

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713012

研究課題名(和文) タンパク質の規則正しい凝集がたどる運命と生体の恒常性破綻

研究課題名(英文) Observed regular protein aggregation structure and their fate, affecting the fail of our living organism homeostasis

研究代表者

山崎 正幸 (Yamasaki, Masayuki)

龍谷大学・農学部・准教授

研究者番号：80397562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝疾患・肺気腫がその病変として代表される、アンチトリプシン欠損症において、その原因となるタンパク質の規則正しい凝集体構造の形成が生体に与える影響を考え、疾患に繋がる毒性を評価することを目的とした。アンチトリプシンは3種類のメカニズムで凝集することを精査し、さらにその構造は時間により巧みに変化することを明らかにした。さらに、それらは細胞外へも分泌されるという事実から、それを取り込む可能性がある細胞での恒常性の異常を解析したが、明確な細胞死などの観察は得られなかった。アンチトリプシンの規則正しい凝集体の形成は生体にとって毒性が低い可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluate the toxicity of antitrypsin aggregates leading to disease in antitrypsin deficiency, which is represented by its lesion. We here consider the influence on the living body of the formation of an ordered aggregate structure of the causative protein. We examined that antitrypsin aggregates by three kinds of mechanisms and further clarified that its structure changes skillfully with time. Furthermore, due to the fact that they are also secreted out of the cell, abnormality of homeostasis in cells that may take in it was analyzed, but clear observation of cell death etc could not be obtained. Formation of regular aggregates of antitrypsin might be toxic to living organisms

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質凝集性疾患 アンチトリプシン ドメインスワップ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 欧米で 3000 人に 1 人が家族性変異のホモ接合体を持つ、Z 型アンチトリプシン欠損症という疾患がある。主な症状は、肝疾患と肺気腫である。申請者は先行研究において、その原因となるアンチトリプシンの凝集体がいかに形成されるかを研究し、さらに細胞内で安定に蓄積し、肝疾患を引き起こす可能性のある凝集体の構造を解明した。

(2) しかしながら、その凝集体が形成される様子は、これまでタンパク質の凝集について考えられてきた常識とは異なるものであった。例えば実験室において、タンパク質の凝集はその変性処理(熱・変性剤への曝露)により引き起こすことができる。その際、タンパク質の構造は大きく破壊され、疎水性部位が不規則に結合した凝集状態が想定される。一方で、病変を引き起こすタンパク質の凝集と言えば、例えばアルツハイマー病におけるアミロイドペプチドの巨大なβ構造凝集が著名である。ところがアンチトリプシン欠損症では、タンパク質が隣の分子とお互いの構造をまるでパズルのように補い合うことでその折りたたみを完成するという、非常に規則正しい凝集体を形成していた。

(3) 決定した2つの結晶構造とそれに関わる解析が示唆したのは、アンチトリプシンが、分子と分子の繋がり方が異なる、少なくとも2つのメカニズムで凝集体を形成することであった。これらの構造は生体内で互いに平衡状態で存在することが予想されたが、その動的な形成のメカニズムや成長についての詳細は不明であった。また、形成された凝集体が細胞の中でどのような細胞内応答を受けるかについての詳細も明らかではなかった。さらに、細胞を用いた実験では、この規則正しい構造の凝集体が細胞外へと分泌される姿が観察されたが、その後の運命は不明である。これらの解明は、タンパク質凝集体がいかに生体で毒性を発揮するのかを定義するための基礎学問的な知識を提供すると共に、アンチトリプシンを典型例としたタンパク質凝集性疾患欠損症において、生体の恒常性破綻を理解するための分子基盤を構築する可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、アンチトリプシン欠損症の疾患において、この多様なメカニズムによる規則正しい凝集が生体にどのような影響を与えるのかを次の観点において検討した。

互いに平衡状態で存在すると考えられる凝集体構造の種類がどれほどあるのか。それ

らがお互いにどのような割合で存在し、どのように成長するのか。それら変化する凝集体の構造に対して、細胞はどのような応答を示すのか。その結果、凝集体の形成から疾患へと繋がる細胞内応答が存在するのか。タンパク質の規則正しい凝集体の形成とは、どのような状態で起こりうる可能性があるのか。また、それはタンパク質の種類によって特異性があるのか。タンパク質がその折りたたみを単独で完結できず、隣の分子と構造を補い合うことで完成する凝集体の形成は、例えば、我々の老化という一般的な現象では起こりえないか。老化のバイオマーカーとして、規則正しい凝集体の形成が使えないか。

## 3. 研究の方法

(1) 試験管内で、アンチトリプシンの凝集メカニズムを精査し、個々のメカニズムを限定して誘引することができる変異体を作成する。それらを用いて凝集体がどのような性質を持って形成されるか、また時間とともに凝集体の構造とその性質がどのように変化していくのかを観察する。

