

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究課題

「アミロイド形成の分子機構解明と
阻害剤・診断法の開発」

研究期間：平成14年3月1日～平成17年3月31日

研究代表者

三原 久和

東京工業大学大学院生命理工学研究科

助教授

1. 研究テーマ

- (1) 研究領域 : 戦略的創造研究推進事業 継続研究課題
(さきがけ研究継続)
- (2) 研究代表者 : 三原 久和
- (3) 研究課題名 : アミロイド形成の分子機構解明と阻害剤・診断法の開発
- (4) 研究実施機関 : 東京工業大学大学院生命理工学研究科
- (5) 研究期間 : 平成14年1月～平成17年3月

2. 研究実施概要

(1) 研究の概要

アルツハイマー病やプリオン病に代表されるアミロイド性疾患の分子機構解明とそれに基づいた新規の阻害機構や診断法開発のための基盤研究を実施することを目的とした。研究代表者独自の人工タンパク質を用いた研究により相対的アミノ酸配列認識機構によるアミロイド線維形成を明らかにし、阻害の機構モデルを提示した。さらにアルツハイマー病アミロイドタンパク質を研究ターゲットとし、人工ペプチドを用いたアミロイド線維の増幅という世界初の研究手法を開発し、線維の増幅による検出感度向上システムの基盤研究を行った。これは、将来の予兆診断などの検知システムに利用できる。また、アミロイドタンパク質に特異的に結合する人工のRNAアプタマーの開発も行った。種々の系を検討し、アミロイドタンパク質の線維化を阻害するRNAアプタマーを獲得した。このように世界に先駆けて、アルツハイマー病アミロイドタンパク質の線維形成阻害法および診断法開発に応用可能である人工ペプチドやRNAアプタマーの開発に成功した。

(2) 研究の成果

国際的評価：本研究の成果は、アルツハイマー病やプリオン病などに代表されるアミロイド線維に関して、代表者らの独自の分子システムによる機構解析とこれに基づく高感度増幅検出技術（診断法）および阻害剤の開発に関する基盤研究にある。本研究は、アミロイドなどペプチド・タンパク質の組織化に関する関連国際的研究者に高く評価され、ギリシャでの国際会議 Third

Multidisciplinary Workshop On Self-assembly of Peptides and Proteins in Biology, Medicine, Nanomaterials & Engineeringにおいて招待講演を行った（アミロイド研究の第一人者であるMIT；Zhang博士主催）。

論文・特許・新聞発表：本研究の成果は，現在まで学術論文に6報，総説等6報，学会発表17件に発表している。さらに最新の成果については論文を準備中である。アミロイドの診断法に応用可能な増幅系人工ペプチドについての成果は，特許申請した：アミロイド 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬，特願2003-295153，平成15年8月19日，国際願PCT/JP2004/008707，2004年6月21日。新聞発表を行い社会への広報も実施している。日刊工業新聞，平成14年8月22日，“たんぱく質アミロイド繊維化防止：人工ペプチドを開発”

共同研究：得られた成果をより実用的なアミロイド診断法として確立すべく，マイクロチップを利用した独自かつ革新的な技術へと発展させる研究計画を立てている。本発展研究のために，ペプチド・タンパク質チップ研究において世界最先端の手法および装置開発を行っている，シンガポール国立大学Shao Q. Yao助教授とソウル国立大学Yoon-Sik Lee教授と共同研究を開始するために平成15年度12月に両先生を招聘した。代表者の新技術の実用化をめざす研究の発展を計画・実施している。

3. 研究構想

本研究は，さきがけ研究の発展型として代表研究者のみで行った。

狂牛病やヤコブ病などのプリオン病や老人性アルツハイマー病などのアミロイド性疾患が，社会問題化している。アミロイド病に共通する原因は，各病気に関連したタンパク質の立体構造が変化し，自己集合化して生成するアミロイド線維とよばれるタンパク質自己組織体である。申請者は，平成10～13年度のさきがけ研究21において，「生体高分子の自己組織化と分子進化」という課題で，アミロイド性タンパク質を研究ターゲットの一つに選択し，アミロイド性タンパク質の立体構造変化とアミロイド線維の自己組織化に関する基礎的研究を実施した。

アミロイド病は，その分子メカニズムが非常に複雑であるが，これを解き明かす研究を通じて，分子根本原理に基づく治療（障害）薬の開発や安全な診断法（薬）の開発というオリジナルかつ高インパクトな発展研究成果が達成される。そこで，本発展推進事業での研究では，さきがけ研究21において獲得した成果に基づき，タンパク質のアミロイド形成の分子機構解明と障害剤および診断法開発に関する以下の発展研究を実施してきた。

相同的配列認識によるアミロイド線維形成の機構解析：

まず、さきがけ研究において研究代表者が世界に先駆けて開発した人工のアミロイド性ペプチドを用いることにより、相同的配列認識によるアミロイド線維形成の機構を明らかにした (ChemBioChem 2002)。この発見した相同的分子集合化メカニズムに基づいた人工系において、相同的配列を有する水溶性の高いペプチドが効果的にアミロイド線維形成を阻害することを見出した (Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003)。要するに、アミロイドは、相同的な配列が認識され集合化、線維化し、また相同的配列をもち、溶解性の高い配列が阻害剤となるタンパク質の自己組織化機構によるものであることを発見した。

設計ペプチドを用いたアミロイド ペプチドのアミロイド線維増幅 (診断) システムの開発：

この相同性配列認識・阻害機構に基づき、アルツハイマー病の アミロイドペプチド ($A\beta$) を認識し、アミロイド線維化を増幅させる新規のシステムの構築に成功した (申請特許)。これは相同的な配列を認識する人工の短鎖ペプチドを種々設計し、 $A\beta$ の線維核を検出容易な濃度まで増幅させるシステムであり、微量な $A\beta$ を増幅し、検出しやすい特に予兆診断に用いることのできる診断法開発の基盤となるものである (図 1)。

