

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840047

研究課題名(和文)細胞外シャペロンによる細胞外蛋白質品質管理機構

研究課題名(英文)The mechanism of extracellular protein quality control by extracellular chaperone

研究代表者

小澤 大作(Ozawa, Daisaku)

福井大学・テニュアトラック推進本部・助教

研究者番号：60554524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：C反応性蛋白質(CRP)と血清アミロイドP成分(SAP)は、古典的なペントラキシンで自然免疫系を制御する分子であるが、そのシャペロン活性については未だに良く分かっていない。申請者は、CRPとSAPが、アミロイド(1-40)とD76N 2ミクログロブリンアミロイド線維形成を抑制することを明らかにした。興味深いことに、カルシウム存在下では、SAPは、反応初期はD76N 2ミクログロブリン線維形成を抑制し、反応後期では線維形成を促進することが明らかになった。これらの結果から、CRPとSAPは、生体内で細胞外シャペロンとして機能していることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：C-reactive protein (CRP) and serum amyloid P component (SAP), two major classical pentraxins in humans, are soluble pattern recognition molecules that regulate the innate immune system, but their chaperone activities remain poorly understood. CRP and SAP dose-dependently and substoichiometrically inhibited both amyloid (1-40) and D76N 2-microglobulin fibril formation in a Ca²⁺-independent manner. Interestingly, in the presence of Ca²⁺, SAP first inhibited, then significantly accelerated D76N 2-m fibril formation. In conclusion, we obtained new insight into the chaperone activity of pentraxins, proposing that classical pentraxins (CRP, SAP) may be a member of extracellular chaperones.

研究分野：生物学

キーワード：シャペロン 蛋白質品質管理 アミロイド

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病を初めとするアミロイド関連疾患は、細胞外における蛋白質の異常凝集体（アミロイド線維）の組織への沈着を伴うことから、近年、蛋白質の異常凝集を抑制する細胞外の蛋白質品質管理機構が注目されている。本研究は、細胞外の恒常性維持の一翼を担う細胞外シャペロンによる細胞外蛋白質品質管理機構の包括的解明を目指し研究を行っている。特に、細胞外シャペロンの高次構造と機能の関係性に着目し、蛋白質科学的手法を中心に研究を行ってきた。

申請者は、これまでの研究から、血中に存在し自然免疫系制御を担う古典的なペントラキシンファミリーである C 反応性蛋白質 (C-reactive protein, CRP) および血清アミロイド P 成分 (serum amyloid P component, SAP) が、生体内で新規細胞外シャペロンとしてその機能を発揮していることが予想される研究成果を得た。

CRP と SAP は、生体内では環状 5 量体構造を持つ (図 1)。CRP は、免疫組織化学的研究からアルツハイマー病の老人斑周辺で検出されている。SAP は、その名の由来通りアミロイド沈着の非線維性蛋白質成分として同定され、様々なタイプのアミロイド沈着部位に共通して共存する。このことから、CRP、SAP とともに、アミロイド線維形成機構との関係性が注目されてきた。SAP の環状 5 量体構造の片側の B 面が、Ca²⁺依存的にアミロイド線維に結合することで線維を安定化し、その結果アミロイド線維形成並びに沈着を促進するという報告がある。一方で、SAP のもう片側の A 面が、変性蛋白質のリフォールディング活性を持つという一見相反する報告もあり、SAP の生理機能に関しては現在も意見が二分している。

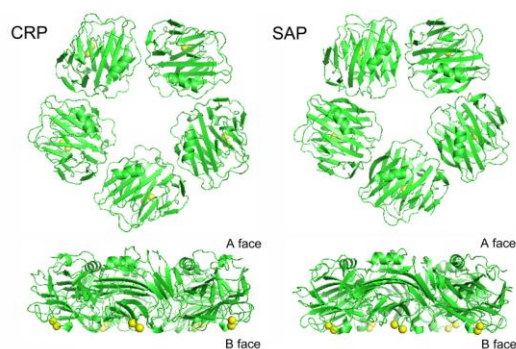


図 1. CRP と SAP の環状 5 量体構造

2. 研究の目的

本研究では、以前の研究で得られた CRP と SAP のアミロイド線維形成抑制効果の結果を踏まえて、さらに詳細にその分子機構を明らかにするために、CRP と SAP の高次構造に注目し、シャペロン機能との関係性を明らかにすることを目的にした。

