

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770150

研究課題名(和文)細胞外シャペロンによる蛋白質凝集抑制機構の解明

研究課題名(英文)The inhibition mechanism of protein aggregation by extracellular chaperone

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外シャペロンによる蛋白質凝集抑制機構を明らかにするため、新規細胞外シャペロンの探索とその機能を評価した。ペントラキシンファミリーである環状5量体の血清アミロイドP成分やC反応性蛋白質は、カルシウム存在下および非存在下における数種のアミロイド線維形成を抑制した。また、血清アミロイドP成分はアミロイド線維と結合し、線維の細胞毒性を弱めた。以上の結果から、血清アミロイドP成分とC反応性蛋白質は、生体内で細胞外シャペロンとして機能し、蛋白質の凝集を抑制していることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：To reveal the inhibition mechanism of protein aggregation by extracellular chaperone, we searched for new extracellular chaperone and examined its function. Serum amyloid P component and C-reactive protein are members of the pentraxin family of cyclic pentameric protein. These proteins inhibited various amyloid fibril formations in the presence and absence of calcium. Moreover, serum amyloid P component bound to amyloid fibrils and suppressed the cytotoxicity induced by amyloid fibrils. These results suggest that serum amyloid P component and C reactive protein play an important role as new extracellular chaperones that inhibit protein aggregation in vivo.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

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

蛋白質の秩序を安定した状態に保つことは、生命活動を行う上で最も重要な事項の一つである。そのため、すべての生物は蛋白質の恒常性を維持する様々な調節機構を備えている。細胞内における蛋白質の品質管理機構については、分子レベルでその詳細が明らかにされつつある。一方、細胞外における蛋白質品質管理機構については、未だ不明な点が数多く存在する。アルツハイマー病やプリオン病、透析アミロイドーシスなどの疾患では、細胞外の蛋白質品質管理機構が正常に機能しないために、アミロイド線維などの蛋白質の異常凝集体が生体組織に沈着するのではないかと推測されている。そのため、細胞外蛋白質品質管理機構の詳細に迫ることは、これらの疾患や予防法の開発を目指す上でも重要である。

近年、主に国外で細胞外における蛋白質品質管理機構の研究が進められており、細胞外シャペロンがその一翼を担うことが示されつつある。代表的な細胞外シャペロンとして $\alpha 2$ -マクログロブリン ( $\alpha 2M$ ) やハプトグロビン、クラステリンが知られており、これらの細胞外シャペロンは炎症に関連のある急性期蛋白質に属する。3つの細胞外シャペロンはいずれも生体内でアミロイド線維に結合し共に組織内に沈着していることから、アミロイド線維との関係性が示唆されてきた。実際、細胞外シャペロンは、アミロイド線維をはじめとする数種の蛋白質の凝集を抑制することが明らかにされている。このことから、生体内では細胞外シャペロンによる蛋白質の品質管理機構が働き、細胞外シャペロンが細胞外の異常な蛋白質を認識して、アミロイド線維など蛋白質の凝集を抑制していると考えられる。しかしながら、細胞外シャペロンがどのような機構で異常蛋白質を認識し凝集を抑制しているかは不明である。

透析アミロイドーシス患者の $\beta 2$ -ミクログロブリン ( $\beta 2-m$ ) アミロイド線維沈着部位では、線維と共に $\alpha 2M$  が共存していることが示されており、血液透析患者の血清中では $\alpha 2M$  と $\beta 2-m$  の複合体形成が報告されている。申請者はこれまで、 $\alpha 2M$  の $\beta 2-m$  アミロイド線維形成に及ぼす影響を検討すると共に、 $\alpha 2M$  と $\beta 2-m$  の複合体形成に着目し、 $\alpha 2M$  が $\beta 2-m$  とどのように相互作用し複合体を形成するのか詳細に理解することで、細胞外シャペロンの異常蛋白質認識及び凝集抑制機構に迫った。その結果、蛋白質が変性し凝集しやすい環境下では、 $\alpha 2M$  は自ら変性蛋白質と相互作用するために有利な構造、つまりダイマー化し疎水性領域をより露出した構造に変化することで、疎水性相互作用により変性蛋白質との親和性を高め、 $\beta 2-m$  などの蛋白質の凝集抑制を行っているのではないかと考えられる知見を得た。しかしながら、 $\alpha 2M$  以外の細胞外シャペロンがどのような機構で異常蛋白質を認識し、凝集を抑制するのかは分かっ

ていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、細胞外シャペロンによる蛋白質品質管理機構の詳細に迫り、細胞外で蛋白質の異常凝集が起きるアミロイドーシスなどの疾患の治療・予防法開発に向けた端緒を掴むことを目的とする。具体的には、新規細胞外シャペロンの探索を行い、細胞外シャペロンによる蛋白質凝集抑制機構の包括的解明を目指す。

