

AA アミロイドーシスの発症機構の解明を目指した  
生物物理化学的研究

2016

薬品物理化学

高瀬 ひろか



## 目次

目次	i
略語表	iii
序論	1
本論	5
第1章 SAA アイソフォームのアミノ酸変異が線維形成に及ぼす影響	5
第1節 緒言	5
第2節 実験材料および方法	6
第3節 結果	9
1. SAA の N 末端領域ペプチドを用いた <i>in vitro</i> における線維形成条件の検討	9
2. 各 SAA アイソフォームに対応する中間領域ペプチドを用いたアミノ酸置換が線維形成に及ぼす影響についての比較検討	17
3. ヘパリンによって誘導される SAA 分子の線維形成領域の検討	21
4. 全長蛋白質を用いた SAA 線維形成におけるアイソフォーム間の比較検討	26
第4節 考察	31
第2章 SAA の線維形成を促進する GAG の構造要因の検討	34
第1節 緒言	34
第2節 実験材料および方法	35
第3節 結果	36
1. GAG 分子種の線維形成促進効果	36
2. 脱硫酸化ヘパリンの線維形成促進効果	39
3. アニオン性高分子の線維形成促進効果	40
4. 断片化ヘパリンの線維形成促進効果	42
第4節 考察	44
第3章 SAA の線維形成に脂質が与える影響	46
第1節 緒言	46

第2節	実験材料および方法-----	46
第3節	結果-----	49
	1. リゾリン脂質を用いた評価 -----	49
	2. SAA-HDL モデル粒子の作製-----	59
	3. SAA-HDL モデル粒子を用いた評価 -----	63
第4節	考察-----	65
	総括-----	67
	謝辞-----	69
	参考文献-----	70

## 略語表

本文において以下の略号を用いた。

AA:	amyloid A
AFM:	atomic force microscope
BSA:	bovine serum albumin
CD:	circular dichroism
CMC:	critical micelle concentration
CS:	chondroitin sulfate
DLS:	dynamic light scattering
DMPC:	dimyristoyl-phosphatidylcholine
DMSO:	dimethyl sulfoxide
DS:	dermatan sulfate
FBS:	fetal bovine serum
Fmoc:	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
GAG:	glycosaminoglycan
GalNAc:	<i>N</i> -acetyl galactosamine
GlcA:	glucuronic acid
GlcNAc:	<i>N</i> -acetyl glucosamine
HDL:	high-density lipoprotein
HPLC:	high performance liquid chromatography
HS:	heparan sulfate
IdoA:	iduronic acid
lysoPA:	lysophosphatidic acid
lysoPC:	lysophosphatidylcholine
MEM:	minimum essential media
MRW:	mean residue weight
NDGGE:	nondenaturing gradient gel electrophoresis
SAA:	serum amyloid A
TEM:	transmission electron microscope
TFA:	trifluoroacetic acid

TFE: 2,2,2-trifluoroethanol

ThT: thioflavin T

WMF: wavelength of maximum fluorescence

〈アミノ酸〉

A: alanine, Ala

C: cysteine

D: aspartic acid

E: glutamic acid

F: phenylalanine

G: glycine

H: histidine

I: isoleucine

K: lysine

L: leucine

M: methionine

N: asparagine

P: proline

Q: glutamine

R: arginine

S: serine

T: threonine

V: valine, Val

W: tryptophan, Trp

Y: tyrosine

## 序論

ミスフォールディングした蛋白質が線維状の凝集体（アミロイド線維）を形成して臓器に沈着し、組織障害をもたらす疾患の総称をアミロイドーシスと呼ぶ [1]。アミロイドーシスは蛋白質の構造異常に起因して発症することからコンフォメーション病の 1 つとして知られている [2]。アミロイドーシスは、アミロイド線維が沈着する臓器が限定される限局性アミロイドーシスと全身の諸臓器に沈着する全身性アミロイドーシスの 2 つに大別される。さらにアミロイド線維を形成する原因蛋白質に応じた疾患名が付けられ、細分化されている（表 I） [3, 4]。現在までに、生体内でアミロイド線維を形成する蛋白質は 20 種類以上が知られている [5]。