特に、SAP は、in vitro では安定な 10 量体

構造を保持するが、生体内では 5 量体として、その機能を発揮すると考えられているため、SAP が安定な 5 量体構造を保持する条件を確立し、その条件における SAP の機能を評価した。

3. 研究の方法

(1) ゲルろ過クロマトグラフィーにより、CRP と SAP の構造状態を評価した。

(2) チオフラビン T による分光蛍光定量法を用いて、CRP と SAP のアミロイドβ (Aβ) アミロイド線維形成への影響を評価した。また、電子顕微鏡において線維形成を確認した。

(3) チオフラビン T による分光蛍光定量法を用いて、CRP と SAP の D76N β2 ミクログロブリン (β2-m) アミロイド線維形成への影響を評価した。また、電子顕微鏡において線維形成を確認した。

(4) EDTA 添加による、SAP の D76N β2-m アミロイド線維形成促進効果の消失を、チオフラビン T 分光蛍光定量法により評価した。

(5) ELISA 法や架橋剤とウエスタンブロット法により、CRP および SAP と Aβ および D76N β2-m の相互作用を測定した。

(6) 濁度測定により、CRP と SAP のグルタチオン-S-トランスフェラーゼの熱変性による不定形凝集体形成への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) まず初めに、Tris-EDTA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 10 mM EDTA) と Tris-Ca buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 2 mM CaCl₂) 条件下で、CRP は 5 量体として存在することが明らかになった。次に、Tris-EDTA buffer 条件下で、SAP は B 面同士がスタックした 10 量体として存在することが明らかになった (図 2)。また、条件検討の結果、SAP が安定な 5 量体構造を保持する MES-Ca buffer (50 mM MES-NaOH (pH 7.0), 500 mM NaCl and 2 mM CaCl₂) 条件を確立した (図 2)。以降の実験は、この 3 種類の溶液条件下で研究を行った。

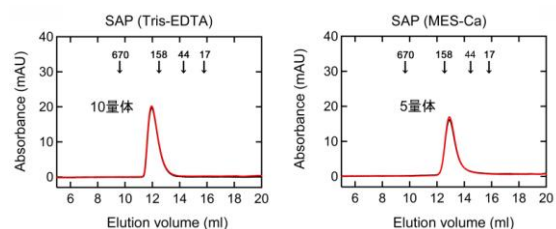


図 2. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Tris-EDTA buffer と MES-Ca buffer 条件下における SAP の構造状態の評価

(2)CRP と SAP が、アルツハイマー病関連 A β (1-40)アミロイド線維形成を、濃度依存的かつ substoichiometric に抑制することを明らかにした (図3)。この線維形成抑制作用は、Ca²⁺非依存的に起きることを見出した。SAP は、10 量体構造においても線維形成抑制効果が見られることから、Ca²⁺非依存的な A 面を介したアミロイド原生蛋白質と相互作用が考えられる。

