

「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 ペプチドなど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に基づき原子レベルで解明することを目標としている。今年度は以下の研究を重点的に行った。

- ① NMRを用いた線維の解析：固体NMRを用いた測定により、 $\beta 2$ ミクログロブリンのフラグメントが形成するアミロイド線維の構造解析を進めた。
- ② 線維形成のリアルタイム観察： $\beta 2$ 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、アミロイド線維形成の分子機構を解析した。特に、アミロイド線維形成に対する基板表面の影響を解析した。
- ③ 線維の構造安定性：熱測定によってアミロイド線維の熱変性過程で、きわめて大きな熱吸収の起きることを見出し、その分子機構を解析した。
- ④ 超音波処理による線維形成：従来アミロイド線維の破碎に用いられてきた超音波処理が、アミロイド線維の核形成を促進することを発見した。

この他、 $\beta 2$ ミクログロブリンのフォールディング反応、アミロイド線維を溶解する薬物の開発、アミロイド線維伝播機構についても研究を進めた。これらの研究により、アミロイド線維形成と、機能的な蛋白質のフォールディングとの、共通点や相違点を明らかにした。

2. 研究実施内容

今年度得られた成果の内いくつかについて以下に詳細を述べる。

(1) アミロイド β ペプチドが形成する老人斑に類似した球状アミロイド集合体 Spherulite の観察

蛋白質のネイティブ状態は自由エネルギーの最小状態であり、フォールディングは自発的に起きる。他方、アミロイド線維形成は物質の結晶形成に類似した反応であり、核形成

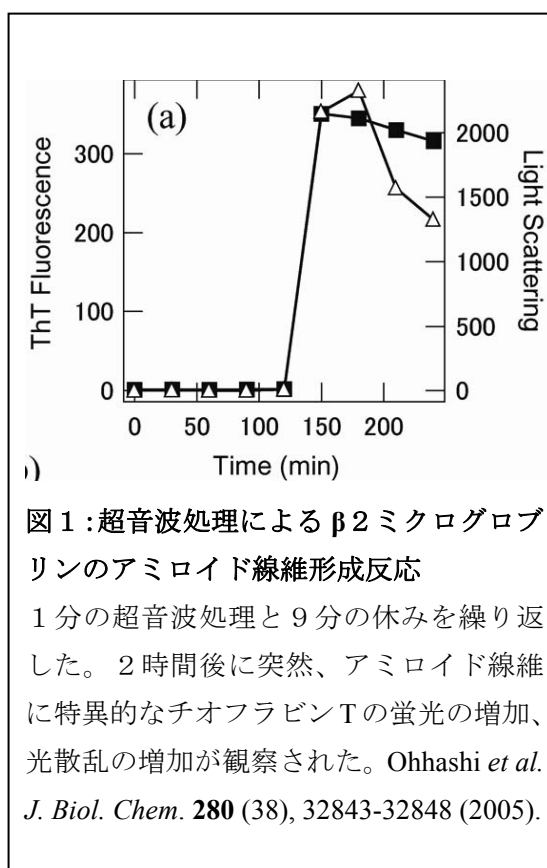
と伸長反応の2段階によって進行する。我々は、全反射蛍光顕微鏡とアミロイド線維に特異的に結合するチオフラビンTを用いて、アミロイド線維の伸長反応を一線維レベルかつリアルタイムで観察する方法を開発し、それを駆使してアミロイド線維形成の分子機構を研究してきた。特にA β ペプチドのアミロイド線維形成では、極めて長く、迅速なアミロイド線維の形成が観測され、A β が強いアミロイド線維形成能力をもっていることを明らかにした。

今年度は、アミロイド線維形成に対する表面の影響に関する研究を重点的に進めた。A β は実験条件下では負に帯電しているのに対して、従来用いてきた石英基板表面も負に帯電している。基板表面の特性によってアミロイド線維の形成速度や形状は大きく影響されることが明らかとなった。特に基板表面を強く負に帯電させて特定の条件可では、他の蛋白質でスフェルライト (Spherulite) として報告されている直径が 30 μm の大きな球状構造体の形成されることを見出した。Spherulite は、形状がアルツハイマー病患者の脳で観測される老人斑の酷似しており、アルツハイマー病発症の分子機構を理解する上でも重要な観察である。

