

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570105

研究課題名（和文） アミロイド線維形成の分子機構の解析と細胞外蛋白質品質管理機構の関与の解明

研究課題名（英文） Studies on the molecular mechanism of amyloid fibril formation and on the role of extracellular quality control mechanism in the fibril formation.

研究代表者

長谷川 一浩 (Hasegawa Kazuhiro)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：60324159

研究成果の概要（和文）：生体内でのアミロイド線維形成機構を解明する為に、生体内環境を模倣した試験管内線維形成系を構築し解析した。①遊離脂肪酸が $\beta 2$ -ミクログロブリン($\beta 2$ -m)アミロイド線維伸長を誘起しうること、②アルツハイマー病 β アミロイド(A β)線維の重合核形成に、A β 蛋白質濃度、気液界面の存在や攪拌が影響し、従来の試験管内重合反応系を再検討する必要があること、③細胞外蛋白質品質管理機構に関して、血中蛋白質である $\alpha 2$ -マクログロブリンが、 $\beta 2$ -mと結合してアミロイド線維形成を抑制するメカニズム等を示した。

研究成果の概要（英文）：We constructed several amyloid fibril formation system *in vitro* to evaluate the roles of the various biological molecules or reaction conditions in the amyloid fibril formation. The key findings of this study are as follows: (1) Non-esterified fatty acids induce the extension of $\beta 2$ -microglobulin amyloid fibril at a neutral pH *in vitro*. (2) Air-water interface, agitation and concentrations of A β peptide play critical roles in the nucleation of β -amyloid fibril of Alzheimer's disease. (3) The detailed molecular mechanism of $\alpha 2$ -macroglobulin, a human plasma protein and an extracellular molecular chaperon, in the inhibition of $\beta 2$ -microglobulin amyloid fibril formation was clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：変性とフォールディング、アミロイド線維、アルツハイマー病、透析アミロイド症

1. 研究開始当初の背景

(1) アミロイド線維形成機構の研究状況

生合成された蛋白質は一般に自ら折れ畳み、機能型天然構造を形成する。一方、ある種の蛋白質は細胞内外で凝集体を形成し、神経変

成疾患やアミロイド症などのフォールディング病と総称される難治性疾患を引き起こす。このうちアミロイドは、20種類を超える前駆体蛋白質モノマーが異常な立体構造をとり、微細な線維を形成し細胞外に蓄積した

ものである。われわれは、アルツハイマー病 β アミロイド(A β)や β 2-ミクログロブリン(β 2-m)アミロイド(透析アミロイド)等の各種アミロイドについて、試験管内における前駆体蛋白質(A β 蛋白質, β 2-m)からのアミロイド線維形成反応系を開発してきた。これらの解析により、線維形成反応が重合核形成過程及び線維伸長過程より構成される、重合核依存性重合モデルで説明できることを示してきた。さらに、各アミロイド線維の核形成・線維伸長・線維安定化の各過程において様々な生体分子・有機化合物との分子間相互作用が重要な役割を果たすこと、またアミロイド毎に特徴的な挙動を示す証拠を積み重ねてきた。また、ポリフェノール類等の各種有機化合物が線維形成を阻害するのみならず、一旦形成された線維を不安定化することを見出した。このように、各種の生体分子はアミロイド線維や前駆体蛋白質に作用することで、核形成・線維伸長・脱重合反応を促進・抑制し、アミロイド線維の形成平衡を動かすと考えられる。

(2) 細胞外における蛋白質の品質管理機構の関与: β 2-m アミロイドや A β 等アミロイド線維形成の際に、脂質分子が形成促進効果を示す。特に β 2-m アミロイドの線維伸長の際には β 2-m が天然状態の立体構造のままでは、線維が伸長しない。ドデシル硫酸ナトリウム、リゾリン脂質、遊離脂肪酸等が β 2-m をアミロイド原性前駆体に変化させ、線維伸長促進効果を示すことを見出した。この結果は生体内における正常な状態では血清アルブミンなどの輸送蛋白質による脂肪酸からの隔離・保護機構が機能するが、何らかの理由で破綻すると、長期間経過後にはアミロイド症を引き起こす可能性を示すものである。一方、細胞外における変性蛋白質の除去には clusterin 等による凝集阻止や腎・肝臓・食細胞での分解をはじめとした“細胞外蛋白質品質管理機構”が関与することが示されているが、その全容は解明されていない。アミロイド前駆体はこれらの品質管理機構の抑制を受けながらも回避して蓄積すると考えられる。品質管理機構の破綻としてのアミロイド症の発症機構は新しい観点であり、この制御機構の実体解明を行うことは重要である。