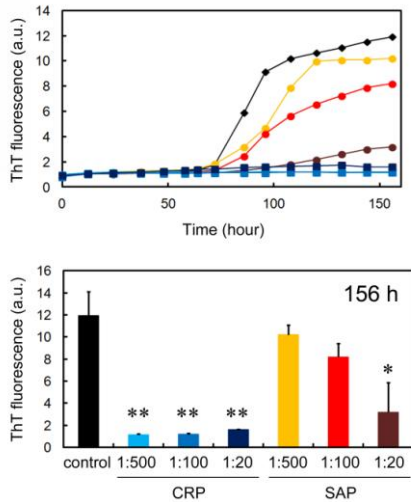


図3. Tris-EDTA buffer 条件下における CRP と SAP の A β (1-40)アミロイド線維形成抑制効果

(3)CRP と SAP は、Tris-EDTA buffer 条件下における遺伝性全身性アミロイドーシス関連 D76N β 2-m アミロイド線維形成もまた抑制することを明らかにした。最も興味深いことに、MES-Ca buffer 条件下における D76N β 2-m 線維形成において、SAP は初期段階では線維形成を抑制し、一度線維が形成されると線維と結合し、線維を安定化することで線維形成を促進することが明らかになった (図4)。SAP のアミロイド線維形成に対する促進と阻害の2面性を、1つの実験系から明らかにした今までに類を見ない非常に画期的な結果であり、これまでの相反する効果の両面を捉えることができた。

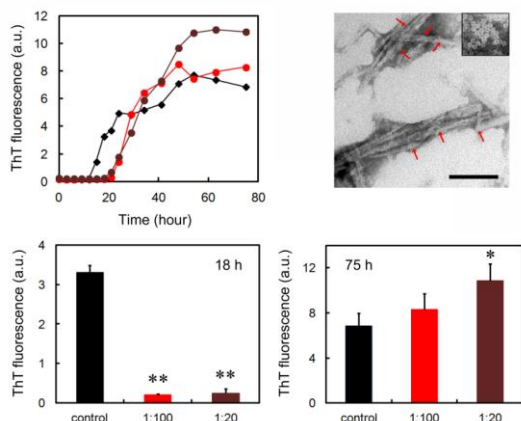


図4. MES-Ca buffer 条件下における SAP の D76N β 2-m アミロイド線維形成抑制および促進効果と線維の側面に結合した SAP の電子顕微鏡像

(4)上記の SAP の D76N β 2-m アミロイド線維形成促進効果が、Ca²⁺依存的なアミロイド線維との相互作用によるものかを検討するために、線維形成反応の途中に、EDTA を加えた。すると、SAP の D76N β 2-m アミロイド線維形成促進効果は消失した (図5)。したがって、SAP は、Ca²⁺依存的に線維と結合し、線維を安定化することで、線維形成が促進されたのではないかと考えられる。

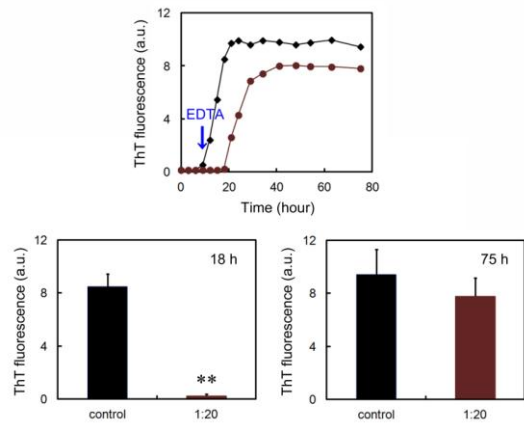


図5. EDTA 添加による SAP の D76N β 2-m アミロイド線維形成促進効果の消失

(5)ELISA 法や架橋剤とウエスタンブロット法による相互作用解析から、A β と D76N β 2-m のモノマーおよびオリゴマーとの結合が示唆され、CRP と SAP はこれらの分子種との相互作用によりアミロイド線維形成を抑制することが考えられる (図6)。

