

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288079

研究課題名(和文) アミロイド分解能を有するミニチュア酵素の人工設計

研究課題名(英文) Designing miniature enzyme that can degrade amyloid fibrils

研究代表者

田村 厚夫 (Tamura, Atsuo)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90273797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会を迎え、アルツハイマー病などのアミロイド線維と呼ばれるタンパク質線維状凝集体が原因となる病気が深刻な問題となっている。これらの根源的な治療には線維の分解が必要となるが既存技術では実効にはほど遠い。そこで、ペプチドから成る「ミニチュア酵素」を設計し線維分解能を付与させることを目指した。このため、1)その細部の小ささゆえファイバーが張り巡らされた空間にも機敏に入り込み、2)接触困難な固体ファイバーの表面にも粘着部位で接着し、3)その場で初めて活性部位が切断機能を発現する、ようにテーラーメイド設計を推進した。この結果、アミロイド等の線維について特異的分解能を付与することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Amyloidosis has been a serious problem in the aging society. To remedy amyloidosis, the most effective way is to hydrolyze amyloid fibrils. We thus tried to design short peptides having hydrolysis activity against amyloid fibrils. As a strategy for the design, we made the peptide to have the catalytic triad composed of histidine, aspartic acid and serine. Based on the strategy, we synthesized 9 peptides named me1-9. It has been shown that me5 takes the alpha-helical conformation and can hydrolyze amyloid fibrils. We tried to hydrolyze variety of amyloids: beta lactoglobulin, insulin, amyloid beta40, amyloid beta42 and beta 2 microglobulin. It is concluded that the peptide me5 can be regarded as a hydrolase which is capable of hydrolyzing the amyloid fibrils.

研究分野：生体分子化学

キーワード：アミロイド 酵素 ペプチド 人工設計 アルツハイマー ナノバイオ ナノファイバー 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

アミロイドと呼ばれる線維状蛋白質が体内の種々の器官あるいは組織に沈着することにより発症する疾患はアミロイドーシスと総称されている。アミロイドとは、アミロイド や 2 ミクログロブリンなど種々のアミロイド前駆体蛋白質が生体内において凝集することにより形成される蛋白質凝集体の総称であり、いずれのアミロイド前駆体蛋白質から形成されても シートに富んだ特徴的なファイバー構造を有している。

厚生労働省特定疾患調査研究班新分類によれば、アミロイドーシスは全身諸臓器にアミロイドが沈着する全身性アミロイドーシスと、特定の臓器に限局して沈着を認める限局性アミロイドーシスとに分類される。全身性アミロイドーシスとしては、例えば、心臓および手関節等の大関節にアミロイドが沈着する老人性 T T R アミロイドーシス、長期透析患者の骨、関節等に発症する透析アミロイドーシスなどがある。限局性アミロイドーシスとしては、例えば、アミロイドが脳に蓄積するアルツハイマー病やクロイツフェルト・ヤコブ病などの脳アミロイドーシスの他、II 型糖尿病に伴う膵島やインスリノーマにアミロイドの沈着などがある。

アミロイドーシスでは、その発症メカニズムに関してはまだ未解明の点が多いが、共通した性質としてアミロイド蛋白質が凝集・蓄積することによって線維が形成されることで、神経細胞等を破壊し脳や組織の萎縮が起こることが報告されている。しかも、アミロイド蛋白質の凝集は症状が認められる数十年前から起こることが知られている。

このように長期に渡り深刻な症状の進行を見せるアミロイドーシスに対する治療薬は神経賦活作用が主要であり、アミロイド蛋白質の除去を目的とした根源的なものではないので対処療法に過ぎず、その効果はきわめて限定的である。アミロイド蛋白質の凝集抑制、

