

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06529

研究課題名（和文）ATTRアミロイドーシスの加齢依存的な発症を制御する環境要因の同定

研究課題名（英文）Exploring environmental factors determining the age-dependent development of ATTR amyloidosis.

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ATTRアミロイドーシスは野生型および変異型トランスサイレチン（TTR）が加齢に伴いアミロイドを形成して発症する難治性疾患であるが、加齢による発症の分子メカニズムは不明である。本研究では、細胞外環境の酸化還元バランス変化がTTRの加齢依存的な凝集体形成を制御するか線虫をモデル生物として明らかにすることとした。TTR凝集体の形成を発光測定または蛍光測定によって評価する線虫株を樹立して検討を行い、加齢に伴いTTRがジスルフィド結合二量体を形成して凝集化し、体内に蓄積することで毒性を示すことを明らかにした。本研究により、加齢に伴う酸化ストレスが本疾患の引き金となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATTRアミロイドーシスの発症を制御する環境要因の同定は長年の懸案であったが、発症に至るまでの分子的背景の全容が未解明であったため研究が進んでいなかった。本研究は、申請者がこれまでに同定していたTTRのジスルフィド結合二量体形成を介した凝集化に着想を得て、加齢に伴うレドックス恒常性の破綻がアミロイド形成を誘導する分子メカニズムをモデル生物を用いて明らかにした点に本研究の学術的意義がある。本研究の成果はレドックスバランスの正常化を標的としたATTRアミロイドーシスの発症予防法の開発へと発展する点で重要であり、健康寿命の延伸に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：ATTR amyloidosis is an incurable disease, as it is triggered by the accumulation of amyloid derived from normal or mutant transthyretin. Although aging is a risk factor for the disease, the molecular mechanism underlying age-related amyloid formation remains largely elusive. In this study, we utilized *C. elegans* as a model organism to explore the potential link between changes in the extracellular redox balance and the formation of amyloid in aging individuals. We have developed new strains of ATTR amyloidosis models that enable the monitoring of amyloid formation through luminescence or fluorescence measurements. As a result, we found that TTR can form a dimer through a disulfide bond as it ages, producing toxic protein aggregates in the body. These results suggest that oxidative stress associated with aging might be a key trigger for amyloidosis.

研究分野：生化学

キーワード：トランスサイレチン レドックス 加齢

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会の到来とともに神経疾患関連のアミロイドーシスの重要性はさらに増しており、治療薬の開発のみならず、健康寿命を延ばすために予防戦略の構築が切望されている。ATTR アミロイドーシスは血清タンパク質であるトランスサイレチン (TTR) が細胞外で変性および凝集して神経系および心臓を中心とした全身臓器に沈着する難治性疾患である。TTR 遺伝子の変異により発症する遺伝性 ATTR アミロイドーシスは指定難病であり、障害発生率と死亡率は極めて高い。興味深いことに、変異型 TTR は生後から産生され続けるのにも関わらず、TTR の凝集体形成およびアミロイド沈着は一般的に壮年期以降にしか起こらない。また、変異型 TTR のみならず、野生型 TTR も加齢に伴いアミロイド線維を形成して野生型 ATTR アミロイドーシスを発症する。診断技術の向上により、本症は従来想定されていたより頻度が高いことが近年明らかになり、発症予防や治療薬開発のために加齢による発症機構の解明が急務となっている。このように、ATTR アミロイドーシスは TTR 遺伝子変異以外に加齢による環境要因の変化が発症に深く関与していると考えられており、その環境要因の同定が切望されている。本研究では、ATTR アミロイドーシスの加齢依存性の発症機序に基づいた予防薬および治療薬の開発に向けた基盤を構築するために、「加齢に伴って変化するどの環境要因がどのように TTR のアミロイド形成を制御するのか？」を学術的「問い」とした。

