

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450476

研究課題名(和文) アミロイド病モデルマウスを使ったヒトリゾチーム変異体の線維の形成機構と毒性の解析

研究課題名(英文) Mechanism of fibril formation of human lysozyme mutants and analysis of its toxicity in the amyloid disease model mice

研究代表者

杉元 康志 (Sugimoto, Yasushi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：10100736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまで不明であった全身性アミロイドーシスを引き起こすヒトリゾチーム変異体の毒性について細胞レベルと生体レベルで検証できた。リゾチーム変異体は分子シャペロンGRP78/BiPと結合したまま小胞体内に蓄積し、IRE1-XBP1-GRP78/BiPを活性化させ、小胞体ストレスを誘導することを明らかにした。蓄積したタンパク質は細胞内でアミロイド線維を形成し、これが長期間影響し、細胞傷害を与えることで組織機能の不全となり、重篤な疾患になると推定した。分泌性タンパク質で起こるいくつかのアミロイドーシスは分子シャペロンとの異常な相互作用が原因となり、疾患を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The toxicity of the human lysozyme mutants that cause a systemic amyloidosis could be verified at the cellular level and the biological level. Lysozyme mutants accumulate in the endoplasmic reticulum, remaining bound to molecular chaperone GRP78 / BiP. The accumulation of both proteins result in activating the IRE1-XBP1-GRP78 / BiP pathway, which induces endoplasmic reticulum stress. Transthyretin mutants accumulated in the endoplasmic reticulum and activated the IRE1-XBP1-GRP78 / BiP pathway and induced ER stress as well as lysozyme. Furthermore, transthyretin mutants remained bound to GRP78 / BiP. Amyloidosis caused by abnormal secreted proteins might have in common. Aggregating proteins tend to form amyloid fibrils and accumulate in the endoplasmic reticulum and provide damage for cell. Cell damage lead to loss of the cell function and cell death. In conclusion, amyloidosis of lysozyme is assumed to be caused by the accumulation of abnormal protein in the cell over long period.

研究分野：生化学

キーワード：リゾチーム アミロイド線維 分子シャペロン 小胞体ストレス GRP78/BiP トランスサイレチン トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、パーキンソン病やプリオン病をはじめとする神経変性疾患およびトランスサイレチン(TTR)やリゾチーム(Lz)などの家族性非神経性全身性アミロイドーシスは細胞内外に異常なタンパク質が蓄積し、それが原因となって組織の機能不全を招く重篤な症状をきたし最終的には死を齎すことから治療・予防法の開発が喫緊の課題となっている。これらの病気の原因となる異常タンパク質は分解されずに共通してアミロイド線維を形成しており、線維形成機構やその細胞毒性は多くの先端的研究が行われているが、不明な点が多く、未解決である。

リゾチームは分子量1万4千の分泌タンパク質であり、機能としてはムラミダーゼ活性を有し、抗菌タンパク質としてタンパク質化学的に詳しく研究されている。また、いくつかの条件下でアミロイド線維を形成することからアミロイド線維形成モデルタンパク質として取り上げられ、ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) の研究が進んでいる。HEWLのヒトホモログであるヒトリゾチームには実際、遺伝的変異によるアミノ酸の置換で全身性アミロイドーシスを引き起こす患者が知られ、タンパク質の構造形成と線維形成のメカニズムについて議論されているが、解決に至ってない。リゾチームは $\alpha$ -ヘリックスからなる $\alpha$ -ドメインと $\beta$ -シートから成る $\beta$ -ドメインから構成されているが、アミロイド線維形成コア領域は $\beta$ -ドメ

インにあり、アミロイドーシス変異はこの領域あるいはその周辺に集中している。

アミロイドジェニックリゾチーム (A-Lz) の毒性についての研究は少なく、A-Lz の全身への蓄積は観察されるもののアミロイドーシスの原因は不明であった。Lz や TTR のような分泌タンパク質の異常が引き起こすアミロイドーシスには共通性が認められる報告があり、小胞体との関連が論議されていた。

