

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08436

研究課題名(和文) 生体成分組成の解析に基づくAAアミロイドーシス発症の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular basis for the pathogenesis of AA amyloidosis based on the compositional analysis of biomolecules

研究代表者

田中 将史 (Tanaka, Masafumi)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40411904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：AAアミロイドーシス発症には血清アミロイドA(SAA)の血中濃度上昇のほか、SAAと他の生体成分との相互作用が寄与する。しかしながら、これら相互作用と疾患の発症とを直接結びつける分子基盤は不明であった。本研究では、グリコサミノグリカンや高密度リポタンパク質(HDL)の構成脂質が同症の発症に与える影響を明らかにすることを目的とした。その結果、ヘパラン硫酸の高硫酸化ドメインやHDL中のホスファチジン酸濃度が影響を与えることを明らかにした。今後も引き続き、SAAが形成する凝集体の細胞毒性などについて評価することで、AAアミロイドーシスの発症機構を分子レベルで解明することを目指す。

研究成果の概要(英文)：Human serum amyloid A (SAA) is a precursor protein of AA amyloidosis. Besides an increase in blood levels of SAA, interactions between SAA and other biological components contribute to the onset of AA amyloidosis. However, the molecular basis that directly links these interactions with the onset of disease has not been fully elucidated. In the present study, we aimed to clarify the influence of glycosaminoglycans and lipid constituents in high-density lipoproteins (HDLs) on the pathogenesis of AA amyloidosis. Our research revealed that the highly sulfated domains in heparan sulfate and the concentration of phosphatidic acid in HDLs affect the onset of AA amyloidosis. In the future, we will continue to evaluate the underlying mechanism of AA amyloidosis at the molecular level by evaluating the cytotoxicity of aggregates formed by SAA.

研究分野：生物物理化学

キーワード：アミロイドーシス 血清アミロイドA 高密度リポタンパク質 グリコサミノグリカン ペプチドライゲーション

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質がアミロイド線維とよばれる凝集体を形成し、臓器に沈着することで機能障害をもたらす疾患をアミロイドーシスという。AA アミロイドーシスにおいては血清アミロイド A (SAA) 由来のアミロイド線維が沈着する。SAA は炎症や感染時にその濃度が急激に増加する急性相反応タンパク質の一種で、血中濃度が高値になることが AA アミロイドーシス発症の危険因子の一つであると考えられている。しかしながら、SAA 血中濃度が高値を示す炎症性疾患の患者の 5-10% が AA アミロイドーシスを発症するにすぎない。すなわち、SAA の血中濃度以外に、AA アミロイドーシスに対する感受性を制御する因子が存在すると考えられる。

アミロイド線維は細胞外マトリックスに沈着する。SAA を含め、多くのアミロイド線維形成タンパク質がヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカン (GAG) と共沈着していることから、GAG がアミロイド線維の形成に関与していると推察される。一方で、GAG は全身に遍在しているにもかかわらず線維が沈着する臓器は限られており、アミロイド線維の沈着には臓器特異性があるといえる。また、生体内で大部分の SAA は脂質とともに複合体を形成し、高密度リポタンパク質 (HDL) として存在することが知られている。一方で、臓器に沈着したアミロイド線維は脂質を含んでおらず、SAA が HDL から解離する過程がアミロイド線維の形成に必要であるといえる。以上のことから、SAA と GAG や脂質との相互作用が AA アミロイドーシスに対する感受性を制御する可能性が示唆される。しかしながら、その詳細な分子基盤に関してはあまり明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

AA アミロイドーシス発症には SAA の血中濃度上昇のほか、SAA と細胞外マトリックスや HDL との相互作用が寄与することが示唆されている。しかしながら、これら相互作用と疾患の発症とを直接結びつける分子基盤は十分に解明されていない。そこで本研究では、細胞外マトリックス構成 GAG や HDL 構成脂質の炎症などに伴う組成変化を調べること、それらの変化が AA アミロイドーシス発症に与える影響を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 臓器由来 GAG の組成解析

炎症を惹起したマウスにアミロイドーシスを誘発する AEF (amyloid enhancing factor) を与え、AA アミロイドーシスモデルマウスを作製した。アミロイド沈着した臓器の凍結切片をコンゴレッドで染色し、陽性部位 (アミロイド沈着部位) と陰性部位 (アミロイド