2. 研究の目的

難治性疾患であるアミロイド症を引き起こす各種アミロイド線維、特に β 2-m アミロイドおよびアルツハイマー病 β アミロイドに焦点を当て、(1)生体内環境を模倣した試験管内

線維形成系モデルを構築し、生体内での線維形成機構を解明する。(2)細胞外の生体環境における蛋白質品質管理機構を解析し、それがアミロイド前駆蛋白質の凝集の予防・促進にどのような効果を及ぼしているのかを解明する。(3)これらの解析によりモデルを作成し、アミロイド症の治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) 生体内環境を模倣した試験管内線維形成系モデルの構築と、生体内での線維形成機構の解明。

① A β 蛋白質(1-40)(A β 40)の核形成反応に対する各種生体物質の影響の解析を試みたところ、試験管内反応系を改良する必要が生じ、基礎検討を行った。蛍光色素チオフラビン T によるアミロイド線維の定量法を駆使して、重合反応に対する界面(気液界面や親水性-疎水性界面)、攪拌の効果を系統的に解析した。

② β 2-m アミロイド線維を生体内で伸長させる誘起因子の候補として、各種遊離脂肪酸の効果を試験管内アミロイド線維形成反応系を用いて解析した。この際、 β 2-m の立体構造変化、遊離脂肪酸のミセル形成、生体内での輸送蛋白質である血清アルブミンとの関係等についても検討した。

(2) 細胞外蛋白質品質管理機構がアミロイド形成に及ぼす効果の解明。

血漿中の変性蛋白質をトラップし凝集を阻止する“シャペロン”候補として haptoglobin、 α 2-マクログロブリン(α 2M)が、 β 2-m アミロイド線維形成に及ぼす効果を、先に開発した試験管内アミロイド線維形成反応系を用いて解析した。また、 α 2M が β 2-m に反応する際の構造変化を、超遠心分析、ウエスタンブロット法等の、物理化学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) A β の核形成反応に対する界面と攪拌の効果。

主な成果。A β の核形成反応に及ぼす各種生体物質の影響を調べるため、試験管内反応系の条件を再検討する必要が生じた。A β 40 濃度を 2.5-20 μ M まで変化させて重合反応を行った。従来一般的に用いられている、気液界面が存在する反応系では、全ての濃度でアミロイド線維の凝集が生じるが、気液界面上に最初に凝集が生じることを見出した(図 1)。

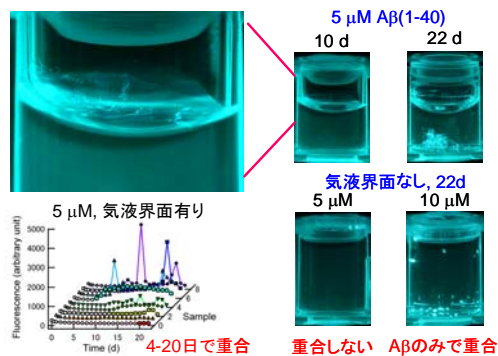


図 1. Aβ凝集体形成に対する気液界面の効果

そこで、気液界面を排除して反応すると、10-20 μM の Aβ40 では重合して線維が生じた。この条件では界面や生体物質が無くても重合してしまうため、生体物質の効果を評価できないと考えられる。従って、気液界面を無くし、Aβ40 濃度を 5 μM 以下にする必要があることが判明した。また、攪拌が存在する生体環境を模倣する為に、気液界面を含んだ状態で攪拌すると重合が顕著に促進されること、気液界面がない状態で回転しても攪拌されないため重合しないことが判明した。そこで、プラスチック片を攪拌子として添加すると、その疎水性表面上で最初に凝集が生じた。以上の結果から、それ自身が線維形成を誘起しない攪拌子が必要であることが示され、引き続き探索を行っている。(Morinaga A et.al., Biochim Biophys Acta. 2010, 雑誌論文②)

位置づけとインパクト。ここ1-2年、各種アミロイドについて、気液界面を始めとする各種界面がその線維形成に重要であることが指摘されはじめています。本研究は、それらの研究とは独自に開始し展開したものである。特に Aβ アミロイド線維の核形成の際に、濃度により界面の影響が異なり、低濃度では気液界面や疎水性界面が不可欠であることを国内外で最初に報告したものである。

