

「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)

## 「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 $\beta$ 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アミロイド線維の構造安定性を、重水素交換、熱測定、圧力効果によって解析し、天然構造と比較した。アミロイド線維には広範囲にわたる領域で $\beta$ シートが形成されている一方、内部には多くの空隙の存在することを示した。

② $\beta 2$ ミクログロブリンやアルツハイマー $\beta$ 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た。これにより、線維核に依存した伸長反応の実態がリアルタイムで明らかとなった。

③アミロイド線維にはいくつかの多形が存在し、それらがシーディング反応によって伝播して行くと考えられる。 $\beta 2$ ミクログロブリンとその断片ペプチドを用いて、アミロイド線維を介した蛋白質構造の伝播を示した。

以上の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アミロイド線維の構造と安定性：

アミロイド線維は単結晶にはならず、高分子量複合体であるため溶液NMRも使うことができない。本研究では、重水素交換、ジメチルスルフォキシドによるアミロイド線維の溶解と溶液NMRを組み合わせることによって、アミロイド線維の構造安定性の解析を進めている。いくつかのアミロイド線維を比較して解析することにより、アミロイド線維には広範囲にわたる領域で $\beta$ シートが形成されていることが示された。また、線維のコアが形成され、それが周辺に成長していくという線維成長機構を提唱した。

アミロイド線維の熱力学的な安定化機構を理解することは、その構造安定性を理解するうえで重要な課題である。アミロイド線維の線維核に依存した伸長反応を、等温滴定型熱

量計で測定することにより、アミロイド線維形成の熱量、比熱の変化を明らかにした。また、圧力に対する応答を測定したところ、圧力増加に伴い、いったんアミロイド線維の構造がより規則的になり、その後、変性することが明らかとなった。これらの結果より、アミロイド線維の構造特徴として内部パッキングの欠陥があることが示唆された。これらは、「天然構造は側鎖主体の構造であるのに対して、アミロイド線維は主鎖主体の構造」という提案と一致している。

## ②アミロイド線維形成のリアルタイム観察

アミロイド線維の形成反応を理解するためには、その直接観察が有用である。全反射蛍光顕微鏡を用いて、アミロイド線維を一線維レベルかつリアルタイムで観察する方法を開発した。今年度は特にアルツハイマー病に関わるアミロイド $\beta$ ペプチドのアミロイド線維形成に焦点を当てた(図1)。伸長反応を鮮明に観測することができた。ほとんどの伸長はシードから一方向に進んだ。極めて長く、迅速なアミロイド線維の形成が観測され、A $\beta$ が強いアミロイド線維形成能力をもっていることが示唆された。