## 2. 研究の目的

A-Lz の細胞毒性と全身性アミロイドーシス機構の解明を行うために、A-Lz のヒト細胞およびマウスで発現を行い、主として細胞および個体に及ぼす影響を細胞生物学手法を用いて追究した。具体的には4種類の A-LZ 遺伝子をヒト細胞 HEK293 およびマウスに導入し、生体内で A-Lz をチェイスし、会合・凝集を観察する。A-LZ のアミロイド線維形成機構を追究する。

## 3. 研究の方法

リゾチーム遺伝子はヒト白血球 cDNA ライブラリーから単離、site-directed mutagenesis により変異体を作製し、pEBMulti-Neo ベクターに組み込み、HEK293 に導入した。72 時間培養後、細胞を回収し、A-Lz の局在を観察した。トランスジェニック (TG) マウスの作製は同様に得た A-LZ-CMV ベクターをマウスの受精卵に導入し、組み込まれたマウ

スをセレクションし、A-Lz の発現を観察した。さらに、肝臓に特異的に発現する pLIVE に A-Lz を組み込んだものをマウスに導入し、肝臓での発現、蓄積を追跡した。

#### 4. 研究成果

A-LZ を過剰発現させた細胞は小胞体 (ER) ストレスを引き起こすことが明らかになった。A-Lz の分泌効率が落ち、培地中では野生型に比べ 80~90%しか見られなかった。細胞可溶成分 (ライセート) では野生型と変異体群では量的には大きな差はなかったが、細胞不溶成分には大量の A-Lz が見られ、これらは小胞体に凝集体として蓄積が観察され、A-Lz の多くはフォールディングされずに小胞体に留まることが示唆された (図 1 A)。その結果、細胞は小胞体ストレスを晒されていた。リゾチーム変異体のフォールディングは分子シャペロン GRP78/BiP によって受けると考えられるが、両者はフォールディング過程で解離することなく会合したまま不溶化して小胞体に蓄積することが確認された (図 1 B)。大量の A-Lz タンパク質の発現は特異的に IRE1-XBP1-GRP78/BiP を活性化させ、GRP78/BiP の動員を亢進させ (図 2)、細胞内に大量の GRP78/BiP を増やすことになるが、フォールディングの失敗で両者の凝集による不溶化を招くと結論された。Lz には GRP78/BiP からフォールディングを受けるためのポケットと考えられる領

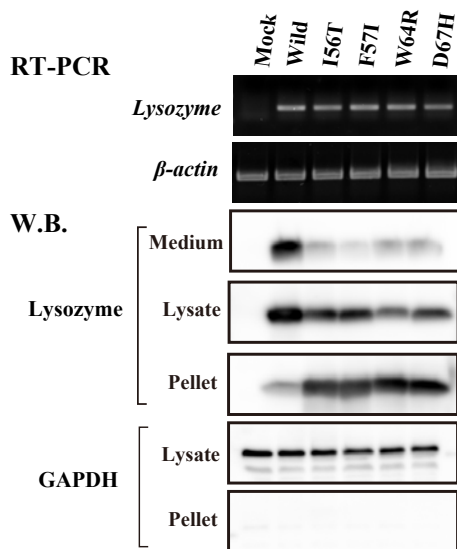
域があり、ここの構造が非常に重要であることが明確になった。ポケットから内部にはアミロイド線維形成領域があり、ここにアミノ酸変異があると GRP78/BiP との相互作用が阻害され、会合したままフォールディングの失敗を招くと推定される。このように A-Lz によるアミロイドシスの 1 つの原因は A-Lz のタンパク質としての不安定さと分子シャペロンとの異常な相互作用が ER ストレスを誘発し、細胞に障害を与えることであると推測された。

