

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成14年度採択研究代表者

後藤 祐児

(大阪大学蛋白質研究所 教授)

「アミロイドーシス発症の分子機構解明」

1. 研究実施の概要

本研究では、主に透析アミロイドーシスの原因蛋白質である $\beta 2$ ミクログロブリンとアルツハイマー病に関わるA β ペプチドをはじめいくつかのアミロイド原性蛋白質を用いて、アミロイドーシス発症の分子機構を、蛋白質の動的立体構造や物性に基づいて、原子レベルで解明する。今年度は以下の研究を行った。

- ①アミドプロトンの重水素交換とNMR解析を組み合わせたアミロイド線維解析法によって、さまざまなアミロイド線維の構造安定性をアミノ酸レベルで解析した。これにより、アミロイド線維の重水素交換反応の様式が、球状蛋白質とは異なることを明らかにした。
- ② $\beta 2$ ミクログロブリンやアルツハイマー β ペプチドのアミロイド線維形成を、全反射蛍光顕微鏡を用いて、直接、一線維レベルで観測し、その機構について解析した。
- ③さらに $\beta 2$ ミクログロブリンのさまざまな部位特異的変異体やペプチド、その光学異性体を用いて、アミロイド線維の形成機構や構造安定性を研究した。

研究を展開することにより、アミロイド線維の形成機能や構造安定性を明らかにすると共に、アミロイド線維形成の阻害剤を開発することが期待できる。

2. 研究実施内容

- ①アミロイド線維の重水素交換： $\beta 2$ ミクログロブリンは、剛直なアミロイド線維に加え、フレキシブルなフィラメント構造を形成する。また、21アミノ酸からなるK3フラグメントでも剛直な線維の形成が見られる。アミドプロトンの重水素交換、ジメチルスルフォキシドに溶解、多次元NMR解析を組み合わせた方法によって、これらのさまざまアミロイド線維の構造柔軟性を、アミノ酸レベルで解析した。その結果、アミロイド線維はまず、K3ペプチドに相当するコア領域に形成され、それが全長に伸長していくことが示された。

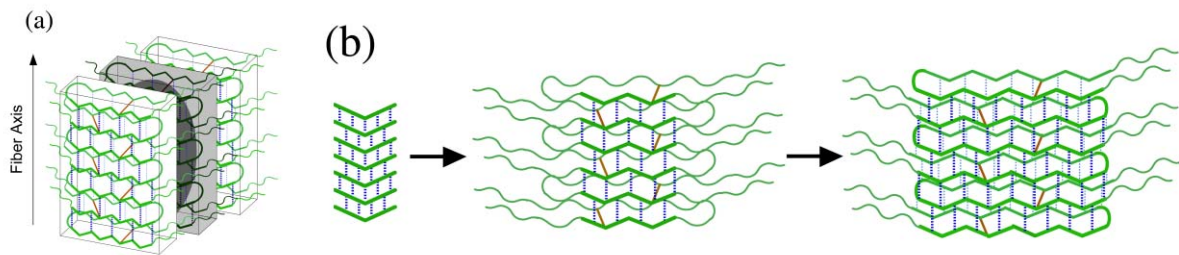


図1：重水素交換実験より得たアミロイド線維 (a)と伸長反応(b)のイメージ。

② アミロイド線維伸長の一線維観測： $\beta 2$ ミクログロブリンとアミロイド β ペプチドのシードに依存した伸長反応を、アミロイド線維に特異的なチオフラビンTの蛍光と全反射顕微鏡を用いて観測した。両アミロイド線維において、伸長反応はシードから一方向に進んだ。また、アミロイド β ペプチドのアミロイド線維形成のインヒビターを検索した。