全身性アミロイドーシスの 1 つである AA アミロイドーシスは、慢性炎症性疾患などの基礎疾患に続発する合併症であり、疾患発症の原因蛋白質は感染や炎症に伴い血中濃度が急激に上昇することが知られている血清アミロイド A（SAA）である。かつては AA アミロイドーシス発症の原因疾患として結核が中心であったが、衛生環境の改善および予防・治療法の確立により結核患者が減少し、現在日本においては関節リウマチが原因疾患の大半を占めている [6]。その他には、家族性遺伝病である地中海熱や癌の合併症として AA アミロイドーシスが発症することが知られている。最近では、肥満に伴う慢性炎症が AA アミロイドーシスを導き得ることも報告されている [7]。AA アミロイドーシス患者は主に脾臓、肝臓、および腎臓へのアミロイド線維の沈着が認められ、特に腎臓においてはアミロイド線維の沈着によって発症した慢性腎疾患が関節リウマチ患者の重篤な死因の 1 つとなっている [8, 9]。AA アミロイドーシスの主な治療法は原因疾患の治療により炎症を抑えることで SAA の産生を抑制することである。近年は関節リウマチに対する効果的な分子標的治療薬が開発されたことから、AA アミロイドーシスの患者数も減少傾向にある [10, 11]。しかしながら、原因疾患を限定しない共通した治療法の確立のためにも AA アミロイドーシスの発症機構を明らかにすることが必要である。

ヒトには *SAA1-4* の 4 つの異なる遺伝子が存在するが、*SAA1* と *SAA2* が炎症に伴い産生される急性期蛋白質であり、*SAA3* はヒト生体内では発現が確認されておらず、*SAA4* は恒常的に産生される。このうち、AA アミロイドーシスの発症に関与するのは *SAA1* である。*SAA1* は炎症や感染時に分泌されるサイトカ

表 I. アミロイドーシスの分類 (アミロイドーシス診療ガイドライン 2010 [4] より一部抜粋)

原因蛋白質	臨床病名
<b>I. 全身性アミロイドーシス</b>	
<b>1. 非遺伝性</b>	
血清アミロイド A	AA アミロイドーシス
免疫グロブリン L 鎖	AL アミロイドーシス
免疫グロブリン H 鎖	AH アミロイドーシス
$\beta_2$ -ミクログロブリン	透析アミロイドーシス
トランスサイレチン	老人性全身性アミロイドーシス
<b>2. 遺伝性 (家族性)</b>	
トランスサイレチン	家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) I、II
アポリポ蛋白質 AI	FAPIII
アポリポ蛋白質 AII	家族性アミロイドーシス
ゲルゾリン	FAPIV
リゾチーム	家族性腎アミロイドーシス
<b>II. 限局性アミロイドーシス</b>	
<b>1. 脳アミロイドーシス</b>	
アミロイド $\beta$ 前駆蛋白質	Alzheimer 病
プリオン蛋白質	Creutzfeldt-Jakob 病
<b>2. 内分泌アミロイドーシス</b>	
(プロ) カルシトニン	C 細胞甲状腺腫瘍に関連
IAPP (アミリン)	2 型糖尿病に関連
心房ナトリウム利尿因子	限局性心房アミロイド

イン、特にインターロイキン-6 (IL-6) の刺激により主に肝臓で産生される。炎症時における SAA1 の血中濃度は、通常の 1000 倍にまで達し、長期にわたる炎症状態により SAA1 が高濃度に持続して存在することが AA アミロイドーシスを引き起こす一つの要因であると考えられている [12]。しかしながら、関節リウマチ患者が AA アミロイドーシスを発症する割合は約 5% であることが知られるなど [13]、慢性炎症性疾患の患者が必ずしも AA アミロイドーシスを発症するわけではない。すなわち、SAA の血中濃度以外の因子が疾患調節因子として AA アミロイドーシスの発症に関与すると考えられる。

