

## 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 6月 1日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590046

研究課題名（和文） 脂質異常症の分子基盤としてのアポリポタンパク質構造異常の解析

研究課題名（英文） Structural basis of dysfunctional apolipoprotein-induced dyslipidemia

研究代表者

齋藤 博幸 (SAITO HIROYUKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60300919

研究成果の概要（和文）：血中や脳内での細胞外脂質輸送を制御しているアポリポタンパク質の遺伝子変異や多型は、脂質異常症やアミロイドーシスなどの疾患発症を引き起こす。その構造的機序解明を目的として、ヘリックス型アポリポタンパク質であるアポ A-I 及びアポ E 変異体の高次構造、安定性、脂質結合性並びにタンパク質凝集性などを調査した結果、変異による N 末ヘリックスバンドル並びに C 末ヘリックス構造の破壊が疾患発症の構造的基盤であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To probe the structural effects of naturally occurring mutations of apolipoproteins that lead to hypolipoproteinemia and systemic amyloidosis, we examined the tertiary structure, stability, lipid-binding property, and aggregation propensity of apolipoprotein A-I and E variants. The results indicate that the disruption of the N-terminal helix bundle and the C-terminal helical structure in apolipoproteins caused by the mutations leads to the critical outcomes of diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：脂質異常症、アミロイドーシス、リポタンパク質、アポリポタンパク質、フォールディング構造異常

## 1. 研究開始当初の背景

アポリポタンパク質は、細胞外脂質輸送システムである血漿リポタンパク質代謝を制御しているタンパク質群であるが、それらの遺伝子変異や多型による疾患発症機序として、アミノ酸変異によるタンパク質のフォールディング構造変化との関連が指摘されている。例えば、高密度リポタンパク質（HDL）の主要構成タンパク質としてその抗動脈硬化作用を担うアポ A-I では、遺伝的なアミノ

酸変異や欠失が、低 HDL 血症にみられる顕著な脂質代謝異常やアミロイド線維化による全身性アミロイドーシスなどの重篤な疾患を引き起こすことが知られている。また、アルツハイマー病発症危険因子として知られるアポ E4 (C112R) は、野生型であるアポ E3 の 112 番目のシステインがアルギニンに置換された多型の一つであるが、その不安定なフォールディング構造が、リソソーム膜破壊作用やフラグメント化による神経細胞毒性発

現、さらには脳内 HDL コレステロール代謝調節異常などの原因であると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究は、血中や中枢神経系でのコレステロール代謝平衡を調節しているヘリックス型アポリポタンパク質であるアポ A-I やアポ E について、それらの遺伝子変異や多型が原因で引き起こされる脂質代謝恒常性の破綻と、それによる脂質異常症やアルツハイマー病などの重篤な疾患発症の分子メカニズムを、アポリポタンパク質の脂質非結合-結合型構造間の動的コンフォメーション平衡の解析、並びに変異による高次構造変化と機能異常との相関解析という物理化学的側面からの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

遺伝性低 HDL 血症やアミロイドーシス、アルツハイマー病の原因となる変異アポリポタンパク質をターゲットとして、遺伝子工学による変異の導入と大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いた大量発現系による変異体の作製、並びに Fmoc 固相合成法による機能部位フラグメントペプチドの作製を行った。

得られたタンパク質やペプチドについて、円偏光二色性、赤外分光、定常光・時間分解ナノ秒蛍光測定などの主に分光学的手法を併用することで、変異によるドメイン構造や脂質非結合-結合型間の動的平衡構造の変化を解析した。

変異体の HDL 形成能の評価としては、人工細胞脂質膜に対する結合・可溶性特性や、培養細胞からのコレステロール搬出作用などを行い、変異による高次構造変化と脂質輸送機能異常との相関を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 低 HDL 血症でみられるヒトアポ A-I 変異体のなかで、N 末と C 末ドメインにそれぞれ変異のある apoA-I Milano (R173C) と apoA-I Nichinan ( $\Delta$ E235) をターゲットとした。変異による N 末ヘリックスバンドル構造の安定性や C 末ドメインヘリックス構造の変化、さらには、それらの構造変化による細胞脂質膜可溶化・HDL 粒子形成作用への影響の解析を行った結果、