(2) 超音波処理によるアミロイド線維形成反応

今年度は、線維核形成反応に関する研究においても興味深い成果を得た。核形成反応は基本的には困難な反応であり、アミロイド形成反応にはラグ相の観察されることが多い。他方、溶液を攪拌あるいは振とうすると、核形成反応が促進されることが知られている。本研究では、これまでアミロイド線維を破碎して伸長核を形成する目的で用いてきた「超音波処理」を、モノマーの β 2 ミクログロブリンに対して行った。

酸変性した β 2 ミクログロブリンに、水槽型の超音波装置を用いて、1分の超音波処理と9分の休みを繰り返したところ。2時間まではほとんど何も見られないが、約3時間後に突然、アミロイド線維に特異的なチオフラビンTの蛍光の上昇、光散乱の上昇が観測された(図1)。原子間力顕微鏡の画像から、アミロイド線維の形成されたことが確認された(図2)。さらに超音波処理を続けると、線維は断片化した。



このようにして形成した線維断片をモノマーの溶液に加えると、きわめて迅速なアミロイド線維形成が観測され、超音波処理によって作られた線維断片はシーディング能力をもつことがわかった。

溶液の攪拌によるアミロイド線維形成の促進実験では、線維が出現する前に不定形の比較的大きな凝集体が観測されるが、本実験では、そのような大きな凝集体は観測されなかった。

以上の結果より、溶液に対するさまざまな刺激によって蛋白質の凝集が起これ、この凝集体の中にアミロイド線維核（鑄型）となる構造が存在したときに、アミロイドの成長がはじまると考えられる。ただし、アミロイド線維の核形成には、大きな凝集体は必須ではないようである。

（３）アミロイド線維の構造安定性

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。アミロイド線維の熱変性過程で、きわめて大きな発熱反応の起きることを発表した。

これは従来の蛋白質の構造熱力学的解釈

の範囲では説明できない現象であり、アミロイド線維が蛋白質の球状構造と大きく異なる状態であることを反映している。おそらく、アミロイド線維の周辺あるいは内部に多くの水分子が捕獲されることによって、発熱反応が起きると考えられる。この解析をさらに発展させることにより、アミロイド線維の熱測定研究においても新たな領域を開拓できる可能性がある。

（４）結論

機能的なネイティブ構造とアミロイド線維を比較することにより、アミロイド線維の構築機構を提案してきた。特に重要な特徴は、線維形成の極めて強い「シード依存性」と線維構造の「多型」と考えている。これらの特徴はネイティブ構造のフォールディング

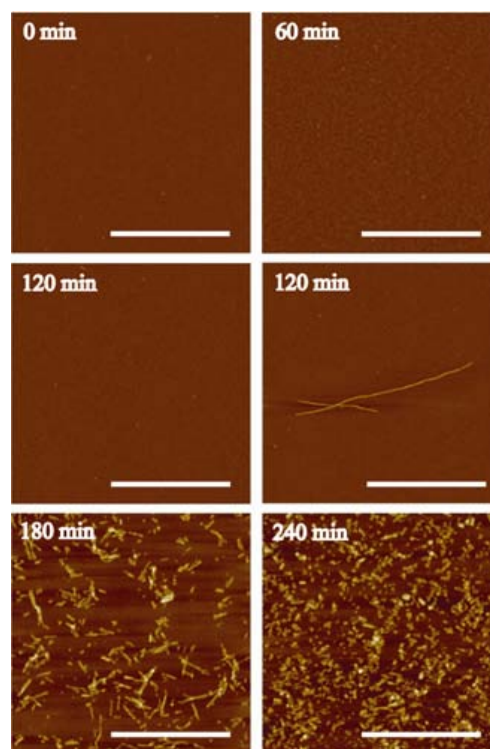


図２：原子間力顕微鏡によるアミロイド線維形成の観察

図１の各時間における観察。２時間まではほとんど何も見られないが、３時間後には多くの線維が形成された。さらに超音波処理を続けると、線維は断片化した。スケールバーは 10 μm 。

グには存在しないが、アミロイド線維の形成では、支配的な原理となる。2つの特徴とそれの引き起こす現象をさらに明らかにすることによって、アミロイドーシス発症の分子機構の解明、その予防や治療、さらには蛋白質の包括的な理解につながると考えている。

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、教授）
- ②研究項目：研究の総括、アミロイド線維の構造物性と形成機構、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、教授）
- ②研究項目：アミロイド線維の構造物性と形成機構

