

「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、蛋白質の動的立体構造や物性に基づいて、アミロイドーシス発症の分子機構を、原子レベルで解明することを目指している。透析アミロイドーシスの原因蛋白質である β 2ミクログロブリンとアルツハイマー病に関わるアミロイド β ペプチド(A β)を用いて、アミロイド線維の形成反応、アミロイド線維の構造と安定性に関する以下の成果を得た。

1. 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、A β アミロイド線維形成の一線維レベルかつリアルタイム観察に成功した。
2. 固体NMRを用いた、 β 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立体構造を決定した。
3. β 2ミクログロブリンのフラグメントが、多様なアミロイド構造を形成することを示した。
4. アミロイド線維を介した蛋白質構造の伝播と適応反応の分子機構を示した。

以上の研究により、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。この他、 β 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。これらの成果は、アミロイドーシスの予防や治療法の確立につながると期待できる。

2. 研究実施内容

1. アミロイド線維形成のリアルタイム観察

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た。この手法を用いて、アミロイド β ペプチド(A β)のアミロイド線維形成を観察したところ、強く負に帯電した基板上で、巨大なアミロイド球体が出現した[1]。これはスフェルライトと呼ばれているものであり形状は老人斑に酷似していた。このことはアルツハイマー病で観察される老人斑の形成機構に重要な示唆を与える。

2. アミロイド線維の構造

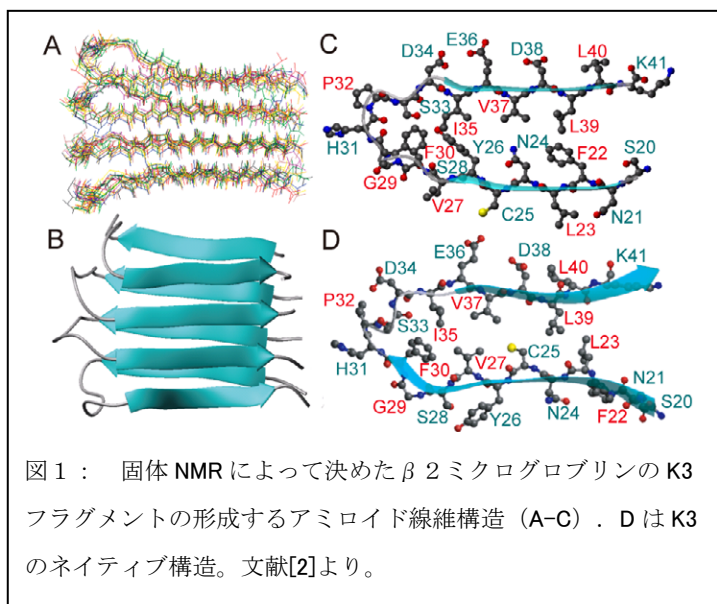
アミロイド線維は、線維軸に対して β シートが直交する「クロス β シート構造」から構成されることがわかっている。しかし、その詳細は不明である。固体 NMR を用いて、 $\beta 2$ ミクログロブリンのフラグメントが形成するアミロイド線維の立体構造を決定した[2]。これより、並行 β シートからなるアミロイド線維の基本構造が明らかとなった。

3. ユニークなネイティブ構造 versus 多様なアミロイド構造

ネイティブ構造の別の特徴は各アミノ酸配列に対するフォールドのユニークさであり、ユニークなフォールディングのできる配列が進化の過程で選択されたと考えられる。これに対して、ひとつのアミロイド原性蛋白質やペプチドの形成するアミロイド線維の構造は多様である。アミロイド線維の構造多様性をもたらす原因のひとつは、空隙の存在である。密に充填される必要がないために、さまざまな線維構造が可能となる。 $\beta 2$ ミクログロブリンに由来する K3 ペプチドが、トリフルオロエタノール存在下で2種類の異なった構造をとることを見出し、その構造安定化の機構を明らかにした[3]。

4. アミロイド線維を介した蛋白質構造の伝播と適応

以上に述べたアミロイド線維の形成反応と構造的特徴が合わさったとき、通常のネイティブ蛋白質にはない意外な特徴が生じる。第一は、アミロイド線維を介した蛋白質の構造伝播である。プリオン病には、同じプリオンタンパク質が原因であるにも関わらず様々な



症状があり、さらに、このようなプリオン種の多様性は、感染時や次世代に伝播される。今日、このようなプリオン病の一見、不思議な現象は、アミロイド線維によって容易に説明できることが指摘されている。つまり、アミロイド線維の構造は多様であり、それは鋳型に依存した増殖によって次世代に継がれる(コンフォメーションメモリー)。

コンフォメーションメモリーは永遠に続くであろうか。

我々は、アミロイド線維の伸長を繰り返したとき、異なった線維構造が伝播すると同時に、そのひとつの線維構造が変化する現象を見出した(アミロイド線維の適応)[3]。このような適応現象は、異なった線維の伸長速度が異なることによって容易に説明することができ

た。生体内でのアミロイド線維の適応現象はまだ知られていないが、アミロイドーシスの進行や伝播を考える上で重要な現象であると考え。

5. 今後の展望

アミロイド線維の構造物性に関する研究は、蛋白質の構造安定性を理解するための重要な問題として、さらには関連する疾病の予防や治療を目標として、大きく展開している。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解析した。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」である。ネイティブ構造とは対照的な2つの特徴と、それらによって引き起こされる現象をさらに明らかにすることは、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、さらには蛋白質世界の包括的な理解につながると期待できる。

また、特に興味深いことは、アミロイド線維形成の操作である。アミロイド線維をナノテクノロジーの素子として見たとき、均質で剛直な線維の特徴は魅力的である。このような観点から、アミロイド線維の配列化を試みている。

文献

- [1] Ban, T. *et al.* Real-time and single fibril observation of the formation of amyloid β spherulitic structures. *J. Biol. Chem.* **281** (44), 33677-33683 (2006).
- [2] Iwata, K. *et al.* 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)
- [3] Ban, T. *et al.* Direct observation of amyloid fibril growth, propagation, and adaptation. *Acc. Chem. Res.* **39** (9), 663-670 (2006).

