

## 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31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390075

研究課題名（和文） ヒトアミロイドーシス発症の分子機構－試験管内モデルと動物モデルの統合による解明－

研究課題名（英文） Clarification of the molecular pathogenesis of human amyloidosis by in vitro amyloid fibril formation systems and transgenic mouse model.

研究代表者

内木 宏延 (Naiki Hironobu)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10227704

研究成果の概要（和文）：本研究では透析アミロイドーシス( $\beta 2$ -ミクログロブリン( $\beta 2$ -m)アミロイド)の発症の分子機構の解明を試みた。 $\alpha 2$ -マクログロブリンが細胞外分子シャペロンとして $\beta 2$ -m線維形成を抑制する機構を明らかにし、遺伝子改変マウスを用いて線維の蓄積に $\beta 2$ -m濃度増加以外の因子の必要性を示し、培養細胞系を用いて線維の毒性発揮機構を解析し、 $\beta 2$ -m線維形成を阻害する化合物を探索する為の新規反応系の構築を試みた。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the molecular pathogenesis of amyloidoses including dialysis-related amyloidosis or  $\beta 2$ -microglobulin ( $\beta 2$ -m) amyloidosis, we constructed experimental amyloid fibril formation systems in vivo and in vitro, and then evaluated the roles of the various biological molecules on the amyloid fibril formation. The key findings of this study are as follows: (1) The detailed molecular mechanism of  $\alpha 2$ -macroglobulin as an extracellular molecular chaperon in the inhibition of  $\beta 2$ -microglobulin amyloid fibril formation was clarified. (2) Human  $\beta 2$ -m transgenic mice expressing excess amount of  $\beta 2$ -m did not showed the amyloid symptom, indicating unknown intrinsic factors are required for the deposition of amyloid fibril in vivo. (3) Toxic effect of the  $\beta 2$ -m amyloid fibril on the cultured synovial fibroblast cells was evaluated. (4) We improved the in vitro fibril formation system to investigate the effect of various biological molecules and organic compounds on the fibrillogenesis at near physiological conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：蛋白質、病理学、透析アミロイドーシス、 $\beta 2$ -ミクログロブリン、アミロイド線維

## 1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでに、独自に開発した分光蛍光定量法及び反応速度論の実験系を駆使し、アルツハイマー病患者脳に認められる

A $\beta$  アミロイドーシス、および長期血液透析患者に発症する $\beta 2$ -ミクログロブリン ( $\beta 2$ -m) アミロイドーシスをモデル疾患に選び、アミロイド線維形成過程を説明する重合核依存

性重合モデル、および線維伸長過程を説明する一次反応速度論モデルを構築 (Naiki, H., Nagai, Y. J. *Biochem.* 2009)、様々な生体分子及び有機化合物の線維形成過程に及ぼす影響を解析して来た。

一方研究分担者の樋口らは、独自にマウスアミロイドーシスモデルを開発、上記試験管モデルが動物レベルでも当てはまることを世界に先駆けて実証し、"Inducible proteopathies"の概念を生んだ (Zhang, B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(20):7263-7268, 2008 他)。

われわれは最近、① リゾフォスファチジン酸 (LPA) など一部のリゾリン脂質、各種遊離脂肪酸 (NEFAs) など、陰性荷電を有する生体界面活性分子が、生理条件下における  $\beta$ 2-m アミロイド線維の試験管内伸長反応を促進すること (Hasegawa, K., et al., *Biochem. J.* 416(2):307-315, 2008 他)、② その分子機構として、LPA 及び NEFA が  $\beta$ 2-m の天然構造を部分的にアンフォールドさせること、③ LPA がアミロイド線維表面に結合し、線維構造を安定化させることにより脱重合を阻害することを明らかにすると共に、④ 代表的ポリフェノール化合物のミリセチンが、 $A\beta$  タンパク質モノマーの一次構造ではなく、 $A\beta$  アミロイド線維の高次構造 ( $\beta$  シート構造) を特異的に認識し、これに結合することにより抗アミロイド効果を示すこと (Hirohata, M., et al., *Biochemistry* 46(7):1888-1899, 2007) を明らかにした。これらの知見に基づき、現在われわれは以下の作業仮説を構築している。 $\beta$ 2-m の血中濃度は血液透析患者で著しく増加し、血中、あるいは関節軟骨、腱組織などに存在する様々な生体分子と相互作用することにより、 $\beta$ 2-m の天然構造が部分的にアンフォールドする。その結果  $\beta$ 2-m は異常構造を獲得し、重合核依存性重合モデルに従いアミロイド線維を形成、組織に沈着する。形成したアミロイド線維表面にも様々な生体分子が結合し、線維構造を安定化することによりアミロイド線維沈着を促進する。以上の結果、手根管症候群、破壊性脊椎関節症などの全身関節症状を主症状とする透析アミロイドーシスを発症する。