(2) 哺乳類細胞を用いて(HEK293細胞、COS-7細胞、SH-SY5Y細胞)、アンチトリプシン凝集体と相互作用するタンパク質を検索する。細胞への凝集体の取り込みを観察する。凝集体の種類により細胞がどのようなストレスを受けるかを解析する。老化した動物において、アンチトリプシン凝集体が血中で形成されていないかを確かめる。

## 4. 研究成果

(1) まずアンチトリプシンの凝集体が形成されるメカニズムの精査を行った。これまでC末2本のストランドがスワップするメカニズム、分子中央2本のストランド(4番と5番)がスワップするメカニズムを確認したが、様々な解析は新しいメカニズムが存在する可能性を示唆していた(Fig. 1)。

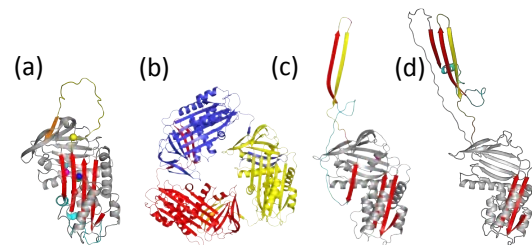


Fig. 1 アンチトリプシンの構造とドメインスワップ: (a) 正しく折りたたんだ天然構造 (b) 分子 C 末 2 本のストランドがスワップした凝集体の結晶構造 (c) 分子中央 2 本のストランドが熱ストレスにより飛び出したモデル図 (d) 本研究で明らかにした分子中央 3 本のストランドが熱ストレスにより飛び出したモデル図

ここで本研究において用いた、タンパク質構造のドメインスワップを評価する方法論を概説する。例えば、分子中央 5 番目のストランドと 6 番目のストランドの間で自然と SS

結合が形成される距離にあるアミノ酸残基を構造上で検索し、それらを共に Cys 残基に変異する。この SS 変異体が大腸菌で大量発現し、単量体のみを精製する。もし5番目のストランドが熱ストレスで飛び出すことが凝集のメカニズムであれば、この SS 変異体は熱凝集しないはずである。また、アンチトリプシンの家族性変異 Z 体に対してさらに上記と同じ位置に Cys 残基を導入した多重変異 Z 体を哺乳類細胞で発現させる。もし、家族性変異体で5番目のストランドがドメインスワップすることで凝集体が形成されるのであれば、分子内ではなく、分子間で SS 結合を安定に形成するはずである。まず、すでに明らかになっている2つのメカニズムによる凝集体の形成を同時に抑制する 2-SS 結合変異体を構築し、大腸菌で発現させ、単量体を精製した。この 2-SS 変異体は、明らかに熱ストレスに対する耐性を示したに関わらず凝集したことは、新たなメカニズムの存在を明確に示唆した。また、この SS 結合を使った方法論を、分子中央のストランド1つ1つについて分子内部のドメインと SS 架橋できる様にデザインした変異体を用いて行った。大腸菌では、これらの SS 変異体は不溶性の凝集体を形成し、単量体を得ることができなかったが、COS-7 細胞でこれらの SS-Z 多重変異体を発現させると、4番目、5番目、6番目のどのストランドも凝集体構造でスワップしていることを示唆する分子間での SS 結合形成のラダーを確認した (Fig. 2)。



Fig. 2 ドメインスワップを行った構造部位で確認される分子間での SS 結合形成: 3番目のストランド (lane 3) では SS 結合の形成が2量体のみであり安定とは言えない。

これらの結果はすべて、分子中央3本のストランドがスワップした凝集体の存在を想定することで解釈出来る。また、アンチトリプシンがドメインスワップをして線状凝集体を形成するためには、同時に、特定の領域がリンカーとして露出する必要がある。これは電子顕微鏡での観察により beads-on-a-string と表現されてきたアンチトリプシン凝集体の morphology をよく表すものであり、様々な変異体を凝集させ、プロテアーゼに対する感受性を N 末端解析によりマッピングした結果は、今までのメカニズムに加え、分子中央3本のストランドがスワップしたメカニズムを導入するのが妥当であると示した。また同時期に他の研究では、アンチトリプシンと相同性の高いファミリータンパク質の一つであるニューロセルピン

で3本または5本のストランドがスワップしている可能性が示された。これらはセルピタンパク質で非常に広く保存された凝集メカニズムである可能性がある。一方で、フレームシフト変異によりドメインスワップに関わるストランドの大半を欠失している NHK アンチトリプシン変異体についても解析を行ったが、ドメインスワップする・規則正しく凝集するといったことに繋がる観測が得られず、分子の後半部分にアンチトリプシンがドメインスワップするために必要な要素が存在することが考えられた。また様々な変異体の凝集について、単量体の凝集を誘引する Seeding 現象は観察されなかったことから、アルツハイマー病などで見られる  $\beta$  アミロイドペプチドの凝集メカニズムと比べてその一般的性質が異なると考えられた。

