

平成21年 4月22日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19790036  
研究課題名 (和文) NMR を用いた難治性疾患 AL アミロイドーシスの発症機構の解明と阻害法の確立  
研究課題名 (英文) Elucidation of the pathogenic mechanism of intractable disease; AL amyloidosis using NMR and inhibition of the amyloid formation.  
研究代表者  
大栗 誉敏 (OHKURI TAKATOSHI)  
九州大学・薬学研究院・助教  
研究者番号：70346807

## 研究成果の概要：

難治性疾患ALアミロイドーシスの原因タンパク質である免疫グロブリンL鎖可変領域ドメイン (VL) について、NMR による物理学的手法から、変性状態での動的構造を明らかにし、その構造がアミロイド線維形成に深く関与していることを突き止めた。また、アミロイド線維に重要な役割をしているアミノ酸を明らかにし、そのアミノ酸変異によってVLのアミロイド線維化を阻害することに成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：蛋白質工学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：ALアミロイドーシス、NMR、変性構造、アミロイド線維、L鎖

## 1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質のフォールディングに異常が生じて凝集し、アミロイドと呼ばれる線維を形成する現象が多数の疾患で見つかり様々な原因タンパク質が同定されている。しかしながら分子レベルでのアミロイド線維形成メカニズムは未だ謎が多く、従って根治療法も確立されていない。分かっていること

は、一次配列及び立体構造の共通した特徴は無く、共通して $\beta$ シート構造に転化し折り重なった構造をとることである。タンパク質は多種多様な天然構造を示すが、すべてが共通の線維構造をとることは驚くべき事実である。従って、タンパク質の詳細なアミロイド線維形成メカニズムの解明は学術的にも重要な課題である。そこで、これまでの研究に

において極めて強い変性状態での構造（変性構造）に着目し、ニワトリリゾチームをモデルタンパク質としてアミロイド形成機構の解析を行ってきた。リゾチームはアミロイド研究に広く用いられているが、一方でNMRによる緩和解析から変性状態（4つのSS結合を還元し一本鎖にしたリゾチームのpH2.0の8M尿素条件下）で6つの疎水クラスターの形成が見つかった。さらに当研究室において3番目のクラスター内の1ポイント変異であるW62Gによりすべてのクラスターが崩壊することをNMR解析により明らかにした（Science, 2002, 295, 1719-22）。これは、タンパク質は極めて強い変性条件下でも離れたアミノ酸同士での相互作用を含んだ構造をとりうるという事を初めて明らかにした例である。さらに他の箇所の1ポイント変異が、変性構造の部分的に形成されたいくつかのバリエーションをもたらすことをNMR解析で明らかにした（Angew. Chem. Int. Ed. Engl, 2004, 43, 5780-5.）。アミロイド形成が変性構造に深く関与しているのであれば、これらの変異は少なからずリゾチームのアミロイド線維形成が影響すると考え、変性構造が異なる変異体を用いてアミロイド解析をおこなった。その結果、変性構造の相違がアミロイド形成に影響を及ぼし、程度の異なるアミロイド線維が形成され、さらにアミロイド形成に対し抑制的に働く領域の存在が示唆された（Pro. Sci, 2006, 15, 2448-52.）。以上の結果は、アミロイド形成は天然構造からの構造変化ではなく、1本のアミノ酸鎖までほどけたランダムに近い状態での構造変化が関与していることを示唆した。タンパク質の局所的な構造の変性や中間的な変性状態での関与は示唆されているが、変性構造に着目した報告はほとんど無く、アミロイド形成メカニズム解明の新しい切り口と言える。

## 2. 研究の目的

本研究では、リゾチームの研究結果で得た概念が、アミロイド疾患の原因タンパク質にも適応できるのか調べることを目的とした。免疫グロブリン性（AL）アミロイドーシスの原因タンパク質である免疫グロブリンL鎖可変領域ドメイン（VL）をターゲットとし、NMRによる物理学的手法から、その変性状態での動的構造を明らかにし、その構造とアミロイド線維形成の関連性を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) VLの大腸菌からの調製

3種のVL；野生型（WT）、Wil、Jtoについて、各遺伝子を大腸菌発現ベクターpET22bに組み込み大腸菌BL21株によりそれぞれ大量発現させた。集菌後ソニケーションにより菌体破碎し、上清画分を陰イオン交換カラムにかけ、素通り画分を陽イオン交換カラムに吸着させ塩濃度勾配により溶出させ目的の蛋白質を単離精製した。NMR解析の為に3種のVLの<sup>15</sup>N標識体及び<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N標識体を、最小栄養培地（<sup>15</sup>N源として<sup>15</sup>N-塩化アンモニウム、<sup>13</sup>C源として<sup>13</sup>Cグルコース）を用いて同様に培養し、それぞれ調製した。3種のVLの還元アルキル化体の調製は、8M尿素溶液存在下で還元後ヨードアセトアミドによりSH基をカルボキシアミドメチル化した。