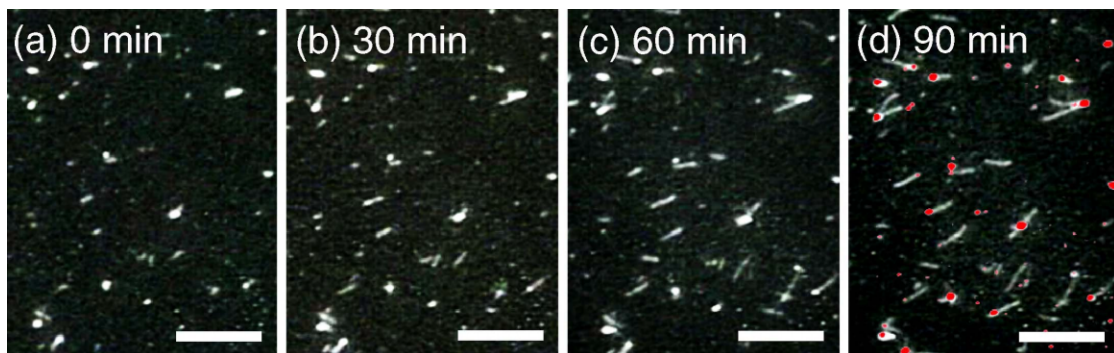


図2：全反射蛍光顕微鏡で観測した $\beta 2$ ミクログロブリンのアミロイド線維の伸長反応。スケールバーは10 μm 。

③ $\beta 2$ ミクログロブリンのアミノ酸変異体のアミロイド線維形成： $\beta 2$ ミクログロブリンのさまざまなアミノ酸変異体を作製して、それらのアミロイド線維形成を調べ、アミノ酸変異のもたらす影響を調べた。その結果、アミノ酸変異によってアミロイド線維形成は大きな影響を受けることが明らかとなった。これらの変異体のネイティブ状態やアミロイド線維の特徴を解析した結果、アミロイド線維の構造安定性とアミロイド線維の形成速度に強い相関があった。これより、アミロイド線維の安定性がアミロイド線維形成速度の重要な因子であることが明らかとなった。

④ K3フラグメントのアミロイド線維形成： $\beta 2$ ミクログロブリンのアミノ酸残基20-41に相当するK3ペプチドのアミロイド線維形成をさまざまな条件で調べた。その結果、K3ペプチドは中性条件下でもアミロイド線維を形成することが明らかとなった。 $\beta 2$ ミクログロブリンは試験管内において酸性条件下でアミロイド線維を形成するが、生理的条件下での線維形成の機構は明らかでない。本研究より、 $\beta 2$ ミクログロブリンが変性すれば生理的条件下でもアミロイド線維を形成できることが示唆された。

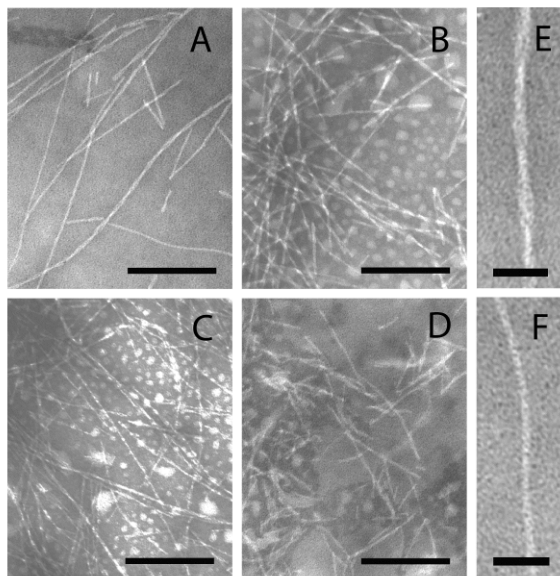


図3：K3ペプチドの形成したさまざまなアミロイド線維の電子顕微鏡画像。A-Dのスケールバーは200 nm、E、Fのスケールバーは40。

3. 研究実施体制

後藤グループ

- ①研究分担グループ長：後藤 祐児（大阪大学蛋白質研究所、教授）
- ②研究項目：アミロイド線維の構造物性と形成機構、アミロイド線維を溶解する薬物の開発

桑島グループ

- ①研究分担グループ長：桑島 邦博（東京大学大学院理学系研究科、教授）
- ②研究項目：アミロイド線維の構造と物性の解析

内木グループ

- ①研究分担グループ長：内木 宏延（福井大学医学部、教授）
- ②研究項目：アミロイド線維の構造物性と形成機構、アミロイド線維を溶解する薬物の開発

樋口グループ

- ①研究分担グループ長：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）
- ②研究項目：アミロイドーシスの伝播の機構

