

## 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10日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22590540
研究課題名（和文）	トランスサイレチン起因アミロイド凝集形成機序としてのラジカル反応の分子機構解明
研究課題名（英文）	Investigation of the molecular mechanism of the radical reaction to induce the amyloid fibril derived from the transthyretin
研究代表者	
中西 豊文 (Nakanishi Toyofumi)	
大阪医科大学・医学部・准教授	
研究者番号：	10247843

## 研究成果の概要（和文）：

TTR標品と自家合成したシステイン-S-スルホン酸を弱アルカリ性下にて共存させ凝集体誘導化反応を惹起させ、*in vitro*異常修飾TTR分子をSDS-PAGEにて分離/PVDF膜転写/抗TTR抗体（4種類：FL-147；C-20；N-19；C-15）/ECL検出し、単量体および2～4量体の分子量に相当するTTRバンドと、それ以外に複数の抗TTR抗体と反応する陽性バンドを見出した。この事実は、DTT存在下においてもTTR多量体などが存在し、更にそれら分子は、抗TTR抗体が認識する構造を有する事を示唆する。この事は、本異常修飾TTR分子が還元剤抵抗性を有し、かつTTR類似構造を持つ事を意味する。FAP/SSA患者血清解析およびTTR標品を用いた予備実験を踏まえ、我々が*in vitro*実験で得られたアミロイド原性を有する種々の翻訳後修飾TTRなどの分子プロフィールを明らかにし、アミロイド原性獲得やその生成/阻止機序など我々の仮説を分子レベルで立証した。更に、上記TTRプロフィールをFTMSにて詳細に明らかにし、アミロイド線維化の重要な第一反応が「S-sulfonation化」であり、その反応によって誘導されたデヒドロアミノ酸( $\alpha$ -acryl amino acid)がランダムポリマー形成→アミロイド線維化に重要な役割を果たしていることを明らかにし、結果を公表した(Amyloids: Composition, Functions and Pathology. NOVA Publisher2012)。

このアミロイド線維化形成に重要な第一反応であるラジカル生成反応を追跡するため、ESR(JEOL社製)による活性酸素種の解析を試みた。標品による活性酸素種の時間毎の追跡は可能である事が判ったが、本反応は非常に短時間に進行する反応であり、実際の試料を用いた解析には高感度の工夫が必要と考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Senile systemic amyloidosis and familial amyloid polyneuropathy are caused by oxidative deposition of conformationally altered transthyretin (TTR). We identified oxidative modification of the 10th cysteine of TTR through S-sulfonation *in vitro*. Based on mass spectrometric analysis, we determined the spectrophotometric, western blotting, and fluorescent microscopic properties of TTR incubated with and without cysteine-S-sulfonate in acidic (pH 4) and alkaline (pH 8) conditions at 37 degrees. The absorption of the aggregated TTR molecules increased more with incubation time and the concentration of cysteine-S-sulfonate at pH 4 than at pH 8. The Congo red binding to the S-sulfonated TTR at pH 4 was saturated with an apparent Bmax of 2.01 mol per mole of the S-sulfonated TTR and apparent KD of  $7.75 \times 10^{-6}$  M. On the other hand, the Bmax of cysteinyl TTR was 1.38, and its KD was  $3.52 \times 10^{-6}$  M while the Bmax of reduced TTR was 0.86, and its KD was  $2.86 \times 10^{-6}$  M. Moreover, we detected positive amyloid fibril staining using Thioflavin T and Congo red with the S-sulfonated TTR but not with untreated or reduced TTR by microscopic fluorescent analysis. After modification of TTR *in vitro*, oligomers resisted reduction and denaturation was irreversibly induced, and which contributed differences in the Western blotting patterns obtained with four anti-TTR antibodies. In conclusion, this

study showed that the formation of S-sulfonation of TTR through oxidative modifications of the thiol residue on the 10th cysteine of TTR is an important trigger step in the formation of transthyretin-related amyloid fibril.

