

蛋白質工学的なアプローチによるアミロイドの基本骨格構造形成の 物理化学的基盤の解明

岡崎統合バイオサイエンスセンター
真壁 幸樹

1. 目的

アルツハイマー病などの神経変性疾患に関与していると考えられている蛋白質の凝集体、アミロイドの形成機構に関する分子レベルでの理解は治療薬開発において極めて重要である。しかしながら、アミロイド繊維はタンパク質もしくはペプチドが自己組織化して生成した不溶の凝集体であるために通常の溶液系の測定方法を用いることが出来ず、アミロイドの構造形成原理などが分かっていない。この限界を乗り越えるために、我々は最近、蛋白質工学的アプローチを用いてアミロイドの基本骨格構造(cross- β 構造)を、一般的な測定系が適用可能である球状蛋白質中に構築することに成功した(CBM(cross-beta mimic)と命名;参考文献1)。本研究ではこのようにして作製されたCBMをモデルシステムとして用いて、cross- β 構造形成の物理化学的基盤を明らかにする。これによって、なぜ多くの蛋白質が本来の構造とは異なるアミロイド構造へ変化することが可能なのかを解明する。cross- β 構造形成の配列・構造・安定性相関を明らかにすることは、分子論に基づいた病態の理解において重要である

2. 実験方法

アミロイドなどの自己組織化したペプチド繊維は基本骨格として広くcross- β 構造を持つ。本研究ではこの基本骨格を球状蛋白質中に取り込んだ人工蛋白質(CBM)をモデルシステムとして用いて、cross- β 構造がどのように形成し、安定化しているのか明らかにする。CBMのcross- β 構造部位がどのようにして安定化しているのかアラニンスキャニング法を人工蛋白質のcross- β 構造部位に導入し、構造-安定性がどのように変化するか調査した。

どのような側鎖-側鎖相互作用に基づいて cross- β 構造が安定化されているのかを明らかにするために CBM を用いて、アラニンスキャニング法を行う。アラニンスキャニング法とは蛋白質中の側鎖残基を一つ一つアラニンに変異させた変異体を作製し、蛋白質の構造や機能にとって重要な残基を部位特異的に同定する方法である。この方法を CBM に適用することで、cross- β 構造における部位特異的な側鎖の役割を明らかにする。これまでもアミロイドを形成する A β (1-40)蛋白質のアラニンスキャニングの報告があるが、多分子が会合しているアミロイドを直接、測定しているため詳細な構造情報に基づいた理解は困難であり、さらに一つ一つのストランド特異的に変異を導入することは原理的に不可能であった。我々の系では、CBM の構造は既知であり、原子レベルでの構造情報に基づいた側鎖の効果を評価できる。また、部位特異的な変異が可能であるため、例えば、一つのストランドだけ特異的にアラニン変異をかけることが出来る。これは従来の方法では不可能であり、ストランド-ストランド間の側鎖相互作用がどのように安定化に寄与しているか明らかに出来る。CBM は側鎖ラダーとしてフェニルアラニン-ロイシンの繰り返し配列を持ち、それぞれの残基に対して系統的にアラニンへ変異させる。構築した変異体の会合状態を分析ゲル濾過クロマトグラフィーによって評価する。合わせて、以前に構築した結晶化システムを用いて、X 線結晶構造解析をそれぞれの変異体に対して行う。目的蛋白質は大腸菌の組み換え蛋白質として発現させた。

3. 結果

LFLFLFLFラダー配列のフェニルアラニンをもつ、3つ、4つアラニンに置換した変異体を構築した。これらの変異体は大腸菌組み換え体として培地1リットルあたり30mg以上発現し、LFラダー変異体と同様に高い純度で精製できた。サイズ排除クロマトグラフィーを用いて、これらの変異体の会合状態を測定したところ、ひとつでもフェニルアラニンがラダー上にあれば二量体を形成できることが分かった(図1)。すべてのフェニルアラニンをアラニンに変異させた変異体ではほぼすべての分子が単量体となった。また、アラニンスキャニング変異体の結晶化に成功し、構造解析を行った。得られた構造からアラニンへの置換が二量体を形成する界面にキャビティを作り出していることが明らかになった(図2)。このキャビティの形成にもかかわらず、 β シートが重なって二量体になっている全体構造には変化がほとんどなかった。

4. 考察

LFラダー変異体の結晶構造から4つのフェニルアラニンが向かい合うロイシンと相互作用することが β シート二量体化の鍵であると考えていたが、今回の結果からフェニルアラニンが一つでもあれば二量体化構造が維持されていることが分かった。わずかな相互作用が維持されていればクロス β スパイン構造は維持できるのかもしれない。この基本骨格を維持するのに必要な相互作用は思った以上に少なくてもよいということは、アミロイド構造形成のための特異的な配列要求性が低いことを表している可能性がある。今後は様々な配列を導入して構造が形成する仕組みを明らかにしていきたい。

5. 参考文献

1. Biancalana M, Makabe K, Koide S.

Minimalist design of water-soluble cross-beta architecture.

Proc Natl Acad Sci U S A. **107**, 3469-3474, 2010

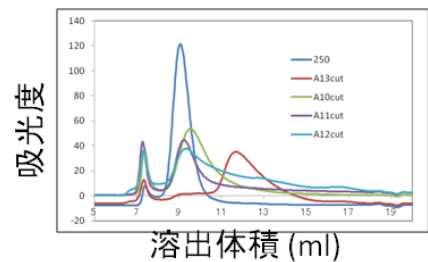


図1 ゲル濾過クロマトグラフィーによる、変異体の会合状態の決定。11.5 ml付近が単量体の溶出体積。9 ml付近が二量体の溶出体積。フェニルアラニンをすべて変異させた変異体(赤)は単量体の所にピークがある。

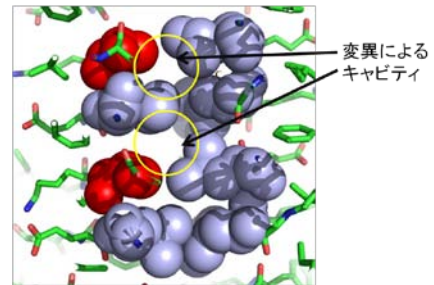


図2 アラニンスキャン変異体の結晶構造。二量体を形成する界面を拡大して示している。ストランドラダーを形成する残基を紫の実体球模型で示した。アラニンに変異させた残基を赤で示す。フェニルアラニンの芳香環が位置していた所に黄色い円で示した、キャビティが形成しているのが分かる。