これまで得られた $\alpha 2M$  の研究結果を基に、申請者は新たな細胞外シャペロンの候補として、ペントラキシンファミリーであるC反応性蛋白質 (CRP) と血清アミロイドP成分 (SAP) に注目した。これらの蛋白質もまた急性期蛋白質に分類され、CRPはアルツハイマー病老人斑内での局在、SAPは古くから多くのアミロイド線維との結合が見出されており、既知細胞外シャペロンとの共通点が存在する。従って、CRPとSAPのアミロイド線維形成に及ぼす影響を検討しその機序を調べた。

### 3. 研究の方法

(1) チオフラビン T による分光蛍光定量法を用いて、CRPとSAPのアミロイド線維形成への影響を評価した。

(2) SAPのターゲットとなる蛋白質の構造状態を明らかにするために、アミロイド線維形成の各時間をサンプリングし、Dot-Blot法からSAPとの相互作用を検出した。

(3) ANS 蛍光測定により、pH 変化に対するCRPとSAPの分子表面の疎水性度を評価した。

(4) CRPとSAPをアミロイド線維溶液に添加し、ANS 蛍光変化の有無を測定した。

(5) アミロイド線維の細胞毒性に対するCRPとSAPの影響をMTTアッセイにより評価した。

### 4. 研究成果

(1) CRP、SAPはともにカルシウム依存的なリガンドとの結合が知られており、カルシウムを介してDNAや糖質と結合することで、細菌や障害された細胞成分の除去などの生理機能を果たす。また、SAPはカルシウム依存的なアミロイド線維との結合が報告されているため、まず初めにカルシウム存在下での透析アミロイドーシス関連 $\beta 2-m$  線維とアルツハイマー病関連アミロイド $\beta$ 線維の2種のアミロイド線維形成に対するCRP、SAPの効果を、チオフラビン T 蛍光分光測定法により調べた。コントロールと比較し、両蛋白質とも濃度依存的に substoichiometric にアミロイド線維形成を抑制することが明らかにな

った (図 1)。

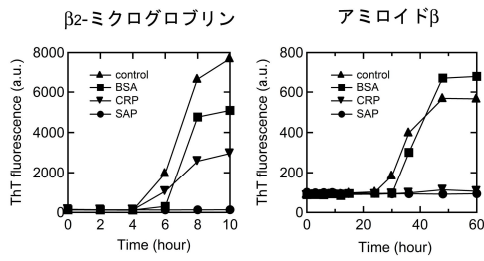


図 1 .カルシウム存在下における CRP と SAP のアミロイド線維形成抑制効果

次に、カルシウム非存在下で同様の実験を行ったところ、CRP、SAP はカルシウム非存在下でも  $\beta 2$ -m とアミロイド  $\beta$  のアミロイド線維形成を抑制した。また、  
型糖尿病関連 IAPP アミロイド線維形成においてもカルシウム非依存的な抑制効果が見られた。従って、CRP、SAP はカルシウムの有無に関わらず、数種のアミロイド線維を効果的に抑制する能力を有する (図 2)。

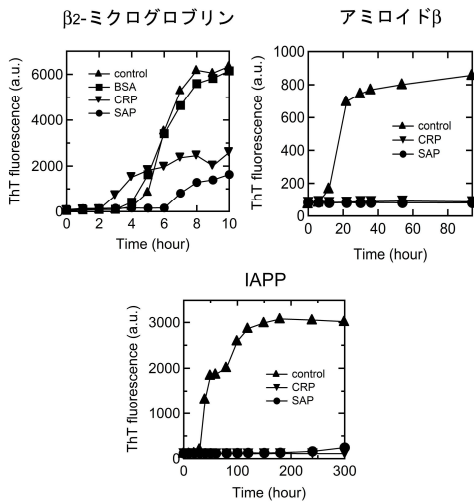


図 2 .カルシウム存在下における CRP と SAP のアミロイド線維形成抑制効果

(2)  $\beta 2$ -m モノマーからのアミロイド線維形成反応溶液の各時間をサンプリングしてニトロセルロース膜に固定し、次に SAP 溶液と反応させ、抗 SAP 抗体とケミルミネッセンスにより相互作用を検出したところ、電子顕微鏡でアミロイド線維が観察され始める 8 時間以降に SAP との相互作用が見られた (図 3)。  
この結果から、線維形成を抑制する一つの要因として、アミロイド線維と SAP の結合が関与していることが示唆される。一方、モノマーやオリゴマーと SAP との反応は今回の Dot-Blot 法では検出されなかった。