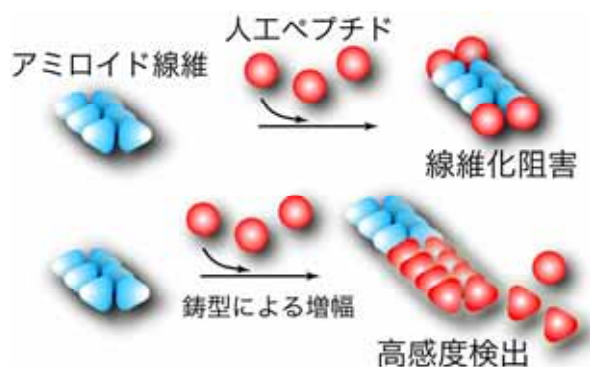


図1. 相同的認識によるアミロイド線維の阻害・増幅システム

アミロイド線維化を阻害するRNAシステムの開発：

さらに細胞システムでの阻害および検出・診断系の構築を目指して、アミロイド線維を特異的に認識するRNAアプタマーの開発にも着手した。アルツハイマー病のアミロイドペプチド ($A\beta$) の繊維になっていないモノマーペプチドや中間体のペプチドオリゴマーを特異的に認識するRNAアプタマーを進化分子工学法 (インビトロセレクション法, 試験管内進化法) により、世界に先駆けて獲得することに成功した。それらのRNAアプタマーの内、いくつかが強く $A\beta$ のアミロイド線維化を阻害することを結合試験および電子顕微鏡観察により明らかにした (図 2)。細胞内でDNAから発現させたRNAによりアミロイド前駆体を捕捉し、アミロイドの線維化を阻害する薬

剤の設計に有効である。また, RNAアプタマーにリボザイムなどの触媒機能を複合化し, アミロイドを高感度に検出するRNAによる診断システムの開発にも応用可能な成果でもある。

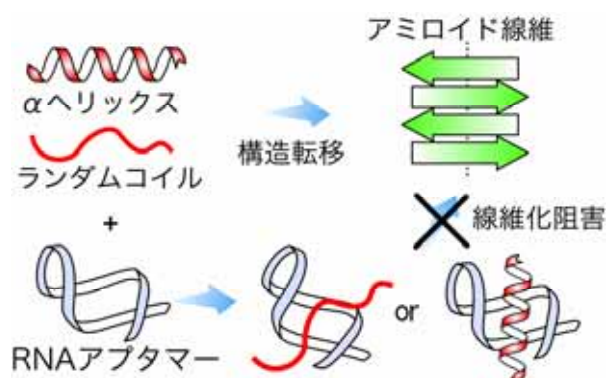


図2. 構造転移によるアミロイド線維の形成とRNAアプタマーによる阻害

4 . 研究実施内容

近年, ミスフォールド体を形成するタンパク質が, 狂牛病, クロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病やアルツハイマー病などの疾病の主たる原因物質として考えられている。プリオン病は, 食の安全などにおいて重要な社会問題となっており, またアルツハイマー病は, 国内において約 100 万人, 米国で 500 万人といわれている患者数からも, その治療法や診断法の開発が高齢化社会の大きな課題となっている。

主原因と考えられているタンパク質は, プリオン病の場合, プリオンタンパク質であり, アルツハイマー病においてはアミロイド ペプチド ($A\beta$) である。両タンパク質の生体内での機能は, 未だ不明であるが, 何らかの要因により, ヘリックスリッチな立体構造から シート構造リッチな立体構造へとコンフォメーションが変化し, その シートが集合化することによりアミロイドという線維状集合体を形成する。したがって, これらの疾病は, アミロイド病またはコンフォメーション病とも呼ばれる。遺伝病も含め約 20 種のアミロイド病が知られているが, 共通点は, シートの集合体からなるアミロイド線維を形成することである (図3, 4)。

以下に本研究で実施したアルツハイマー病のアミロイド ペプチド ($A\beta$) に関する研究成果について詳細に述べる。

アミロイドーシス

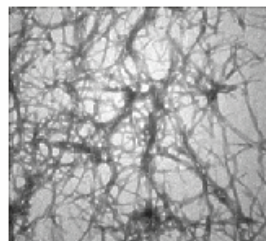
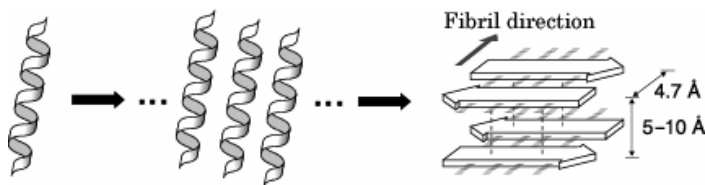
蛋白質が凝集してアミロイド線維と呼ばれる線維状構造を形成して、組織に沈着する病気の総称。

病名	病原タンパク質
プリオン病	PrP
透析アミロイドーシス	β -microglobulin
パーキンソン病	α -synuclein
アルツハイマー病	amyloid β peptide



アミロイド老人斑 プリオン蛋白質

図3 . アミロイド病 (アミロイドーシス)



500 nm

図4 . 構造転移とアミロイド線維形成 .
アミロイド ペプチドアミロイドの電子顕微鏡写真

アルツハイマー病においてアミロイド ペプチド ($A\beta$) は、40~42 残基からなるペプチドで、自己組織化によって線維状集合体 (アミロイド線維) を形成し、脳内に沈着して老人斑を形成する。この老人斑の形成により神経変性が引き起こされる。したがって、 $A\beta$ のアミロイド線維の形成は、アルツハイマー病の発症過程において重要な役割を果たしていると考えられる (図5)。

本研究では、アルツハイマー病アミロイド タンパク質を研究ターゲットとし、人工ペプチドを用いたアミロイド線維の増幅という世界初の研究手法を開発し、線維の増幅による検出感度向上システムの基盤研究を行った。これは、将来の予兆診断などの検知システムに発展、利用できる。また、アミロイドタンパク質に特異的に結合する人工のRNAアプタマーの開発も行った。種々の系

を検討し、アミロイド タンパク質の線維化を阻害するRNAアプタマーを獲得した。このように、アルツハイマー病アミロイド タンパク質の線維形成阻害法および診断法開発に応用可能である人工ペプチドやRNAアプタマーの開発に成功した。

