

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名: アミロイドーシス発症の分子機構解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

後藤 祐児(大阪大学蛋白質研究所 教授)

主たる共同研究者

内木 宏延(福井大学医学部 教授)(平成 14年11月~)

桑島 邦博(自然科学研究機構岡崎総合バイオサイエンスセンター 教授)(平成 14年11月~)

樋口 京一(信州大学医学部附属加齢適応研究センター 教授)(平成 14年11月~)

3. 研究内容及び成果

アミロイド線維の沈着を伴う疾患をアミロイドーシスと呼ぶ。現在、アルツハイマー病、透析アミロイドーシスをはじめとする 20 種類以上のアミロイドーシスが知られている。アミロイド線維の前駆蛋白質は、生体機能に重要な役割を果たすものが多い。また、病気とは関係しない蛋白質やペプチドもアミロイド線維を形成する。アミロイド線維は、一般的な蛋白質の構造やフォールディングを考える上でも、きわめて重要な構造状態である。本研究では、アミロイドーシス発症の分子機構を、蛋白質の構造と物性に基づいて解明することを目標とした。

研究には、内木、樋口、桑島が共同研究者として参加し、蛋白質科学と基礎医学が連携した。後藤は、全反射蛍光顕微鏡、溶液 NMR、固体 NMR などを用いて、アミロイド線維の形成機構、構造安定性、伝播の機構を解明することを目指した。内木は、基礎医学・病理学的立場から、一群の化合物によるアミロイド線維形成の促進、阻害、あるいは分解の作用機構を研究した。樋口は、マウスモデルを用いてアミロイドーシスの伝播を研究した。桑島は、アミロイド原性蛋白質のフォールディング反応を解析した。

3-1.アミロイド線維の形成機構と構造物性(後藤グループ)

線維成長のリアルタイム観察:全反射蛍光顕微鏡と蛍光色素チオフラビン T を組み合わせることによって、アミロイド線維の伸長過程を一線維レベルでリアルタイムに観察する方法を考案した。この手法を用いて、透析アミロイドーシスの原因となる 2 ミクログロブリンのアミロイド線維や、アルツハイマー病に関わる A β ペプチドの線維形成反応を解析した。特に A β については、環境に依存して、老人斑に類似した球状構造体、スフェルライトをはじめとして、様々な超分子形態の出現することを明らかにした。

立体構造解析:アミロイド線維が高濃度のジメチルスルホキシドに可溶であることに着目し、水素・重水素交換、溶液 NMR 測定と組み合わせることで構造安定性を解析する手法を確立した。この手法を用いて、2 ミクログロブリンの線維構造を解析し、線維のコア領域をアミノ酸残基レベルで明らかにした。この手法は、世界的にも普及し、今日、様々なアミロイド線維で応用されている。

アミロイド線維の原子構造解析法として、固体 NMR が注目されている。本研究では、2 ミクログロブリンのフラグメントの形成する線維の立体構造を、固体 NMR によって明らかにした。各分子は「 β -ループ- β 」の基本構造を形成し、これが積み重なって線維を形成していた。同様な構造は、他のアミロイド線維でも報告されており、「 β -ループ- β 」構造はアミロイド線維の基本構造であると考えられる。

アミロイド線維の物性の解析: 熱量計を用いて、アミロイド線維の構造安定性や形成機構を解析した。特に、滴定型熱量計を用いて線維形成に伴う熱量を測定することにはじめて成功した。また、熱や圧力に対する応答から、蛋白質の正常なフォールディングとアミロイド線維形成の相違点を明らかにした。主に 2ミクログロブリンとその変異体を用いて、線維の構造多様性やその伝播実験を行った。そして、構造多様性や、シードに依存した伸長反応によって、プリオン病の特徴である、表現型の多様性や伝播、適応といった現象の説明できることを示した。

以上のように、アミロイドーシス発症の分子機構が、蛋白質の立体構造と物性に基づいて理解できることを提案した。

3-2. ヒトアミロイドーシスに共通する分子病態の解明と治療戦略 (内木グループ)