野生型 Lz および 4 種類の A-Lz の TG マウスを作製した。いずれの TG マウスにも Lz 遺伝子は導入されたことからその発現を見た。mRNA の発現は確認されたが、Lz タンパク質のシグナルはいずれの導入マウスでも弱いものであった。その原因は不明であるが、より強いプロモーターを用いることが推奨された。そこで pLIVE ベクターを用いた肝臓に特異的に発現するマウスを作製した。野生型 Lz および 4 種類の A-Lz の肝臓で Lz タンパク質の発現を確認できた。野生型 Lz は血漿にも見られ、分泌が確認された。しかし、A-Lz は血漿中には極めて少量しか確認できず、分泌効率の低下が観察された。その一方、細胞実験結果と同様に細胞不溶成分に見られ、GRP78/BiP と共に小胞体に蓄積して、ER ストレスが個体レベルで確認された (図 3)。A-Lz の毒性は不良タンパク質の長期に渡る小胞体内での蓄積による ER ストレスが原因と推定

された。

遺伝的変異で発生する異常タンパク質の細胞内蓄積が原因で起こる家族性アミロイド病のうち、A-Lz の他に TTR 変異体も小胞体分子シャペロン GRP78/BiP と会合したまま小胞体内に蓄積していることが観察された。このように異常分泌タンパク質の凝集は、最終的にはアミロイド線維となり、細胞傷害、細胞壊死を起こし、アミロイドーシスの病症となると考えられる。本研究は小胞体アミロイドーシスとして定義できる Lz 疾患の原因、過程を明らかにすることが出来た。

## A



## B

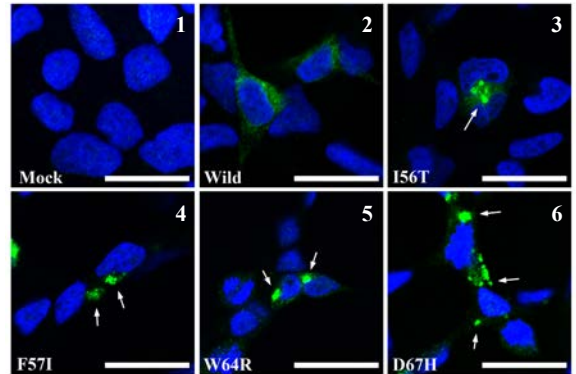


図1 リゾチーム変異体の HEK293 細胞における発現と小胞体内蓄積

(Mock, ベクターのみ ; Wild, 野生型; I56T, F56I, W64R, D67H, アミロイドジェニックリゾチーム) A, HEK293 細胞における発現 B, 細胞局在性

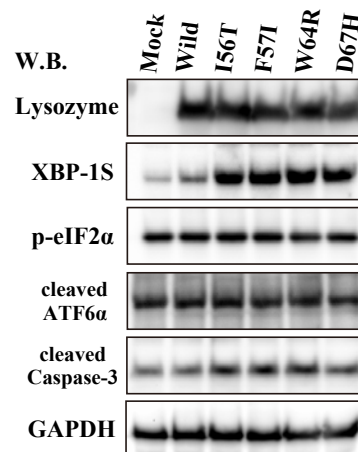


図2 リゾチーム変異体蓄積による小胞体ストレス

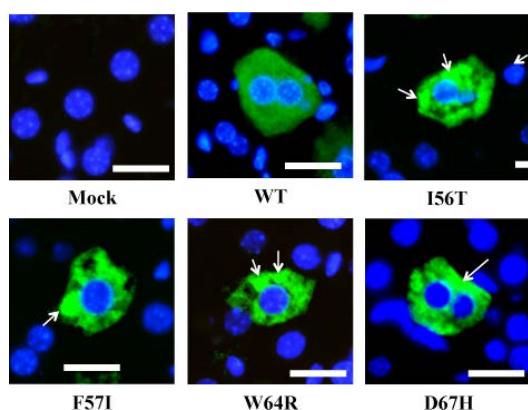


図3 pLIVE -vector 導入マウスにおけるリゾチームの細胞内蓄積

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7件)