あるいは凝集したアミロイド蛋白質の分解除去が可能な薬剤こそが、アルツハイマー病の予防および治療における原因治療薬となり得る。

2. 研究の目的

そこで本申請では、アミロイドーシスの根治を目指すため、アミロイド線維のみを特異的に分解する小型のミニチュア酵素の人工設計を進めることとした。以前私共は、小型のペプチドで構成される、エステル結合を加水分解するミニチュア酵素の設計に成功していた。この中のある1つがアミロイド線維の分解能を有することを偶然発見した(特願2013-222702)。この機能を発展させるため、1) その細部の小ささゆえファイバーが張り巡らされた空間にも機敏に入り込み、2) 接触困難な固体ファイバーの表面にも粘着部位で接着し、3) その場で初めて活性部位が切断機能を発現する、よう線維に特化したテラーメイド設計を推進する。

また、これらはリニアなペプチドを会合させることで形成しているが、より効率性を高めるため、環状でナノチューブ形態となるものを候補として加えた。これらは、環状ペプチドが積層することで構成されるペプチドナノチューブとなり、内部に機能発現空間を保有する新たな構造体である。

対象とするアミロイド線維となるタンパク質としては、アルツハイマー病のアミロイドを中心とし、ミニチュア酵素が働く最も適切な条件を特定し、その反応機構を解明することを目指した。特に、通常分解困難な線維体を分解すること自体が画期的なため、種々の条件下で徹底的に実験を繰り返して再現性を徹底的に確認することも大切である。

さらに、研究の進展に伴い、機能がなぜ発現するのか、そのメカニズムの解明の大切さがクローズアップされてきた。機能メカニズ

ムが解明されれば、ミニチュア酵素の改良に明快な指針がもたらされるからである。この際、ペプチド（タンパク質）が本来ある温度で持っている熱エネルギーと、ペプチドを取り巻く水分子の挙動が重要であるとの知見が得られている。そこで、これらを検出する新たな物理化学的手法の開発および測定解析を行うことを行うこととした。

3. 研究の方法

実験的な設計指針としては、まずアミノ酸数28程度からなり、らせん状のヘリックス構造を取る構造体とした。ヘリックスが2本あるいは4本束になるバンドル型の会合体を基本構造とし、活性部位のアミノ酸 Ser, His, Asp の所謂 catalytic triad を導入したりニアペプチドの改良を行った。名称としては、ミニチュア酵素 (miniature enzyme) から、me を取り、me1 を出発点として改良したものを順に me2, me3 などと呼称することとした。ペプチドについて得られた立体構造の解析に基き、[1]活性部位アミノ酸配置の最適化、[2]線維接着部位の性質および大きさの改変、[3]ヘリックス構造本体の安定化、を行った。設計 合成と精製 構造解析 機能測定 評価および再設計、のサイクルで改善を数回繰り返した。構造解析は、核磁気共鳴測定などの分光測定解析を駆使して行い、機能測定は生化学的手法で行った。以上より得られたポジティブなデータのみならず、機能低下した場合のネガティブなデータも貴重な情報となるので、総合して最適アミノ酸配列設計の指針、即ちどの部位がどう働いて機能を果たしているのかのマップを確定する。

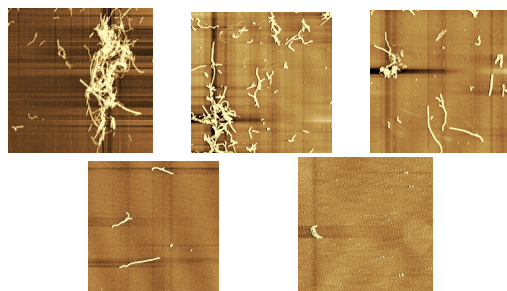
続いて、環状ペプチドを積層させナノチューブ化することで、環の内部空間を反応部位とする空間設計を行った。また、ペプチドナノチューブの外面に反応部位を保持させることの可能性も検証した。これは上記リニアペプチド会合体でも、ペプチド間に存在する空間で反応することと同義である。環状ペ