SAA1 はアミノ酸 104 残基から構成され、SAA 分子にはその中間領域に相当する 52 残基目と 57 残基目のアミノ酸がそれぞれ 1 残基ずつ異なる 3 種類のア



イソフォーム SAA1.1 (52Val、57Ala)、SAA1.3 (52Ala、57Ala)、および SAA1.5 (52Ala、57Val) が存在する。日本人において、SAA アイソフォームの保有頻度が健常者と AA アミロイドーシス患者とで異なることから、SAA アイソフォームは AA アミロイドーシス発症のリスク因子であると考えられている [14]。アミロイドーシスに限らず、蛋白質分子中のわずか 1 残基のアミノ酸変異によって、疾患が引き起こされる例は数多く存在する。しかしながら、SAA アイソフォーム間のアミノ酸変異がアミロイド線維の形成や AA アミロイドーシス発症に対してどのような影響をもたらすのか分子レベルで検討された例はこれまで存在しない。そこで本論第 1 章では、SAA の線維形成を *in vitro* において評価する方法を確立し、SAA アイソフォームのアミノ酸変異が線維形成にどのような影響を及ぼすのか分子レベルで検討した。

また、アミロイドーシス患者の臓器沈着物からは、原因蛋白質とともに様々な生体分子が検出されていることから、アミロイドーシス発症におけるこれら生体分子の疾患調節因子としての関与が示唆されている [15]。「アミロイド」という名前は、沈着物がヨウ素デンプン反応に対して陽性を示したことから「デンプン様のもの」と捉えられたことに由来する。しかしながら、アミロイドの本体は蛋白質であり、糖は質量として臓器沈着物の 2%未満しか含まれないが [16]、ほとんどのアミロイド沈着部位から細胞外マトリックスに存在するグリコサミノグリカン (GAG) が蛋白質と共に検出されており、アミロイドーシス発症において、GAG の関与が示唆される。GAG はコア蛋白質に結合し、プロテオグリカンの糖鎖部分として全身に分布しているにも関わらずアミロイド線維の沈着する部位が限られていることから、GAG の特異的な構造がアミロイド線維の沈着に寄与しているのではないかと考えた。そこで第 2 章では、SAA の線維形成に対して促進的効果を及ぼす GAG の構造的特徴について解析した。

SAA は高密度リポ蛋白質 (HDL) を構成するアポリポ蛋白質の 1 つであり、生体内では主に脂質に結合した状態で存在する。SAA 以外にも、生体内でアミロイド線維を形成する蛋白質にはアポリポ蛋白質 (アポ) A-I やアポ A-II、アミロイド  $\beta$  (A $\beta$ ) 蛋白質、アミリン、 $\alpha$ -シヌクレインなど脂質に結合するものが多い。蛋白質分子中のアミノ酸配列において、線維を形成しやすい領域には疎水性の高いアミノ酸が多く存在すると考えられており、これは脂質への結合性を示す領域とも共通する。すなわち、脂質に結合して安定に存在している蛋白質が、何らかのきっかけで蛋白質同士が結合 (凝集) してアミロイド線維とな

り疾患を引き起こすと考えられる。そこで第3章では、まずリゾリン脂質への結合が SAA の線維形成に及ぼす影響を評価し、さらに生体内における SAA の構造をより反映した SAA-HDL モデル粒子を作製し、SAA 線維形成への脂質の関与について検討した。

本研究を通じて、疾患調節因子（SAA アイソフォーム、GAG、脂質）が SAA の線維形成に及ぼす影響について生物物理化学的アプローチによって分子レベルで検討を行うことにより、AA アミロイドーシス発症の分子基盤を解明することを計画した。

