

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580336
 研究課題名(和文) リゾチームをモデルタンパク質としたアミロイド線維形成機構と細胞毒性発現の解析
 研究課題名(英文) Analysis of amyloid fibril formation mechanism and cell toxicity of lysozyme
 研究代表者
 杉元 康志(SUGIMOTO YASUSHI)
 鹿児島大学・連合農学研究科・教授
 研究者番号：10100736

研究成果の概要(和文)：リゾチームアミロイド線維形成コアペプチドの解析により、W62が線維形成に重要なアミノ酸であることを確かめ、W62を含む領域の分子表面への露出により、W62を中心に分子会合が起こり、整列した構造を形成して線維化すると結論した。細胞毒性解析により、線維はネクローシス的な細胞死を誘導することが観察され、一方、ヒト変異体リゾチームは分泌障害を起こし、その結果、細胞内に不溶性画分として蓄積することが確認された。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that W62 of lysozyme is a crucial amino acid on amyloid fibrils formation by analysis of core peptide. It is speculated that the fibrillation of lysozyme would occur by exposure to molecular surface of the region containing the W62, resulting in causing molecular association by mainly W62, and being formed the aligned structure. The cytotoxicity of lysozyme fibrils showed the cell death like necrosis. On the other hand, on the case of expression intracellular of the human mutant, cells cause impaired secretion, as a result, lysozyme could be accumulated as an insoluble fraction in cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：リゾチーム、アミロイド線維、コアペプチド、トリプトファン62、細胞毒性、ヒトリゾチーム変異体、アミロイドーシス

1. 研究開始当初の背景

アミロイド線維が原因となる多くの疾患

が知られているが、リゾチームもヒトでは遺伝子変異により、アミノ酸の置換によって全

身性アミロイドーシスを引き起こす。線維形成のメカニズムはよく研究されているが、まだ本質的には解明されていない。また、線維と発症との関連、線維の毒性についても不明な点が多く、未解決なものとなっている。線維形成のメカニズムにおいては分子内部にあるコア領域と呼ばれるものの存在が指摘されているが、詳細な解析は行われてなかった。毒性についても線維自体なのか、あるいは線維化する前の分子体なのか、結論が出ておらず、毒性の発現機構についてはほとんど解明されていない。これはリゾチームに限らず他のアミロイド病を引き起こす多くのタンパク質についても未解決な問題である。

2. 研究の目的

タンパク質のミスフォールディングや変性が原因で生体内にアミロイド線維が蓄積し、重篤な疾患が発症するアミロイド病は社会的に重要な問題であり、解決が急がれる。ヒトの生体に広く分布するリゾチームは遺伝子の点変異によって異常なタンパク質となり、線維を形成し、全身に蓄積してアミロイドーシスを引き起こす。遺伝的な変異によりタンパク質内のアミノ酸が置換され、構造変化により会合・凝集しやすい構造となり、最終的にアミロイド線維を形成するとされている。ヒトではアミロイドーシスを引き起こす4種類の遺伝子変異が知られ、この変異タンパク質はいずれも β -ドメインの周辺に点在しており、変異によるこの領域の構造変化によりアミロイド線維形成コア部分の表面への出現により、分子同士の会合が起こり、凝集そして線維化に進むと考えられる。

卵白リゾチームとオボアルブミンとの異種タンパク質同志の相互作用によるアミロイド線維形成の過程でリゾチームのアミノ酸9個から成るアミロイド線維形成コアペプチドを同定した。このペプチドはこれまで

発表されていたジスルフィド結合還元リゾチームに残る6つの疎水性クラスターの3番目のもので、非常に疎水性が高く、C末端にはトリプトファンを有していた。還元リゾチームのこのトリプトファンをグリシンに変異させたタンパク質ではアミロイド線維を形成しないことから、リゾチームのアミロイド線維形成に最も重要なアミノ酸と考えられる。

アミロイド線維はその毒性により神経系では、アルツハイマー病、パーキンソン病やプリオン病などが知られており、他の組織や臓器にも蓄積により機能低下や不全を招く疾患がある。これらはいずれもタンパク質の異常な構造によって起こり、毒性を発揮して長い期間を経て発症して行くとされる。毒性についてはほとんど解明されてなく、線維自体より線維形成過程のオリゴマーに強い毒性があるとの報告が多くなされ、線維と毒性については疑問も出されている。しかし、異常タンパク質の細胞内あるいは細胞外での蓄積が疾患を引き起こすことに疑いはなく、*in vitro* で容易にアミロイド線維を作製することが出来るリゾチームはこの問題に重要なサジェスションを与えるモデルとして広く深く研究されている。

本研究では見出したリゾチームアミロイド線維形成コアペプチドの解析を進めることにより、アミロイド線維形成機構を解明すると共に、線維の細胞毒性について解析を行い、アミロイド線維が抱える問題にいくつかの知見を提供した。

3. 研究の方法

線維形成実験

卵白リゾチーム(生化学工業 K.K) およびヒトリゾチーム(和光純薬工業 K.K)は5mg/mlになるように50 mM Glycine-HCl 緩衝液(pH 2)に溶解し、58°Cでインキュベートした。