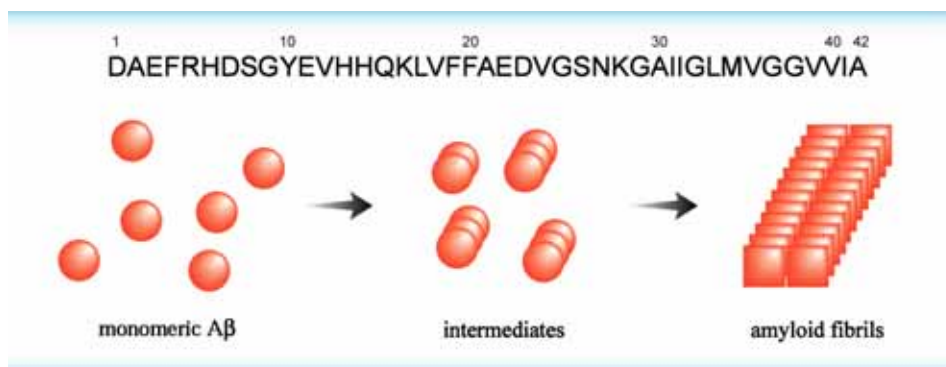


図5 . アルツハイマー病アミロイド ペプチド(A β)の構造と線維化モデル

4 - 1 . 設計ペプチドを用いたアミロイド ペプチドのアミロイド線維増幅(診断)システムの開発

発症時の微量のアミロイド線維を検出することができれば、アルツハイマー病の診断への応用が期待できる。しかし、生体内における A β 線維核の生理的濃度は低く、検出が困難である。本研究では、少量のアミロイド線維を増幅させることによる検出系の構築を目指した。その方法として、アミロイド線維に対する結合能と線維形成能を有する種々の人工ペプチドを設計し、アミロイド線維を増幅させることを目的とした(図6)。

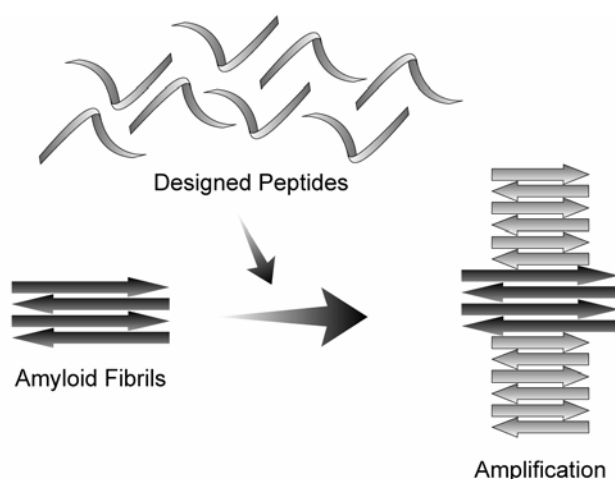


図6 . 設計人工ペプチドによるアミロイド線維核の増幅

・ペプチドの設計と合成

アミロイド ペプチドとして、疎水性残基を多く含む A β 10-35 と天然型の A β 1-40 を合成した。人工ペプチドは、A β の線維形成に重要と考えられている 14 残基目から 23 残基目までの配列をもとに、電荷を保存、疎水性を強めるように設計した。疎水性部分については 20 残基目のフェニルアラニンの重要性が本研究室での予備実験からも判明しているため、このフェニルアラニンを保存し、19 残基目を疎水性およびシート性を考慮して種々のアミノ酸に置換した。他の疎水性アミノ酸はすべてロイシンとした。ヒスチジンはリシン残基に、アスパラギン酸はグルタミン酸へ置換し、電荷的性質を保つとともに、電荷的相補性も維持するように設計した(図7)。すべてのペプチドは Fmoc 固相合成法により合成し、精製は逆相 HPLC、同定は MALDI-TOFMS により行った。

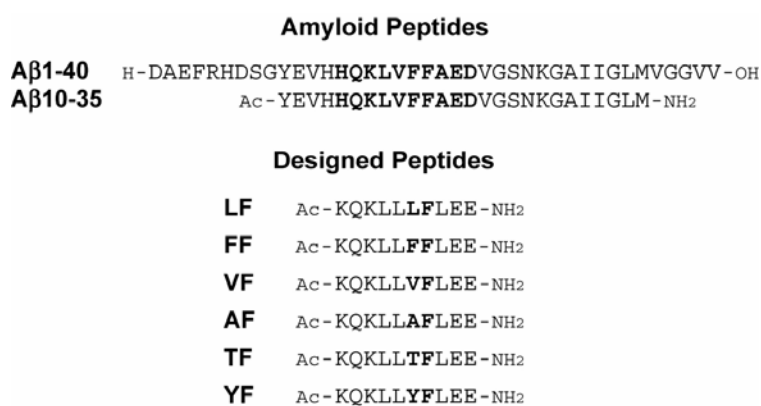


図7. 設計ペプチドの構造. 上部はアミロイド ペプチド, A の構造

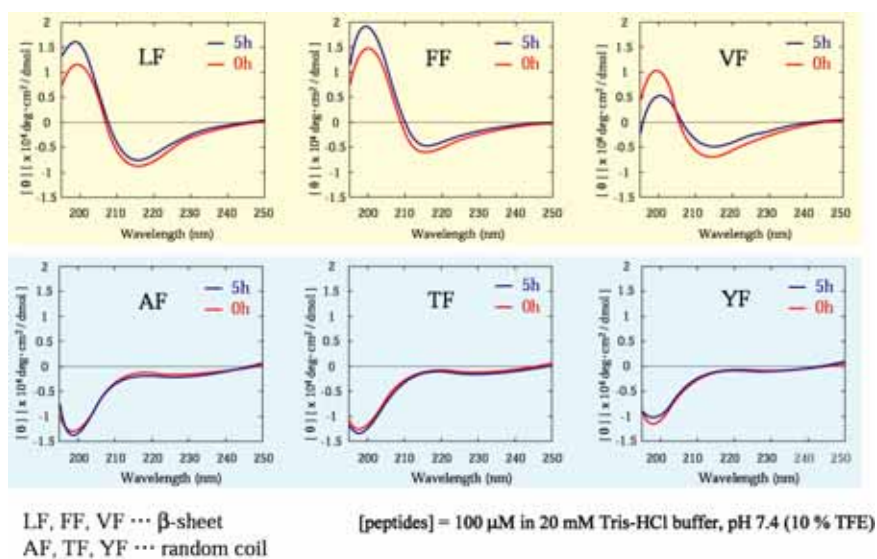


図8. 設計ペプチドの立体構造 (CD スペクトル)

・ペプチドの立体構造

各人工ペプチドについて円二色性スペクトルを測定したところ、疎水性の高い LF, FF, VF はシート構造を形成できるが、より疎水性の低い AF, TF, YF はランダムコイル構造でシート構造を形成できないことがわかった(図8)。わずか1残基のアミノ酸の性質の違いでペプチドの立体構造(シート性)に大きな違いが生じた。シート構造をとらない AF, TF, YF は線維形成能もなかった。以下、線維性も示した LF, FF, VF について述べる。

