

# アミロイド形成配列を導入した $\beta$ シートモデルタンパク質の詳細構造評価 Structural characterization of beta-sheet model proteins with amyloid forming peptide sequences

真壁幸樹\*, 堀裕基

山形大学大学院理工学研究科バイオ化学専攻, 〒992-8510 山形県米沢市城南 4-3-1 6

Koki Makabe\* and Yuki Hori

Yamagata University, 4-3-16 Jyonan, Yonezawa, 992-8510, Japan

アミロイドはタンパク質本来の天然構造が壊れて自己組織化した、 $\beta$ シートに富んだ線維状凝集体である。分子構造の解明が進められているが、試料が固体で不均一であるため困難であった。本研究ではアミロイドを形成する短いペプチド配列を  $\beta$  シートに富んだモデルタンパク質中に移植し、結晶構造解析から詳細構造を明らかにした。作製した変異体の分子構造からアミロイド形成配列は  $\beta$  シートを大きく捻れさせることが明らかとなった。

## 1 はじめに

アルツハイマー病に関与していると考えられている脳老化蛋白質の凝集体、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。高い社会的要請があるにも関わらず、どのようにしてアミロイドが形成しているのか、立体構造に基づいた物理化学的な理解についてはほとんど進んでいない。その原因は、試料が (1) 多様で不均一な会合状態を持ち、(2) 不溶性の固体であり、従来の溶液論的測定法が適用できないためである。

この限界を乗り越えるために、我々は蛋白質工学的アプローチを用いてボレリア由来 Outer Surface Protein A(OspA; 図1左)を改変し、アミロイドの基本骨格構造(cross- $\beta$  構造)を OspA 蛋白質中に構築した (Peptide Self-Assembly Mimic; PSAM、図1中、右、参考文献参照)。PSAM は OspA の  $\beta$  シート領域を疎水的な残基であるフェニルアラニン-イソロイシンに置換することで  $\beta$  シートの二量体化、つまり cross $\beta$  構造が誘導された。PSAM は可溶の球状タンパク質であるために、結晶化を含む通常のタンパク質試料の測定が可能である。本研究ではこのようにして作製された人工蛋白質をモデルシステムとして用いて、この基本骨格形成の構造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をめざした。

今回の研究課題では前回の共同利用実験 (2013G024) で得られた結果を引き継ぎ、詳細な構造形成原理の解明を目指した。

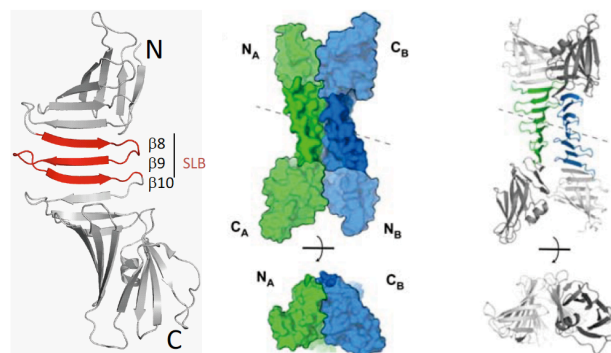


図1 (左) モデルタンパク質として用いる OspA の結晶構造。(中) クロス  $\beta$  構造を模倣した変異体。(右) この変異体では  $\beta$  シートが会合しているのが分かる [1]。

## 2 実験

我々は結晶化抵抗性である OspA (図1左)に、表面残基の変異を導入することで、容易に高分解能の結晶が得られることを報告した (Protein Science 2006)。これまでに 40 以上変異体の構造決定に成功しており、本課題においても迅速に結晶を作製できる。加えて、OspA は大腸菌の組み換え体発現として培地 1 リットルあたり数十 mg 程度発現し、比較的に大量のサンプル量を必要とする X 線結晶構造解析に適したモデル蛋白質である。

PSAM の cross- $\beta$  構造部位がどのようにして安定化しているのかアミロイドを形成することが既知である短いペプチド配列を人工蛋白質の cross- $\beta$  構造部位に移植し、構造-安定性がどのように変化するか調査した。