チドとの構造の差異により、新たな機能向上も期待される。

さらに、機能発現メカニズムの解明について、新たにテラヘルツ領域の光を用いた物理化学的解析を適用した。この領域の分光測定の利点としては、機能に直接関与するタンパク質（ペプチド）分子のダイナミクスが検出できる点がある。ペプチド分子の周囲に存在する水分子が機能発現に必要なのは言うまでもないが、この分光法を一定量の水分子存在量で観測することで、その重要性を浮き彫りにする。特に、温度を極低温から大きく変化させることで、熱エネルギーがペプチドのダイナミクスにどのように影響し機能発現に関与しているのかを明確にする。

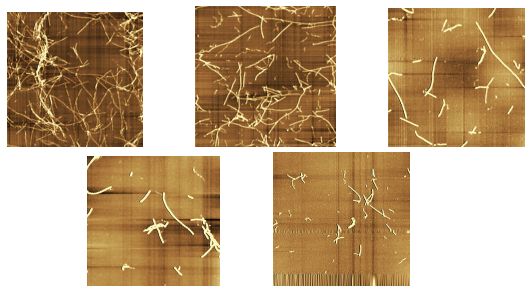
4. 研究成果

アミロイド分解能について、多くの測定実験を重ねた。その中で、実際に線維を「見る」ことを原子間力顕微鏡で達成したものを以下に図に示す。この図で、上段左がミニチュア酵素添加前のアミロイドベータタンパク質から成るアミロイド線維、中央が添加後一定時間経過後の変化（1, 10, 60 min, および一日後）を示す。この図で、一辺は5マイクロメートル、線維の直径は10ナノメートル前後である。



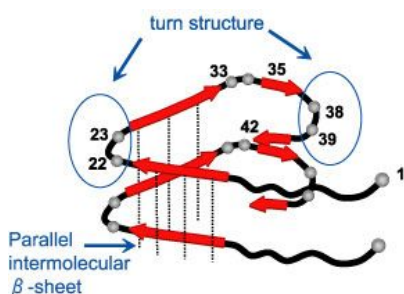
初めに存在した線維は、時間が経つにつれて分解し、1日後にはほとんど存在していないことがわかる。この点で、アミロイド線維を分解するペプチドの創製に世界に先駆けて成功したこととなった。ただし、ミニチュア「酵素」であることを証明するためには、触媒量で機能を発揮することが必要である。実際、上記はアミロイド とミニチュア酵素を

等モル混合している所謂ストイキオメトリックな反応条件であった。そこで、ミニチュア酵素を百分の一量に減らして同様に経時変化を原子間力顕微鏡で形態を追跡した所、下記のようになった。



経過時間は先程と同じで最後のみ2日後である。1日以上経った後の残余物は多少多目ではあるが、やはり数十分というタイムスケールで劇的に線維が減少したことが見て取れる。つまり、設計したペプチドは少量でも十分機能する酵素であると見做すことができた。

次に、分解メカニズムを解明するために、アミロイド のどの部分が加水分解されたのかを質量分析によって明らかにすることとした。このため、ミニチュア酵素添加後に時間を追って反応溶液をサンプリングし、LC-MS によって分解物の分子量を明らかにしていった。分子量より、どの部位で切断を受けて生じたペプチド断片であるかを確定し、アミロイド の構造図上に切断サイトをマッピングしたものが下記の図である。



ここで、丸印で示した部分が切断サイトであり、特徴としては赤矢印で示した シートと呼ばれる固い構造上を切断するのではなく、ターンと呼ばれる比較的柔らかい折り返し部分を切断している。これは、自然界の酵素

と同様、固い部分は「食べにくく」、柔軟でダイナミックに動いている部分にアタックしていることを示していると考えている。

環状ペプチドを構成単位とするペプチドナノチューブの機能化については、環内部の配位空間にどのような物質を取り込むことができるかの可能性開拓を行った。現在までの所、金属や錯体イオン、薬剤などの低分子性芳香族化合物を「選択的」に取り込むことに成功している。人工設計したペプチドであっても生体物質特有の高選択性を獲得可能なことを示したものである。現在、アミロイドタンパク質のみを選択的に認識することが可能か試行錯誤している段階である。