## ③アミロイド線維を介した構造の伝播と適応

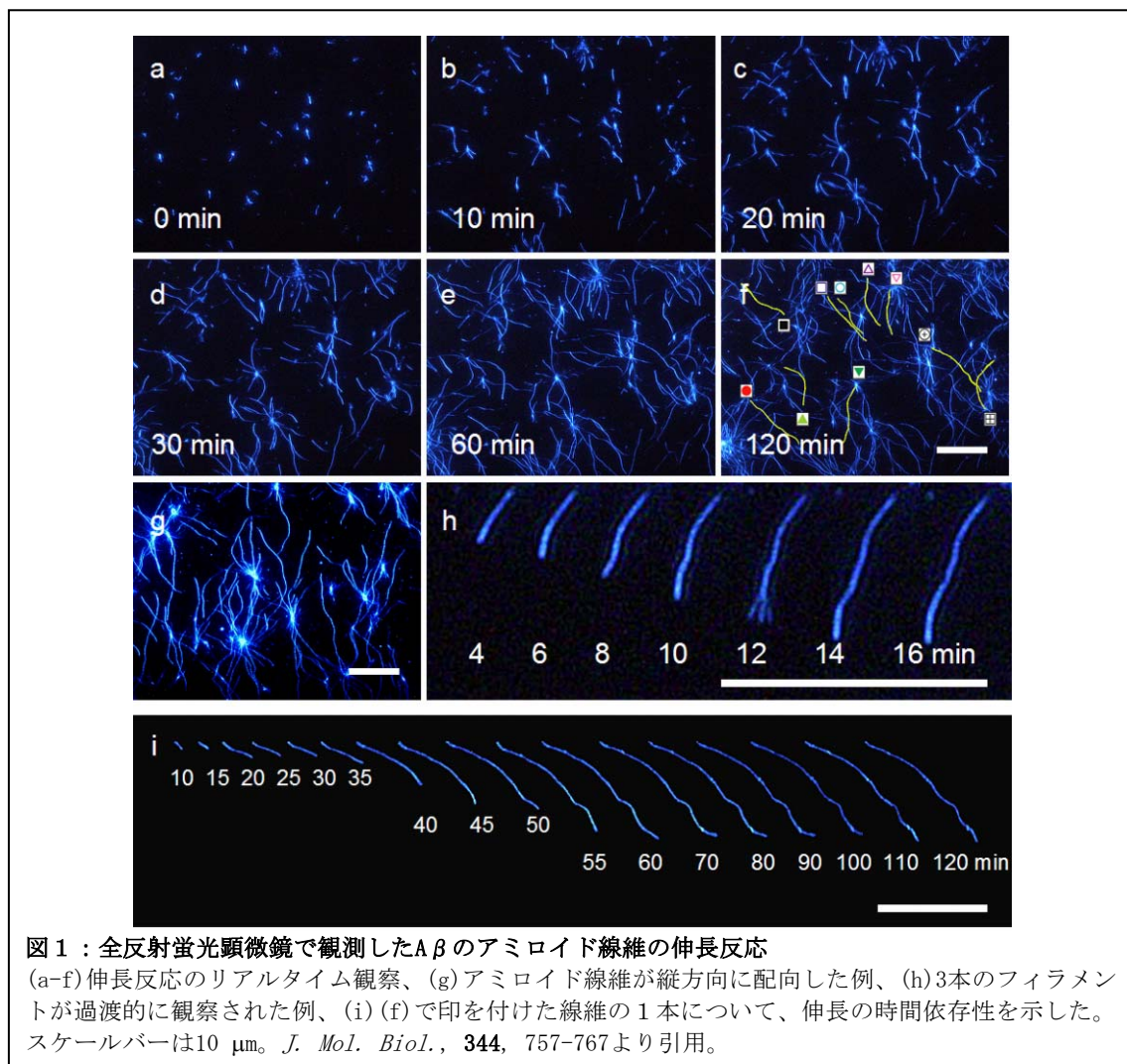
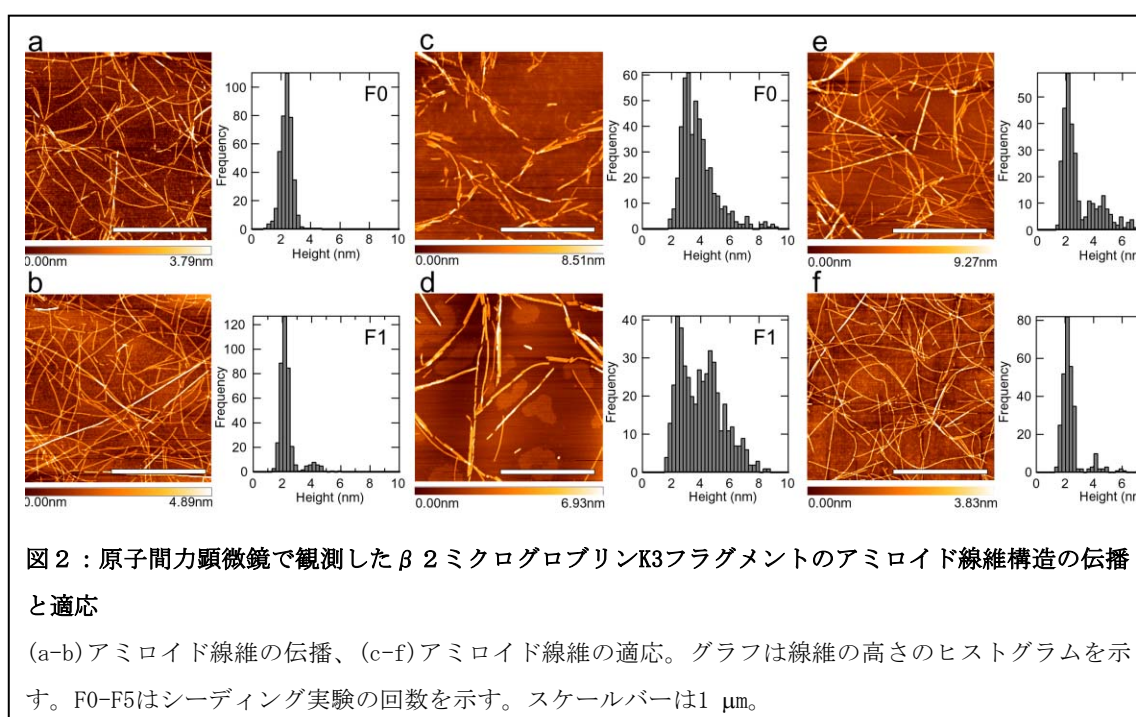