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	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 境界医学・病態検査学

キーワード： (1)アミロイド (2)ラジカル反応 (3)質量イメージング (4)凝集体形成

### 1. 研究開始当初の背景

TTR は遺伝性 (FAP) / 老人性アミロイドーシス (SSA) の起因タンパク質であり、アミノ酸変異によって 4 量体構造が崩れ、単量体となりアミロイド凝集形成を誘導し発症する事が明らかになった。また、高次構造の安定化に寄与し *in vitro* アミロイド化阻止作用を有する低分子化合物

(NS.Green et.al.,2005、Y.Sekijima et.al.,2006) などが見出され、薬物療法として国際的治験がスタートするなど、変異 TTR の高次構造の“安定化”を焦点にした研究が展開されている。しかし、SSA においては TTR 分子のアミノ酸変異は認められず、その発症機序についても未だ不明な点が多いのが現状である。我が国は世界各国に比較して急速に超高齢化社会に移行しつつある現状を考えると、社会生活・医療現場での予想を超えた混乱・弊害に直面することが予想される。そういう社会情勢からも老人特有の難治性/原因不明疾患=アミロイドーシスを始めとする老人性痴呆症の発症機序の解明・その治療法/予防薬の開発が切望される。

我々は、FAP/SSA 診断及び *in vitro* 研究から TTR の異常修飾構造 (=S-亜硫酸化) とアミロイド原性獲得の関連性につい

て研究を続けて来た (M.Kishikawa et al.,1999/T.Nakanshi et al., 2004/中西豊文ら,2008)。つまりアミロイド凝集体形成はラジカル反応を含む一連の反応結果と捉え、その凝集体形成の分子機構を解明しようとする今回の研究は、他のアミロイド起因タンパク質にも発展する。更に、画像解析に構造解析を融合させた最新イメージング質量分析法を用い、アミロイド組織切片を直接解析し沈着タンパク質の構造異常を解析する方法はこれまでに無く、新しい観点からアミロイド原性獲得機序や治療薬の開発に寄与する新発見が得られることが期待される。

FAP/SSA 診断を通してアミロイド原性を有する S-亜硫酸化 TTR を初めて明らかにした。そこで、TTR をモデルタンパク質とし、S-亜硫酸化誘導試薬として Cys-S-スルホン酸を合成し、TTR の酸化/B 脱離/S-亜硫酸化に続くラジカル反応によって生成した  $\alpha$  アクリルアミノ酸由来ランダム凝集体形成の分子機構を証明出来れば、TTR 分子と類似の他の高  $\beta$  シート構造を有するタンパク質のアミロイド線維化機序の解明に繋がって行くのではないかと、また、本一連反応を阻止する化合物の基本構造を明らかにすることによってアミロイ

ドーシス発症阻止薬の開発に繋がって行く可能性を有するのではと考え計画を立案した。

## 2. 研究の目的

トランスサイレチン (TTR) のアミロイド原性獲得機序として、システイン (Cys) SH 残基の亜硫酸化に着目し、S-亜硫酸化 TTR の自己凝集能・コンゴレッド染色染色能獲得等を証明した。今回、更に化学反応論的な観点から不可逆的β脱離/ラジカル反応による高反応性αアクリルアミノ酸生成→ランダム凝集体形成反応の分子機構を解明し、他のアミロイドドーシス起因タンパク質の線維化機序解明へ展開する。つまり、この一連の凝集形成反応は、TTR をはじめタンパク質のアミロイド原性獲得に共通する第一反応と考え、TTR 標品/アミロイドドーシス剖検組織等を用い、TTR 分子内に起こるラジカル反応生成物と凝集体形成の分子機構を解明し、更に他のアミロイドドーシス起因タンパク質を用いて、アミロイド凝集形成機序としての普遍性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

TTR 標品、市販正常組織を用い、*in vitro* 誘導化試薬として Cys-S-スルホン酸を共存下、実験的アミロイド凝集体形成反応を惹起させ、経時的にその反応生成体の TTR 構造解析、アミロイド染色能、電気泳動学的解析、免疫組織学的解析によって、一連のアミロイド凝集体形成の反応機序を解明する。同時に、反応生成体の異常構造 TTR 分子を PC 上で再現し、高次構造変化を明らかにする。また、FAP/SSA 患者剖検組織グアニジン抽出物を解析し、*in vitro* 誘導化実験結果との関連性を検証する。更に、実験的アミロイド組織及び FAP/SSA 組織切片を質量イメージングにて直接解析し、マスイメージング、組織