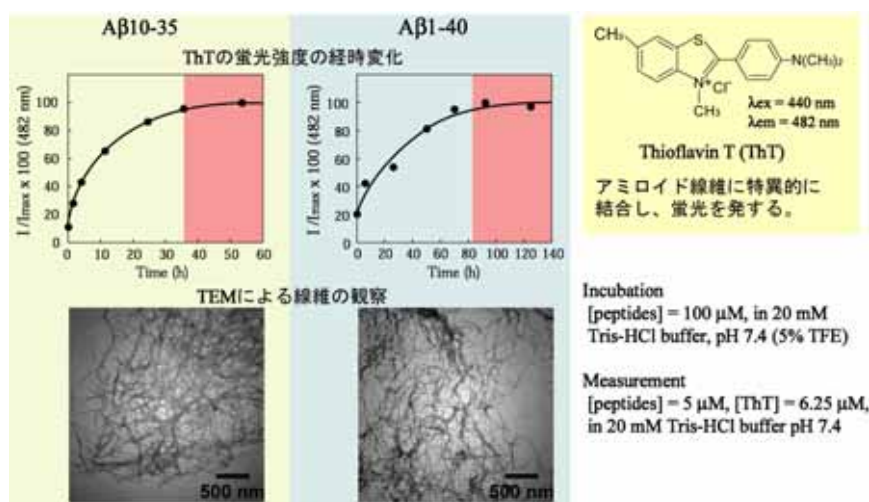


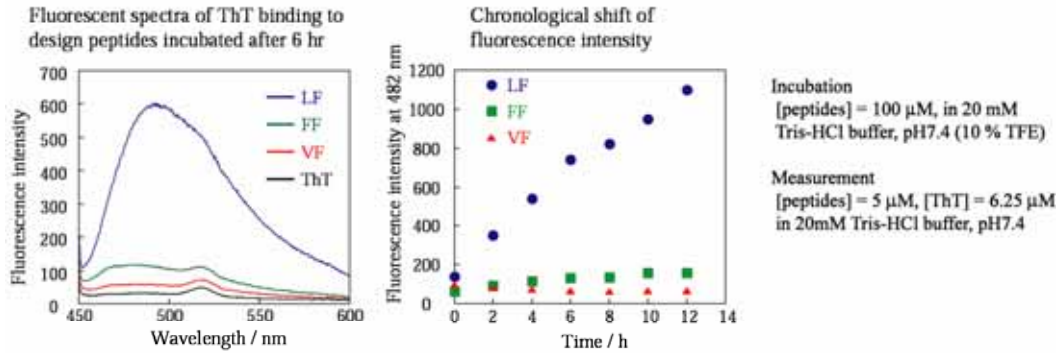
図9 . A の線維形成。チオフラビン T と透過型電子顕微鏡による評価

・ペプチド単体の線維形成能

各人工ペプチド, および Aβ の線維形成能の評価は, アミロイド線維に特異的に結合し蛍光を発するチオフラビン T (ThT) を用いた蛍光測定により行った。人工ペプチドの Aβ への結合能および Aβ 線維増幅能の評価においては, ペプチド溶液中に核として少量の Aβ1-40 あるいは Aβ10-35 の線維を添加し, 蛍光強度の経時変化を測定した。また, 透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いることにより線維の観察を行った。

Aβ1-40 および Aβ10-35 の線維形成の様子を図9に示す。この線維核を使用した。また, 人工ペプチド単体での線維形成能を, ThT の蛍光変化量により評価したところ, 時間変化にともない, LF が最も蛍光強度が増大した。FF, VF は小さな蛍光増加のみを示した。アミノ酸1残基の違いによる大きな変化が観測された(図10)。またこれら3つのペプチドでは, TEM において線維が観察された。しかし, AF, TF, YF については蛍光変化が全く見られなかったことから, 線維形成にはペプチドの疎水性, シート性が重要である。

ThT binding analysis



TEM images of designed peptides fibril formation

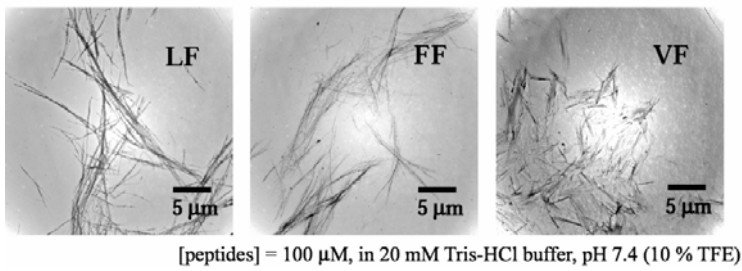


図 1 0 . 人工ペプチド単体での線維形成能

・ペプチドによるA β アミロイド増幅

人工ペプチドによる A β の線維増幅反応を行った。LF, FF, VF に, 核として少量の A β 10-35 線維を添加したところ, 蛍光強度の増大が見られた。特に VF では,

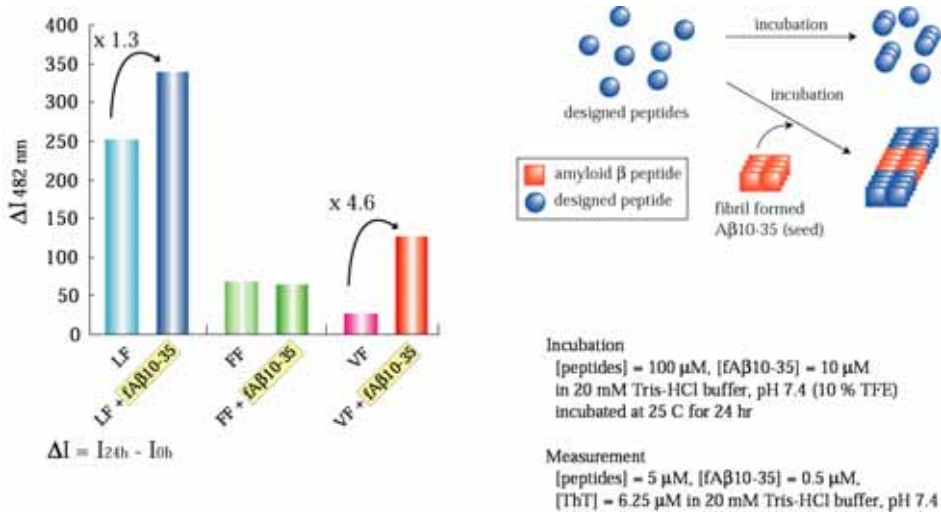


図 1 1 . 人工ペプチドによる A のアミロイド線維増幅

ペプチド単体での蛍光変化量があまり見られなかったのに対し, 核の添加により単独よりも下記条件において約 4.6 倍の蛍光変化量を示した(図 1 1)。FF は A β 線維

