

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06659

研究課題名（和文）TTR単量体の変性、凝集体形成の分子機構の解明と遺伝性難病FAPの創薬への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism underlying TTR monomer unfolding and aggregate formation and its application to therapeutic approaches for FAP

研究代表者

佐藤 卓史（Sato, Takashi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（薬）・助教

研究者番号：70555755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：家族性アミロイドポリニューロパチーの原因タンパク質であるトランスサイレチン（TTR）は四量体から単量体への解離、単量体の変性・凝集体形成を経てアミロイドを形成する。本研究では、遺伝子変異によりTTR単量体の構造がどのように変化し、変性した単量体がどのような会合様式で細胞毒性を示す凝集体を形成するのかを明らかにすることを目的とした。TTRは変性に伴い遊離システイン残基を介して分子間でジスルフィド結合した中間体を形成後に凝集化することが明らかになった。さらに、この中間体が細胞毒性の本体であることが示唆された。本研究により、TTRの新たなアミロイド形成機構を提唱することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の研究で汎用されていた酸性条件による変性とは異なり、本研究ではより生理的環境に近い中性条件におけるTTRのアミロイド形成機構を解析した。変性条件を緩和させることで不安定な中間体構造の同定につながり、細胞毒性を示す凝集体を特定できた点に本研究の学術的意義がある。細胞毒性を示す凝集体形成にはTTR分子間のジスルフィド結合が必須であることから、加齢に伴う酸化還元バランスの破綻が疾患発症に關与することを示唆された。本研究は疾患発症概念や予防薬開発において酸化還元バランスの重要性を提起する点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Transthyretin (TTR), a serum protein, is responsible for senile and hereditary amyloidosis. TTR forms amyloid fibrils by dissociating the tetramer into a monomer, denaturation of the monomer, leading to aggregate formation. In this study, we aimed to clarify how the structure of the TTR monomer is denatured by genetic mutations and how the denatured monomers form cytotoxic aggregates. We found that TTR aggregates forming intermediates with disulfide bonds between molecules via free cysteine residues upon denaturation. Furthermore, our results suggest that this intermediate is cytotoxic itself. This study allowed us to propose a new mechanism of amyloid formation in TTR.

研究分野：生化学

キーワード：トランスサイレチン アミロイドーシス ジスルフィド結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) はトランスサイレチン (TTR) の遺伝子変異が原因で発症する難治性疾患である。患者数は約 5 万人 (国内約千人) であり、障害発生率と死亡率は極めて高く、大きなアンメットメディカルニーズが存在する。現在、臨床応用されている肝移植、TTR 四量体安定化剤 (Tafamidis) による治療は発症初期にしか効果がないため、症状が進行した FAP 患者に対する新たな治療薬が切望されている。TTR は主に肝臓で産生されるタンパク質であり、血液中では四量体として存在する。TTR のアミロイド形成は「四量体から単量体への解離」と「単量体の変性・凝集体形成」の 2 つの過程に大別される (図 1)。前者はアミロイド形成反応の律速段階であり、TTR 四量体安定化を標的とした創薬研究が盛んに行われている。一方、後者は新たな創薬標的として有望視されているが、単量体の変性過程の分子機構、細胞毒性を示す凝集体とその形成機構の詳細は不明である。この原因は、アミロイド形成実験に汎用される酸変性条件では律速段階以降の過程の反応速度制御が難しく、変性状態の TTR 単量体や凝集体の検出・解析が困難になるためである。