次に、機能発現メカニズム解明につながる、新たな物理化学的測定解析法の開拓について述べる。このペプチドが酵素として機能するためには、分子がダイナミックに動くことが必須である。機能に必要な動き、即ちダイナミクスはこのような大きな揺らぎで構成されているはずであるが、その検出法は極めて限られている。そこで、私共はテラヘルツ領域の周波数成分を有する分光測定を行うこと、その際、乾燥したペプチドからスタートして、水分含量を増加させていくことで大きな揺らぎを誘起し、かつ「加水」分解に必要な水分子そのものの数も増加させることで、ダイナミクスと機能発現に必要な熱運動モードを検出した。この測定を 100K 程度の低温から 280K 程度の室温に至るまで温度変化させて行い、熱エネルギーとの相関を詳細に調べた。この結果、機能発現に必要なと考えられてきた、200K 付近の所謂ガラス転移温度で出現するアンハーモニックなダイナミクスについて、新たな分子論的描像を得ることができた。

なお、研究自体の最終目標としては、実際にヒトに投与することでアルツハイマー病を根治することである。そのため、実験室内 (in vitro) だけでなく、生体内 (in vivo)

での有効性を示す必要がある。この点で、in vivo での実験システムを保有している他大学との共同研究を開始した。

以上すべてをまとめると、アルツハイマー病の原因とも言われるアミロイド線維を分解するミニチュア酵素の創製に世界で初めて成功した。その機能発現メカニズムでは、ダイナミクスが重要であり、その一端を明らかにすることができたと言える。

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)

Naoki Yamamoto & Atsuo Tamura (2014) Designing Cell-Aggregating Peptides without Cytotoxicity. *Biomacromolecules* **15**, 512-523.

Naoki Yamamoto, Tomoyo Andachi, Atsuo Tamura, & Keisuke Tominaga (2014) Temperature and hydration dependence of low-frequency spectra of lipid bilayers studied by terahertz time-domain spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 9359-9368.

Naoki Yamamoto, Kaoru Ohta, Atsuo Tamura, & Keisuke Tominaga (2016) Broadband Dielectric Spectroscopy on Lysozyme in the sub-Gigahertz to Terahertz Frequency Regions: Effects of Hydration and Thermal Excitation *J. Phys. Chem. B*, **120** (21), pp 4743-4755 (2016)

山本直樹、太田薫、田村厚夫、富永圭介 (2016) タンパク質の動的挙動に及ぼす水とおよび熱活性の影響, 応用物理, 85, 689-692.

[学会発表](計18件)

Naoki Yamamoto, Shoko Tsuchida, Atsuo Tamura, Eri Chatani, Role of prefibrillar intermediates of insulin B chain in its amyloid fibril formation, 動的秩序と機能第5回国際シンポジウム, 東京大学駒場キャンパス, 2017,01

Naoki Yamamoto, Shota Ito, Kaoru Ohta, Atsuo Tamura, Eri Chatani, Hideki Kandori, Keisuke Tominaga, Protein

Hydration Dynamics Studied by Broadband Dielectric Spectroscopy, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 淡路夢舞台国際会議場, 2016,12

Yoshihiro Iida, Atsuo Tamura, Artificially designed peptides that degrade amyloid fibrils., The Protein Society 2016 Annual Symposium, The Protein Society, Baltimore, MD, USA", 2016,07,

Yoshihiro Iida, Atsuo Tamura, Design of peptides that specifically bind to the rare metal, 第54回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016,11

齋藤 康平, 田村 厚夫, ドラッグデリバリーを志向したペプチドナノチューブの分子設計, 第89回日本生化学会大会, 日本生化学会, 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス, 2016,09