を添加しても蛍光強度の増加は見られず、線維増幅能はなかった。LF は、蛍光増大が認められたものの、ペプチド単体での蛍光も強く、線維増幅の感度としては VF より劣っていた。

また、TEM で観察することにより、核の有無による線維形状の違いを確認することができた(図 1 2)。VF 単体では、短い線維しか形成できないが、 $A\beta$ の線維核を加えることにより、 $A\beta$ 様のアミロイド線維が大きく増幅された。したがって、ペプチド VF が $A\beta$ 核により $A\beta$ アミロイド構造をとって増幅したことが判明した。 $A\beta$ 1-40 線維を核として添加しても同様の結果になったことから、この条件下では VF が線維増幅に最も適している。

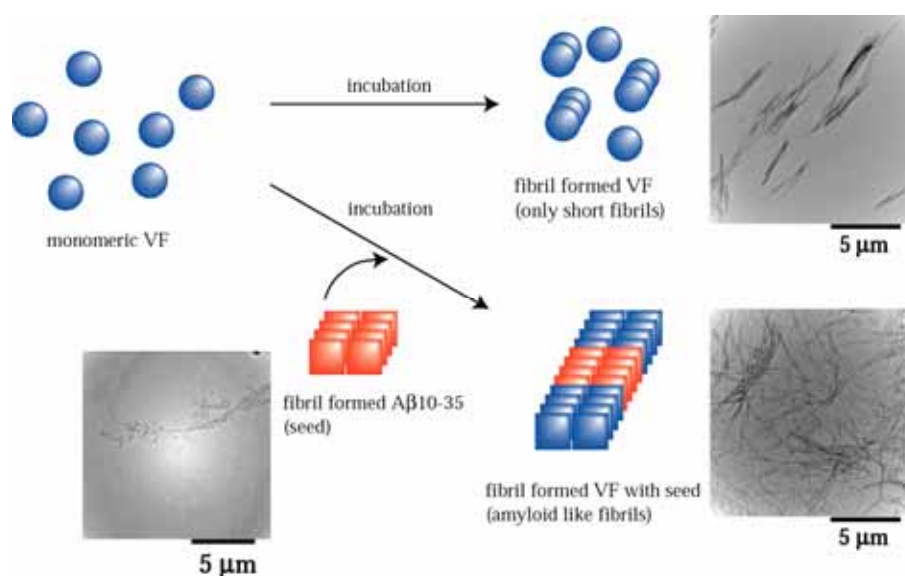


図 1 2 . 人工ペプチド VF による $A\beta$ のアミロイド線維増幅と線維形状変化

続いて、 $A\beta$ の線維核濃度による増幅感度の検討を行った。人工ペプチド VF を用いて $A\beta$ 1-35 の線維増幅の核濃度依存を実施した(図 1 3)。 $A\beta$ の濃度依存的に蛍光シグナルの数十倍もの増大が観測され、 $A\beta$ のアミロイド線維核を定量できることもわかった。天然型の $A\beta$ 1-40 を用いた実験では、時間依存的に $A\beta$ アミロイドの線維増幅が観測された。また、 $A\beta$ 1-40 の濃度に依存して蛍光強度増加度が変化し、 $A\beta$ 1-40 に対しても定量性があることが示された。

・ 結 論

本研究により、人工ペプチドを用いることで $A\beta$ 線維を増幅させることに成功した。特に人工ペプチド VF は、 $A\beta$ アミロイド線維の増幅能に優れており、チオフラビン T 分析で数十倍の蛍光強度増大シグナルを示し、 $A\beta$ アミロイド線維の定量的解析の可能性が十分に示せた。

今後は、人工ペプチドのアミノ酸残基の多様性を増やして A β 線維の認識能を向上させ、より高感度な A β アミロイド線維検出系の構築を実施し、アルツハイマー病の予兆診断に応用できるシステム構築が期待される。

