

氏 名	上野 幸香
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学 位 記 号 番 号	博理工甲第 829 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	Study on identification of novel A $\beta$ 42-binding peptides through the development of the universal methodology (新規 A $\beta$ 42 結合ペプチドの取得およびその方法開発研究)
論 文 審 査 委 員	委員長 教 授 西垣 功一 委 員 教 授 坂井 貴文 委 員 特任教授 伏見 譲 委 員 准 教 授 根本 直人 委 員 准 教 授 松岡 浩司

## 論文の内容の要旨

アルツハイマー病 (AD) は認知機能が進行性に低下する神経変性疾患であり、その病理所見として老人斑や神経原線維変化がある。老人斑はアミロイド  $\beta$  (A  $\beta$ ) が細胞外に沈着したものであり、神経原線維変化は過剰にリン酸化されたタウタンパク質が神経細胞内に蓄積したものである。A  $\beta$  42 の会合体に関する研究はこれまで様々な観点から行われてきており、種々な有害オリゴマーの報告があるが、まだ統一の見解が確立していない現状である。そこで我々は最も基本的なモノマーの重合初期段階に着目し、その段階で作用するペプチドの取得を目指した。

ペプチド取得方法として、進化分子工学的手法を用いた。進化分子工学によって有用な分子を取得するためには、高品質な一次ライブラリーは必要不可欠である。そこでまず 20 種類のアミノ酸の出現頻度に偏りのない、オクタペプチドライブラリーの作製を試みた。ライブラリー作製方法として、すでに我々の研究室において確立されている Y 連結ブロックシャフリング (YLBS) 法を採用し、各アミノ酸ブロックの初期投入量に傾斜をかけることで、出現頻度の偏りを改善することに成功した。

この様にして作製した一次ライブラリーから、cDNA ディスプレイ法により A  $\beta$  42 に結合するペプチドを選択したが、結合はあまり強くないと推測評価された。

そこで、より強く A  $\beta$  42 に結合するペプチド取得のために、プロテアーゼの活性調節ペプチドの取得においてその有用性が示されてきた発達ライブラリー法を適用した。具体的には、一次ライブラリーから選択されたペプチドのコンセンサス配列を 4 アミノ酸に分割し、このブロックを YLBS 法により連結することによって ASAC (all-steps-all-combinations) ライブラリーを作製した。この二次ライブラリーにおいては、設計的に発生する配列以外に非設計的配列をも含み、分子多様性が増大している。

選択されたペプチドの特性を解析するために、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法、ゲルシフトアッセイ、細胞毒性阻害実験を行った。SPR 法により算出した二次ライブラリーセレクション産物の解離定数は  $10^{-8} \sim 10^{-6}$  M であり、すでに報告されている A  $\beta$  42 結合分子と比べ遜色のない強い結合強度であった。また、一

次ライブラリーセクション産物と比較して、二次ライブラリーセクション産物の A $\beta$  42 に対する結合力は有意に上昇しており、発達ライブラリー法の有用性を支持するものとなった。

ゲルシフトアッセイによる蛍光標識 A $\beta$  42 とペプチドのインキュベーション産物泳動実験から結合が認められ、さらに SDS 処理試料の泳動実験から A $\beta$  42 のオリゴマー化を促進しているペプチドの存在が確認された。つまり、結合様式の異なるタイプの複数のペプチドの取得に成功したといえる。

また、A $\beta$  42 による細胞毒性におけるペプチドの効果を調べる実験から、A $\beta$  42 の細胞毒性を緩和する傾向が示唆された。

次に、選択された A $\beta$  42 結合ペプチドの応用として、ペプチド利用型 ELISA (pep-ELISA) の開発を行った。方法開発に当たっては、現時点で評価系の確立しやすいカテプシン E をモデルとして採用した。カテプシン E はアスパラギン酸プロテアーゼであり、TRAIL の切出しによりガン細胞をアポトーシスへ誘導することが知られている。pep-ELISA システム構築の後、生物試料に関してカテプシン E 量を測定した結果、高感度 (ng/ml) かつ特異的な測定を実現していることが示された。