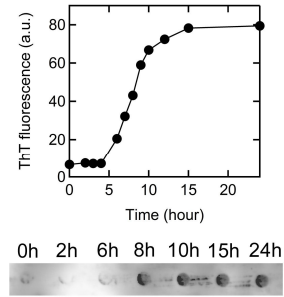


図 3 .  $\beta 2$ -m アミロイド線維形成の各時間における SAP との相互作用

(3) pH の酸性化は炎症部位で見られる。これまでの  $\alpha 2$ M の研究結果から、pH の酸性化は  $\alpha 2$ M の構造変化 (疎水性領域の露出) を引き起こし、疎水性相互作用による変性蛋白質との親和性の増加をもたらすことが示された。従って、CRP、SAP の pH 変化による疎水性領域の評価を行った。CRP と比較し、SAP は  $\alpha 2$ M と同様 pH の酸性化により ANS 蛍光が顕著に増加し、疎水性領域の露出が見られた (図 4)。

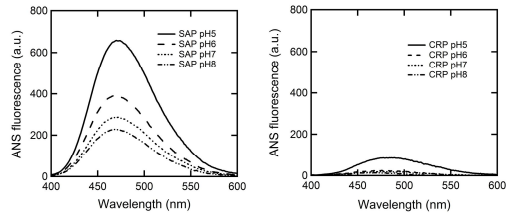


図 4 . pH の酸性化による CRP、SAP の ANS 蛍光変化

(4) CRP と SAP を  $\beta 2$ -m アミロイド線維と反応させたのち ANS 蛍光測定を行うと、SAP と  $\beta 2$ -m アミロイド線維の反応溶液中では、ANS 蛍光の減少が見られた。これは、SAP と  $\beta 2$ -m アミロイド線維の結合により、ANS 蛍光色素が結合できる疎水性領域が埋もれたことが考えられる。つまり、疎水性相互作用の関与が示唆される。(図 5)。

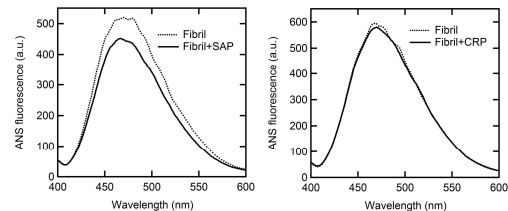


図 5 . CRP、SAP と  $\beta 2$ -m アミロイド線維の反応液中の ANS 蛍光変化

(5)β2-m アミロイド線維の細胞毒性に対する CRP と SAP の影響を MTT アッセイを用いて評価した。β2-m アミロイド線維を HeLa 細胞に投与する前に SAP と反応させると、SAP の濃度依存的にβ2-m アミロイド線維の細胞毒性効果は減弱された(図6)。CRP では細胞毒性抑制効果は見られなかった。

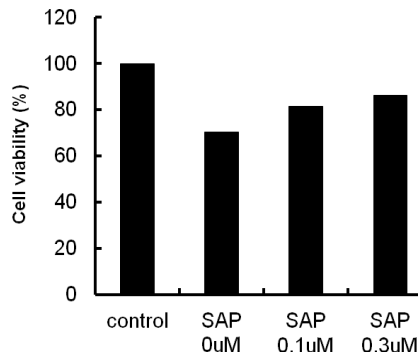


図6 β2-m アミロイド線維の細胞毒性に対する SAP の抑制効果

以上の結果より、CRP、SAP はカルシウムの有無に関わらずアミロイド線維形成を抑制することが明らかになった。これらの蛋白質は生体内で細胞外シャペロンとして蛋白質の凝集を抑制している可能性がある。特に、SAP はアミロイド線維と疎水性相互作用により結合することで、アミロイド線維形成抑制効果のみならずアミロイド線維の細胞毒性を阻害する能力も示された。SAP はα2M と共通する特徴も持つことからも有力な新規細胞外シャペロンであると考えられる。今後、さらに構造生物学的手法を駆使し、分子レベルで細胞外シャペロンの蛋白質凝集抑制機構を明らかにしていく予定である。

#### 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2件)

Hasegawa K, Ozawa D, Ookoshi T, Naiki H. Surface-bound basement membrane components accelerate amyloid-β peptide nucleation in air-free wells: an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1834(8), 1624-1631, 2013 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.04.011.

Ozawa D, Hasegawa K, Ookoshi T, Naiki H. Molecular mechanisms of β2-microglobulin amyloid fibril formation. The Proceedings of the XIIIth International Symposium on Amyloidosis 45-47, 2012 査読無

〔学会発表〕(計2件)

小澤大作・細胞外シャペロンによるアミロ

イド線維形成抑制機構の解明・臨床ストレス応答学会シンポジウム, 松本, November 15-16, 2013. (招待講演) 口頭発表

Ozawa D, Hasegawa K, Ookoshi T, Naiki H. Molecular mechanisms of β2-microglobulin amyloid fibril formation. XIIIth International Symposium on Amyloidosis, Groningen (the Netherlands), May 6-10, 2012. (一般講演) 口頭発表およびポスター発表

〔図書〕(計1件)

小澤大作 他、医薬ジャーナル社、変革する透析医学 透析アミロイドーシスの病態、2012、498(341-345)

〔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