一方で、部分的にアンフォールドした  $\beta$ 2-m に結合し、構造を安定化することによりアミロイド線維形成を阻害する生体分子群も存在すると考えられるが、その実態はほとんど解明されていない。最近、細胞外タンパク質品質管理機構の存在が明らかになり (Yerbury et al. *Biochemistry* 44:10914-10925, 2005)、ごく最近、 $A\beta$  アミロイド線維形成に対する抑制効果も報告された (Yerbury et al. *J. Biol. Chem.* 284:4246-4254, 2009)。一方、品質管理機構の中心を担う細胞外分子シャペロンの  $\alpha$ 2-マクログロブリン ( $\alpha$ 2-M) が、血液透

析患者血清中で  $\beta$ 2-m と複合体を形成していることも報告されている (Motomiya et al. *Kidney Int.* 64:2244-2252, 2003)。

アミロイド線維形成過程における前駆タンパク質、あるいはアミロイド線維と種々の生体分子との複雑な相互作用解明に向けた研究は、われわれを始めとしてようやく緒に就いたのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒトアミロイドーシスのモデル疾患として透析アミロイドーシスを選び、発症の分子機構を、独自に開発する試験管内実験系、新たに開発する遺伝子改変マウス、培養細胞系、および臨床病態解析を有機的に組み合わせ、総合的に解明する。具体的には、① 種々の生体分子が  $\beta$ 2-m アミロイド線維形成を促進・抑制する分子機構、特に細胞外分子シャペロンの  $\beta$ 2-m 線維形成抑制機構を解明すること、②  $\beta$ 2-m 線維による細胞・組織傷害機構を解明すること、③  $\beta$ 2-m 線維形成・沈着を阻害する有機化合物を探索すること、および ④ ヒトアミロイドーシスに共通する発症機構や治療戦略の作業モデルを提案すること、の4点を目的とする。本研究で得られる新知見や実験パラダイム・ツールは、他のヒトアミロイドーシス研究にも普遍的に活用することが出来、学術的波及効果は大きい。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞外シャペロンによる  $\beta$ 2-m アミロイド線維形成抑制機構の解明:  $\beta$ 2-m アミロイド線維形成はチオフラビン T による分光蛍光定量法や電子顕微鏡を用いて確認した。 $\alpha$ 2M と  $\beta$ 2-m の相互作用は Dot blot 法や ELISA 法、ウェスタンブロット法を用いて検討した。 $\alpha$ 2M と  $\beta$ 2-m の構造は円二色性測定、超遠心分析、ANS 蛍光測定により解析した。

(2) モデルマウスを用いた生体分子の機能解明: 透析アミロイドーシスモデルマウスとして、マウス  $\beta$ 2-m をノックアウトした上で、ヒト  $\beta$ 2-m を過剰発現するトランスジェニックマウス ( $hB2MTg^{+/+}mB2m^{-/-}$ ) を作成し、病理学的解析を行った。

(3)  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維の細胞毒性に関する検討: ウサギ滑膜線維芽細胞由来の株細胞 (HIG-82) を 24 穴プレートに培養し、 $\beta$ 2-m アミロイド線維、あるいは  $\beta$ 2-m モノマーを種々の濃度で培養液に添加した。一定時間のインキュベーションの後、LDH release assay 及び MTT reduction assay を行い、アミロイド線維の培養細胞に対する毒性の有無と程度を評価するとともに、培養細胞染色キットによる染色を行い形態学的な評価を行った。さらに、アミロイド線維によるアポトーシス誘導の有無、程度を評価するため