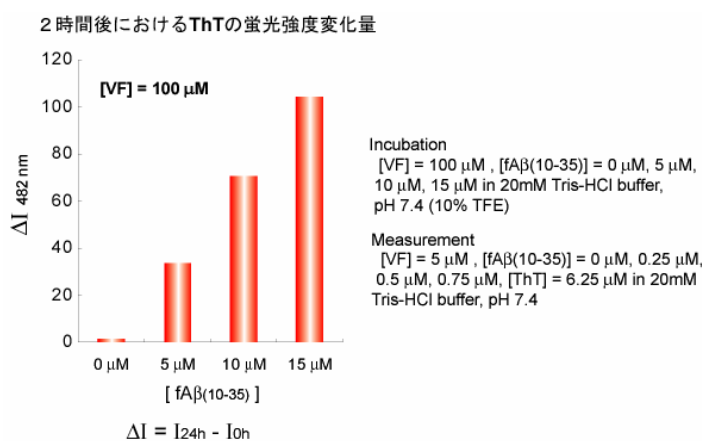


図 1 3 . 人工ペプチド VF による A 10-35 アミロイド線維増幅：核濃度依存

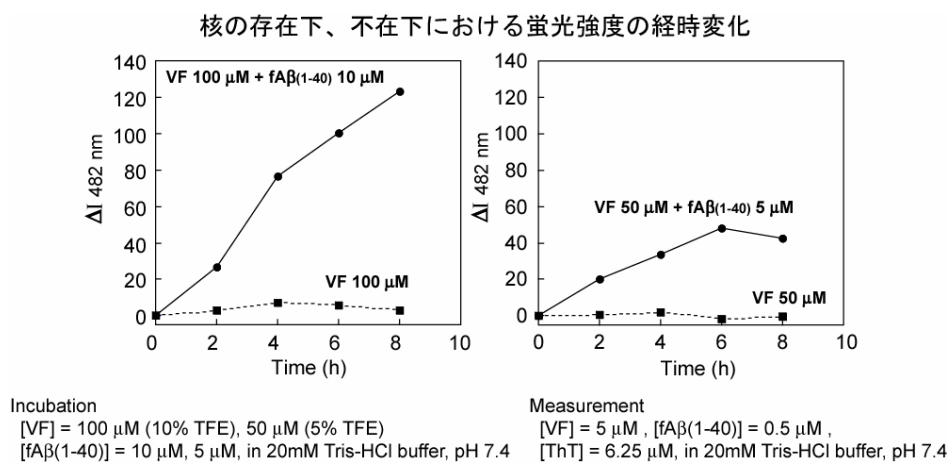


図 1 4 . 人工ペプチド VF による A 1-40 アミロイド線維増幅：時間変化と核濃度依存

4 - 2 . アミロイド ペプチドのアミロイド線維化を阻害する RNA システムの開発

タンパク質のミスフォールディングは種々の致死性疾患の原因であることが明らかになりつつある。アルツハイマー病もこれらの一つであり、アミロイド ペプチド(A β)のミスフォールディング集合体であるオリゴマーやアミロイド線維が神経細胞に害を及ぼすことが発症原因と考えられている。A β は通常ランダムコイル構造

であるが、オリゴマーへと集合化しシート構造へと転移することによりアミロイド線維が形成されることがわかっている(図4, 5, 15)。これら Aβのランダムコイル構造やオリゴマーに強く結合し安定化する分子は、アルツハイマー病の早期診断や治療法の開発に役立つと考えられる。一方近年、特定のタンパク質や小分子に強く結合する RNA 分子を選択する手法が開発され、医薬品開発などの応用研究が盛んに行われている。

そこで本研究では、ランダムコイル構造またはオリゴマーの Aβに特異的に結合する RNA 分子 (RNA アプタマー) をインビトロセクション(進化分子工学)法により選択、獲得することを試みた。また得られた RNA アプタマーを用いて Aβへの結合実験やアミロイド線維形成阻害実験を実施した。

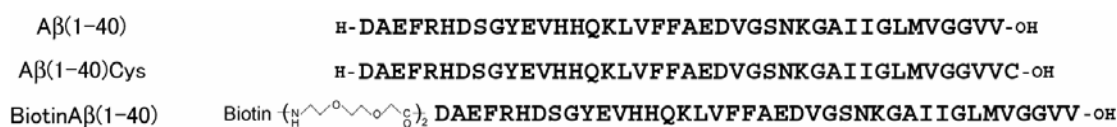


図15. 本研究で用いた A と誘導体の構造

・Aβの合成

40 残基からなる Aβ1-40と、ストレプトアビジン修飾ビーズ上への固定化のための Biotin Aβ1-40と金コロイド上への固定化のための Aβ1-40Cys を合成した(図15)。すべてのペプチドはFmoc固相法により合成し、逆相HPLCにより精製し、MALDI-TOFMSにより同定した。

・インビトロセクション法によるRNAアプタマーの選択

40 塩基のランダム領域を含む 89 塩基の DNA を構築し、これを転写して RNA ライブラリーを作成した。この RNA とランダムコイル状態のビオチン化 Aβ 1-40を混合し、ストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いて Aβ1-40と結合している RNA を回収した(図16a)。また、オリゴマーモデルとして Aβ 1-40を金コロイドに共有結合させたものを作製し、RNA と混合することで、オリゴマーに結合する RNA の選択も試みた(図16b)。得られた RNA は逆転写 PCR により DNA として増幅した。このサイクルをそれぞれ9サイクル行い、Aβに結合する RNA アプタマーを獲得した。RNA 配列は逆転写後の対応する DNA 配列を大腸菌クローニングにより解析し決定した。

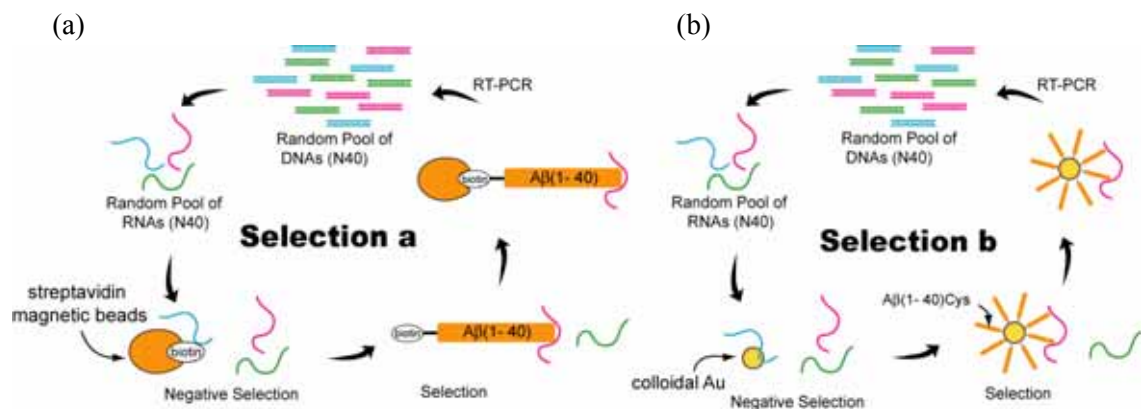


図 1 6 . インビトロセクション法のスキーム :

BiotinA β 1-40(a) と A β 1-40CysGold (b)系

インビトロセクション法のサイクルを重ねるにつれ，逆転写 PCR 後の DNA の量が増大したことから，A β 1-40に結合する RNA が効果的に増幅していることが示された。各セクション後，DNA をクローニングし，それぞれ十数個の配列を解析した。得られた配列にはともにウラシルが多く含まれており，しかも連続しているという顕著な特徴があった。この結果，ウラシルの連続配列が A β 1-40を認識していることが示唆された (図 1 7)。

5'-GGGAUGUUCUAGGCGGUUGAUGA-N40-CAUCC-AGAGUAGCAUAAUUGAUCCGA-3'

Name	Sequences
9R-N-1	UUUUUUUUUCAACAAUAAUCGGUGUGUGUUUGAUUAGUUU
9R-N-2	UAGCGUAUGCCACUCUCCUGGGACCCCCGCGGAUGGCCA
9R-E-1	GCCUAUUGUUUUUGUUUUUUGUUUAGGUUAUUAUGUGUU -xxxxxC
9R-E-2	UUUGGGGUGUCGGGCGAUUUUUAGGGUUGGGCCAGGCCGU
9R-G-1	GGUUUGUUCUUGUGUUGCGUUUGAGUUUGACCUGGCCCC
9R-G-2	AUGCUAUGUGUUACCCUCCCAAUCAGGGCCCCUGCCUUU-UGCAC