透析アミロイドーシスおよびアルツハイマー病をモデル疾患として、種々の生体分子のアミロイド線維形成・分解過程への影響を解析した。特に 2ミクログロブリンのアミロイド線維伸長を惹起するいくつかの物質を見出し、これに基づき、透析アミロイドーシス発症の作業仮説を提案した。一方、線維形成阻害・不安定化をもたらす一連の有機化合物を見出し、アミロイドーシスの予防・治療薬の開発の基盤を構築した。

3-3. アミロイドーシス伝播の機構 (樋口グループ)

マウス apoA-II アミロイドーシスは、プリオン病と類似した伝播を示すことから、試験管内でのアミロイド線維形成と生体でのアミロイドーシス発症・伝播を関連させて解明するための貴重なモデルシステムである。重度なアミロイドーシスが発症する C 型 apoA-II を持つマウス系統を用いて、アミロイドーシス発症におけるアミロイド構造伝播の意義を研究した。その結果、AA アミロイドーシスでは、アミロイド構造の伝播が発症に重要な役割を果たすことを明らかにした。今後、個体を用いた生物学的、病理学的解析が、アミロイドーシスの予防や治療の開発に特に重要である。

3-4. アミロイド前駆蛋白質のフォールディング反応 (桑島グループ)

2ミクログロブリンは酸性条件下で中間体を形成し、それがアミロイド線維の前駆体であると示唆されているが詳細は不明である。2ミクログロブリンの酸変性反応と酸変性状態からのフォールディング反応を詳細に解析し、中間体の特徴を明らかにした。アミロイド中間体を解明することにより、アミロイド線維形成の抑制・治療に向けた方法論の確立につながると期待される。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
論文数 国内:26件、海外、144件。口頭発表 国内:46件、海外:43件。特許、国内1件

特記すべき論文:

(1) Ban, T., Yamaguchi, K. & Goto, Y. Direct observation of amyloid fibril growth, propagation, and adaptation. (2006) *Acc. Chem. Res.* **39** (9), 663-670.

蛍光顕微鏡や原子間力顕微鏡を駆使して、アミロイド線維の形成や構造伝播、適応現象を一線維レベル、あるいはリアルタイムで観察し、これらを総合して、アミロイド線維形成機構を論じた。

(2) Iwata, K., Fujiwara, T., Matsuki, Y., Akutsu, H., Takahashi, S., Naiki, H. & Goto, Y. 3D Structure of amyloid protofilaments of β 2-microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (48), 18119-18124 (2006).

アミロイド線維は大きな凝集体であるため、X線結晶解析や溶液核磁気共鳴などの蛋白質構造解析の主

要な手法が使えず、その詳細な構造は解明されていなかった。本論文は、アミロイド線維の原子レベル立体構造解析に固体NMRが有効であることを示した。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

医学領域の重要な対象ではあるが謎の多かったアミロイドーシスの研究は、現在、蛋白質科学との連携によって、急速な発展を続けている。特に注目されるのは、構造生物学的研究である。現在、多くの研究者の努力によって、さまざまなアミロイド線維の原子レベルでの構造が明らかになりつつある。これらの状況によって、「アミロイド構造生物学」という新たな研究領域が台頭しつつある。アミロイド構造生物学は、これまでの、機能的な蛋白質を中心とした構造生物学研究の地平を大きく広げるものとして、蛋白質研究の進展に大きな貢献をすることが期待できる。

本研究では、蛍光顕微鏡、溶液・固体 NMR を用いた構造物性研究を中心に研究を展開した。それらの成果は、世界的なアミロイド構造生物学の台頭に、中心的な役割を果たしてきた。特に、全反射蛍光顕微鏡を用いたアミロイド線維の一線維、リアルタイム観察は、世界で追従する研究グループの現れない独自で強力な手法であり、アミロイド線維の実体と特徴を鮮明にした。また、重水素交換と NMR を組み合わせたアミロイド線維の構造安定性解析法は、今日、様々なアミロイド線維で適用される標準的な方法となっており、世界的にも極めて高い評価を得ている。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

本プロジェクトに参加した研究者が、京都大学大学院薬学研究科助教授、ハンガリー Eötvös 大学 Associate Professor に就任した。