## 第1章 SAA アイソフォームのアミノ酸変異が線維形成に及ぼす影響

### 第1節 緒言

アミロイドーシスの原因となる蛋白質にはアミノ酸配列の相同性はなく、体内で分布する組織も異なっているが、これら蛋白質が形成するアミロイド線維には共通の特徴がいくつかある。例えば、一般にアミロイド線維は分岐のない直線的な形態を持ち、不溶性の線維として主に細胞外に沈着する。また、アミロイド線維を形成する蛋白質は、二次構造として、線維軸に対して垂直に並ぶ $\beta$ シート構造を形成しており、コンゴーレッドやチオフラビン T (ThT) などの蛍光色素が特異的に結合して蛍光を発する [17]。これらの共通の特徴を利用して、アミロイド形成蛋白質の研究においては、*in vitro* 実験系におけるアミロイド形成蛋白質の形態学的、構造学的、分光学的特徴を調べることで蛋白質の種類によらず線維の形成が評価されている。

AA アミロイドーシスの発症に関与する SAA1 には 52 残基目と 57 残基目のアミノ酸 1 残基ずつが異なる 3 つのアイソフォーム SAA1.1、SAA1.3、SAA1.5 が存在する。日本人において、健常者では 3 つのアイソフォームの保有頻度はほぼ等しいにもかかわらず、AA アミロイドーシス患者では有意に SAA1.3 の保有頻度が高く、SAA1.1 の保有頻度が低い [14]。すなわち、SAA1.3 が AA アミロイドーシス発症のリスク因子と考えられる。SAA の線維形成についてはこれまでアイソフォーム間でアミノ酸配列が共通な N 末端から十数残基のみが必須と報告されてきた [18]。しかしながら、SAA アイソフォームの変異部位を含む中間領域については未検討であり、52 残基目と 57 残基目のアミノ酸の違いが、AA アミロイドーシス発症に及ぼす影響に関する分子レベルの報告はなかった。

そこで第1章では、他のアミロイド形成蛋白質において構築された線維形成評価のための *in vitro* 実験系を応用し、線維形成能を持つことがすでに報告されている SAA 分子の N 末端領域ペプチドを用いて SAA に対する線維形成評価法を確立した。続いて、SAA 断片化ペプチドおよび SAA 全長蛋白質を用いて、アイソフォーム間に存在するアミノ酸変異が線維形成能および線維形態に与える影響を検討した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### 実験材料

各種の Fmoc アミノ酸はペプチド研究所から購入した。ヘパリンナトリウムおよび ThT は Celsus Laboratories、Sigma-Aldrich からそれぞれ購入した。緩衝液としては 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.6)、もしくは 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) を用いた。他の全ての試薬は特級もしくはペプチド合成用を使用した。

### ペプチドの合成と蛋白質の調製

本章で用いた 9 種のヒト SAA ペプチドのアミノ酸配列を表 1 に示した。SAA (1–27)、(12–27)、(1–27/L7P)、SAA1.1 (43–63)、SAA1.3 (43–63)、SAA1.5 (43–63)、および (77–104) ペプチドの 7 種については Fmoc 固相法を用いて合成した [19]。また、SAA (1–42) および SAA1.1 (43–76) ペプチドは固相合成用樹脂に結合した状態でスクラム社から購入した。9 種の SAA ペプチドは全て N 末端側をアセチル化、C 末端側をアミド化している。ペプチドの樹脂からの切り出しおよび Fmoc アミノ酸の側鎖の保護基の脱保護には主反応に必要な TFA、脱離した保護基による副反応を防ぐためのスカベンジャーとして ethanedithiol、thioanisole、phenol および H<sub>2</sub>O を含む混合溶液を用いた。切り出したペプチドを HPLC により分離・精製した後、Applied Biosystems 社の Voyager-DE PRO マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計により分子量を測定した (表 1)。

ヒト SAA1 アイソフォームである SAA1.1 (52Val、57Ala)、SAA1.3 (52Ala、57Ala)、SAA1.5 (52Ala、57Val) の組換え蛋白質は大腸菌によって産生させた [20, 21]。これらの蛋白質は SAA 分子の N 末端に Met が 1 残基導入されている。