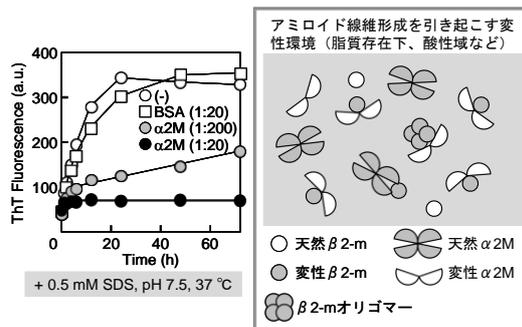
に、DAPI 染色、TUNEL 染色の二重染色を行い、アポトーシス率を測定した。また、Congo-red 染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、添加したアミロイド線維が細胞に付着しているのか、細胞内に取り込まれているのかを検討した。

(4) 試験管内アミロイド線維伸長反応系の検討：ビーズ状担体(攪拌子)に各種生体成分蛋白質を固定した。0-5  $\mu\text{M}$  の  $\text{A}\beta(1-40)$  溶液を攪拌子と共に 96 ウェルマイクロプレート中に気液界面を排除し封入した。マイクロプレートを上下方向に回転させることで担体を沈降させて攪拌した。アミロイド線維形成をチオフラビン T 蛍光によりモニターした。また、蛍光実体顕微鏡を用いてアミロイドの凝集状態を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞外シャペロンによる  $\beta 2$ -ミクログロブリンアミロイド線維形成抑制機構の解明 (雑誌論文(7)) :

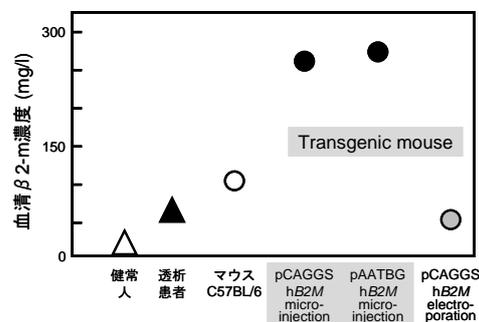
透析アミロイドーシス患者の血清中では、細胞外シャペロンである  $\alpha 2\text{M}$  とアミロイド線維を形成する  $\beta 2\text{-m}$  との複合体が検出されるが、その形成機構や生物学的意義について検討した。中性 pH、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下での  $\beta 2\text{-m}$  アミロイド線維形成において、 $\alpha 2\text{M}$  は濃度依存的に、substoichiometric に  $\beta 2\text{-m}$  アミロイド線維形成を抑制した。Dot blot 法や ELISA 法による親和性解析から、 $\alpha 2\text{M}$  と  $\beta 2\text{-m}$  の相互作用は SDS 非存在下よりも SDS 存在下で強くなること示された。円二色性測定、超遠心分析、ANS 蛍光測定を用いて 0.5 mM SDS 存在下での  $\alpha 2\text{M}$  の構造を解析したところ、天然状態ではテトラマーとして存在する  $\alpha 2\text{M}$  は SDS 存在下では一部がダイマーに解離し、疎水性領域をより露出することが明らかになった。ウエスタンブロット法により、 $\beta 2\text{-m}$  は  $\alpha 2\text{M}$  のテトラマーとダイマー両方と結合し、ダイマーに強く結合していることが明らかになった。さらに SDS 存在下のみならず、ヘパリン存在下、pH を下げることによっても、同様に  $\alpha 2\text{M}$  の  $\beta 2\text{-m}$  アミロイド線維形成抑制やダイマー化、 $\beta 2\text{-m}$  との親和性変化が見られた。以上の結果から、 $\beta 2\text{-m}$  が変性するような環境下では、 $\alpha 2\text{M}$  の一部はダイマーに解離し疎水性領域を露出することによって変性した  $\beta 2\text{-m}$  と疎水性相互作用により強く結合することで蛋白質品質管理を行っているのではないかと考えられる。生体内では  $\alpha 2\text{M}$  は  $\beta 2\text{-m}$  アミロイド線維形成抑制に関与していると示唆される。