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

【後藤祐児】

- Fernandez, A., Kardos, J., Scott, L. R., Goto, Y. & Berry, R. S. Structural defects and the diagnosis of amyloidogenic propensity. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6446-6451.
- Gozu, G., Lee, Y.-H., Ohhashi, Y., Hoshino, H., Naiki, H. & Goto, Y. Conformational dynamics of β 2-microglobulin analyzed by reduction and reoxidation of the disulfide bond. (2003) *J. Biochem.* **133**, 731-736.
- Fernández, A., Kardos, K. & Goto, Y. Protein folding: could hydrophobic collapse be coupled with hydrogen-bond formation? (2003) *FEBS Letters* **536**, 187-192.
- Ban, T., Hamada, H., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16462-16465.
- Hirota-Nakaoka, N., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2003) Dissolution of β 2-microglobulin amyloid fibrils by dimethylsulfoxide. *J. Biochem.* **134**, 159-164 .
- Hasegawa, K., Ohhashi, Y., Yamaguchi, I., Takahashi, N., Tsutsumi, S., Goto, Y., Gejyo, F. & Naiki, H. Amyloidogenic synthetic peptides of β 2-microglobulin-A role of the disulfide bond. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **304**, 101-106.
- Chiba, T., Hagihara, Y., Higurashi, T., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2003) Amyloid fibril formation in the context of full-length protein: Effects of proline mutations on the amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. *J. Biol. Chem.* **278**, 47016-47024.
- Yagi, M., Sakurai, K., Kalidas, C., Batt, C. A. & Goto, Y. Reversible unfolding of bovine β -lactoglobulin mutants without a free thiol group. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47009-47015.
- Villanueva, J., Hoshino, H., Katou, H., Kardos, J., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Increase in the conformational flexibility of β 2-microglobulin upon copper binding: A possible role for copper in dialysis-related amyloidosis. (2004) *Protein Sci.* **13**, 797-809.
- Ohhashi, Y., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Optimum amyloid fibril formation of peptide 20-41 at neutral pH suggests intrinsic amyloidogenic preference of β 2-microglobulin under physiological conditions. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 10814-10821.

○ Hiramatsu, H., Goto, Y., Naiki, H. & Kitagawa, T. Core structure of amyloid fibril proposed from IR-microscope linear dichroism. (2004) *J. Amer. Chem. Soc.* **126**, 3008-3009.

○ Yamaguchi, K., Katou, H., Hoshino, M., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Core and heterogeneity of β 2-microglobulin amyloid fibrils as revealed by H/D exchange. (2004) *J. Mol. Biol.* **338**, 559-571.

【桑島邦博】

○ Inobe, T. & Kuwajima, K. Φ Value analysis of an allosteric transition of GroEL based on a single-pathway model. (2004) *J. Mol. Biol.* **339**, 199-205.

【内木宏延】

○ Yamaguchi, I., Suda, H., Tsuzuike, N., Seto, K., Seki, M., Yamaguchi, Y., Hasegawa, K., Takahashi, N., Yamamoto, S., Gejyo, F. & Naiki, H. Glycosaminoglycan and proteoglycan inhibit the depolymerization of β 2-microglobulin amyloid fibrils in vitro. (2003) *Kidney International*, **64**, 1080-1088.

○ Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. (2003) *J. Neurochem.* **87**, 172-181.

【樋口京一】

○ Kitagawa, K., Wang, J., Mastushita, T., Kogishi, K., Hosokawa, M., Fu, X., Guo, Z., Mori, M. & Higuchi, K. Polymorphisms of mouse apolipoprotein A-II: seven alleles found among 41 inbred strains of mice. (2003) *Amyloid*, **10**, 207-214.

○ Umezawa, M., Tatematsu, K., Korenaga, T., Fu, X., Matsushita, T., Okuyama, H., Hosokawa, M., Takeda, T. & Higuchi, K. Dietary fat modulation of ApoA-II metabolism and prevention of senile amyloidosis in the senescence accelerated mouse (SAMP1). (2003) *Journal of Lipid Research*, **44**, 762-769.

○ Guo, Z., Mori, M., Fu, X., Yao, J., Xing, Y., Korenaga, T., Li, G., Matsushita, T., Hosokawa, M. & Higuchi, K. Amyloidosis modifier genes in the less amyloidogenic A/J mouse strain. (2003) *Laboratory Investigation*, **83**, 1605-1613.

○ Korenaga, T., Fu, X., Xing, Y., Matsushita, T., Kuramoto, K., Syumiya, S., Hasegawa, K., Naiki, H., Ueno, M., Ishihara, T., Hosokawa, M., Mori, M. & Higuchi, K. Tissue Distribution, Biochemical Properties and Transmission of Mouse Type A AApoAII Amyloid. (2004) *American Journal of Pathology*, **164**, 1597-1606.

○ Fu, X., Korenaga, T., Fu, L., Xing, Y., Guo, Z., Matsushita, T., Hosokawa, M., Naiki, H., Baba, S., Kawata, Y., Ikeda, S., Ishihara, T., Mori, M. & Higuchi, K. Induction of AApoAII amyloidosis by various heterogeneous amyloid fibrils. (2004) *FEBS Letters*, **563**, 179-184.

(2) 特許出願

なし