内局在及び TTR 抗体などアミロイド関連抗体による組織免疫学的解析にて研究結果を検証する。組織切片での誘導化反応は市販品を代用する事も考慮し、マスイメージングについては、研究協力者・連携研究者に委託。

## 4. 研究成果

TTR標品と自家合成したシステイン-S-スルホン酸を弱アルカリ性下にて共存させ凝集体誘導化反応を惹起させ、*in vitro*異常修飾TTR分子をSDS-PAGEにて分離/PVDF膜転写/抗TTR抗体(4種類:FL-147; C-20; N-19; C-15)/ECL検出し、単量体および2-4量体の分子量に相当するTTRバンドと、それ以外に複数の抗TTR抗体と反応する陽性バンドを見出した。この事実は、DTT存在下においてもTTR多量体などが存在し、更にそれら分子は、抗TTR抗体が認識する構造を有する事を示唆する。この事は、本異常修飾TTR分子が還元剤抵抗性を有し、かつTTR類似構造を持つ事を意味する。

FAP/SSA患者血清解析およびTTR標品を用いた予備実験を踏まえ、我々が*in vitro*実験で得られたアミロイド原性を有する種々の翻訳後修飾TTRなどの分子プロファイルを明らかにし、アミロイド原性獲得やその生成/阻止機序など我々の仮説を分子レベルで立証した。更に、上記TTRプロファイルをFTMSにて詳細に明らかにし、アミロイド線維化の重要な第一反応が「S-sulfonation化」であり、その反応によって誘導されたデヒドロアミノ酸(α-acryl amino acid)がランダムポリマー形成→アミロイド線維化に重要な役割を果たしていることを明らかにし、結果を公表した(Amyloids: Composition, Functions and Pathology. NOVA Publisher2012)。

このアミロイド線維化形成に重要な第一反応であるラジカル生成反応を追跡するため、ESR(JEOL 社製)による活性酸素種の解

析を試みた。標品による活性酸素種の時間毎の追跡は可能である事が判ったが、本反応は非常に短時間に進行する反応であり、実際の試料を用いた解析には高感度の工夫が必要と考えられた。

#### 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7件) 全て査読有り

1) 中西豊文、伊藤美奈子、上田一仁、和田晋一、藤岡重和、辻 求、田窪 孝行 新鮮凍結/ホルマリン固定パラフィン包埋 組織切片/剥離毛髪を用いた MALDI イメージング解析とその応用研究 **臨床病理** 60,125-30,2012.

2) Bouras G, Nakanishi T, Fujita Y, Tsunemi S, Takubo T, Tanigawa N. Identification of beta-tubulin as a common immunogen in gastrointestinal malignancy by mass spectrometry of colorectal cancer proteome: Implications for early disease detection. **Anal & Bioanal. Chem.** 403(7):1801-1809, 2012.

3) Hiura Y, Nakanishi T, Tanioka M, Takubo T, Moriwaki S. Identification of autoantibodies for alpha- and gamma-enolase in serum from a patient with melanoma. **Jpn Clin Med.** 2:35-41, 2011.

4) Miki A, Katagi M, Shima N, Kamata T, Tatsuno M, Nakanishi T, Tsuchihashi H, Takubo T, Suzuki K.

Imaging of methamphetamine incorporated into hair using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight imaging mass spectrometry. **Forensic Tox.** 29:111-6, 2011.

5) Miki A, Katagi M, Kamata T, Zaitzu K, Tatsuno M, Nakanishi T, Tsuchihashi H, Takubo T, Suzuki K. MALDI-TOF and MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of methamphetamine incorporated into hair. **J.Mass Spectrom.**, 46(4):411-6, 2011

6) Nakanishi T, Yoshioka M, Moriuchi K, Yamamoto D, Tsuji M, Takubo T. S-sulfonation of transthyretin is an

important trigger step in the formation of transthyretin-related amyloid fibril.