図1：全反射蛍光顕微鏡で観測したA $\beta$ のアミロイド線維の伸長反応

(a-f)伸長反応のリアルタイム観察、(g)アミロイド線維が縦方向に配向した例、(h)3本のフィラメントが過渡的に観察された例、(i)(f)で印を付けた線維の1本について、伸長の時間依存性を示した。スケールバーは10  $\mu$ m。J. Mol. Biol., 344, 757-767より引用。

アミロイド線維にはいくつかの多形が存在し、それらがシーディング反応によって伝播して行く。このような構造の伝播が、プリオン病で示唆される「ひとつのプリオン蛋白質による異なった病態」の分子機構ではないかと考えられている。

$\beta$ 2ミクログロブリンを用いて、シーディングによるアミロイド線維の伝播を研究した。酸性条件で作製したアミロイド線維は中性では不安定であるが、シーディングを繰り返すことによって中性で安定な線維ができるようになる適応現象を発見した。また、 $\beta$ 2ミクログロブリンの断片ペプチドによっても、シーディングの繰り返しによって、構造の伝播と共に、構造の適応の起きる場合のあることを示した。これらの適応現象は、伸長反応速度の異なるアミロイド線維が競争するモデルにより説明することができた。



#### ④アミロイド線維と天然構造の違い

以上の研究により、アミロイド線維と天然構造の本質的な違いが明らかとなりつつある。第1が、線維構造の多形である。アミロイド線維は超分子構造であり、同じ蛋白質が形成するにも関わらず、いくつかの微妙に異なった構造形態が観測される。アミロイド線維に存在する空隙が多形の存在に大きく関わる。第2が、構造形成の極めて強いシード依存性である。一般に自発的な線維形成が困難であるのに対して、シード存在下の形成は著しく促進される。このとき、シードは鋳型として作用し、線維の構造にもシード依存性が観測される。これら、「構造多形」と「シード依存構造形成」という2つの特徴が合わさることにより、「異なった構造の伝播と適応」が起きる。これらの現象が、プリオン病をはじめとするアミロイドーシスの発症と伝播の分子機構を解明する鍵となると考えている。

### 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、アミロイド原性蛋白質予測、アミロイド線維を利用したナノ材料の創製

#### 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（原著論文）発表

##### 【後藤祐児】

- Takehiro Narimoto, Kazumasa Sakurai, Azusa Okamoto, Eri Chatani, Masaru Hoshino, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Yuji Goto  
Conformational stability of amyloid fibrils of  $\beta$ 2-microglobulin probed by guanidine hydrochloride-induced unfolding. *FEBS Letters*, **576** (3), 313-319 (2004).
- Tadato Ban, Masaru Hoshino, Satoshi Takahashi, Daizo Hamada, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Yuji Goto  
Direct observation of A $\beta$  amyloid fibril growth and inhibition. *J. Mol. Biol.*, **344** (3), 757-767 (2004).
- Jozsef Kardos, Kaori Yamamoto, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Yuji Goto  
Direct measurement of the thermodynamic parameters of amyloid formation by isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Chem.*, **279** (53), 55308-55314 (2004).
- Hiromasa Wadai, Keiichi Yamaguchi, Satoshi Takahashi, Takashi Kanno, Tomoji Kawai, Hironobu Naiki and Yuji Goto