ペプチドは合成品を用い、DMSO（ジメチルスルフォキシド）で溶解し、最終濃度 2mg/ml にし、リゾチームと同じ条件で線維形成を行った。線維の形成はチオフラビンT (ThT)、CongoRed および透過型電子顕微鏡で確認した。タンパク構造の変化はCDスペクトル、トリプトファン蛍光スペクトル、アクリルアミドによるトリプトファン消光、表面疎水性を測定し、評価した。

細胞毒性実験

線維の毒性はヒト Neuroblastoma SH-SY5Y を使い、予め *in vitro* で作製した線維を細胞に添加し、時間経過で MTT assay、viability assay, apoptosis assay を行うことで細胞毒性を評価した。

4. 研究成果

卵白リゾチームからアミロイド線維形成に必要な9個のアミノ酸から成る最小ペプチドを同定した。本ペプチドは自己凝集性に富み、それ自体でアミロイド線維を形成した（図1）。これをリゾチームアミロイド線維形成コアペプチドと結論し、ペプチドのアミノ酸と線維形成との関連を調べた結果、W62が線維形成に重要なアミノ酸であることを確かめた（Table 1）。W62を他のアミノ酸に置換した場合、線維の形成が低下するかあるいは全く生じないことが確かめられた。W62を含む領域の分子表面への露出により、W62を中心に分子会合が起こり、整列した構造を形成して線維化すると結論した。ヒトリゾチームはW62がY63となっており、両リゾチームでのコアペプチドに違いが見られたが、ヒトコアペプチドでも線維を形成することから、本ペプチドはリゾチーム共通の線維形成領域であることが証明できた。この領域は α -ドメインと β -ドメインを繋ぐポケット部分にあり、ヒトのアミロイドーシスを引き起こす変異体のタンパク質ではこの付近のアミ

ノ酸が変化しており、この領域の構造変化により、タンパク質の会合・凝集が促進され、線維化して細胞内に蓄積し、アミロイドーシスの原因となると推定された。

リゾチームの細胞毒性実験により、線維を細胞培養の培地中に添加した場合、細胞生存率は濃度依存的に減少し、ネクローシスの細胞死を引き起こすことが観察された。一方、分泌型ヒトリゾチーム変異遺伝子を構築し、細胞に導入した場合、変異体リゾチームは分泌が阻害され、その結果、細胞内に不溶性画分として蓄積することが確認された。これらの細胞は生存率が減少し、毒性が見られた。以上の結果から、リゾチーム線維は毒性を有し、ヒトの場合、アミノ酸の変異より構造変化した線維が細胞外内に蓄積することにより疾患が発症することが裏付けられた。

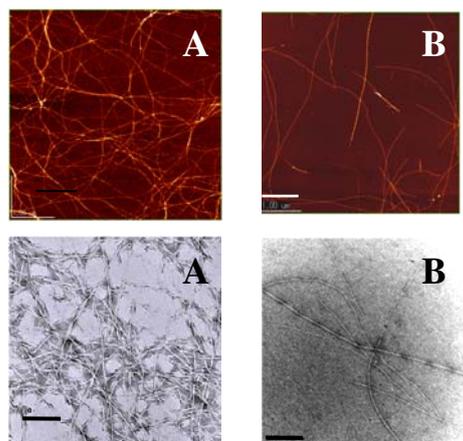


図1 リゾチームアミロイド線維上、AFM：下、TEM. A, コアペプチド B, リゾチーム

Table 1 Summary of competent peptides on fibrils formation

Peptide	pH2	pH4	pH7	pH9
STDYGILQINSRW	+++	++	-	-
GILQINSRW	+	++	+	-

GILQINSRG	-	-	-	-
GILQINSGW	++	+	-	-
GILQINSR	-	±	-	-
GILQINS	-	-	-	-
ILQINSRW	±	+	-	-
LQINSRW	-	-	-	-
ILQINSR	-	-	-	-

+++ , much; ++ , surely; + , somewhat; ± , very few; - , non

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Tokunaga Y, Sakakibara Y, Kamada Y, Watanabe K, Sugimoto Y. Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils. Int J Biol Sci. 2013;9(2):219-27

2. Sugimoto Y, Kamada Y, Tokunaga Y, Shinohara H, Matsumoto M., Kusakabe, T, Ohkuri T, Ueda T. Aggregates with lysozyme and ovalbumin show features of amyloid-like fibrils. Biochem Cell Biol. 2011 Dec;89(6):533-44.

[学会発表] (計 8 件)

- 1 杉元 康志、清川由樹、釜田佳季、渡邊 啓一 「胚発生における卵白リゾチームの構造変化」日本生化学会 2012年12月
- 2 徳永 雄平、清川由樹、釜田佳季、渡邊 啓一、杉元 康志 「リゾチームのアミロイド線維形成コアペプチドの解析」日本ペプチド学会 2012年11月
- 3 徳永 雄平、渡邊 啓一、杉元 康志 「リゾチームのアミロイド線維形成機構の解明」日本蛋白質科学会 2012年6月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉元 康志 (SUGIMOTO YASUSHI)
鹿児島大学・連合農学研究科・教授
研究者番号：10100736

(2) 研究分担者

松元 光春 (MATSUMOTO MITSUHARU)
鹿児島大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：30157383

日下部 宣宏 (KUSAKABE TAKAHIRO)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号：30253595

(3) 連携研究者

渡邊啓一 (WATANABE KEIICHI)
佐賀大学・農学部・教授
研究者番号：40191754