① N 末ドメインアミノ酸の変異・欠失によるアポ A-I のヘリックスバンドル構造の不安定化が、タンパク質疎水性領域の露出を誘起することで脂質膜との相互作用を促進する

② C 末ヘリックス領域アミノ酸の変異・欠失は、C 末端ヘリックス構造の部分的破壊による脂質結合性・細胞膜可溶性の低下を引き起こすことで、HDL 粒子形成異常の原因となる

③ アポ A-I の種差間のホモロジー解析に基づいた部位特異的アミノ酸改変により、ヒト

の C 末端に多く存在する芳香族アミノ酸は、両親媒性ヘリックス疎水面の疎水性度の増大によって C 末ドメインの高親和性脂質結合を担うとともに、N 末-C 末ドメイン間の疎水的相互作用に関与している可能性があることなどが明らかとなった。

(2) 血中や脳内でのコレステロール代謝調節異常を引き起こすアポ E4 アイソフォームをターゲットとして、野生型であるアポ E3 との脂質結合構造の差異の検出を行う目的で、

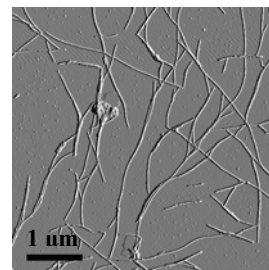
① アポ E タンパク内への環境感受性蛍光プローブであるピレンやアクリロダン分子を導入するため、新たな変異体の設計を行った。アポ E の N 末と C 末ドメインにおける標識位置として、94 番目のセリンと 264 番目のトリプトファン、290 番目のセリン残基を選択し、それぞれをシステイン残基に置換した変異体を作製したところ、いずれの変異によってもアポ E 構造に大きな摂動を与えていないことが確認された。

② 上記で設計した蛍光標識アポ E 分子を用いた脂質結合に伴うピレン蛍光強度変化のリアルタイム解析や、分子内トリプトファン残基-アクリロダン分子間の蛍光共鳴エネルギー移動測定などから、人工脂質粒子や HDL 粒子に対するアポ E の結合挙動の解析を行った。その結果、HDL 粒子結合に伴うアポ E の N 末ドメインコンフォメーション変化がアポ E アイソフォーム間で異なることが示され、HDL 代謝調節挙動との関連が示唆された。

(3) 全身性アミロイドーシスの原因となるヒト変異アポ A-I として Iowa (G26R) を取り上げ、そのフォールディング構造とアミロイド線維形成性との相関を解析することで、アポリポタンパク質構造異常によるアミロイドーシス発症の分子メカニズム解明を試みた。

G26R 変異体の全長タンパクや組織沈着領域である N 末フラグメントを大腸菌発現系によって作製し、それらのアミロイド線維形成能や線維形態の評価を行った。その結果、G26R 変異がアポ A-I ヘリックスバンドル構造を不安定化するとともに、N 末

1-83 残基フラグメントの生理的中性環境下でのアミロイド線維化を促進するという二元的な役割を有していることを世界で初めて見出した (発表論文 4)。また、構造モデル予測により、R26 が D24 及び D28 との



アポ A-I アミロイド線維の原子間力顕微鏡像

環境下でのアミロイド線維化を促進するという二元的な役割を有していることを世界で初めて見出した (発表論文 4)。また、構造モデル予測により、R26 が D24 及び D28 との

塩橋形成によって $\beta$ シート構造を安定化していることが示唆された。

今後の展開として、生体環境を模倣した不均一膜系や細胞外マトリックスでのアポ A-I アミロイド線維形成機構の物理化学的解析、細胞膜やリポタンパク質環境下におけるアポ A-I アミロイドのタンパク質超分子構造や線維凝集体の組織障害作用の解析などを進めていく予定である。