(2) 次に興味深いのは、この規則正しいアンチトリプシン凝集体が形成され成長することに関する動的な観点である。その1つのモデルは、折りたたみを十分に完成できないがそれなりにエネルギー順位が低い、パズルのピースのような構造体がまずできあがり、それがお互いに手をつなぎ合って凝集を完成するモデルである。そしてもう1つは、最初に分子間でお互いの手をつなぎ合うことが重要であり、そこからエネルギー順位の高かった構造が急速に収束し凝集を完結するモデルである。実際、アンチトリプシンの凝集を誘導すると約1日の間、Native PAGE 上でのラダー形成のパターンに明確な変化が見られる。凝集体形成直後から5日後に至るまで、プロテアーゼに対する感受性を質量解析によりマッピングすると、完成された凝集体の結晶構造上では分子の内側に存在しプロテアーゼによる切断を受ける可能性が皆無な場所での切断が多く見られ、さらにドメインスワップに関わるストランド構造における切断は見られなかった (Fig. 3)。

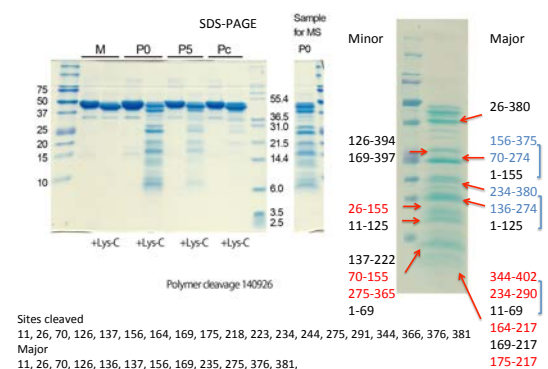


Fig. 3 凝集体の成長とプロテアーゼに対する感受性: 凝集体の形成を誘導した直後、5日後、別の熱ストレスで誘導したものは、Lys-C に対する感受性が大きく異なり、結晶構造として観察された完成された凝集体構造では考えられない切断パターンを示した。

これらは、アンチトリプシンの凝集体形成において、最初にドメインスワップすることの

重要性を示唆し、早い時間ではエネルギー順位の高い構造が集積しているモデルを支持する（後者）。また、前者のモデルを証明するアプローチとして、結晶構造を元に、アンチトリプシンが細かなドメイン構造を準安定に形成する可能性を考え、様々なストップ codon 変異体を作成したが、どれも不溶性の構造を形成した。これは前者モデルの妥当性を裏打ちしている。一方で、凝集体の成長と疎水性の変化を蛍光物質の結合により評価すると、確かに凝集を誘導した直後の疎水性は高いが、その後に凝集体が成長しても、全体的な疎水性はわずかに減少するのみであった。むしろ熱ストレスのかけ方を変えることにより異なるメカニズムで凝集を誘導したほうが、疎水性に大きな違いが観察された。これらは、凝集体の成長、メカニズム、疎水性、細胞内での毒性の関連性を考える上で、今後重要な視点であると確信している。ちなみに、アンチトリプシンの単量体は約5万の分子量であるため、その凝集体の分子量は少なくとも10万、大きければ100万以上も想定される。しかしながら興味深いことに、すべてのサイズの凝集体は10万のポアサイズを通り抜けないが、30万のポアサイズを通り抜ける性質を持つ。これは、凝集体が極めて縦に長い morphology を持つことを示しており、もし細胞へ取り込まれることを考えた場合に、物理的な影響を持つと予想された。

(3) 次に、これら様々な性質を持ちお互いに平衡状態で存在すると考えられる凝集体が、アンチトリプシン欠損症においてどのような細胞内応答を受けるのか、相互作用するタンパク質の検索を行った。これまでの研究により、凝集体はその種類により分解され、また蓄積し最終的に細胞死を導くことが予想されている。そこで HEK293 細胞を NP-40 存在下で溶解した細胞抽出液に、異なった熱ストレスで誘導した、また誘導後の時間経過が異なるアンチトリプシンの凝集体を一定時間作用させたのち免疫沈降した。様々な架橋剤の影響も検討したが、残念ながら、アンチトリプシンと相互作用する新たなタンパク質を同定することができなかった。既知の小胞体ストレス応答タンパク質である BiP、Calnexin では凝集体構造の時間変化に応じて、相互作用の変化を観察することができ、それぞれの応答は凝集体折りたたみの熟成度に対して異なる観察を得た (Fig. 4)。