図 1 7 . A β 1-40 結合性の RNA アプタマー : 獲得配列の一部代表例

・アミロイド線維結合実験

獲得された代表的 RNA アプタマーを用いて，A β 1-40CysGold への結合特性を評価

した。結果として 9R-N-2 や 9R-E-2 が A β が集合化した A β 1-40CysGold へ強く結合する RNA であることが判明した (図 1 8)。

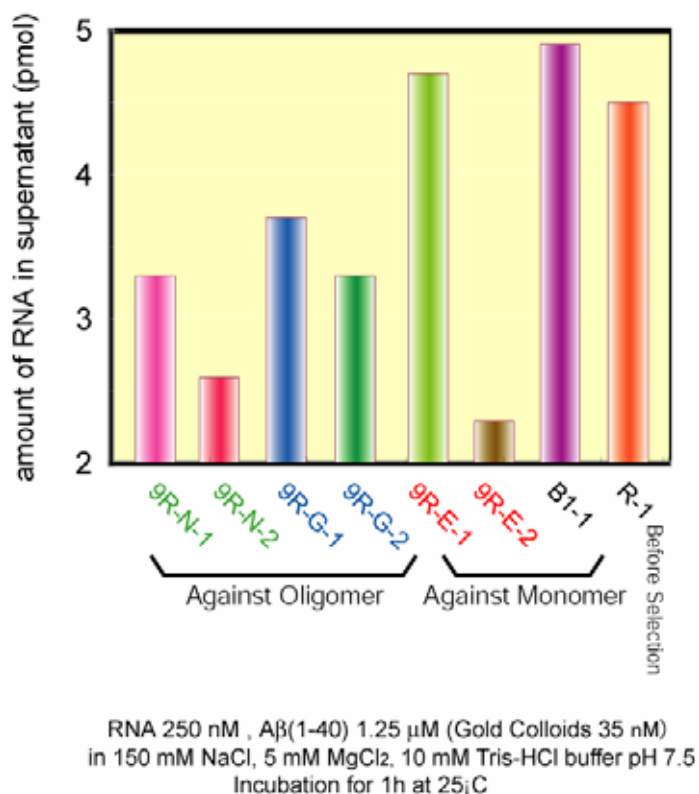


図 1 8 . RNA アプタマーの A β 1-40CysGold への結合 : バーが低いほど強く結合している

・ アミロイド線維形成阻害

得られた RNA アプタマーを用いて , RNA 存在下 , 非存在下において A β 1-40をインキュベートし , アミロイド線維形成に与える影響について透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により評価した。上記の結合実験で A β 1-40CysGold へ強い結合性を示した RNA が A β 1-40のアミロイド線維形成を顕著に抑制することが示された (図 1 9)。また A β 1-40CysGold への結合の弱い RNA は , A β 1-40のアミロイド線維形成の抑制能も低いことが示された。以上から , 得られた RNA が A β 1-40と結合することで , A β 1-40の構造転移過程に影響を及し , その結果として , アミロイド線維形成を阻害したことが示された。

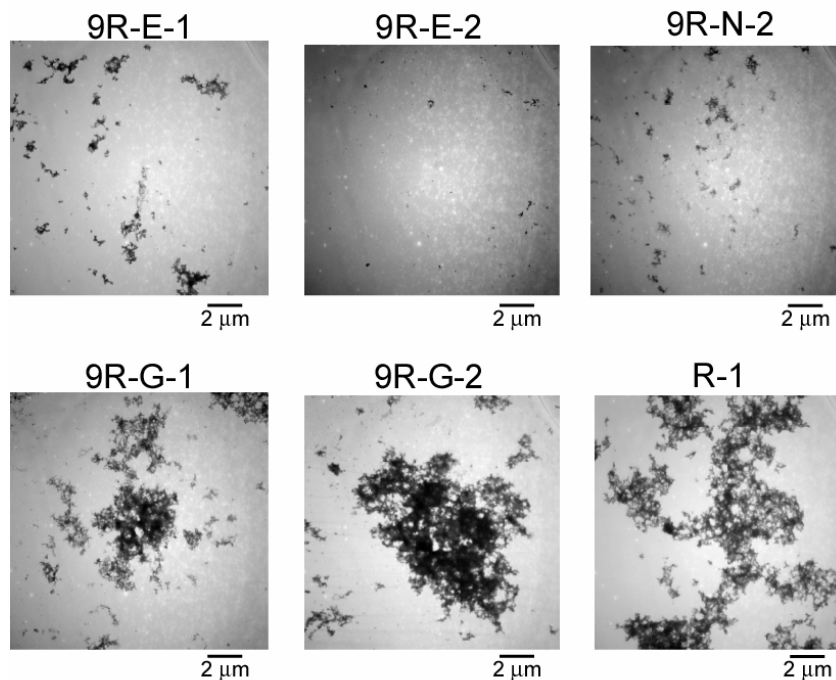


図 19 . RNA アプタマーの A β 1-40 アミロイド線維形成阻害

・ 結 論

2つのセレクション法により、A β 1-40のアミロイド線維形成を阻害する RNA アプタマーを獲得し、A β 線維化を阻害する RNA システムの構築に成功した。2つのセレクションから得られた RNA はともにウラシルを多く含み、これが A β との結合に重要である。

今後、研究を発展させ詳細な結合メカニズムの解析を進めることにより、より効果的に A β に結合し、アミロイド繊維化を阻害する小分子 RNA を獲得することが重要である。また、アミロイド線維の形成過程は非常に複雑であり、未だ未解明の部分が多くある。このような種々のアミロイド線維形成中間体へ結合するさまざまな RNA を本研究で得られた成果を活用し、獲得することにより、アミロイド線維形成過程の詳細なメカニズムの解明を行うことができアルツハイマー病検査や治療に非常に有用な RNA システムの構築が期待される。またアミロイド疾患の早期診断、遺伝子治療などへの応用も期待できる。