今後の展望。従来から試験管内反応系を用いて核形成を誘起する因子を探索していたが、それらの反応系では高濃度 Aβ の使用や気液界面の共存により反応が複雑になり、核形成誘起効果を正確に判定できていなかった可能性がある。本研究の結果を基にして核形成を引き起こしにくい攪拌子を探索し、気液界面を排除した上で線維を形成することのできる反応系を構築することで上記の問題点を克服し、生体での核形成反応を忠実に再現することを試みる。

(2) β2-m アミロイド線維の試験管内線維伸長に及ぼす遊離脂肪酸の効果の解析。

主な成果。透析アミロイド症の原因物質である β2-m アミロイド線維は、中性緩衝液中で、ドデシル硫酸ナトリウム、リゾリン脂質

により伸長することを見出しているが、これらに類似する生体界面活性成分として、血液中に豊富に存在する遊離脂肪酸(NEFA)の効果を検討した。超音波破碎した β2-m アミロイド線維をシードとして用い、β2-m に遊離脂肪酸を添加し、37°C の中性緩衝液中でインキュベートした。ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸は、それぞれ、臨界ミセル濃度(ミセルを形成する最低濃度)を超える濃度では、線維伸長を誘起した(図2)。

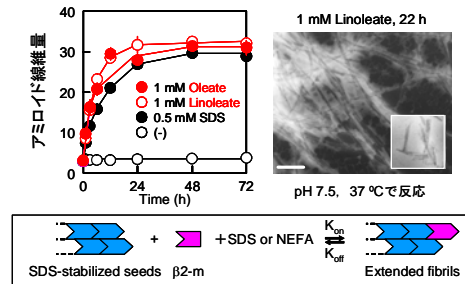


図 2. 遊離脂肪酸によるβ2-mアミロイド線維伸長反応

パルミチン酸、ステアリン酸は 37°C ではミセルを形成せず、単独では線維伸長効果がないが、血液中の遊離脂肪酸組成に類似したオレイン酸、リノール酸との混合物にするとミセルを形成し、線維伸長を誘起する。円二色性スペクトルを用いた解析により、オレイン酸は β2-m に結合してその立体構造を部分的に変性させることで、アミロイド線維型への構造変換を促進する可能性が示された。次に、遊離脂肪酸が生体内でも線維伸長効果を示し得るか検討した。脂肪酸は生体中ではアルブミンに結合して輸送されるが、アルブミンの結合容量を超えると線維を伸長させることが示された。従って、アルブミン非結合型遊離脂肪酸に線維伸長活性があることが示された。透析時に用いるヘパリンによる遊離脂肪酸の増加などにより、非結合型遊離脂肪酸の濃度が増加し線維形成を促進し、長期間の血液透析の継続によりアミロイドが蓄積する可能性がある。また、線維伸長効率の高いリノール酸などの不飽和遊離脂肪酸は、酸化されると線維伸長活性が低下するが、生体中での酸化型不飽和遊離脂肪酸の割合は僅かである。従って、不飽和遊離脂肪酸も線維形成促進に寄与している可能性がある。

(Hasegawa K, et al., Biochem J. 2008, 雑誌論文④)

位置づけとインパクト。前述のように、β2-m アミロイド線維は中性 pH で伸長するためには何らかの因子が必要である。伸長促進効果を有する生体因子としては、既に報告したリゾリン脂質(Ookoshi T, Hasegawa K, et al., Nephrol Dial Transplant. 23(10): 3247-3255, 2008)に続き、2 例目である。

今後の展望。遊離脂肪酸が、透析患者生体

内で実際に線維伸長に働くことを、各種のモデルを構築して検証する予定である。線維伸長促進因子が同定されれば、それをターゲットにした透析アミロイド症の予防・治療薬の開発につながると考えられる。透析患者は日本国内で2009年度で29万人に達するとされ、その内の相当程度の患者が長期的には透析アミロイド症を発症すると見込まれることから、このような予防・治療法の開発の意義は大きいと考えられる。

(3) β 2-m アミロイド線維形成における細胞外蛋白質品質管理機構の影響。

主な成果。細胞外蛋白質品質管理機構に関して、血中に豊富に存在する α 2-マクログロブリン(α 2M)やハプトグロビン等の急性期反応蛋白質が、 β 2-m アミロイド線維形成を抑制する機構について、試験管内反応系を用いて解析した。 β 2-m は線維形成の際に低濃度の界面活性物質(遊離脂肪酸等)を添加して、部分変性させることで線維に組み込むことが可能である。ここに α 2M を添加すると線維形成を抑制した(図3)。 α 2M を β 2-m に対し、モル比で 1/200, 1/100, 1/20 を添加すると、濃度依存性に伸長した線維量が低下した。