非沈着部位) とをレーザーマイクロダイセクション (LMD) によりそれぞれ回収した。酵素によりタンパク質消化を行い、ゲルろ過やイオン交換クロマトグラフィー等により GAG を抽出した。抽出した GAG の一部を酵素で二糖単位まで分解した後、蛍光標識を行い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて硫酸基含有量および二糖単位における硫酸化部位を解析した。

また、AA アミロイドーシスモデルマウスより肝臓切片を作製し、パラホルムアルデヒドで固定化後、透過処理を行った。ヘパラン硫酸の高硫酸化部位を認識する抗体 (HepSS-1) をビオチン化し、切片に対して反応させた後、ストレプトアビジン R-PE を反応させ、共焦点顕微鏡で観察した。

### HDL 構成脂質の組成解析と SAA-HDL モデル粒子の物性評価

正常および炎症マウスより血液を採取した後、超遠心により HDL を分離し、酵素定量法や液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置を用いて構成脂質組成の解析を試みた。また、生体内の脂質組成を模倣した SAA-HDL モデル粒子を再構成により作製し、SAA 二次構造の安定性を円二色性分散計 (CD) により評価した。また、SAA がアミロイド線維として沈着する際に C 末端領域が切断されることから、酵素による切断に対する安定性を解析した。

### SAA 分子 C 末端切断の影響

AA アミロイドーシスの沈着部位には、SAA (104 残基) の N 末端断片 (主に 76 残基) が検出される。そこで、2 つのペプチドブロックのライゲーション反応と脱硫反応の組み合わせにより、SAA (1-76) ペプチドを化学合成し、線維形成を評価した。具体的には、アミロイド線維に特異的に結合する蛍光色素 (ThT) を用いた蛍光測定、CD や赤外吸収 (IR) スペクトル測定による二次構造解析、透過型電子顕微鏡による形態観察などを行った。

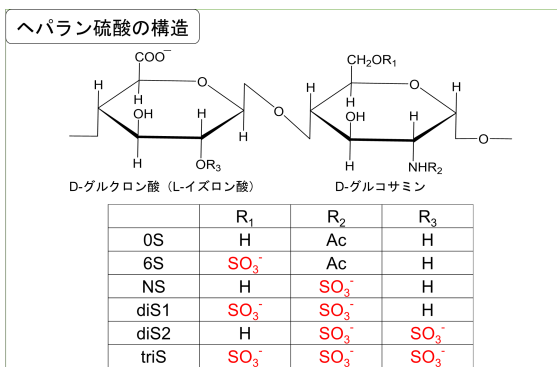
## 4. 研究成果

### 臓器由来 GAG の組成解析

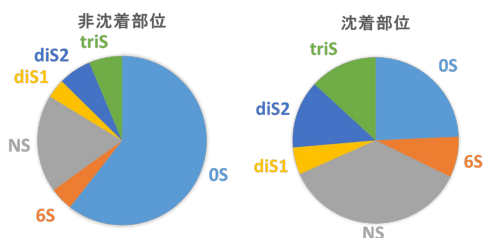
まず、臓器切片より抽出される超微量の GAG から、その組成を HPLC によって解析が可能であるかを調べた。1 枚の臓器切片より GAG を抽出し、酵素により二糖に分解した後、蛍光標識を行った。その結果、抽出方法や用いる酵素などに工夫や注意が必要であるが、超微量の GAG でも解析できる可能性が示された。

そこで、アミロイドーシスモデルマウスを作製し、アミロイド沈着した臓器 (肝臓) の凍結切片を得た。切片をアミロイド蛍光染色剤であるチオフラビン S で染色し、アミロイド沈着および非沈着部位を LMD によりそれ