アミロイドを形成することが既知である、ペプチド配列として、 $\alpha$  クリスタリン由来配列 VLGDV、インシュリン由来配列 LYQLE を用いた。これらのペプチド配列を CBM のストランド 8、9 へ導入し

た変異体を構築した。 $\alpha$ クリスタリン由来配列をストランド9へ導入した変異体を $\alpha$ Cry1、ストランド8、9両方へ導入した変異体を $\alpha$ Cry2、インシュリン由来配列をストランド9へ導入した変異体をIns1、ストランド8、9両方へ導入した変異体をIns2とそれぞれ命名する。

それぞれの変異体を大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し一晚培養し、組換えタンパク質を得た。Ni-NTAカラムを用いて精製を行い、N末端側にあるポリヒスチジンタグをスロンピン処理で切断・除去した。

得られた試料をサイズ排除クロマトグラフィーで分子状態を評価し、尿素変性剤変性による安定性測定、X線結晶構造解析を行った。

### 3 結果および考察

サイズ排除クロマトグラフィーの結果、ストランド9にのみペプチド配列を導入した $\alpha$ Cry1とIns1は野生型と同様に単量体として存在していることが分かった。二つのストランドへペプチド配列を導入した $\alpha$ Cry2とIns2は単量体と可溶の凝集体の混合状態で発現したが、ゲルろ過分離によって単量体成分のみを単離すると単量体として安定に存在していた。このことからアミロイド形成配列をモデルタンパク質中で凝集を防いだ状態で維持できていることが分かる。

変性剤変性による安定性測定から、これら4種類の変異体は野生型と比較して不安定化していた。しかし、尿素濃度が低いところでは天然構造を保持していることが示された。

4種類の変異体について、結晶化スクリーニングによる結晶化条件の探索と条件の最適化を行った結果、 $\alpha$ Cry1とIns1で良好な単結晶を得ることに成功した。KEK-PFの共同利用によってX線回折データを収集し、 $\alpha$ Cry1で1.9Å、Ins1で1.8Åの分解能で結晶構造を決定できた(図2)。

変異体の結晶構造を野生型構造に重ね合わせを行うと、変異導入部位の $\beta$ シートの所で大きく構造が変化しているのが観察できた。

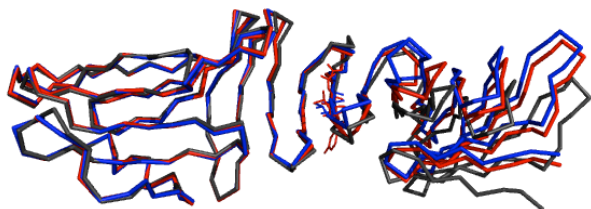


図2 野生型(グレー)、 $\alpha$ Cry1(青)およびIns1(赤)のC末端ドメインでの重ね合わせ。変異導入部位から大きく構造が変化しているのが分かった。

### 4 まとめ

モデルタンパク質中の $\beta$ シートを構成する $\beta$ ストランドをアミロイド形成配列に置換するという、大きな変異導入

にかかわらず、構築した変異体は単量体として安定に存在し、変性剤非存在下では天然構造を有していることが分かった。これはモデルタンパク質がアミロイドなどの凝集形成からペプチド配列を有効に保護していることを示している。

$\alpha$ Cry1とIns1の結晶構造と野生型構造の比較から、変異導入部位で $\beta$ シート構造が大きくねじれていることが明らかになった(図2)。これはたった一本の $\beta$ ストランドによって、劇的な $\beta$ シート構造の変換がおこせることを示している。このような構造変化を誘導するようなペプチド配列が通常の蛋白質をアミロイドへ変換する中心的な部位になっている可能性が考えられる。

現在、以上の結果を原著論文として投稿するために準備を進めている。

### 謝辞

PFタンパク質結晶構造解析ビームラインのスタッフの皆さんが使いやすい測定環境をいつも提供してくださるおかげで、今回の成果を得ることが出来ました。感謝いたします。OspA発現プラスミドを恵与してくださった、ニューヨーク大学小出昌平博士に感謝いたします。

### 参考文献

[1] K. Makabe et al., *PNAS* **8**, 3469 (2010)

\* makabe@yz.yamagata-u.ac.jp