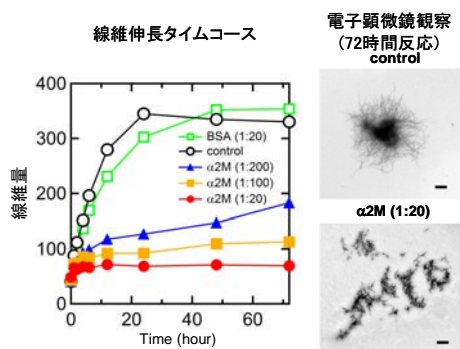


図3. α 2-Mによる β 2-mアミロイド線維伸長反応の抑制

同時に、天然状態ではテトラマーである α 2M が、この変性環境下ではダイマー化し、疎水性領域を露出させ、変性 β 2-m と強く結合することを超遠心分析、ウエスタンブロット法、トリプトファン蛍光分析、ELISA 法により見出した。また、陰イオン性界面活性剤による変性に止まらず、pH6.4 の酸変性条件下でも α 2M がダイマー化することが示された。さらに、 β 2-m アミロイドはヘパリン共存下の弱酸性溶液中で線維伸長することを新たに見出したが、 α 2M はこの伸長反応も抑制することが示された。以上のように、 α 2M は通常の条件ではテトラマーであるが、弱酸性 pH や界面活性剤の存在などに代表される変性環境下ではダイマー化し疎水性領域を露出することで、変性した蛋白質に強く結合し、反応系から排除することで、アミロイド線維形成を抑制する可能性が示された。 α 2M は生体内

においても細胞外分子シャペロンとして、細胞外品質管理機構の一端を担っていると考えられる。(Ozawa D, et al., J Biol Chem. 2011, 雑誌論文①)

位置づけとインパクト。近年、細胞外で変性した蛋白質を除去し、それらの凝集・蓄積を阻止する細胞外品質管理機構の存在と、その主役をなす細胞外分子シャペロンについての研究が行われている。本研究は、 β 2-m アミロイド線維形成過程において、細胞外分子シャペロンが線維形成を抑制することを詳細に示した最初のものである。これにより、核形成・線維伸長・線維安定化の諸過程に加えて、変性蛋白質を系から排除することで線維形成を抑制する可能性が示された。このことは透析アミロイド症治療・予防法のターゲットの可能性が広がったことを示している。

今後の展望。今回検討した α 2M に加えて、他の細胞外分子シャペロン候補を探索して、細胞外品質管理機構で主要な役割を果たしている因子の同定を試みる。さらに、この因子の機構を亢進させる等の方法によりアミロイド線維形成を抑制する方法の探索を試みることで、治療・予防法の開発に有用と考えられる。

(4) アミロイド線維形成のモデルの作成と、試験管内実験系と生体モデルの対比。

培養細胞・動物モデル(ヒト β 2-m トランスジェニックマウス等)を用いて in vivo 線維形成反応系を作成する。このモデルに対する薬剤・生体成分の反応を解析し、試験管内線維形成モデルと対比・解析する。これらのモデルを用いて例えばポリフェノール等の薬剤の効果を解析し、各種アミロイド症に対する治療法の開発を試みる。動物モデルとしてはヒト β 2-m トランスジェニックマウスを、分担研究者、内木宏延が、信州大学・大学院医学研究科 樋口京一教授との共同研究として検討を進めている (Zhang P, Fu X, Sawashita J, Yao J, Zhang B, Qian J, Tomozawa H, Mori M, Ando Y, Naiki H, Higuchi K. Mouse model to study human A beta2M amyloidosis: generation of a transgenic mouse with excessive expression of human beta2-microglobulin. Amyloid. 17(2):50-62, 2010)。このマウスは、マウス β 2-m をノックアウトした上で、ヒト β 2-m を導入しており、血中 β 2-m が高い値を示す。ところが、このマウスは自発的にも、また、外部から β 2-m アミロイドをシードとして投与しても β 2-m アミロイドの蓄積が認められない。試験管内 β 2-m アミロイド線維形成反応系においても、 β 2-m が部分変性することが線維伸長に必須であることが示されている。 β 2-m トランスジェニックマウスにおいても同様な状況にあり、 β 2-m を変性する何らかの因子が不足している可能性が