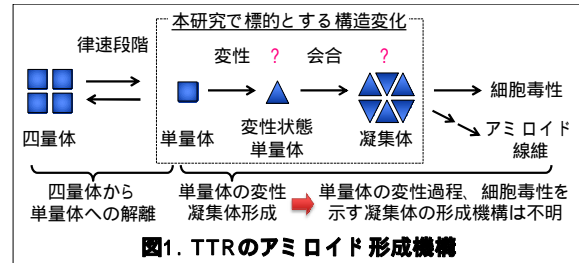


図1. TTRのアミロイド形成機構

代表者は、単量体の変性・凝集体形成過程の解明には律速段階である四量体から単量体への解離過程をスキップすることが必須であると考え、四量体形成に関わる部位に立体障害となるアミノ酸変異 (四量体化阻害変異) を導入した TTR を用いた研究を行ってきた (Sato *et al.* *EMBO J.* 2008, Susuki and Sato *et al.* *J Biol Chem.* 2009, Sato *et al.* *Mol Cell.* 2012)。培養細胞を用いた解析から、野生型 TTR に四量体化阻害変異を導入した単量体型 TTR は正しくフォールディングして細胞外に分泌されるのに対し、FAP 発症変異 TTR (FAP-TTR) に四量体化阻害変異を導入した単量体型 FAP-TTR はミスフォールディングして細胞内で分解されることを明らかにした。したがって、単量体型 TTR と単量体型 FAP-TTR の構造状態を比較することで酸変性条件を用いることなく変性による TTR 単量体の立体構造変化を明らかにできると考えられる。しかし、単量体型 FAP-TTR は不溶性になりやすいため大腸菌を用いたタンパク質精製が困難であることが知られていた。そこで、代表者は大腸菌での単量体型 FAP-TTR タンパク質の発現・精製法の改良に取り組み、様々な FAP 変異を導入した単量体型 FAP-TTR タンパク質の精製に成功した。精製した単量体型 TTR、FAP-TTR タンパク質の物性評価を行ったところ、TTR 単量体の変性・凝集体形成の分子機構解明の手がかりとなる以下の新しい知見を得た。

(1) TTR 単量体には 3 つの構造状態の動的平衡が存在しており、野生型と変異型では構造平衡が異なる。

(2) 単量体型 FAP-TTR はネイティブ状態では存在しないジスルフィド結合を介した二量体 (S-S 結合二量体) を形成する。

(3) 単量体型 FAP-TTR は中性条件で S-S 結合二量体が会合した凝集体を形成する。

2. 研究の目的

本研究では、TTR 単量体の変性・凝集体形成を標的とした創薬研究を展開するために、上記の知見を切り口として、変性による TTR 単量体の立体構造の変化、細胞毒性を示す凝集体の会合状態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動的平衡にある TTR 単量体の各構造状態の安定性序列の解明

代表者は TTR 単量体の構造平衡状態を変化させて、3 つの構造状態のうち各構造へと誘導する 3 種類の低分子化合物を同定している。上記の化合物を使い分けることによって、各構造状態の熱安定性および凝集性を SYPRO orange および ProteoStat を用いた示差走査蛍光測定 (DSF) により解析した。各構造状態の立体構造は核磁気共鳴分光法 (NMR) により決定した。TTR 単量体の構造平衡状態と四量体の構造安定性との関連を明らかにするために、subunit exchange assay および ANS displacement assay を行った。

(2) アミロイド形成における S-S 結合二量体の機能解析

TTR にひとつ存在するシステイン残基 (Cys10) に変異を導入した組換えタンパク質 (Cys 変異型 TTR) を調製した。S-S 結合二量体生成がアミロイド形成に必須であるか調べるために、野生型および Cys 変異型 TTR のアミロイド形成を Native PAGE および Thioflavin T assay により評価した。次に、TTR 単量体を中性条件下で変性させて S-S 結合二量体を調製してサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。精製した S-S 結合二量体の立体構造を NMR および高速原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した。アミロイド形成における機能解析として、S-S 結合二量体がネイティブ構造の TTR 単量体の変性・凝集を誘導するか明らかにするために、Native PAGE、非還元 SDS-PAGE および Western blotting による凝集体形成評価を行った。

(研究3) 細胞毒性を示す S-S 結合二量体の会合状態の解明

研究2で精製した S-S 結合二量体を用いて TTR 凝集体を作製した。また、Cys 変異型 TTR を用いて S-S 結合二量体を含まない凝集体を作製した。凝集体中の S-S 結合二量体の有無が構造形態に及ぼす影響を明らかにするために、Native PAGE、円偏光二色性スペクトル (CD) 測定および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて解析した。次に、凝集体中の S-S 結合二量体の有無が細胞毒性に与える影響を明らかにするために、ヒト神経芽細胞腫 SY-SY5Y 細胞に対する各凝集体の細胞毒性を Cell Counting Kit-8 assay および Cytotoxicity LDH Assay を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 動的平衡にある TTR 単量体の各構造状態の安定性序列の解明