5. 研究実施体制

研究者名

氏名	所属	役職	参加時期
三原 久和	東京工業大学大学院 生命理工学研究科	助教授	平成14年1月～17年3月

・ さきがけ研究の発展・継続による個人型研究である。

6. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

- ・ 第1回生命化学国際シンポジウム

First International Symposium on Biomolecular Chemistry

2003年12月2日～5日

兵庫県立淡路夢舞台国際会議場

主たる実行・運営委員として、以下の2名の研究者も招聘し、JST協賛の下、開催した。

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属, 役職)	招聘の目的	用務先	滞在期間
Yoon-Sik Lee ソウル国立大学 教授	共同研究の推進・ 打ち合わせ	兵庫県淡路国際 会議場	平成15年 12月3日～ 12月5日
Shao Q. Yao シンガポール国立大学 助教授	共同研究の推進・ 打ち合わせ	東京工業大学 兵庫県淡路国際 会議場	平成15年 12月1日～ 12月10日

7 . 研究成果

(1) 発表論文

- 1 . 三原久和
ポリペプチドの立体構造依存的自己組織化
高分子, **51**, 236-239 (2002)
- 2 . 三原久和
アミロイド形成の分子機構と阻害
化学工業, **53**, 491-496 (2002)
- 3 . Y. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara
Amyloid Architecture: Complementary Assembly of Heterogeneous
Combinations of Three or Four Peptides into Amyloid Fibrils
ChemBioChem, **3**, 637-642 (2002)
- 4 . 三原久和
ペプチドアミロイド線維状構造体の構築と制御
オレオサイエンス, **3**, 233-239 (2003)
- 5 . T. Yamashita, Y. Takahashi, T. Takahashi, H. Mihara
Inhibition of Peptide Amyloid Formation by Cationic Peptides with
Homologous Sequences
Bioorg. Med. Chem. Lett., **13**, 4051-4054 (2003)
- 6 . T. Takahashi, K. Tada, H. Oshima, S. Matsumura, H. Mihara
Construction of the Artificial Peptides and RNAs Targeting Amyloid
Peptides
Peptide Science 2003, 455-456 (2004)
- 7 . Y. Takahashi, H. Mihara
Construction of a chemically and conformationally self-replicating
system of amyloid-like fibrils
Bioorg. Med. Chem., **12**, 693-699 (2004)
- 8 . 上村 忍, 松村幸子, 菊地 円, 三原久和
シートペプチドによるナノスケールファイバーの構築
高分子加工, **53**, 313-318 (2004)
- 9 . 高橋 剛, 三原久和
図解バイオ活用技術のすべて, 自己組織化ペプチド
(東京工業大学大学院生命理工学研究科編) 工業調査会, 164-167 (2004)

10. H. Kodama, S. Matsumura, T. Yamashita, H. Mihara
Construction of a protein array on amyloid-like fibrils using coassembly of designed peptides
Chem. Commun., 2876-2877 (2004)
11. H. Mihara, S. Matsumura, T. Takahashi
Construction and Control of Self-Assembly of Amyloid and Fibrous Peptides
Bull. Chem. Soc. Jpn., **78**, 572-590 (2005)
12. 三原久和
図解高分子新素材のすべて, ペプチド工学
(國武豊喜監修) 工業調査会, 106-109 (2005)

(2) 口頭発表 (国内 12 件, 国際 5 件)

国際会議招待講演 : H. Mihara, Design and Control of Peptide Amyloid Formation : Third Multidisciplinary Workshop On Self-assembly of Peptides and Proteins in Biology, Medicine, Nanomaterials & Engineering, Crete, Greece, 1-5 August, 2003
(アミロイド研究の第一人者であるMIT; Zhang博士主催)

(3) 特許出願 (国内 1 件, 海外 1 件)

- ・アミロイド 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬
特願2003-295153, 平成15年8月19日, 特開2005-60336
国際願PCT/JP2004/008707, 2004年6月21日, WO2005/016957

(4) その他特記事項

日刊工業新聞, 平成14年8月22日

“ たんぱく質アミロイド線維化防止 : 人工ペプチドを開発 ”

8 . 結び

プリオン病やアルツハイマー病に関する研究は、ほとんどが病理研究やモデル動物を用いた医学・生物学的研究であった。とくに1997年にノーベル賞を受賞したPrusiner博士のプリオン説に端を発し、アミロイド性タンパク質のアミロイド線維化が疾病の主原因であることが判明し、タンパク質の分子論的研究の重要性が強く認識されるようになった。欧米とくに米国では、分子研究と病理学研究の両者の重要性が強く認識されており、種々の病気に関連したアミロイドタンパク質群の研究が幅広く実施されている。欧米の分子論的研究者としては、S. Lindquist (プリオン研究, U. Chicago, USA), J. Kelly (アミロイド病タンパク質研究, Scripps Inst., USA), S. Zhang (アミロイドペプチド研究, MIT, USA), C. Dobson (タンパク質フォールディング研究, U. Oxford, UK), N. Boden (アミロイドペプチド研究, U. Leeds, UK)らが有名であり、多くの研究者、研究層からなる。

一方、国内においては医学部における病理学研究が主流であり、分子論的研究者は少数である。代表的研究者は、後藤祐児 (タンパク質フォールディング研究, 大阪大学), 桑島邦博 (タンパク質フォールディング研究, 東京大学), 三原久和 (アミロイドペプチド・タンパク質研究, 東京工業大学)らが分子論研究者としてあげられる。しかしながら、アミロイドタンパク質の性質をより根本的原理から追求する人工ペプチドやRNA研究を行っているのは、三原 (東京工業大学)のみである。本研究成果は、独自の分子論研究により見出されたアミロイド線維形成の相同的認識機構をもとに、診断法開発につながる高感度増幅法や阻害剤開発への発展が期待される重要な研究であり、世界的にも類を見ないものである。さらに、層の厚い欧米に後塵を拝さないためにも分子根本的なアミロイド研究の推進が重要である。

謝辞

最後になりましたが、さきがけ研究21に引き続き、SOSRTの3年間の支援は、アミロイドの基礎および発展研究の遂行に非常に有意義でありました。この場をお借りして、科学技術振興機構に厚く御礼申し上げます。また終始、種々のサポートをしていただきました「発展・継続」第一研究事務所の参事および関係者の方々に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行に協力していただいた東京工業大学大学院生命理工学研究科の高橋剛助手をはじめ関係した学生諸氏に大変感謝いたします。研究の場所を提供いただいた東京工業大学に御礼申し上げます。