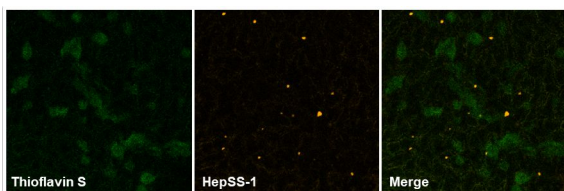
ぞれ回収し、GAGの組成解析を行った。その結果、非沈着部位と比較して、沈着部位においては硫酸化されていないGAGの割合が有意に低く、予想通りGAGの硫酸基含有量がAAアミロイドーシス発症を制御し得ることが示された。しかしながら、別個体を用いた解析では再現性が確認されず、作業工程の煩雑さを考慮し、解析を一旦中断することにした。



ヘパラン硫酸組成比



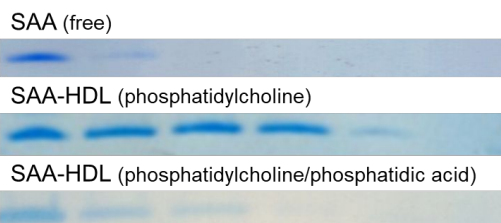
そこで次に、HepSS-1を用いた組織染色により、アミロイド沈着部位と硫酸化度の高いヘパラン硫酸の局在との関連性を調べた。AAアミロイドーシスモデルマウスより作製した肝臓切片に対し、ビオチン化したHepSS-1を反応させ、R-PE標識ストレプトアビジンにより染色し、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、チオフラビンSで染色されるアミロイド沈着部位の周辺に、ヘパラン硫酸の高硫酸化ドメインが存在していることが示された。



#### HDL構成脂質の組成解析とSAA-HDLモデル粒子の物性評価

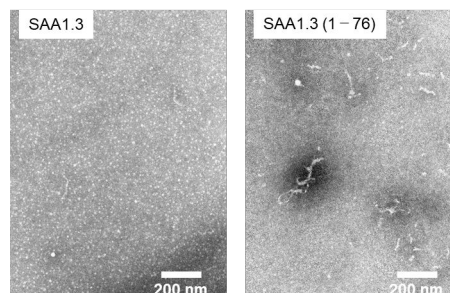
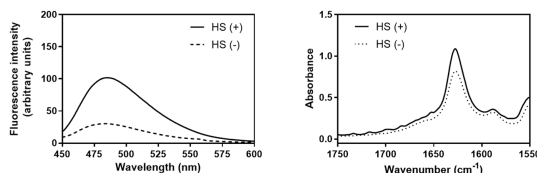
酵素定量法や液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置を用いて炎症に伴うHDL構成脂質の組成変化の解析を行ったが、いずれの方法でも上手くいかなかった。その過程で、炎症に伴いHDL中のホスファチジン酸の濃度が上昇するという報告(Atherosclerosis 2014; 237: 652-60.)を発見し

た。そこで、ホスファチジン酸を含むSAA-HDLモデル粒子を再構成により作製した。その結果、ホスファチジルコリンのみからなるSAA-HDLモデル粒子と比較して、粒子自体のサイズや安定性およびSAAの二次構造や熱安定性などに大きな差異はなかったが、酵素消化に対する安定性の差異が認められ、SAAの局所構造に違いがあることが示唆された。



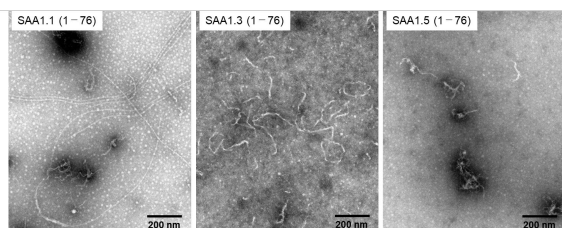
#### SAA分子C末端切断の影響

中性条件において、日本人でAAアミロイドーシスのリスクファクターとされるアイソフォームであるSAA1.3(1-76)ペプチドにヘパラン硫酸を添加した場合、ThT蛍光強度の経時的な増加が認められた。このとき、CD測定からは典型的なシート構造を示すスペクトルは得られなかったが、IR測定によりシート構造の形成が明確に示され、原子間顕微鏡で線維状の凝集体が観察された。この結果は、中性条件ではThT蛍光強度の増加や線維状の凝集体の形成が認められなかった全長SAA1.3の場合とは異なるものとなった。すなわち、SAA分子のC末端部分(77-104残基)の切断が、中性条件でのアミロイド線維の形成を促進する可能性が示された。