「内木」グループ

- ①研究分担グループ長：内木 宏延（福井大学、教授）
- ②研究項目：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、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】

- Chatani, E., Kato, M., Kawai, T., Naiki, H. & Goto, Y. Main-chain dominated amyloid structures demonstrated by the effect of high pressure. *J. Mol. Biol.* **352** (4), 941-951 (2005).
- Sasahara, K., Naiki, H. & Goto, Y. Kinetically controlled thermal response of β 2-microglobulin amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **352** (3), 700-711 (2005).
- Raman, B., Ban, T., Sakai, M., Pasta, S. Y., Ramakrishna, T., Naiki, N., Goto, Y. & Rao, C. H. α B-Crystallin, a small heat shock protein, prevents the amyloid fibril growth of an amyloid β -peptide and β 2-microglobulin. *Biochem. J.* **392** (3), 573-81 (2005).
- Yamaguchi, K., Takahashi, S., Kawai, T., Naiki, H. & Goto, Y. Seeding-dependent propagation versus maturation of amyloid fibril conformation. *J. Mol. Biol.* **352** (4), 952-960 (2005).

- Ohhashi, Y., Kihara, M., Naiki, H. & Goto, Y. Ultrasonication-induced amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. *J. Biol. Chem.* **280** (38), 32843-32848 (2005).
- Hiramatsu, H., Goto, Y., Naiki, H. & Kitagawa, T. Structural model of the amyloid fibril formed by β 2-microglobulin #21-31 fragment based on vibrational spectroscopy. *J. Amer. Chem. Soc.* **127** (22), 7988-7989 (2005).
- Chatani, E. & Goto, Y. Structural stability of β 2-microglobulin amyloid fibrils in comparison with its native fold. *Biochim. Biochem. Acta*, **1753**, 64-75 (2005).
- Kardos, J., Okuno, D., Kawai, T., Hagihara, Y., Yumoto, N., Kitagawa, T., Závodszky, P., Naiki, N. & Goto, Y. Structural studies reveal that the diverse morphology of β 2-microglobulin aggregates is a reflection of different molecular architectures. *Biochim. Biochem. Acta*, **1753**, 108-120 (2005).
- Yamamoto, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Goto, Y., Gejyo, F. & Naiki, H. Kinetic analysis of the polymerization and depolymerization of β 2-microglobulin-related amyloid fibrils in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **1753**, 34-43 (2005).
- Molecular interactions in the formation and deposition of β 2-microglobulin-related amyloid fibrils. Naiki, H., Yamamoto, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Goto, Y. & Gejyo, F. *Amyloid*, **12** (1), 15-25 (2005).
- Iizuka, R., Yoshida, T., Ishii, N., Zako, T., Takahashi, K., Maki, K., Inobe, T., Kuwajima, K. & Yohda, M. Characterization of archeal group II chaperonin-ADP-metal fluoride complexes: Implications that group II chaperonins operate as a "two-stroke engine. *J Biol Chem.* **280** (48) 40375-40383 (2005).
- Tojo, K., Tokuda, T., Hoshii, Y., Fu, X., Higuchi, K., Matsui, T., Kametani, F. & Ikeda, S. Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. *Amyloid*, **12**, 103-130 (2005).
- Yan, J., Fujii, K., Yao, J., Kishida, H., Hosoe, K., Sawashita, J., Takeda, T., Mori, M. & Higuchi, K. Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. *Exp Gerontol.* **41**, 130-140 (2006).
- Korenaga, T., Yan, J., Sawashita, J., Matsusita, T., Naiki, H., Hosokawa, M., Mori, M., Higuchi, K. & Fu, X. Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol*, **168**, 898-906 (2006).
- Zhang, H., Sawashita, J., Fu, X., Korenaga, T., Yan, J., Mori, M. & Higuchi, K. Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J.* (2006) published on line March 20, 2006
- Hirohata, M., Ono, K., Naiki, H. & Yamada, M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Neuropharmacology* **49** (7), 1088-1099 (2005).

- Ono, K., Noguchi, M., Matsumoto, Y., Yanase, D., Iwasa, K. & Naiki, H., Yamada, M. Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes β -amyloid fibril formation in vitro. *Neurobiol.Dis.* **20** (2), 233-240 (2005).
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Neurochem. Int.* **48** (4), 275-285 (2006)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数： 0 件（CREST 研究期間累積件数： 1 件）