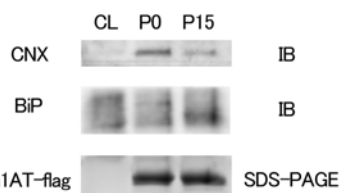


Fig. 4 凝集体の形成に対する細胞のストレス応答：凝集を誘導した直後のアンチトリプシンにCalnexinは良く相互作用し、逆に15日間成長させた凝集体にBiPは相互作用した。

(4) その他、アンチトリプシンに関して興味深い事実は、アンチトリプシンは肝臓細胞だけでなく、神経系を構成するグリア細胞でも発現することである。さらに興味深いのは、共同研究において、ある著名な疾病の患者において、アンチトリプシンの存在量が血液中有意に増大する観察をしたことである。その手法では、アンチトリプシンが単量体であるか、凝集体であるかを区別することはできない。そこで、グリア細胞をストレス下で培養したところ、アンチトリプシン凝集体の分泌が確認された。分泌された凝集体を取り込む可能性がある1つの対象が神経芽細胞腫である。SH-SY5Y細胞を神経細胞に誘導した状態で、様々な凝集体を細胞培養液に注入し、その取り込みを観察した。その後、凝集体に曝露した細胞を回収し、NP-40存在下で溶解した細胞抽出液をSDS-PAGEにより分析すると、不溶性の凝集体が多量に形成されることを観察した。しかしながら、凝集体に曝露した細胞を共焦点顕微鏡下で3D観察すると、アンチトリプシンの凝集体は、細胞内部に取り込まれるというよりは、細胞表面に沈着する様子を多く観察した。また細胞質の還元活性を示すホルマジン生性能を用いて細胞毒性を評価したが、凝集体と単量体を細胞に取り込むことにより大きな違いは観察されなかった。

(5) さらに共同研究により、老化モデルマウスの血液を提供していただき、老化した個体において生体の恒常性が破綻し、アンチトリプシンの規則正しい凝集体が存在する可能性を予備的に試験した。2ヶ月齢と26ヶ月齢の老化モデルマウスから得た血清サンプルをNative PAGEに供し、アンチトリプシンの存在を観察したところ、両方のサンプルで少量の凝集体が確認され、26ヶ月齢の方がやや多い傾向が得られた。この観察は、本研究課題で問題としているアンチトリプシンの規則正しい凝集体の形成が、大きなストレスなく我々の生体で常に起こりうる可能性を示唆しており、今後精査する必要がある。

(6) 一般的にタンパク質凝集性疾患において、凝集体はその形・大きさ・溶解性などが刻々と変化する超混在系で存在する。そして問題は、疾患に繋がるタンパク質凝集体の毒性の所在がはっきりと見えてこないことである。そこで研究の終盤では、共同研究によりドラッグデリバリーで用いられる乳酸ポリマーの利用を導入した。このポリマーの凍結乾燥物と凝集体の溶液を混合すると、①凝集体を包み込むことでその構造変化をトラップする効果を観察した②そして当然それは効率良く細胞内へとデリバリーされる。現在、構造の完成度が低い凝集体構造ほど、COS-7細胞に対して細胞死を引き起こしやすい予備的観察を得ている。今後、タンパク質凝集体の動的变化と毒性に関する重要なデータとなる。

(7)最後に考えるべきは、ドメインスワップという、タンパク質分子がお互いにその構造を補い合うことにより完成する凝集体の形成が、どれほど一般性を持つのかということであった。よく実験で利用される一般的なタンパク質について、熱ストレス下で形成される凝集体の構造をNative PAGE上で観察したところ、ドメインスワップしたタンパク質の凝集体が示す典型的なラダーを何例か観察した。これまでの知見から、生体の恒常性が破綻することによりタンパク質の折りたたみ pathwayが変化し、ドメインスワップした構造の凝集体を完成する可能性は無視できない。しかし、その形成がどれほど生体に対して毒性を持つのかについては、本研究の結果から正確に判断することは未だ難しい。

以上の結果は、すべてをまとめて一つの論文で発表することを画策していたため、成果の公表が大変遅れている。元々のアンチトリプシン凝集体の毒性に関する仮説をシンプルに解釈できない結果が出ている現状において、今後は研究成果の項目1つ1つを論文にまとめ、この競争的資金での研究が元となった成果として公表していく。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山崎 正幸、小寺里奈、清水瞳、「アンチトリプシン凝集体の構造平衡とその毒性評価」第87回日本生化学大会、2014年10月17日、京都
- ② Yamasaki, M. “Serpine polymerizations: their Structural diversity and Toxicity”, The 3<sup>rd</sup> International Conference of Indonesian Chemical Society 2014 (招待講演) (国際学会), Ambon, Indonesia, Sep. 16th, 2014.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山崎 正幸 (YAMASAKI, Masayuki)

龍谷大学・農学部・准教授

研究者番号：80397562