TTR 単量体は Native PAGE で電気泳動すると構造状態が異なると予想される 3 本のバンド (トップフォーム、ミドルフォーム、ボトムフォーム) が観察される。代表者は TTR アミロイド形成を制御する化合物スクリーニングの実施中に各フォームへと構造を変化させる化合物を同定した。そこでまず、化合物による各フォームへの構造変化の経時的解析を行い、各フォームがメジャーとして存在する化合物の処理時間を決定した。本条件下において、TTR 単量体の構造安定性を評価したところ、コントロールと比較してトップフォーム状態では熱安定性が低下することが明らかになった。この構造状態を NMR により解析したところ、TTR の存在する 2 つの β -sheet のうち片方の β -sheet のみにシグナルの移動が観察され、ループ領域のシグナルが消失した。特に、Cys10 近傍のアミノ酸残基のシグナル変化が顕著であったことから、トップフォーム状態へと変化させる化合物は Cys10 と相互作用することで、構造変化を誘導することが示唆された。一方、ミドルフォームおよびボトムフォーム状態となる条件では熱安定性に変化はなかった。NMR により構造解析を行ったところ、予想に反してミドルフォームおよびボトムフォーム状態では同一のシグナルが観察された。NMR から得られた構造情報と Native PAGE でのバンドパターンに矛盾が生じた原因は現在解析中である。最後に、TTR 四量体に対する各化合物の影響を調べたところ、トップフォーム状態へと変化させる化合物は四量体構造を不安定化させ、単量体への解離を促進させた。一方、ミドルフォームおよびボトムフォーム状態へと変化させる化合物は、サイロキシン結合部位に作用することにより、四量体構造を安定化させることが示唆された。TTR 四量体安定化剤は FAP 治療薬として臨床応用されていることから、本研究で同定した 2 種類の化合物は新規 FAP 治療薬候補となることが期待される。一方、TTR 四量体および単量体構造を不安定化した化合物の相互作用様式や結合に伴う構造変化を詳細に解析することで、アミロイド形成に至る過程の構造変化に関する情報を取得できると考えられる。

(2) アミロイド形成における S-S 結合二量体の機能解析

代表者は、単量体型 FAP-TTR はネイティブ状態では存在しないジスルフィド結合を介した二量体 (S-S 結合二量体) を形成することを見出した。そこでまず、S-S 結合二量体が凝集体形成に必須であるか Cys 変異型 TTR を用いて検討した。中性条件下での変性では、Cys 変異により凝集体形成が完全に抑制された。一方、従来から汎用されている酸性条件下での変性では、Cys 変異型 TTR も野生型と同様に凝集体形成を形成した。したがって、変性条件によって形成される凝集体の質 (形態や構成分子) が異なることが示唆された。そこで、S-S 結合二量体を精製して物性評価を行ったところ、S-S 結合二量体は常温下で容易に Thioflavin T 陽性の凝集体を形成することが明らかになった。NMR および AFM による S-S 結合二量体の構造解析の結果より、S-S 結合二量体の立体構造はネイティブ状態と変性状態の中間状態にあたる partial unfolding 状態であることが示唆された。興味深いことに、S-S 結合二量体を還元剤処理するとネイティブ構造の単量体に回復したことから、ジスルフィド結合が partial unfolding 状態のロック機能を果たしており、還元剤処理によりロックを解除するとネイティブな構造状態へと戻ることが明らかになった。次に、アミロイド形成における S-S 結合二量体の機能を解析したところ、S-S 結合二量体はネイティブ構造の TTR 単量体とジスルフィド結合の架け替え反応を起こすことで S-S 結合二量体を複製・増幅して、凝集体形成を促進することを見出した。以上より、中性条件下での TTR アミロイド形成では、TTR 単量体が変性に伴い S-S 結合二量体を形成する過程が律速段階であることが示唆された。

(研究3) 細胞毒性を示す S-S 結合二量体の会合状態の解明

S-S 結合二量体を含む凝集体と S-S 結合二量体を含まない凝集体を作製して、その構造形態を TEM で観察したところ、S-S 結合二量体を含む凝集体は未成熟な線維構造を有しており、長期間インキュベーション後も線維の伸長・束化は観察されなかった。一方、S-S 結合二量体を含まない凝集体は線維構造を作りやすく、長期間インキュベーションにより線維の束化が進行した。各凝集体の二次構造を解析したところ、両者は異なる CD スペクトルを示した。したがって、凝集体の構成分子が異なる、つまり S-S 結合二量体の存在の有無でアミロイド線維の構造形態が異なることが示唆された。そこで次に、線維構造の形態の違いが細胞毒性の発現に影響を与えるか調べるために、ヒト神経芽細胞腫 SY-SY5Y 細胞に対する各凝集体の毒性を検討した。その結果、S-S 結合二量体を含まない凝集体は細胞毒性を示さないのに対して、S-S 結合二量体を含む凝集体は細胞毒性を示すことが明らかになった。細胞に処理する凝集体の会合状態が細胞毒性