$\alpha 2\text{M}$  による中性pHでの  $\beta 2\text{-m}$  アミロイド線維の伸長反応抑制

(2) モデルマウスを用いた生体分子の機能解明 (雑誌論文(2)) :

透析アミロイドーシスモデルマウスとして、マウス  $\beta 2\text{-m}$  をノックアウトした上で、ヒト  $\beta 2\text{-m}$  を過剰発現するトランスジェニックマウスを開発した。このマウスは、自発的にも、合成あるいは患者組織から抽出した  $\beta 2\text{-m}$  アミロイド線維をシードとして投与しても、 $\beta 2\text{-m}$  アミロイドの蓄積が認められなかった。この結果は血中  $\beta 2\text{-m}$  濃度が増加するだけではアミロイド線維形成には不十分であることを示している。我々は既に、試験管内線維形成系においても、 $\beta 2\text{-m}$  は天然構造のままではアミロイド線維に組み込まれず、リゾリン脂質等により部分変性する必要があることを示しており、マウスでの in vivo 実験結果と矛盾しない。以上の結果は、リゾリン脂質等の炎症関連因子による促進や、本研究で明らかにした細胞外分子シャペロンによる抑制機構の破綻など、反応機構の様々な段階の発症因子が重複してはじめてアミロイドーシスを発症する可能性を示唆している。発症のトリガーになる因子を同定することは、予防・治療のターゲットとして重要であり、本トランスジェニックマウスはこの誘起因子を探索するために適切なモデルであると考えられる。



透析アミロイドーシスモデルマウス ( $\text{hB2MTg}^{+/+}\text{mB2m}^{-/-}$ ) の作成：血清中  $\beta 2\text{-m}$  濃度の比較

今後、誘起因子を体外から投与することや、別の遺伝子改変マウスとの掛け合わせによる遺伝子導入などにより、誘起因子の同定を

試みることが可能となった。現在、変異遺伝子を導入したヒト  $\beta 2$ -m トランスジェニックモデルマウスの作成を行い、当該遺伝子の影響の解析を試みている。

### (3) $\beta 2$ -ミクログロブリンアミロイド線維の細胞毒性に関する検討:

$\beta 2$ -mアミロイド線維を100  $\mu\text{g/ml}$ 含む培養液でインキュベーションした群は、モノマー(100  $\mu\text{g/ml}$ )添加群、及びコントロール群と比較して、LDH release assay、MTT reduction assayのいずれの方法でも有意にviabilityが低下していた。光学顕微鏡で観察すると、アミロイド線維を添加した群では、生細胞は少なく、核濃縮や細胞質の膨化、空胞化などの壊死性の変化がみられると共に、アポトーシス小体と考えられる核の断片化も認められた。DAPI/TUNEL二重染色による検討では、アミロイド線維投与群では陰性対照、及びモノマー投与群に比して多くのTUNEL陽性像が認められた。また、Congo-red染色を行い、アミロイド線維が細胞表面に付着していることを確認した。 $\beta 2$ -mアミロイド線維は細胞表面に付着し、壊死及びアポトーシスの両者を引き起こすことで毒性を発揮すると考えられた。成書には壊死とアポトーシスは互いに相反する事象ではなく、種々の病的状態において、同時に、あるいは連続して起こると記載されており、矛盾しないと思われる。本研究の結果は、 $\beta 2$ -mアミロイド沈着による骨・関節破壊の病態に、 $\beta 2$ -mアミロイド線維による直接の細胞傷害効果が関与している可能性を示唆している。

### (4) 試験管内 $\beta 2$ -mアミロイド線維伸長反応系の検討:

Alzheimer病A $\beta$ アミロイドの重合反応について、A $\beta$ が自発的に核形成を行わない濃度まで低下させ、核形成を強く誘起する気液界面を無くした容器に封入した状態で、セファロースビーズを攪拌子とすると線維形成が長時間起きないことを見いだした。このビーズに、基底膜のモデル物質でありcollagen, lamininなどを含んでいるMatrigelを結合させ、反応液に添加し攪拌反応したところ有意に重合反応を促進することが示された。従来、lamininなどの基底膜蛋白質は、A $\beta$ の重合を阻害するとの報告がなされていた。しかし本研究で、より生理条件に近い重合反応系を構築したことにより、脳アミロイドアンギオパチーにおいて血管平滑筋細胞の基底膜にA $\beta$ アミロイドが蓄積する病理学的観察と一致する説明がなされたと考える。(雑誌論文(18))。この反応系を応用し、強い蛋白質変性作用を有する可能性のある気液界面を排除した $\beta 2$ -mアミロイド線維形成反応系の構築を試みている。この反応系を用いて、気液界