山本 直樹, 津原 祥子, 田村 厚夫, 茶谷 絵理, 線維前駆中間体を經由したアミロイド線維形成機構 - インスリン B 鎖が形成する初期会合体のキャラクタリゼーション -, 第16回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016,06

Naoki Yamamoto, Eri Chatani, Atsuo Tamura, Keisuke Tominaga, Temperature and Hydration Dependence of the Complex Dielectric spectra of proteins at GHz and THz regions obtained by THz Time-domain spectroscopy and dielectric spectroscopy, AWEST2015, 淡路夢舞台国際会議場, 2015,06,

齋藤 康平, 田村 厚夫, 薬剤候補化合物を内包する自己集合ペプチドなチューブの分子設計, 第88回日本生化学会大会, 神戸国際会議場, 2015,12,

田村 厚夫, 飯田 禎弘, アミロイド線維分解能を持つミニチュア酵素の人工設計, 第3回日本アミロイドーシス研究会学術集会, ,

東京都(KKR ホテル東京),2015,08

田村 厚夫, 機能性ペプチドの人工設計: アミロイド分解能を持つミニチュア酵素の創製へ, ライフサイエンス ワールド 2015 (第 12 回アカデミックフォーラム) 東京ビッグサイト, 2015,05

飯田 禎弘, 田村 厚夫, Hydrolysis of lipid droplets by artificially designed peptides, 第 53 回日本生物物理学会, 金沢, 2015,09

田村 厚夫, (招待講演) 新機能を有するペプチド分子の人工設計: アミロイド分解能とレアメタル結合回収能, 第 33 回シーズ公開会, 大阪科学技術センター, 2015,02

田村 厚夫, (招待講演) 人工設計ペプチドを用いたレアメタルのリサイクル&センシング, 平成 26 年度「大学発! 環境技術シーズ発表会」, 近畿経済産業局, 大阪市北区阪急ターミナルビル 17F, 2014,12

田村 厚夫, (招待講演) ペプチドデザイン技術を用いた新規機能性物質設計: レアメタルリサイクルとアミロイド分解, ライフサイエンス分野における先進研究 ~ 機能性材料とその加工技術を中心に 新化学技術推進協会会議室(東京都), 2014,10

枝川 朝子, 田村 厚夫, 球状中空構造を有するペプチド集合体の分子設計, 第 87 回日本生化学会大会, 2014,10

Keisuke Ogihara, Atsuo Tamura, Design of a peptide nanotube having the capability of rare metal binding./Hydrolysis of amyloid fibrils by artificially designed peptides, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014,09

Naoki Yamamoto, Atsuo Tamura, Keisuke Tominaga, Temperature and Hydration Dependence of Complex Dielectric Spectra of Lysozyme from GHz to THz Frequency Region, 8th International Conference on Broadband

Dielectric Spectroscopy and its Applications, Wisla, POLAND, 2014,09,

Yoshihiro Iida, Atsuo Tamura, Hydrolysis of amyloid fibrils by artificially designed peptides, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014,09

〔図書〕(計 1 件)

田村厚夫 選択的レアメタル/アース回収能を持った人工設計ペプチドの創製 バイオベース資源確保戦略 -都市鉱山・海底鉱山に眠る貴金属・レアメタル等の分離・回収技術-Strategies for Ensuring Stable Supplies of Resources on the Basis of Biotechnology -Separation and Recovery Technologies for Precious and Rare Metals Untapped in Urban and Submarine Mines- (2015) 小西康裕監修 203-211, CMC 出版

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)
名称: アミロイド分解能を有する人工ペプチドおよびその利用
発明者: 田村厚夫、飯田禎弘
権利者: 国立大学法人神戸大学
種類: PCT
番号: JP2014/078053
出願年月日: 2014/10/22
国内外の別: 国外

取得状況(計 1 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

田村 厚夫 (TAMURA, Atsuo)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 90273797