以上、本研究は新しい方法論を開発導入して A $\beta$  42 に強く結合するペプチドの淘汰に成功し、AD 研究の基礎的試料を提供するとともにその応用法を開発した。また同時に、一連の研究を通じて、発達ライブラリー法の有効性を示すデータを提供したことになった。

## 論文の審査結果の要旨

提出された学位論文「新規  $A\beta 42$  結合ペプチドの取得およびその方法開発研究」の研究内容は下記に示すものである。

アルツハイマー病 (AD) は認知機能が進行性に低下する神経変性疾患であり、その病理所見として老人斑や神経原線維変化がある。老人斑はアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) が細胞外に沈着したものであり、神経原線維変化は過剰にリン酸化されたタウタンパク質が神経細胞内に蓄積したものである。 $A\beta 42$  の会合体に関する研究はこれまで様々な観点から行われてきており、種々な有害オリゴマーの報告があるが、まだ統一の見解が確立していない現状である。そこで申請者らは最も基本的なモノマーの重合初期段階に着目し、その段階で作用するペプチドの取得を目指した。

ペプチド取得方法として、進化分子工学的手法を用いた。進化分子工学によって有用な分子を取得するためには、高品質な一次ライブラリーは必要不可欠である。そこでまず 20 種類のアミノ酸の出現頻度に偏りのない、オクタペプチドライブラリーの作製を試みた。ライブラリー作製方法として、すでに申請者の研究室において確立されている Y 連結ブロックシャフリング (YLBS) 法を採用し、各アミノ酸ブロックの初期投入量に傾斜をかけることで、出現頻度の偏りを改善することに成功した。

この様にして作製した一次ライブラリーから、cDNA ディスプレイ法により  $A\beta 42$  に結合するペプチドを選択したが、結合はあまり強くないと推測評価された。

そこで、より強く  $A\beta 42$  に結合するペプチド取得のために、プロテアーゼの活性調節ペプチドの取得においてその有用性が示されてきた発達ライブラリー法を適用した。具体的には、一次ライブラリーから選択されたペプチドのコンセンサス配列を 4 アミノ酸に分割し、このブロックを YLBS 法により連結することによって ASAC (all-steps-all-combinations) ライブラリーを作製した。この二次ライブラリーにおいては、設計的に発生する配列以外に非設計的配列をも含み、分子多様性が増大している。

選択されたペプチドの特性を解析するために、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法、ゲルシフトアッセイ、細胞毒性阻害実験を行った。SPR 法により算出した二次ライブラリーセクション産物の解離定数は  $10^{-8} \sim 10^{-6}$  M であり、すでに報告されている  $A\beta 42$  結合分子と比べ遜色のない強い結合強度であった。また、一次ライブラリーセクション産物と比較して、二次ライブラリーセクション産物の  $A\beta 42$  に対する結合力は有意に上昇しており、発達ライブラリー法の有用性を支持するものとなった。

ゲルシフトアッセイによる蛍光標識  $A\beta 42$  とペプチドのインキュベーション産物泳動実験から結合が認められ、さらに SDS 処理試料の泳動実験から  $A\beta 42$  のオリゴマー化を促進しているペプチドの存在が確認された。つまり、結合様式の異なるタイプの複数のペプチドの取得に成功したといえる。このことは、タンパク質 (ペプチド) の相互作用に限らず、広く種々な分子の相互作用の解析に用いることのできる新しい方法の提供になっている。

また、 $A\beta 42$  による神経細胞 Neuro2A を用いた細胞毒性テストでペプチドの効果を調べたところ、 $A\beta 42$  の細胞毒性を緩和する傾向が示唆された。

以上、本研究は新しい淘汰のためのスクリーニング系や評価系の方法論を開発導入して  $A\beta 42$  に強く結合するペプチドの淘汰に成功し、また同時に、一連の研究を通じて、発達ライブラリー法の有効性を示すデータを提供した。これらのことから、アルツハイマー病における  $A\beta 42$  の関わりを深く研究する材料と方法論の提供および進化工学の技術的發展に寄与したことになる。