- Stereospecific amyloid fibril formation of a peptide fragment of  $\beta$ 2-microglobulin. *Biochemistry*, **44** (1), 157 – 164 (2005).
- Bakthisaran Raman, Eri Chatani, Miho Kihara, Tadato Ban, Miyo Sakai, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, Ch Mohan Rao, and Yuji Goto  
Critical balance of electrostatic and hydrophobic interactions is required for  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibril growth and stability. *Biochemistry*, **44** (4), 1288-1299 (2005).
  - Takashi Kanno, Keiichi Yamaguchi, Hironobu Naiki, Yuji Goto and Tomoji Kawai  
Association of thin filaments into thick filaments revealing the structural hierarchy of amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **149**, 213-218 (2005).
  - Miho Kihara, Eri Chatani, Miyo Sakai, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Yuji Goto  
Seeding-dependent maturation of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibrils at neutral pH. *J. Biol. Chem.* **280** (1), 12012-12018 (2005).
  - Bakthisaran Raman, Tadato Ban, Kei-ichi Yamaguchi, Miyo Sakai, Tomoji Kawai, Hironobu Naiki, and Yuji Goto  
Metal ion-dependent effects of clioquinol on the fibril growth of an amyloid  $\beta$  peptide. *J. Biol. Chem.* **280** (16), 16157-16162 (2005)
  - Atushi Kameda, Masaru Hoshino, Takashi Higurashi, Satoshi Takahashi, Hironobu Naiki, and Yuji Goto  
NMR characterization of refolding of  $\beta$ 2-microglobulin trapped by prolyl cis-trans isomerization. *J. Mol. Biol.* **348** (2), 383-397.

【内木宏延】

- Suguru Yamamoto, Itaru Yamaguchi, Kazuhiro Hasegawa, Shinobu Tsutsumi, Yuji Goto, Fumitake Gejyo, and Hironobu Naiki  
Glycosaminoglycans enhance the trifluoroethanol-induced extension of  $\beta$ 2 microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 126-133 (2004).
- Suguru Yamamoto, Kazuhiro Hasegawa, Itaru Yamaguchi, Shinobu Tsutsumi, József Kardos, Yuji Goto, Fumitake Gejyo, and Hironobu Naiki  
Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of  $\beta$ 2 microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry*, **43** (34) 11075-11082 (2004).
- Kenjiro Ono, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Masahito Yamada  
Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-

- amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res.* **75** (6), 742-750 (2004)
- Kenjiro Ono, Yuji Yoshiike, Akihiko Takashima, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Masahito Yamada  
Vitamin A exhibits potent antiamyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp. Neurol.* **189** (2), 380-392 (2004).
  - Kenjiro Ono, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Masahito Yamada  
Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biophys. Biophys. Acta* **1690** (3) 193-202 (2004).
  - Hideki Hayashi, Nobuyuki Kimura, Haruyasu Yamaguchi, Kazuhiro Hasegawa, Tatsuki Yokoseki, Masao Shibata, Naoki Yamamoto, Makoto Michikawa, Yasuhiro Yoshikawa, Keiji Terao, Katsumi Matsuzaki, Cynthia A. Lemere, Dennis J. Selkoe, Hironobu Naiki, and Tatsuhiko Yanagisawa  
A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J. Neurosci.* **24** (20), 4894-4902 (2004).
  - Naoki Yamamoto, Kazuhiro Hasegawa, Katsumi Matsuzaki, Hironobu Naiki, Katsuhiko Yanagisawa  
Environment- and mutation-dependent aggregation behavior of Alzheimer amyloid beta-protein. *J. Neurochem.* **90** (1), 62-69 (2004).

【樋口京一】

- 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. *FEBS Lett.* **563**, 179-184 (2004).
- Tatsumi Korenaga, Xiaoying Fu, Yanming Xing, Takatoshi Matsusita, Kazunao Kuramoto, Seigo Syumiy a, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, Masaki Ueno, Tokuhiro Ishihara, Masanori Hosokawa, Masayuki Mori, Keiichi Higuchi  
Tissue Distribution, Biochemical Properties and Transmission of Mouse Type A AApoAII Amyloid. *American J. Pathology*, **164** (5), 1597-1606 (2004).
- Wei, L., Kawano, H., Fu, X., Cui, D., Ito, S., Yamamura, K., Ishihara, T., Tokuda, T., Higuchi, K. and Maeda, S.  
Deposition of transthyretin amyloid is not accelerated by the same amyloid in vivo. *Amyloid*, **11**(2), 113-120 (2004).
- Yazaki, M., Fushimi, T., Tokuda, T., Kametani, F., Yamamoto, K., Matsuda, M., Shimojo, H., Hoshii, Y., Higuchi, K. and Ikeda, S.  
A patient with severe renal amyloidosis associated with an immunoglobulin

gamma-heavy chain fragment. *Am. J. Kidney Disease*, **43**(5), 23-28 (2004).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）