ペプチドは超純水に溶解し、蛋白質は 4 M の尿素溶液で溶解後、超純水で一晩透析を行った後に使用した。ペプチドおよび蛋白質溶液はサンプル調製前に遠心により不溶性もしくは凝集物質を除去した。蛋白質溶液は調製の間、4°C で維持した。ペプチドおよび蛋白質の濃度決定にはウシ血清アルブミンをスタンダードとする Lowry 法を用いた [22, 23]。ウシ血清アルブミンを含む DC プロテインアッセイキットは Bio-Rad 社から購入した。

表 1-1. SAA ペプチドのアミノ酸配列と分子量

Peptide	Sequence	Found: $m/z$ (Calculated: $[M+H]^+$ )
1-27	RSFFSFLGEAFDGARDMWRAYSDMREA	3261.9 (3259.5)
12-27	DGARDMWRAYSDMREA	1971.9 (1970.9)
1-27/L7P	RSFFSF <b>P</b> GEAFDGARDMWRAYSDMREA <sup>*2</sup>	3245.6 (3243.4)
1-42	RSFFSFLGEAFDGARDMWRAYSDMREANYIGSDKYFHARGNY	5043.5 (5045.3)
43-63 (1.1) <sup>*1</sup>	DAAKRGPGGVWAAEAISDARE <sup>*3</sup>	2169.2 (2168.1)
43-63 (1.3) <sup>*1</sup>	DAAKRGPGGAWAAEAISDARE <sup>*3</sup>	2140.5 (2140.1)
43-63 (1.5) <sup>*1</sup>	DAAKRGPGGAWAAEVISDARE <sup>*3</sup>	2168.4 (2168.1)
43-76 (1.1) <sup>*1</sup>	DAAKRGPGGVWAAEAISDARENIQRFFGHGAEDS	3626.1 (3626.7)
77-104	LADQAANEWGRSGKDPNHFRPAGLPEKY	3166.5 (3165.6)

\*1) () 内は SAA アイソフォームを示す

\*2) 太字はアミノ酸の置換部位を示す

\*3) 太字は SAA アイソフォームの変異部位を示す

### ThT 蛍光測定

全ての蛍光測定は Hitachi F-7000 spectrophotometer を用いて 37°C で行った。セルは層長 4×4 mm の石英セルを用いた。得られた結果は適切なブランクの値を差し引くことによって補正した。ThT 蛍光強度は 440 nm で励起した際の 450-600 nm までをモニタリングした。特記しない限り、サンプルは ThT、ヘパリン、およびペプチドもしくは蛋白質の濃度がそれぞれ 10 μM、41 μg/mL、50 μg/mL になるように調製した。また、塩が SAA の線維形成に及ぼす影響についての評価では、NaCl 濃度が 150 mM となるよう調製した。

## 円二色性 (CD) 測定

CD スペクトル測定は Aviv 社の 62ADS spectropolarimeter を用いて、37°C で行った。得られた結果は適切なブランクの値を差し引くことによって補正した。平均残基モル楕円率  $[\theta]$  は式  $[\theta] = (\text{MRW}) \times \theta \div (10 \times l \times c)$  を用いることにより算出した。 $\theta$  は測定により得られた楕円率 (degree) を示す。 $l$  はセルの層長 (cm) を示し、0.2 cm を用いた。 $c$  はサンプル溶液のペプチド濃度 (g/mL) を示し、平均アミノ酸分子量を表す MRW は用いたペプチドの分子量をアミノ酸残基数で除することで得た。サンプルはヘパリン、およびペプチドもしくは蛋白質の濃度がそれぞれ 41  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$  になるように調製した。線維形成実験において、測定はサンプル調製 1 日後に行った。

## 透過型電子顕微鏡 (TEM)

カーボン加工された銅グリッド (400 メッシュ) にサンプル溶液を滴下した後、1–2 % (w/v) 酢酸ウランでネガティブ染色を行うことにより TEM 観察用試料を作製した。作製した試料の観察には Tecnai F20 transmission electron もしくは JEM-1200EX transmission electron microscope を使用した。サンプル調製後少なくとも 6 日経過後の溶液を TEM 観察用試料の作製に用いた。