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 のアミロイド形成機構は「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。これまでに、申請者は詳細な機構が不明であった「単量体の変性・凝集体形成」過程について解析を行ってきた。その結果、TTR 単量体はシステイン残基の遊離チオール基を介して分子間でジスルフィド結合した二量体 (S-S dimer) を変性依存的に形成した後に、細胞毒性を示す凝集体へと構造変化することを明らかにした。一般的に、タンパク質のジスルフィド結合形成は酸化還元 (レドックス) 環境により制御される。これまでの研究により、加齢によりレドックス恒常性の破綻が生じて、血液中 (細胞外環境) のレドックスバランスが酸化方向に過度に偏った状態になることが報告されている (Go YM and Jones DP, *Clin Sci.* 2017)。そこで、「加齢に伴う細胞外環境のレドックスバランス変化が TTR の S-S dimer 形成を誘導して ATTR アミロイドーシスの発症を制御するのではないか？」と仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴って変化する環境要因として細胞外環境のレドックスバランスに着目して、TTR の S-S dimer および凝集体形成がレドックスバランスの変化により制御されるかをモデル生物として線虫を用いて解析する。最終的には、ATTR アミロイドーシスの加齢依存的な発症機構における TTR のレドックス制御の役割を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) S-S dimer および TTR 凝集体を検出するレポータータンパク質の作製および機能評価

S-S dimer 形成を評価するレポータータンパク質には、NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) システムを採用した。LgBiT または SmBiT と TTR を連結するリンカー鎖長が異なる組換えタンパク質を大腸菌発現系を用いて調製し、溶液中の酸化還元電位変化に応じて形成される S-S dimer 量を発光測定および SDS-PAGE により解析してレポーターとしての有用性を評価した。

TTR 凝集体形成を評価するレポータータンパク質には、蛍光タンパク質 (GFP, TagRFP) 融合 TTR を採用した。蛍光タンパク質と TTR を連結するリンカー配列が異なる組換えタンパク質を大腸菌発現系を用いて調製し、溶液中の酸化還元電位変化に応じて形成される S-S dimer および TTR 凝集体を SDS-PAGE, Native-PAGE により解析して蛍光タンパク質の融合が S-S dimer や TTR 凝集体形成を妨げないリンカー配列を探索した。

### (2) S-S dimer および TTR 凝集体を検出するレポータータンパク質の培養細胞系での機能評価

上記で作製した各種レポーター融合 TTR の発現プラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入して、各種レポーター融合 TTR が細胞外環境へと分泌されるか、細胞外環境のレドックスバランス変化により S-S dimer および TTR 凝集体を形成するかを発光測定、蛍光測定、Western blotting により評価した。

### (3) 各種レポータータンパク質を発現する線虫を用いた加齢依存性の S-S dimer および TTR 凝集体の形成評価

細胞外環境における加齢依存性の S-S dimer 形成を評価するために、異なる器官 (咽頭筋、体壁筋) に LgBiT 融合 TTR, SmBiT 融合 TTR をそれぞれ発現する線虫株を樹立した。本線虫株は各器官から分泌された LgBiT 融合 TTR および SmBiT 融合 TTR が偽体腔 (細胞外環境) において S-

S dimer を形成することを企図したモデルである．各日齢の線虫からライセートを調製して S-S dimer 量を発光測定により評価した．

細胞外環境における加齢依存性の TTR 凝集体形成を評価するために，蛍光タンパク質融合 TTR を体壁筋に発現する線虫株を樹立した．変異型 TTR の細胞外分泌促進を企図して TagRFP 融合野生型 TTR と GFP 融合変異型 TTR を共発現するヘテロ接合体モデルを作製し，比較対照として TagRFP 融合野生型 TTR と GFP 融合野生型 TTR を共発現する野生型ホモ接合体モデル，TagRFP 融合変異型 TTR と GFP 融合変異型 TTR を共発現する変異型ホモ接合体モデルを作製した．各日齢の線虫を蛍光顕微鏡により観察し，個体当たりの GFP 陽性凝集体数を計測した．さらに，各線虫株の寿命を測定した．

#### 4．研究成果

##### (1) S-S dimer および TTR 凝集体を検出するレポータータンパク質の作製および機能評価

LgBiT または SmBiT と TTR の間に 6 残基または 15 残基の flexible リンカーを挿入した組換えタンパク質を調製し，物性評価を行ったところ，LgBiT 融合 TTR ではリンカー 6 残基の方が安定性が高く，リンカー 15 残基の場合は不安定であり凝集化しやすいことが明らかになった．AlphaFold2 を用いた構造予測により，リンカー長が長くなると LgBiT と TTR が相互作用するため構造が不安定化することが示唆された．SmBiT 融合 TTR ではリンカー長に関わらず安定な構造を保持した．リンカー長が 6 残基の LgBiT 融合 TTR と SmBiT 融合 TTR 組換えタンパク質を用いてレドックス変化による S-S dimer 形成を評価し，酸化的環境での S-S dimer 形成により LgBiT と SmBiT の構造相補性が促進され，発光酵素となることを確認した．この相補反応は還元剤存在下または S-S dimer 形成に関わるシステイン残基 (Cys) への変異導入により抑制されたことから，構造相補性による発光シグナルは S-S dimer 量を反映することが示された．