そこで次に、AAアミロイドーシスに関連する主なアイソフォームに相当するSAA(1-76)ペプチドを化学合成し、それらの線維形成能を比較した。ThT蛍光測定の結果、SAA1.1(1-76)ペプチドではほとんど蛍光強度の増大は認められず、SAA1.1が日本人

において最も罹患率の低いアイソフォームであることを反映する結果であると考えられた。しかしながら、SAA1.3 よりも寧ろ SAA1.5 においてより高い蛍光強度を示した。すなわち、ThT 蛍光強度の増大が必ずしも AA アミロイドーシスの発症と相関しないことが示された。さらに3つのアイソフォームに相当する SAA (1 - 76) ペプチドが形成する凝集体の形態を比較したところ、いずれのアイソフォームにおいても線維状の凝集体が観察されたが、長さや太さなどの点で明らかに異なる形態をもつことが明らかとなった。ただし、ThT 蛍光強度の増大を示さなかった SAA1.1 (1 - 76) ペプチドでも線維状の凝集体が観察されるなど不明な点も多く、再現性の確認が必要である。



以上、AA アミロイドーシス発症に与えるヘパラン硫酸の高硫酸化ドメインや HDL 中のホスファチジン酸濃度の影響について明らかにした。また、SAA 分子 C 末端の切断がアミロイド線維の形成を促進する可能性を示した。しかしながら、AA アミロイドーシスの罹患率を決定する SAA アイソフォームの影響については未解明である。例えば、C 末端領域の切断に対する感受性がアイソフォーム間で異なる可能性も考えられる。さらには、凝集体の形態は、細胞に対するその毒性と密接に関連することが知られているため、これら凝集体の細胞毒性が異なる可能性も考えられる。今後引き続き、これらについても評価することで、AA アミロイドーシスの発症機構を分子レベルで解明することを目指す。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Tanaka M.\*, Kawakami T., Okino N., Sasaki K., Nakanishi K., Takase H., Yamada T., Mukai T.  
Arch. Biochem. Biophys. 2018, 639: 9-15.  
査読有  
“Acceleration of Amyloid Fibril Formation by Carboxyl-Terminal Truncation of Human Serum Amyloid A”

Tanaka M.\*, Nishimura A., Takeshita H., Takase H., Yamada T., Mukai T.

Chem. Phys. Lipids 2017, 202: 6–12. 査読有  
“Effect of Lipid Environment on Amyloid Fibril Formation of Human Serum Amyloid A”

Takase H., Tanaka M.\*, Yamamoto A., Watanabe S., Takahashi S., Nadanaka S., Kitagawa H., Yamada T., Mukai T.  
Amyloid 2016, 23 (2): 67–75. 査読有  
“Structural Requirements of Glycosaminoglycans for Facilitating Amyloid Fibril Formation of Human Serum Amyloid A”

〔学会発表〕(計5件)

Masafumi Tanaka, Toru Kawakami, Toshiyuki Yamada, Takahiro Mukai  
Effect of Carboxyl-Terminal Truncation on Amyloid Fibril Formation of Human Serum Amyloid A  
16th International Symposium on Amyloidosis  
(第16回 国際アミロイドーシスシンポジウム) 熊本、2018年3月

田中将史、沖野希、高瀬ひろか、川上徹、山田俊幸、向高弘  
AA アミロイドーシスで沈着する SAA (1 - 76) ペプチドの線維形成能評価  
第4回日本アミロイドーシス研究会学術集会、東京、2016年8月

田中将史、高瀬ひろか、関山慶紀、灘中里美、北川裕之、向高弘  
AA アミロイドーシス発症に及ぼすグリコサミノグリカン硫酸基の影響  
第63回日本生化学会近畿支部例会、神戸、2016年5月

沖野希、田中将史、高瀬ひろか、川上徹、山田俊幸、向高弘  
血清アミロイド A (1 - 76) ペプチドの合成とアミロイド線維形成能評価  
日本薬学会第136年会、横浜、2016年3月

田中将史  
SAA の構造特性  
AASAA (AA アミロイドーシスと血清アミロイド A) 研究会、東京、2015年8月

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 将史 (TANAKA, Masafumi)  
神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40411904