### (2) VLのNMR解析

<sup>1</sup>H<sup>15</sup>N-HSQCスペクトルは、<sup>15</sup>N標識体について0.1mM蛋白質濃度、塩酸水溶液pH2、20℃で測定した。HSQCスペクトルの帰属は、<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N標識体を0.5mM蛋白質濃度で3D-NMR測定を行い、HNC0、HN(CA)CO、HN(CO)CA、HNCA、CBCA(CO)NH、HNCACBの6つのスペクトルを用い、H(CCO)NHと<sup>15</sup>N Tocsyを補助的に利用して行った。

### (3) アミロイド線維化実験

pH2 あるいは pH7.5 の条件にて蛋白質を 37°C でインキュベーションし、蛋白質溶液を 50mM リン酸緩衝液 pH7.5 で希釈し最終濃度が 20 $\mu$ M となるようチオフラビン T を加えた。その後、蛍光光度計 (Hitachi, F-2000) により 450nm 励起での 485nm の蛍光波長を測定し、アミロイド線維形成を評価した。また、アミロイド線維について電子顕微鏡 (JEOL, JEM-100CX) を用いて観測した。

## 4. 研究成果

### (1) VL の NMR 解析

AL アミロイドーシスの報告されている多くが  $\lambda$ 6 タイプの L 鎖可変部配列に属している。それらの中の Wil 及び Jto と呼ばれる  $\lambda$ 6 タイプの VL と元である  $\lambda$ 6 鎖の生殖細胞の染色体上での L 鎖可変部配列 WT の 3 種について遺伝子合成を行い、大腸菌による発現系を構築し調製した。それらの配列は非常に類似性が高い。調製した 3 種の VL についての変性状態での構造を調べる為、種々の pH の条件における蛋白質の 2 次構造解析を行った。その結果、pH2 の条件でいずれもランダムな 2 次構造を示すことが分かった。

2 次構造が変性している pH2 での NMR 解析を行った。3 種の VL について 3 次元 NMR 解析から  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトルの帰属に成功した (Fig. 1)。そして、pH2 における動的構造を解析するため、NMR による緩和時間の解析を行った。その結果を Fig. 2 に示す。完全なランダムであれば縦軸の緩和時間は一定であるが、3 種の VL は特定の領域に緩和時間のピーク増加が見られ何らかのクラスターを形成していることが分かった。この特定の領域にはいくつかの疎水性アミノ酸とシステイン残基が含まれていた。3 種の VL はいずれも SS 結合を 1 つ持っており、C23 と C88 が結合

している。そこで SS 結合の影響を調べるため、3 種の VL の還元アルキル化体を調製し同様に NMR 解析を行った。その結果、3 種の VL ともにピークが減少した。この結果から SS 結合が変性構造に大きく寄与している事が分かった。また、3 種間で比較すると Wil は WT 及び Jto に比べピークが低く、還元アルキル体でも 2 種よりも低くなっていた。即ち、Wil は異なる変性構造を取ることが分かった。

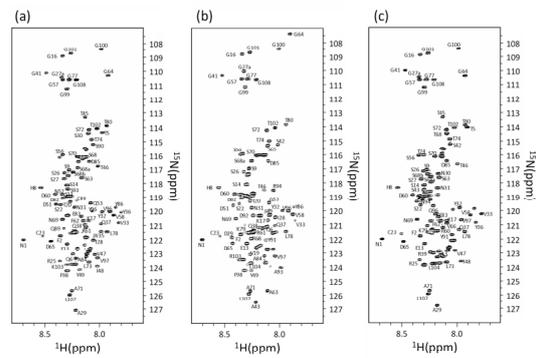


Fig.1  $^1\text{H}^{15}\text{N}$  HSQC spectra of L-chain domains. WT (a), Jto (b), and Wil (c) obtained in HCl, pH 2, in 95%  $\text{H}_2\text{O}/5\%$   $\text{D}_2\text{O}$  at 37 °C. Assignments are indicated in the figure.

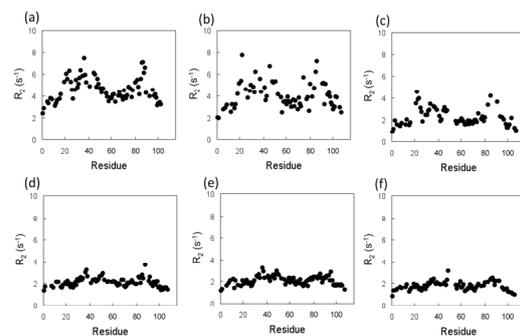


Fig.2 Residue-specific R2 rates. WT (a), Jto (b), Wil (c), S-S reduced and alkylated WT(d), S-S reduced and alkylated Jto (e), S-S reduced and alkylated Wil (f) at pH 2 and 37 °C.