蛍光タンパク質融合 TTR にはリンカー鎖長の異なる flexible リンカーまたは rigid リンカーを挿入した組換えタンパク質を調製した．flexible リンカー型は大部分が不溶性画分に存在しており，可溶性画分からの精製が困難であった．一方，rigid リンカー型は可溶性画分での発現量が増加し，生化学的解析に必要な量を精製できた．蛍光タンパク質融合 TTR 組換えタンパク質を用いてレドックス変化による S-S dimer 形成を評価し，rigid リンカー型では蛍光タンパク質の融合が S-S dimer および TTR 凝集体形成の妨げにならないことを明らかにした．

##### (2) S-S dimer および TTR 凝集体を検出するレポータータンパク質の培養細胞系での機能評価

野生型または Cys 変異型 LgBiT 融合 TTR と SmBiT 融合 TTR (両方ともリンカー 6 残基) を HEK293 細胞に発現させ，細胞外 (培地中) および細胞内の発光量を測定したところ，細胞内外に関わらず Cys 変異型に比べて野生型では発光量が高かった．したがって，培養細胞の環境下においても NanoBiT システムが S-S dimer 形成評価に利用できることが示された．一方，細胞内外で発光量を比較したところ，細胞内の発光量が細胞外の発光量よりも 2-3 倍高いことが明らかになり，S-S dimer は細胞外だけでなく，細胞内においても形成されることが示された．本研究では線虫の細胞外環境で形成された S-S dimer を特異的に検出する手法を開発したいため，細胞内において LgBiT 融合 TTR と SmBiT 融合 TTR の S-S dimer 形成が起こらないように，異なる器官から LgBiT 融合 TTR と SmBiT 融合 TTR をそれぞれ発現させる工夫が必要であることが示唆された．

リンカータイプおよび鎖長が異なる蛍光タンパク質融合 TTR を HEK293 細胞に発現させ，培地中の蛍光タンパク質融合 TTR の分泌量を評価したところ，flexible リンカーに比べて rigid リンカーの方が分泌量が多く，rigid リンカー鎖長が長いほど分泌量が増加することが明らかになった．本結果は大腸菌発現系での可溶性画分発現の結果と相関しており，flexible リンカーを介して融合した蛍光タンパク質が TTR 四量体構造を不安定化するために分泌量が低下すると推察した．次に，培地中に分泌された蛍光タンパク質融合 TTR が細胞外環境のレドックスバランス変化によって S-S dimer および TTR 凝集体を形成するかを解析した．システインの細胞内取り込みを担うトランスポーター xCT を過剰発現した HEK293 細胞に対して xCT 選択的阻害剤である Erastin を処理することでシステイン/システイン量比が変化した細胞外環境を構築した．本細胞株に rigid リンカー型蛍光タンパク質融合 TTR を発現させたところ，Erastin 処理群 (より酸化的環境) では Erastin 未処理群と比較して S-S dimer 量および TTR 凝集体量が増加したことから，rigid リンカー型蛍光タンパク質融合 TTR はノンタグ TTR と同様にレドックスバランス変化に応じて S-S dimer を形成することが明らかになった．

##### (3) 各種レポータータンパク質を発現する線虫を用いた加齢依存性の S-S dimer および TTR 凝集体の形成評価

LgBiT 融合 TTR を咽頭筋から分泌し，SmBiT 融合 TTR を体壁筋から分泌する線虫株を細胞外 S-S dimer 検出線虫として作製した．各日齢における S-S dimer 形成を発光測定により評価したところ，発光量は加齢依存的に増加した．S-S dimer 形成に関わるシステイン残基に変異を導入した Cys 変異型 TTR を発現する線虫株では，加齢依存的な発光量の増加が認められなかったことから，発光量変化は S-S dimer 形成によるものであることが示された．興味深いことに，線虫ライセート中の発光成分は大部分が線虫破碎後の不溶性画分に存在していたことから，S-S dimer は不溶性凝集体として加齢に伴い蓄積することが示唆された．