1. Kamada Y, Nawata Y, Sugimoto Y. Lysozyme Mutants Accumulate in Cells while Associated at their N-terminal Alpha-domain with the Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78/BiP. *Int J Biol Sci.* 2016 12:184-197. doi: 10.7150/ijbs.13710. (査読あり)
2. Tokunaga Y, Matsumoto M, Sugimoto Y. Amyloid fibril formation from a 9 amino acid peptide, 55th-63rd residues of human lysozyme. *Int J Biol Macromol.* 2015; 80:208-216. doi: 10.1016/j.ijbiomac. (査読あり)
3. Shigeta T, Zaizen Y, Sugimoto Y, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S. Heat shock protein 90 acts in brassinosteroid signaling through interaction with BES1/BZR1 transcription factor. *J Plant Physiol.* 2015;1178:69-73. doi: 10.1016/j.jplph.2015.02.003. (査読あり)
4. Kamada Y, Kusakabe T, Sugimoto Y. Amyloidogenic lysozymes accumulate in the endoplasmic reticulum accompanied by the augmentation of ER stress signals. *Biochim Biophys Acta.* 2015 1850:1107-1119. doi: 10.1016/j. (査読あり)
5. Shigeta T, Zaizen Y, Asami T, Yoshida S, Nakamura Y, Okamoto S, Matsuo T, Sugimoto Y. Molecular evidence of the involvement of heat shock protein 90 in brassinosteroid signaling in Arabidopsis T87 cultured cells. *Plant Cell Rep.* 2014;33:499-510. doi:10.1007/s00299-013-1550-y. (査読あり)
6. Tokunaga Y, Matsumoto M, Tokunaga M,

- Arakawa T, Sugimoto Y. Amyloid fibril formation in vitro from halophilic metal binding protein: its high solubility and reversibility minimized formation of amorphous protein aggregations. *Protein Sci.* 2013; 22:1582-1591. doi: 10.1002/pro.2359. (査読あり)
7. 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; 9:219-227. doi: 10.7150/ijbs.5380. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 8件)

- 1 縄田勇介ら「アミロイドジェニックは GRP78/BiP と小胞体内に蓄積し、小胞体ストレスを誘発する」(於:神戸ポートランド)2015年11月
- 2 T.Kamimoto et al. 「Kurozu Increases HSPA1A Expression and Ameliorates Cognitive Dysfunction in Aged SAM P8 Mice.」The 29th Annual Symposium of the Protein Society (於:スペイン、バルセロナ)2015年7月
- 3 Y.Sugimoto et al. 「Amyloidogenic lysozyme accumulates in the endoplasmic reticulum tangling with GRP78/BiP and evokes ER stress.」The 29th Annual Symposium of the Protein Society (於:スペイン、バルセロナ)2015年7月
- 4 釜田佳季ら「リゾチーム変異体の小胞体への蓄積と小胞体ストレス」日本分子生物学会第37回年会(於:パシフィック横浜)2014年12月
- 5 有馬拓広ら 「ピキア酵母におけるヒトリゾチーム変異体の遺伝子発現とタンパク産生」(於:神戸国際会議場)2013年12月
- 6 重田 友明ら 「ブラシノステロイド情報伝達における転写因子 BES1 の相互作用因子の機能解析」日本分子生物学会第36回年会(於:神戸国際会議場)2013年12月
- 7 釜田佳季ら 「ヒトリゾチーム変異体発現による凝集体の解析」日本分子生物学会第36回年会(於:神戸国際会議場)2013年12月
- 8 有馬拓広ら 「リゾチームアミロイド線維形成コアペプチドのシーズ効果」日本生化学会九州支部例会(於:佐賀大学)2013年5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〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉元 康志 (SUGIMOTO Yasushi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：10100736