### (2) アミロイド線維化実験

3 種の VL について、pH2 の条件でアミロイド線維形成実験を行った。アミロイド線維に特異的に結合するチオフラビン T を用いて、その結合による 485nm の蛍光強度の増加によって調べた (Fig. 3a)。その結果、Wil は WT 及び Jto に比べ線維化が遅い事が分かった。

さらに、還元アルキル体についても調べた結果、いずれも線維化が遅くなった (Fig. 3b)。

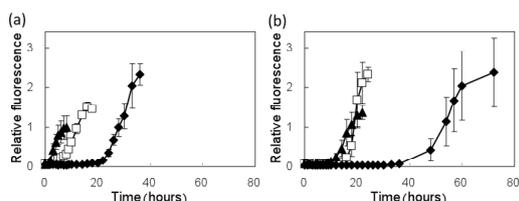


Fig.3 Amyloid fibril formation at pH 2 and 37 °C. (a) Non-reduced WT (▲), Jto (□), and Wil (◆); (b) S-S reduced and alkylated WT (▲), Jto (□), and Wil (◆). Fibril formation was monitored by Thioflavin T emission at 485 nm upon excitation at 450 nm.

これらの結果は、NMR 解析によって明らかにした変性構造の程度と相関していた。線維のアミロイド線維が形成される速度が変性構造の程度に相関した。また、pH2 で形成されたアミロイド線維について電子顕微鏡観察を行った (Fig. 4)。その結果、Wil は WT 及び Jto に比べ短く曲がった形をしていた。以上の事から、VL のアミロイド線維形成は、変性構造の違いにより異なることが分かった。リゾチームにおいて得られた結果が、アミロイド原因蛋白質の VL でも同様に見られた。

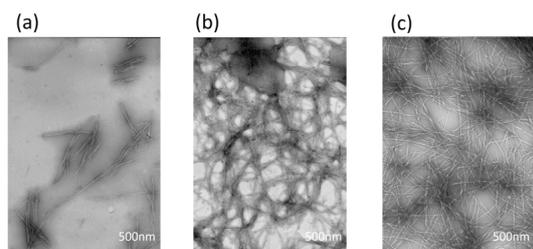


Fig.4 Electron micrographs of fibrils. WT (a), Jto (b), and Wil (c) at pH 2 and 37 °C. Scale bars represent 500 nm.

### (3) Wil へのアミノ酸変異によるアミロイド線維形成への影響

pH2 において Wil は他よりも変性構造の程度が低く、pH2 でのアミロイド線維化は遅いものであった。興味深いことに、Wil、Jto、WT では生理条件下では Wil が線維化されやすく、Jto、WT は線維化がほとんど起こらない。変性構造では 3 者ともに 3 つのクラスターが存

在していた。クラスター内のアミノ酸配列を比較すると、ほとんど同じであるが、Jto、WT の Q34、Q53、S93 が Wil では His 残基であった。そこで、Wil の H34Q/H53Q/H93S 変異体 (3Hmut. Wil) を作製しそのアミロイド線維形成実験を行った。その結果、生理条件下での線維化は 3Hmut. Wil では抑えられた (Fig. 5)。以上の事から、変性構造を元に考慮したアミノ酸変異で、アミロイド線維化を阻害することに成功した。即ち、蛋白質のアミロイド線維形成はその変性構造が重要であり、変性構造をターゲットとして阻害する方法が有効であると考えられる。

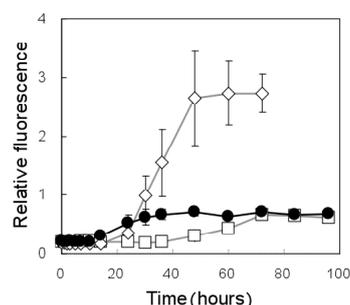


Fig.5 Amyloid fibril formation at pH7.5 and 37 °C. Wil (◇), Jto (□), and 3Hmut.Wil (●). Fibril formation was monitored by Thioflavin T emission at 485 nm upon excitation at 450 nm.

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

① The involvement of the residual structure containing long-range interactions on the denatured state of a protein in the amyloid fibrils formation. Takatoshi Ohkuri, Tomonori Mishima, Akira Monji, Taiji Imoto, Tadashi Ueda. 第 2 回環太平洋蛋白質科学国際会議 (PRICPS), 2008 年 6 月, Cairns.

② 変性条件下における抗体  $\lambda$  6 鎖の残存構造がアミロイド線維形成に及ぼす影響. 三島朋徳、大栗誉敏、門司晃、阿部 義人、植田正. 第 46 回日本生物物理学会, 2008 年 12 月, 福岡.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大栗 誉敏 (OHKURI TAKATOSHI)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号: 70346807