

研究テーマ (和文) AB		タンパク質工学的アプローチによるアミロイドの構造形成原理の解明			
研究テーマ (欧文) AZ		The structure formation mechanism of amyloid revealed by a protein engineering approach			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓)マカベ	名)コウキ	研究期間 B	2012 ~ 2013 年
	漢字 CB	真壁	幸樹	報告年度 YR	2013 年
	ローマ字 CZ	Makabe	Koki	研究機関名	山形大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		山形大学大学院理工学研究科・准教授			
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)					
<p>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。しかしながら立体構造に基づいたアミロイドの各残基の役割に関してはほとんど理解が進んでいない。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困難であるためである。この問題を乗り越えるために我々はアミロイドの基本構造を球状蛋白質へ移植したモデル蛋白質を作製した(PNAS 2010)。本研究ではこのモデル蛋白質に様々な変異を導入し、どのようにしてアミロイドの基本構造が形成しているのか解明を目指した。</p> <p>モデル蛋白質中のロイシンフェニルアラニンラダーをアラニンへ系統的に変異させ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。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。</p> <p>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ていた以上に少なくてよいということは、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。</p>					
キーワード FA	蛋白質	蛋白質デザイン	アミロイド	β シート	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

The formation mechanism of amyloid is still elusive. The reasons of the difficulty are (1) Heterogeneity of the amyloid specimens and (2) the solid nature of the specimens. Such properties hamper the application of the general analytical methods used for soluble samples. To overcome these difficulties, we have been developed a protein engineering method using beta-rich globular protein. We have already reported the success of the capture of the amyloid core structure into a globular protein (PNAS 2010). In this study, I modified this model protein into the amyloid core structure and investigated the structure formation mechanism of amyloid.

We have mutated the Phe residues in the Leu-Phe ladder with alanine. We mutated to alanine by the stepwise manner and we have successfully purified these mutants. The alanine mutants shows that if there is only one Phe residue the dimer structure retains. Then we determined the crystal structure of the ala mutant. The structure reveals that the mutation induces a cavity between the two sheets. We speculate that the minimum interaction is enough to maintain the amyloid core structure.