面や疎水性表面などの線維形成誘起能の評価や、さらには、生体成分・有機物等のアミロイド線維重合への効果の評価を行う予定である。

### 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18件)

- (1) Yagi H, Ozawa D, Sakurai K, Kawakami T, Kuyama H, Nishimura O, Shimanouchi T, Kuboi R, Naiki H, Goto Y. Laser-induced propagation and destruction of amyloid  $\beta$  fibrils. *J Biol Chem* 285(25), 19660-19667, 2010. doi: 10.1074/jbc.M109.076505. 査読有
- (2) Zhang P, Fu X, Sawashita J, Yao J, Zhang B, Qian J, Tomozawa H, Mori M, Ando Y, Naiki H, Higuchi K. Mouse model to study human A $\beta 2$ M amyloidosis: generation of a transgenic mouse with excessive expression of human  $\beta 2$ -microglobulin. *Amyloid* 17(2), 50-62, 2010. doi: 10.3109/13506129.2010.483116. 査読有
- (3) Yamamoto K, Yagi H, Lee YH, Kardos J, Hagihara Y, Naiki H, Goto Y. The amyloid fibrils of the constant domain of immunoglobulin light chain. *FEBS Lett* 584(15), 3348-3353, 2010. doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.019. 査読有
- (4) Chatani E, Ohnishi R, Konuma T, Sakurai K, Naiki H, Goto Y. Pre-steady-state kinetic analysis of the elongation of amyloid fibrils of  $\beta 2$ -microglobulin with tryptophan mutagenesis. *J Mol Biol* 400(5), 1057-1066, 2010. doi: 10.1016/j.jmb.2010.05.071. 査読有
- (5) Yoshimura Y, Sakurai K, Lee YH, Ikegami T, Chatani E, Naiki H, Goto Y. Direct observation of minimum-sized amyloid fibrils using solution NMR spectroscopy. *Protein Sci* 19(12), 2347-2355, 2010. doi: 10.1002/pro.515. 査読有
- (6) Konuma T, Chatani E, Yagi M, Sakurai K, Ikegami T, Naiki H, Goto Y. Kinetic intermediates of  $\beta 2$ -microglobulin fibril elongation probed by pulse-labeling H/D exchange combined with NMR analysis. *J Mol Biol* 405(3), 851-862, 2011. doi: 10.1016/j.jmb.2010.11.029. 査読有
- (7) Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH, Sakurai K, Yanagi K, Ookoshi T, Goto Y, Naiki H: Inhibition of  $\beta 2$ -microglobulin amyloid fibril formation by  $\alpha 2$ -macroglobulin. *J Biol Chem* 286(11), 9668-9676, 2011. doi: 10.1074/jbc.M110.167965. 査読有
- (8) Ozawa D, Kaji Y, Yagi H, Sakurai K,