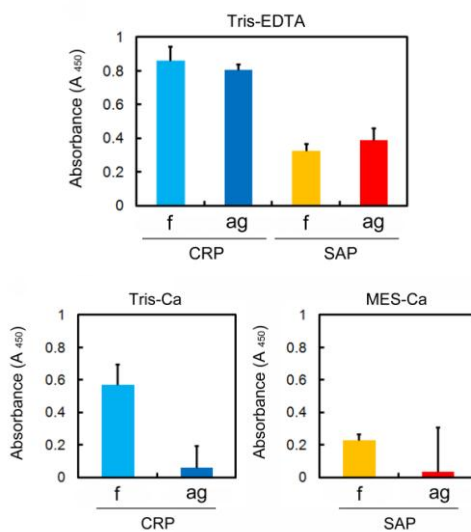


図6. ELISA 法を用いた CRP および SAP と

D76N β 2-m の相互作用解析 (f: fresh D76N β 2-m, ag: aggregated D76N β 2-m)

(6)SAP はアミロイド線維形成のような秩序立った凝集のみならず、グルタチオン-S-トランスフェラーゼの無秩序な不定形凝集体の形成も抑制することが確認され、細胞外シャペロンとしての幅広い蛋白質凝集抑制活性が示された (図7)。

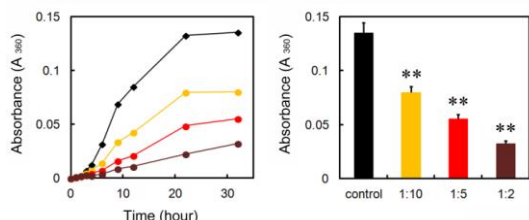


図7. SAPによるグルタチオン-S-トランスフェラーゼの不定形凝集体形成の抑制

以上の結果から、CRPとSAPは生体内で、細胞外シャペロンとして、細胞外の蛋白質品質管理を行っている可能性が考えられる。一方、一度線維が形成されると、SAPは線維と結合して線維を安定化することから、線維形成を促進してしまうことが明らかになった。

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 5件)

- ① Ozawa, D., Nomura, R., Mangione, P. P., Hasegawa, K., Okoshi, T., Porcari, R., Bellotti, V., Naiki, H. Multifaceted anti-amyloidogenic and pro-amyloidogenic effects of C-reactive protein and serum amyloid P component in vitro. *Sci. Rep.* in press 査読有
- ② 小澤 大作, 大越 忠和, 長谷川 一浩, 内木 宏延. β ₂-ミクログロブリンアミロイド線維の形成機序, 腎と骨代謝 in press 査読無
- ③ Naiki, H., Okoshi, T., Ozawa, D., Yamaguchi, I., Hasegawa, K. Molecular pathogenesis of human amyloidosis: Lessons from β ₂-microglobulin-related amyloidosis. *Pathol. Int.* 66(4):193-201, 2016
DOI:10.1111/pin.12394 査読有
- ④ Okoshi, T., Yamaguchi, I., Ozawa, D., Hasegawa, H., Naiki, H. Endocytosed β ₂-microglobulin amyloid fibrils induce necrosis and apoptosis of rabbit synovial fibroblasts by disrupting endosomal/lysosomal membranes: A novel mechanism on the cytotoxicity of amyloid fibrils. *PLoS ONE* 10(9):e0139330, 2015.
DOI:10.1371/journal.pone.0139330 査読有
- ⑤ 内木 宏延, 長谷川 一浩, 小澤 大作,

大越 忠和. ヒトアミロイド線維形成・沈着の分子機構, *Dementia Japan* 28:275-282, 2014 査読無

[学会発表] (計 1件)

- ① 小澤 大作, 野村 寮, Mangione P. Patrizia, 長谷川 一浩, 大越 忠和, Porcari Riccardo, Bellotti Vittorio, 内木 宏延. C反応性蛋白質と血清アミロイドP成分の多面的シャペロン効果, 第16回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場(福岡), 6, 7-9, 2016.

[その他]

ホームページ等

<http://byouri2.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小澤 大作 (OZAWA, Daisaku)

福井大学・テニユアトラック推進本部・助教

研究者番号: 60554524

(2)研究協力者

内木 宏延 (NAIKI, Hironobu)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 10227704

長谷川 一浩 (HASEGAWA, Kazuhiro)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 60324159

大越 忠和 (OOKOSHI, Tadakazu)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 90362037