#### 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 15 件)

1. Takechi, Y., Saito, H., and Okamura, E. Slow Tumbling but Large Protrusion of Phospholipids in the Cell Sized Giant Vesicle. *Chem. Phys. Lett.* 査読有, 570, 136-140 (2013)  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2013.03.048>
2. Nguyen, D., Nickel, M., Mizuguchi, C., Saito, H., Lund-Katz, S., and Phillips, M. C. Interactions of Apolipoprotein A-I with High Density Lipoprotein Particles. *Biochemistry* 査読有, 52(11), 1963-1972 (2013)  
DOI: 10.1021/bi400032y
3. Tanaka, M., Takamura, Y., Kawakami, T., Aimoto, S., Saito, H., and Mukai, T. Effect of Amino Acid Distribution of Amphipathic Helical Peptide Derived from Human Apolipoprotein A-I on Membrane Curvature Sensing. *FEBS Lett.* 査読有, 587(5), 510-515 (2013)  
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.026
4. Adachi, E., Nakajima, H., Mizuguchi, C., Dhanasekaran, P., Kawashima, H., Nagao, K., Akaji, K., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Saito, H. Dual Role of an N-terminal Amyloidogenic Mutation in Apolipoprotein A-I: Destabilization of Helix Bundle and Enhancement of Fibril Formation. *J. Biol. Chem.* 査読有, 288(4), 2848-2856 (2013)  
DOI: 10.1074/jbc.M112.428052
5. Chetty, P. S., Ohshiro, M., Saito, H., Dhanasekaran, P., Lund-Katz, S., Mayne, L., Englander, W., and Phillips, M. C. Effects of the Iowa and Milano Mutations on Apolipoprotein A-I Structure and Dynamics Determined by Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry. *Biochemistry* 査読有, 51(44), 8993-9001 (2012)  
DOI: 10.1021/bi300926j
6. Takechi, Y., Mizuguchi, C., Tanaka, M., Kawakami, T., Aimoto, S., Okamura, E., and Saito, H. Physicochemical Mechanism for the Lipid Membrane Binding of Polyarginine: the Favorable Enthalpy Change with Structural Transition from Random Coil to  $\alpha$ -Helix. *Chem. Lett.* 査読有, 41(10), 1374-1376 (2012)  
DOI: 10.1246/cl.2012.1374
7. Mizuguchi, C., Hata, M., Dhanasekaran, P., Nickel, M., Phillips, M. C., Lund-Katz, S., and Saito, H. Fluorescence Analysis of the Lipid Binding-induced Conformational Change of Apolipoprotein E4. *Biochemistry* 査読有, 51(28), 5580-5588 (2012)  
DOI: 10.1021/bi300672s
8. Lysenko, N. N., Hata, M., Dhanasekaran, P., Nickel, M., Chetty, P. S., Saito, H., Lund-Katz S., and Phillips, M. C. Influence of C-Terminal  $\alpha$ -Helix Hydrophobicity and Aromatic Amino Acid Content on Apolipoprotein A-I Functionality. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* 査読有, 1821(3), 456-463 (2012)  
DOI: 10.1016/j.bbalip.2011.07.020
9. Takechi, Y., Tanaka, H., Kitayama, H., Yoshii, H., Tanaka, M., and Saito, H. Comparative Study on the Interaction of Cell-Penetrating Polycationic Polymers with Lipid Membranes. *Chem. Phys. Lipids* 査読有, 165(1), 51-58 (2012)  
DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2011.11.002
10. Egashira, M., Takase, H., Yamamoto, I., Tanaka, M., and Saito, H. Identification of Regions Responsible for Heparin-Induced Amyloidogenesis of Human Serum Amyloid A Using Its Fragment Peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* 査読有, 511(1-2), 101-106 (2011)  
DOI: 10.1016/j.abb.2011.04.019
11. Takechi, Y., Yoshii, H., Tanaka, M., Kawakami, T., Aimoto, S., and Saito, H. Physicochemical Mechanism for the Enhanced Ability of Lipid Membrane Penetration of Polyarginine. *Langmuir* 査読有, 27(11), 7099-7107 (2011)  
DOI: 10.1021/la200917y
12. Tanaka, M., Dhanasekaran, P., Nguyen, D., Nickel, M., Takechi, Y., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Saito, H. Influence of N-Terminal Helix Bundle Stability on the Lipid-Binding Properties of Human Apolipoprotein A-I. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* 査読有, 1811(1), 25-30 (2011)  
DOI: 10.1016/j.bbalip.2010.10.003
13. Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Nickel, M., Nakatani, R., Saito, H., Phillips, M. C., and Lund-Katz, S. Molecular Basis for the