- Kawakami T, Naiki H, Goto Y. Destruction of amyloid fibrils of keratoepithelin peptides by laser irradiation coupled with amyloid-specific thioflavin T. *J Biol Chem* 286(12), 10856-10863, 2011. doi: 10.1074/jbc.M111.222901. 査読有
- (9) 内木宏延, 長谷川一浩, 小野賢二郎, 山田正仁. アミロイド線維形成の重合核依存性重合モデルと線維形成阻害薬の探索. *薬学雑誌* 130(4), 503-509, 2010. 査読無
- (10) 内木宏延. 透析アミロイドーシス発症の分子機構. *医学のあゆみ* 別冊:75-81, 2010. 査読無
- (11) Kardos J, Micsonai A, Pál-Gábor H, Petrik É, Gráf L, Kovács J, Lee YH, Naiki H, Goto Y. Reversible heat-induced dissociation of  $\beta_2$ -microglobulin amyloid fibrils. *Biochemistry* 50(15), 3211-3220, 2011. doi: 10.1021/bi2000017. 査読有
- (12) So M, Yagi H, Sakurai K, Ogi H, Naiki H, Goto Y. Ultrasonication-dependent acceleration of amyloid fibril formation. *J Mol Biol* 412(4), 568-577, 2011. doi: 10.1016/j.jmb.2011.07.069. 査読有
- (13) 高橋直生, 木村秀樹, 吉田治義, 内木宏延: アミロイドーシス. *日内会誌* 100(5), 1282-1288, 2011. 査読無
- (14) Yamada M, Naiki H. Cerebral amyloid angiopathy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107, 41-78, 2012. doi: 10.1016/B978-0-12-385883-2.00006-0. 査読無
- (15) Chatani E, Yagi H, Naiki H, Goto Y: Polymorphism of  $\beta_2$ -microglobulin amyloid fibrils manifested by ultrasonication-enhanced fibril formation in trifluoroethanol. *J Biol Chem* 287(27), 22827-22837, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.333310. 査読有
- (16) Yanagi K, Sakurai K, Yoshimura Y, Konuma T, Lee YH, Sugase K, Ikegami T, Naiki H, Goto Y: The monomer-seed interaction mechanism in the formation of the  $\beta_2$ -microglobulin amyloid fibril clarified by solution NMR techniques. *J Mol Biol* 422(3), 390-402, 2012. doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.034. 査読有
- (17) Yoshimura Y, Lin Y, Yagi H, Lee YH, Kitayama H, Sakurai K, So M, Ogi H, Naiki H, Goto Y: Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(36), 14446-14451, 2012. doi: 10.1073/pnas.1208228109. 査読有
- (18) Hasegawa K, Ozawa D, Ookoshi T, Naiki H. Surface-bound basement membrane components accelerate amyloid- $\beta$  peptide nucleation in air-free wells: an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. *Biochim Biophys Acta*, 2013, in press. 査読有
- [学会発表] (計 24 件)
- (1) 八木寿梓, 小澤大作, 櫻井一正, 加治優一, 川上 徹, 九山浩樹, 内木宏延, 後藤祐児: レーザー照射によるアミロイド線維の増殖と崩壊. 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6,16-18, 2010.
- (2) 小沼 剛, 茶谷絵理, 八木正典, 櫻井一正, 池上貴久, 内木宏延, 後藤祐児: パルスラベル H/D 交換法と NMR を用いた  $\beta_2$  ミクログロブリンの線維伸長中間体の解析. 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6,16-18, 2010.
- (3) 宗 正智, 八木寿梓, 櫻井一正, 内木宏延, 後藤祐児: 超音波による超高速アミロイド線維形成反応. 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6,16-18, 2010.
- (4) 吉村優一, 櫻井一正, 李 映昊, 池上貴久, 茶谷絵理, 内木宏延, 後藤祐児:  $\beta_2$ -ミクログロブリンが形成するアミロイド線維の溶液 NMR による直接観察. 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6,16-18, 2010.
- (5) Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH, Sakurai K, Yanagi K, Ookoshi T, Goto Y, Naiki H:  $\alpha_2$ -Macroglobulin inhibits  $\beta_2$ -microglobulin amyloid fibril formation in vitro. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Sep 13-16, 2010.
- (6) Yagi H, Ozawa D, Sakurai K, Naiki H, Goto Y: Laser-induced propagation and destruction of amyloid  $\beta$  fibrils. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Sep 13-16, 2010.
- (7) Yoshimura Y, Sakurai K, Lee YH, Ikegami T, Chatani E, Naiki H, Goto Y: Direct observation of minimum-sized amyloid fibrils using solution NMR spectroscopy. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Sep 13-16, 2010.
- (8) Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Higuchi K: Transmissible amyloid fibrils formed by selective N-, C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Sep 13-16, 2010.
- (9) Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH, Sakurai K, Yanagi K, Ookoshi T, Goto Y, Naiki H:  $\alpha_2$ -Macroglobulin inhibits  $\beta_2$ -microglobulin amyloid fibril formation in vitro. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12,7-10, 2010.
- (10) 長谷川一浩, 森永章義, 山田正仁, 内

木宏延:  $\beta$  アミロイド線維の核形成における界面の影響. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12,7-10, 2010.