ある。今後、このような因子、例えば、リゾリン脂質等を体外から投与することで、アミロイド線維形成を誘起することができれば、誘起因子を同定する上で非常に有用なモデルになる。また、このようなアミロイド発症モデルができれば、薬剤の予防・治療効果の判定に極めて有利なモデルを得ることができると考えられる。

(5)まとめ。

上記のように、アルツハイマー病βアミロイド線維の重合核形成における、界面と攪拌の促進効果、β2-m アミロイド線維伸長に対する遊離脂肪酸の誘起効果、生体内における変性蛋白質除去に働く細胞外分子シャペロンとしてのα2-マクログロブリンの機能など、生体内で生じているはずのアミロイド線維形成や分解・抑制の複数の段階について、試験管アミロイド線維形成反応系を用いて解析を行った。今後、これらの複数のアミロイド線維に関する結果をお互いにフィードバックしながら、アミロイド線維形成の全容を解明し、予防・治療法の開発につなげることを目指す。

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4件)

- ① Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH, Sakurai K, Yanagi K, Ookoshi T, Goto Y, Naiki H. Inhibition of β2-microglobulin amyloid fibril formation by α2-macroglobulin. *J Biol Chem*. 286(11): 9668-9676, 2011. 査読有り。
- ② Morinaga A, Hasegawa K, Nomura R, Ookoshi T, Ozawa D, Goto Y, Yamada M, Naiki H. Critical role of interfaces and agitation on the nucleation of Abeta amyloid fibrils at low concentrations of Abeta monomers. *Biochim Biophys Acta*. 1804(4):986-995, 2010. 査読有り。
- ③ Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Zhang B, Yan J, Mori, M, Naiki H, Higuchi K. Amyloid fibrils formed by selective N-, C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. *Biochim Biophys Acta*. 1794(10):1517-1529, 2009. 査読有り。
- ④ Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ookoshi T, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N, Yoshida H, Miyazaki R, Goto Y, Naiki H. Growth of β2-microglobulin-related amyloid fibrils by non-esterified fatty acids at a neutral pH. *Biochem J*. 416(2): 307-315, 2008. 査読有り。

[学会発表] (計6件)

- ① 長谷川 一造、森永 章義、山田 正仁、内木 宏延、βアミロイド線維の核形成における界面の影響、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010.12.9、神戸。
- ② Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH., Sakurai K., Yanagi K., Ookoshi T., Goto Y., Naiki H. α₂-Macroglobulin inhibits β₂-microglobulin amyloid fibril formation in vitro. The 3rd International Symposium on Protein Community, 2010.9.13, Nara.
- ③ Morinaga A, Hasegawa K, Nomura R, Ookoshi T, Ozawa D, Goto Y, Yamada M, Naiki H. The role of interfaces and agitation on the fibril formation of amyloid β-protein. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010, 2010.7.10-15, Hawaii.
- ④ 澤下 仁子、亀谷 富由樹、長谷川 一造、張 蓓茹、王 耀勇、森 政之、内木 宏延、樋口 京一、マウスF型 apolipoprotein A-II(apoA-II)のC末アミノ酸配列はアミロイド線維形成を阻止する。日本基礎老化学会第33回大会2010.6.17-18、名古屋。
- ⑤ 高橋 直生、木村 秀樹、大越 忠和、長谷川 一造、奈良 雅文、宮崎 良一、内木 宏延、吉田 治義、透析アミロイドーシス発症における血漿リゾリン脂質濃度の意義、第52回(平成21年度)日本腎臓学会学術総会、2009.6.4、横浜。
- ⑥ 大越 忠和、長谷川 一造、後藤 祐児、内木 宏延、遊離脂肪酸によるβ2-ミクログロブリンアミロイド線維伸長反応促進効果の解析、第98回日本病理学会総会、2009.5.1-3、京都。

[図書] (計0件)

該当無し

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当無し

○取得状況 (計0件)

該当無し

[その他]

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 一浩 (Hasegawa Kazuhiro)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：60324159

(2) 研究分担者

内木 宏延 (Naiki Hironobu)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：10227704

小澤 大作 (Ozawa Daisaku)
福井大学・医学部・特命助教
研究者番号：60554524
(H22 年度)

(3) 連携研究者

該当無し