蛍光タンパク質融合 TTR を体壁筋から分泌する線虫株を細胞外環境における TTR 凝集体検出

線虫として作製した。蛍光顕微鏡観察の結果、野生型ホモ接合体、ヘテロ接合体モデルでは偽体腔に分泌された GFP 融合野生型 TTR、GFP 融合変異型 TTR の蛍光シグナルがそれぞれ観察された。一方、変異型ホモ接合体モデルでは GFP 融合変異型 TTR の蛍光シグナルが偽体腔では観察されず、体壁筋内においてのみ観察された。したがって、線虫においても野生型 TTR との共発現により変異型 TTR の分泌が促進されることが示された。次に、各日齢の線虫 1 個体当たりの GFP 陽性凝集体数を計測したところ、ヘテロ接合体モデルでは変異型 TTR 凝集体数が加齢に伴い大きく増加した。一方、野生型ホモ接合体では加齢に伴って野生型 TTR の凝集体数がわずかに増加したが、その増加率はヘテロ接合体モデルの約 1/3 程度であった。また、加齢に伴う変異型 TTR 凝集体数の増加は S-S dimer 形成に関わるシステイン残基への変異導入により抑制されたことから、S-S dimer 形成を介した TTR 凝集化が *in vivo* においても生じることが明らかになった。最後に、TTR 凝集体の蓄積による線虫寿命への影響を検討したところ、ヘテロ接合体モデルの平均寿命は野生型ホモ接合体の平均寿命に比べて短縮し、変異型 TTR に Cys 変異を導入した線虫では平均寿命が野生型ホモ接合体と同程度まで回復した。以上の結果より、線虫では加齢に伴い TTR が S-S dimer を形成して凝集化し、体内に蓄積することで毒性を発揮することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inada Yuki, Ono Yuichiro, Okazaki Kyo, Yamashita Takuma, Kawaguchi Tomoyuki, Kawano Shingo, Kobashigawa Yoshihiro, Shinya Shoko, Kojima Chojiro, Shuto Tsuyoshi, Kai Hirofumi, Morioka Hiroshi, Sato Takashi	4. 巻 174
2. 論文標題 Hydrogen bonds connecting the N-terminal region and the DE loop stabilize the monomeric structure of transthyretin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 355 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 卓史、稲田 祐貴、小橋川 敬博、森岡 弘志
2. 発表標題 細胞外プロテオスタシスにおけるレドックス制御とタンパク質凝集との関連解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会オンライン（招待講演）
4. 発表年 2021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への変異が構造安定性に及ぼす影響とその機構の解析
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲田祐貴, 佐々木亮子, 小野祐一朗, 小橋川敬博, 野井健太郎, 首藤 剛, 甲斐広文, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 レドックスバランス変化による加齢依存性ATTRアミロイドーシスの発症制御機構の解析
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021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への変異がアミロイド形成を制御する ~核磁気共鳴法と分子動力学計算による解析~
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲田祐貴, 佐々木亮子, 小野祐一朗, 山下拓真, 小橋川敬博, 鬼木健太郎, 猿渡淳二, 山中邦俊, 首藤剛, 甲斐広文, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 レドックス環境変化によるATTRアミロイドーシス発症制御機構の解明
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下拓真, 稲田祐貴, 山中邦俊, 間淵周子, 小橋川敬博, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 トランスサイレチンの凝集体構成因子S-S dimerのin vivo定量解析に向けた発光プローブの開発
3. 学会等名 令和5年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下拓真, 稲田祐貴, 山中邦俊, 間淵周子, 小橋川敬博, 森岡弘志, 佐藤卓史
2. 発表標題 レドックス制御によるトランスサイレチン凝集体形成の分子機構解析
3. 学会等名 第22回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤卓史, 稲田祐貴, 山下拓真, 山中邦俊, 小橋川敬博, 森岡弘志
2. 発表標題 レドックス制御を介した加齢に伴うトランスサイレチン凝集体形成
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	山中 邦俊  (Yamanaka Kunitoshi)  (90212290)	熊本大学・発生医学研究所・准教授   (17401)	

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
---------	---------