- (11) 水野愛子, 宗 正智, 八木寿梓, 櫻井一正, 河田康志, 内木宏延, 後藤祐児: 超音波による K3 peptide と  $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維形成. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12,7-10, 2010.
- (12) 茶谷絵理, 小沼 剛, 大西玲奈, 八木正典, 櫻井一正, 池上貴久, 内木宏延, 後藤祐児: 伸長反応中間体の観察によるアミロイド構造伝播機構の解明. 第11回日本蛋白質科学会年会(蛋白質のフォールディングと異常凝集の統一原理), 吹田, 6,7-9, 2011.
- (13) 宗 正智, 八木寿梓, 櫻井一正, 荻 博次, 内木宏延, 後藤祐児: 超音波によるアミロイド線維形成促進. 第11回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6,7-9, 2011.
- (14) 吉村優一, 櫻井一正, 八木寿梓, 宗 正智, 李 映昊, 荻 博次, 内木宏延, 後藤祐児: 超音波処理下で作製した微細アミロイド線維の構造および物性のキャラクタリゼーション. 第11回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6,7-9, 2011.
- (15) 櫻井一正, 柳 浩太郎, 吉村優一, 小沼剛, 菅瀬謙治, 池上貴久, 内木宏延, 後藤祐児: 溶液NMRによる $\beta$ 2ミクログロブリンアミロイド線維形成のモノマー線維核相互作用機構の解明. 第11回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6,7-9, 2011.
- (16) 小澤大作, 加治優一, 八木寿梓, 櫻井一正, 川上 徹, 内木宏延, 後藤祐児: チオフラビン T とレーザー光を利用したアミロイド線維の分解. 第11回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6,7-9, 2011.
- (17) 内木宏延:  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維形成・沈着の分子機構. 第56回日本透析医学会学術集会・総会(透析アミロイドーシス UpDate), 横浜, 6,17-19, 2011.
- (18) 長谷川一浩, 内木宏延: 気液界面の影響を排除したアルツハイマー病  $\beta$  アミロイド線維の核形成検出系の開発. 第84回日本生化学会大会, 京都, 9,21-24, 2011.
- (19) 長谷川恭平, 八木寿梓, 志鷹裕司, 内木宏延, 後藤祐児: 超音波による amyloid  $\beta$ (1-40)の線維形成機構. 第84回日本生化学会大会, 京都, 9,21-24, 2011.
- (20) 小澤大作, 加治優一, 八木寿梓, 櫻井一正, 川上 徹, 内木宏延, 後藤祐児: 蛍光色素チオフラビン T とレーザー光によるアミロイド線維の分解. 第84回日本生化学会大会, 京都, 9,21-24, 2011.
- (21) Ozawa D, Hasegawa K, Ookoshi T, Naiki

H: Molecular mechanisms of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibril formation. XIII<sup>th</sup> International Symposium on Amyloidosis, Groningen(the Netherlands), May 6-10, 2012.

- (22) 小澤大作, 長谷川一浩, 李 映昊, 櫻井一正, 柳 浩太郎, 大越忠和, 後藤祐児, 内木宏延: 細胞外シヤペロンによるアミロイド線維形成抑制機構の解明. 第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6,20-22, 2012.
- (23) 澤下仁子, 張 蓓茹, 龜谷富由樹, 長谷川一浩, 森 政之, 内木宏延, 樋口京一: マウス F 型 apoA-II の C 末ペプチドは老化アミロイドーシス高発症マウスのアミロイド沈着を軽減する. 第27回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会, 東京, 7,6-7, 2012.
- (24) 内木宏延: アミロイド線維形成・沈着の分子機構. 第58回日本病理学会総会秋季特別総会(ヒトの疾患解明に直結した最新の病理学研究), 名古屋, 11,22-23, 2012.

[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

内木 宏延 (Naiki Hironobu)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 10227704

### (2) 研究分担者

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

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

伴 匡人 (Ban Tadato)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号: 00579667

(H22→H23: 研究分担者)

樋口 京一 (Higuchi Keiichi)

信州大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 20173156

### (3) 連携研究者

なし