**Biochim.Biophys Acta.**

1804(4):1449-56,2010

7) Tunemi S, Nakanishi T, Fujita Y, Bouras G, Miyamoto Y, Miyamoto A, Sakai A, Noumra E, Takubo T, Tanigawa N. Proteomics-based identification of a tumor associated antigen and its corresponding autoantibody in gastric cancer. **Oncology Reports.** 23,949-56,2010.

[学会発表] (計8件)

1) 中西豊文 MS イメージングによるアミロイド症診断および薬物動態追跡の試み 第37回日本医用マススペクトル学会 (Oct.25-6,2012 名古屋)

2) 中西豊文 新規がん診断マーカーの探索~質量分析技術の臨床応用 第65回日本臨床化学会近畿支部例会 (Oct.20,2012 大阪)

3) Nakanishi T, Ito M, Nirasawa T, Ueno T, Tsuji M, Takubo T. Identification of amyloidogenic proteins in FFPE tissue sections by MALDI-imaging coupled with *on-tissue* digestion and immunohistochemical /microscopic examinations. 19<sup>th</sup> Mass Spectrometry Conference (IMSC2012) (Sep. 15-21,2012 Kyoto)

4) Kamata T, Shima N, Miki A, Zaitzu K, Katagi M, Tatsuno M, Nakanishi T, Sato T, Tsuchihashi H, Suzuki K.

Imaging hair analysis for drugs: A new perspective to investigate drug use history. 19<sup>th</sup> Mass Spectrometry Conference (IMSC2012) (Sep. 15-21,2012 Kyoto)

5) 上田一仁、中西豊文、田窪孝行 MALDI-イメージングによる臨床分析と疾患診断への応用 第52回日本臨床化学会年会 (Sep.6-8,2012 盛岡)

6) 上田一仁、中西豊文、蕨澤 崇、伊藤美奈子、田窪孝行 MALDI-イメージングによる臨床組織切片を用いた病理診断の基礎的検討 第36回日本医用マススペクトル学会 (Sep.15-16,2011 大阪)

7) Nakanishi T

The detection of disease-specific proteins in clinical samples by the soft-ionization mass spectrometry. IUPAC international Congree on Analytical Sciences 2011.(May22-26,2011, Kyoto)

8) Nakanishi T, Takaori K, C. Iacobuzio-Donahue A, Yachida S, Hruban RH, Miyamoto Y, Tanigawa N, Tabushi Y, Takubo T. Detetction of alpha-enolase and trio sephosphate isomerase in sera from patients with pancreatic cancer by autoanti bodiomics analysis. 58<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry. (Jun.25-29, 2010. Salt Lake, CO, USA)

〔図書〕(計2件)

1) Nakanishi T, Iwasaki N, Saito K, Yoshioka M, Yamamoto D, Tsuji M, Nirasawa T, Takubo T. 「A critical study of the isosteres of 10<sup>th</sup> cysteine residue of transthyretin induced with cysteine-S-sulfonate by ultra-high resolution mass spectrometry. 」 In: Amyloids: Composition, Functions and Pathology. NOVA Publisher (Irene P. Halcheck and Nancy R. Vernon) p165-176, 2012.

2) 中西豊文 『『臨床プロテオーム』個別化医療を目指す臨床バイオマーカー探索』(日本臨床プロテオーム研究会編 加藤治文、中村和行、西尾和人、西村俊秀編) 金原出版 分担：臨床材料を用いた MALDI-イメージング解析 (第8章：分子イメージングと医療) p294-298, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：毛髪中に含まれる生理活性物質の解析方法

発明者：中西豊文

権利者：大阪医科大学

種類：特許出願

番号：特願2012-198042

出願年月日：平成24年9月10日

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中西 豊文 (Nakanishi Toyofumi)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10247843

(2)研究分担者

田窪 孝行 (Takubo Takayuki)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60163359

辻 求 (Tsuji Motomu)

大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60144466

山本 大助 (Yamamoto Daisuke)

大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50240106

内藤 康秀 (Naito Yasuhide)

光産業創成大学院大学・光医療・健康分野・准教授  
研究者番号：40237186

(3)研究者協力者

蕨澤 崇 (Nirasawa Takashi)  
Bruker Daltonics 社・課長

リチャードMカプリオリ (Richard M Caprioli) バンダービルト大学・教授