には C-端側のアミノ酸配列が重要な役割を担っていることが判明し、引き続き、凝集メカニズムの解析を行っている。

### 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 2 件)

Toshifumi Akizawa, Masanari Taniguchi, Aya Kojima, Takaya Nakai and Motomi Konishi, Intermolecular Interaction of Human Prion Fragment Peptides, Peptide Science 2014, 査読有、2015, 169-172

Aya Kojima, Motomi Konishi, Toshifumi Akizawa, Prion Fragment Peptides are Digested with Membrane Type Matrix Metalloproteinases and Acquire Enzyme

Residence through Cu<sup>2+</sup>-binding, Biomolecules 2014, 査読有、2014, 510-526, DOI: 10.3390/biom4020510

〔学会発表〕(計 9 件)

廣瀬玲子、中井貴也、小嶋絢、豊田英尚、谷口将済、小西元美、秋澤俊史、hPrP 由来フラグメントペプチド hPrP150-159 に対する結合部位の検索、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 日～28 日、神戸サンボーホール(兵庫県神戸市)

廣瀬玲子、中井貴也、小嶋絢、豊田英尚、谷口将済、小西元美、秋澤俊史、ヒトプリオンタンパク質由来フラグメントペプチド hPrP150-159 の結合部位の検討、第 31 回関西地区ペプチドセミナー、2014 年 11 月 29 日、関西大学(大阪府吹田市)

Toshifumi Akizawa, Masanari Taniguchi, Aya Kojima, Takaya Nakai, Motomi Konishi, Intermolecular Interaction of Human Prion Fragment Peptides, 第 51 回ペプチド討論会、2014 年 10 月 22 日～24 日、徳島大学(徳島県徳島市)

廣瀬玲子、中井貴也、小嶋絢、豊田英尚、谷口将済、小西元美、秋澤俊史、ペプチド固定化担体を用いた hPrP 由来フラグメントペプチド間の結合性の検討、第 64 回に翻訳学会近畿支部総会大会、2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学(京都府京都市)

秋澤俊史、凝集性タンパク質の酵素分解と耐性獲得の機序におけるフラグメントペプチドの有用性について、BMAS、2014 年 8 月 20 日～21 日、帝京大学(東京都板橋区)

Toshifumi Akizawa, Aya Kojima, Motomi Konishi, STRUCTURAL STUDY OF PRION FRAGMENT PEPTIDES BY CIRCULAR DICHROISM ANALYSIS、33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, 2014 年 8 月 31 日～9 月 5 日、National Palace of Culture (ブルガリア、ソフィア)

中井貴也、廣瀬玲子、小嶋絢、谷口将済、小西元美、秋澤俊史、ヒトプリオン病由来フラグメントペプチド間の結合性の検討、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本大学(熊本県熊本市)

Toshifumi Akizawa, Aya Kojima, Reiko Hirose, Motomi Konishi, Metal binding ability and structure analysis of the

synthetic fragment peptides originating from Human prion protein, The 23<sup>rd</sup> Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine, 2013 年 6 月 21 日、武蔵野大学(東京都西東京市)

廣瀬玲子、小嶋絢、小西元美、秋澤俊史、ヒトプリオン病由来フラグメントペプチド間の結合性の検討、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋澤 俊史 (AKIZAWA Toshifumi)  
摂南大学・薬学部・教授  
研究者番号：30202526

### (2) 研究分担者

小西 元美 (KONISHI Motomi)  
摂南大学・薬学部・准教授  
研究者番号：20229446