の発現に重要であるか調べるために、凝集体の作製時間を変えたサンプルを調製して SY-SY5Y 細胞に処理した。その結果、凝集体の作製時間に関わらず S-S 結合二量体を含む凝集体は細胞毒性を示した。したがって、TTR 凝集体の細胞毒性の発現には凝集体中への S-S 結合二量体の含有が必須であることが本研究から始めて明らかになった。今後、S-S 結合二量体が細胞毒性を示す分子機構を明らかにすることで、FAP の新たな創薬標的の同定や治療薬開発に貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Urabe G, Sato T, Nakamura G, Kobashigawa Y, Morioka H, and Katsuki S	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 1.2 MV/cm pulsed electric fields promote transthyretin aggregate degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68681-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuriko Wakita, Takashi Sato, Keisuke Chosa, Mary Ann Suico, Ryoko Sasaki, Shingo Kawano, Nami Hashimoto, Yuriko Teranishi, Yoshiki Imai, Hiroshi Morioka, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai	4. 巻 41
2. 論文標題 Characterization of non-amyloidogenic G101S transthyretin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 628-636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b17-01021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野祐一朗, 稲田祐貴, 小橋川敬博, 首藤剛, 甲斐広文, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 トランスサイレチンに唯一存在するシステイン残基が構造安定性およびアミロイド形成に与える影響の解析
3. 学会等名 令和2年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Inada, Takashi Sato, Kentaro Noi, Ryoko Sasaki, Yuichiro Ono, Yoshihiro Kobashigawa, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai, Hiroshi Morioka
2. 発表標題 Unfolding-dependent disulfide-linked dimer formation leads to the transthyretin amyloid assembly pathway toward the production of cytotoxic aggregate.
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲田祐貴, 小野祐一朗, 佐々木亮子, 小橋川敬博, 首藤 剛, 甲斐広文, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 トランスサイレチンのアミロイド形成過程の新規中間体S-S dimerの機能解析
3. 学会等名 第19回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野祐一朗, 稲田祐貴, 小橋川敬博, 首藤剛, 甲斐広文, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 トランスサイレチンに唯一存在するシステイン残基が構造安定性およびアミロイド形成に与える影響の解析
3. 学会等名 令和2年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Inada, Takashi Sato, Kentaro Noi, Ryoko Sasaki, Yuichiro Ono, Yoshihiro Kobashigawa, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai, Hiroshi Morioka
2. 発表標題 Unfolding-dependent disulfide-linked dimer formation leads to the transthyretin amyloid assembly pathway toward the production of cytotoxic aggregate
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲田祐貴, 小野祐一朗, 佐々木亮子, 小橋川敬博, 首藤 剛, 甲斐広文, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 トランスサイレチンのアミロイド形成過程の新規中間体S-S dimerの機能解析
3. 学会等名 第19回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲田祐貴, 佐藤卓史, 小野祐一朗, 小橋川敬博, 甲斐広文, 森岡弘志
2. 発表標題 トランスサイレチンのアミロイド形成過程の新規中間体S-S dimerの機能解析
3. 学会等名 第18回次世代を担う若手パイオ・フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲田祐貴, 小野祐一朗, 佐々木亮子, 小橋川敬博, 首藤剛, 甲斐広文, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 アミロイド形成過程におけるトランスサイレチンの新規中間体構造の機能解析
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲田祐貴, 小野祐一朗, 小橋川敬博, 首藤剛, 甲斐広文, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 トランスサイレチンのアミロイド線維形成初期過程で形成される新規中間体の同定とその機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲田祐貴, 佐藤卓史, 河野慎吾, 小橋川敬博, 甲斐広文, 森岡弘志
2. 発表標題 トランスサイレチンの品質管理における小胞体分子シャペロンの基質認識機構の解明
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲田祐貴, 佐藤卓史, 河野慎吾, 小橋川敬博, 甲斐広文, 森岡弘志
2. 発表標題 トランスサイレチンの品質管理における小胞体分子シャペロンBiPの基質認識機構の解析
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野慎吾, 小橋川敬博, 稲田祐貴, 甲斐広文, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 トランスサイレチンのアミロイド形成過程における複数の単量体構造の動的平衡状態の機能解析
3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 環状一本鎖抗体	発明者 森岡 弘志, 小橋川 敬博, 佐藤 卓史, 福 田 夏希, 山内 聡一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、WO 2020/013126	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

http://seimeibunseki.org

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森岡 弘志 (Morioka Hiroshi) (20230097)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授 (17401)	
研究分担者	小橋川 敬博 (Kobashigawa Yoshihiro) (90455600)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・准教授 (17401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	野井 健太郎 (Noi Kentaro) (30588405)	大阪大学・ナノサイエンスデザイン教育研究センター・特任助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関