3. 研究実施体制

(1)「後藤」グループ

①研究者名

後藤 祐児 (大阪大学 教授)

②研究項目

後藤 祐児 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

(2)「桑島」グループ

①研究者名

桑島 邦博 (東京大学 教授)

桑島 邦博 (自然科学研究機構 教授)

②研究項目

桑島 邦博 アミロイド線維の構造物性と形成機構

(3)「内木」グループ

①研究者名

内木 宏延 (福井大学 教授)

②研究項目

内木 宏延 アミロイドーシスの分子病態解明とアミロイド線維を溶解する薬物の開発

(4)「樋口」グループ

①研究者名

樋口 京一 (信州大学 教授)

②研究項目

樋口 京一 アミロイドーシスの伝播の機構

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

【後藤祐児】

- Direct observation of amyloid growth monitored by total internal reflection fluorescence microscopy.
Ban, T. & Goto, Y. *Methods Enzymol.* (2006) **413**, 91-102.
- Conformation of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin probed by tryptophan mutagenesis.
Kihara, M., Chatani, E., Iwata, K., Yamamoto, K., Matsuura, T., Nakagawa, A., Naiki, H. & Goto, Y. (2006) *J. Biol. Chem.* **281** (41) 31061-31069.
- Seeding-dependent propagation and adaptation of amyloid fibril conformation.
Chatani, E., Naiki, H. & Goto, Y. (2006) *J. Mol. Biol.* **359** (4), 1086-1096.
- Real-time and single fibril observation of the formation of amyloid β spherulitic structures.
Ban, T., Morigaki, K., Yagi, H., Kawasaki, T., Kobayashi, A., Yuba, S., Naiki, H. & Goto, Y. (2006) *J. Biol. Chem.* **281** (44), 33677-33683.
- Exothermic effects observed upon heating of β_2 -microglobulin monomers in the presence of amyloid seeds.
Sasahara, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2006) *Biochemistry*, **45** (29), 8760-8769.
- Structure of interacting segments in the growing amyloid fibril of β_2 -microglobulin probed with IR spectroscopy.
Lu, M., Hiramatsu, H., Goto, Y. & Kitagawa, T. (2006) *J. Mol. Biol.* **362** (2), 355-364.
- Mechanism by which the amyloid-like fibrils of a β_2 -microglobulin fragment are induced by fluorine-substituted alcohols.
Yamaguchi, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2006) *J. Mol. Biol.*, **363** (1), 279-288.
- 3D Structure of amyloid protofilaments of β_2 -microglobulin fragment probed by solid-state NMR.
Iwata, K., Fujiwara, T., Matsuki, Y., Akutsu, H., Takahashi, S., Naiki, H. & Goto, Y. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (48), 18119-18124.
- Flexible docking of an amyloid-forming peptide from β_2 -microglobulin.
Standley, D. M., Yonezawa, Y., Goto, Y. & Nakamura, H. (2006) *FEBS Lett.* **580** (26),

6199-6205.

【内木宏延】

- Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro.
Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M. (2006) *Neurochem. Int.* **48** (4), 275-285.
- Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis.
Korenaga, T., Yan, J., Sawashita, J., Matsushita, T., Naiki, H., Hosokawa, M., Mori, M., Higuchi, K. & Fu, X. (2006) *Am. J. Pathol.* **168** (3), 898-906.
- Blood-borne factors inhibit Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro.
Ono, K., Noguchi-Shinohara, M., Samuraki, M., Matsumoto, Y., Yanase, D., Iwasa, K., Naiki, H. & Yamada, M. (2006) *Exp. Neurol.* **202** (1), 125-132.
- Inhibitors of amyloid β -protein aggregation mediated by GM1-containing raft-like membranes.
Matsuzaki, K., Noguch, T., Wakabayashi, M., Ikeda, K., Okada, T., Ohashi, Y., Hoshino, M. & Naiki, H. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1768** (1), 122-130.
- Cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies patients enhances α -synuclein fibril formation in vitro.
Ono, K., Noguchi-Shinohara, M., Yoshita, M., Naiki, H. & Yamada, M. (2007) *Exp. Neurol.* **203** (2), 579-583.
- The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure.
Hirohata, M., Hasegawa, K., Tsutsumi-Yasuhara, S., Ohhashi, Y., Ookoshi, T., Ono, K., Yamada, M. & Naiki, H. (2007) *Biochemistry*, **46** (7), 1888-1899.

【樋口京一】

- Amyloidosis in transgenic mice expressing murine amyloidogenic apolipoprotein A-II (Apoa2c).
Ge, F., Yao, J., Fu, X., Guo, Z., Yan, J., Zhang, B., Zhang, H., Tomozawa, H., Miyazaki, J., Sawashita, J., Mori, M. & Higuchi, K. (2007) *Lab. Invest.* (in press)
- Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. (2006) Yan, J., Fujii, K., Yao, J., Kishida, H., Hosoe, K., Sawashita, J., Takeda, T., Mori, M. & Higuchi, K. *Exp. Gerontol.* **41**(2), 130-140

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0件 (CREST 研究期間累積件数:1件)