Differences in Lipid and Lipoprotein Binding Properties of Human Apolipoproteins E3 and E4. *Biochemistry* 査読有, 49(51), 10881-10889 (2010)  
DOI: 10.1021/bi1017655

14. Kono, M., Tanaka, T., Tanaka, M., Vedhachalam, C., Chetty, P. S., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Saito, H. Disruption of the C-terminal Helix by Single Amino Acid Deletion is Directly Responsible for Impaired Cholesterol Efflux Ability of Apolipoprotein A-I Nichinan. *J. Lipid Res.* 査読有, 51(4), 809-818 (2010)  
DOI: 10.1194/jlr.M002113
15. Lund-Katz, S., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Kono, M., Nickel, M., Saito, H., and Phillips, M. C. Surface Plasmon Resonance Analysis of the Mechanism of Binding of ApoA-I to High Density Lipoprotein Particles. *J. Lipid Res.* 査読有, 51(3), 606-617 (2010)  
DOI: 10.1194/jlr.M002055

[学会発表] (計 29 件)

1. Takechi, Y., Yoshii, H., Tanaka, M., Kawakami, T., Aimoto, S., Okamura, E., Saito, H. Physicochemical Mechanism for the Enhanced Ability of Lipid Membrane Penetration of Polyarginine. International Association of Colloid and Interface Scientists 2012, 2012.5.13-5.18 (仙台国際センター, 宮城県)
2. Lund-Katz, S., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Nickel, M., Hata, M., Saito, H., Phillips, M. C. Interactions of apoA-I with HDL particles. XVI International Symposium on Atherosclerosis HDL Satellite Meeting, 2012.3.30-4.1 (Hilton Cairns, Cairns, Australia)
3. Chetty, P. S., Takase, H., Saito, H., Lund-Katz, S., Mayne, L., Englander, W., Phillips, M. C. Amide hydrogen-deuterium exchange as a tool to probe the effects of point-mutations on apolipoprotein A-I structure-function. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2011, 2011.4.28-30, (Hilton Chicago, Chicago, USA)
4. Tanaka, M., Takamura, Y., Kawakami, T., Aimoto, S., Saito, H. Effect of amino acid residues on membrane curvature sensing of amphipathic helix in human apolipoprotein A-I. 5th International Peptide Symposium, 2010.12.4-9, (京都国際会議場, 京都府)
5. Lund-Katz, S., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Kono, M., Nickel, M., Saito, H., Phillips, M. C. Interactions of apolipoprotein A-I with

spherical HDL particles. 6<sup>th</sup> IAS-sponsored Workshop on HDL. 2010.5.17-20, (Westin Whistler, Whistler, Canada)

6. 中嶋 宏之、アミロイドーシス変異アポA-Iの線維形成と細胞増殖抑制作用、日本薬学会第133年会、2013.3.29、パシフィコ横浜 (神奈川県)
7. 武知 佑樹、細胞サイズベシクルの高濃度調製と溶液NMRによる物性解析、第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012.11.16、京都大学 (京都府)
8. 長尾 耕治郎、HDL形成過程におけるABCA1トランスポーターとapoA-Iの結合機構の解析、第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012.11.16、京都大学 (京都府)
9. 長尾 耕治郎、ABCA1とapoA-Iの結合機構の解析、膜シンポジウム2012、2012.11.7、神戸大学 (兵庫県)
10. 武知 佑樹、溶液NMRを用いた細胞サイズベシクルの評価、膜シンポジウム2012、2012.11.6、神戸大学 (兵庫県)
11. 足立 愛美、脂質結合タンパク質アポA-IのG26R変異によるアミロイド線維形成、膜シンポジウム2012、2012.11.6、神戸大学 (兵庫県)
12. 馬場 照彦、Membrane disc formation from tetraether-type artificial phospholipids and apolipoproteins, 第50回日本生物物理学会年会、2012.9.22、名古屋大学 (愛知県)
13. 馬場 照彦、部分フッ素化リン脂質と脂質親和性タンパク質からの膜ディスク形成、日本膜学会第34年会、2012.5.8、早稲田大学 (東京都)
14. 足立 愛美、ApoA-I Iowa (G26R) 変異によるアミロイド線維形成、日本膜学会第34年会、2012.5.8、早稲田大学 (東京都)
15. 高瀬 ひろか、ヒト血清アミロイドA(SAA)の中間領域の線維形成能評価、日本薬学会第132年会、2012.3.30、北海道大学 (北海道)
16. 馬場 照彦、分枝鎖人工リン脂質とアポリポタンパク質A-Iからの膜ディスク形成、日本化学会第92春季年会、2012.3.27、慶應義塾大学 (神奈川県)
17. 中谷 亮介、環境感受性蛍光プローブ標識によるアポEコンフォメーション変化の解析、第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2011.11.24、岡山大学 (岡山県)
18. 足立 愛美、アポA-Iアミロイドーシス変異体の物性とアミロイド形成の評価、第50回日本薬学会中国四国支部学術大会、2011.11.12、サンポート高松 (香川県)
19. 高瀬 ひろか、硫酸化度の異なるグリコサミノグリカンがヒト血清アミロイドAの線維形成に与える影響、第61回日本薬学

- 会近畿支部大会、2011. 10. 22、神戸学院大学（兵庫県）
20. 高瀬 ひろか、グリコサミノグリカンによるヒト血清アミロイド A の線維形成部位の検討、第 84 回日本生化学大会、2011. 9. 22、京都国際会議場（京都府）
  21. 馬場 照彦、テトラエーテル型リン脂質類縁体の膜特性と脂質親和性タンパク質との複合体形成、日本膜学会第 33 年会、2011. 5. 12、産総研臨海副都心センター（東京都）
  22. 田中 将史、両親媒性ペプチドの膜曲率認識におけるアミノ酸置換の影響、日本膜学会第 33 年会、2011. 5. 12、産総研臨海副都心センター（東京都）
  23. 武知 佑樹、膜透過性アルギニンポリペプチドと酸性リン脂質膜の相互作用、日本膜学会第 33 年会、2011. 5. 12、産総研臨海副都心センター（東京都）
  24. 田中 将史、膜曲率センサーとして働くアポ A-I の構造要件の検討、日本薬学会第 131 年会、2011. 3. 30、グランシップ静岡（静岡県）
  25. 馬場 照彦、安定膜形成性人工リン脂質とアポリポタンパク質 A-I からの膜ディスク形成とその安定性、日本化学会第 91 春季年会、2011. 3. 28、神奈川大学（神奈川県）
  26. 武知 佑樹、細胞膜透過ペプチドの物理的膜透過メカニズム解明に向けたアルギニンポリペプチド-脂質二分子膜間相互作用の解析、第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2010. 11. 29、富山国際会議場（富山県）
  27. 植野 哲、疎水性アミノ酸残基を持つカチオン性コポリペプチドと脂質二分子膜との相互作用、膜シンポジウム 2010、2010. 11. 19、京都大学（京都府）
  28. 河野 百恵、ApoA-I Nichinan ( $\Delta E235$ ) 変異による HDL 粒子形成異常のメカニズム、日本膜学会第 32 年会、2010. 5. 14、産総研臨海副都心センター（東京都）
  29. 江頭 昌志、フラグメントペプチドを用いた血清アミロイド A 蛋白 (SAA) アミロイド化部位の探索、日本膜学会第 32 年会、2010. 5. 14、産総研臨海副都心センター（東京都）

[図書] (計 1 件)

1. 斎藤 博幸、他、製剤への物理化学 第 2 版、2012、302、廣川書店

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

斎藤 博幸 (SAITO HIROYUKI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60300919

### (2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

田中 将史 (TANAKA MASAFUMI)  
神戸薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：40411904