## 原子間力顕微鏡 (AFM)

AFM 観察用試料を作製する直前に雲母基板の積層構造を壁開し、新たな面を露出させた。SAA サンプルを準備した雲母基板に滴下し 10 分間風乾後、2 mL の超純水で雲母基板表面を洗浄した。この工程を 5 回繰り返した後、試料滴下後の雲母基板を真空乾燥機で乾燥させた。AFM 画像は Veeco Instruments 社の AFM Nanoscope IIIa SPM を用いて、室温、タッピングモードにより得た。測定にはオリンパス社の silicon cantilever AC240TS (spring constant, 2 N/m; tip radius, 7 nm; resonance-frequency, 70 kHz; tip height, 15  $\mu\text{m}$ ; cantilever thickness, 2.8  $\mu\text{m}$ ) を用いた。

## ヘパリンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー

SAA 断片化ペプチドのヘパリンに対する結合親和性の解析にはアフィニティークロマトグラフィーを用いた。カラムは GE Healthcare 社の HiTrap Heparin HP column (カラム体積 1 mL) を用いた。カラムはカラム体積の 10 倍量の 10 mM

酢酸緩衝液 (pH 4.0) もしくは 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を Bio-Rad 社の Biologic FPLC を用いて流速 1.0 mL/min で流すことにより平衡化した。解析時の移動相の流速は 0.1 mL/min とし、サンプルは各断片化ペプチド 20  $\mu$ g を全量 1 mL 注入した。その後、カラム体積の 5 倍量の緩衝液 (50 分間) によりカラムに結合していないペプチドを除去後、0–2 M NaCl の線形濃度勾配となるようカラム体積の 5 倍量 (50 分間) の移動相を流し、その後カラム体積の 3 倍量 (30 分間) の 2 M NaCl を流してカラムからペプチドを解離させた。ペプチドの溶出を 280 nm の吸光度によりモニタリングした。

### 第 3 節 結果

#### 1. SAA の N 末端領域ペプチドを用いた *in vitro* における線維形成条件の検討

アミロイド線維形成の評価において、線維に結合することで蛍光を発する ThT が広く用いられる。ThT は分子内に電子アクセプターであるベンゾチアゾール部位と電子ドナーである *N,N*-ジメチルアニリン部位を持つ (図 1–1)。遊離状態の ThT は、光照射によって励起された電子のエネルギーがドナー・アクセプター間の単結合を軸とした回転によって消失するため、ほとんど蛍光を発しない。一方で、ThT が凝集体の  $\beta$  シート構造に結合すると分子の回転が抑制されるため、励起エネルギーの一部を蛍光として発すると考えられている [24, 25] が、実際には ThT の蛍光を発する機構についての詳細は明らかになっていない。ここでは、線維形成の指標として ThT を加え、一定時間経過後の蛍光測定を行った。

アミロイド形成蛋白質であるアミロイド  $\beta$  蛋白質 (A $\beta$ ) においては pH を下げるによりペプチドの凝集が促進されることが ThT 蛍光測定より明らかにされている [26]。SAA においても、10 mg/mL という血中濃度と比較してはるか

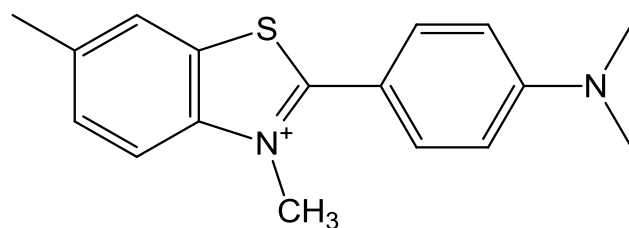


図 1–1. ThT の構造式

に高い濃度で酢酸に溶解させた場合に、蛋白質のみで線維を形成するとの報告がある [21]。正常時、約 1  $\mu\text{g/mL}$  の SAA が血液中には存在し、炎症や感染時には SAA の血中濃度が正常時の 100–1000 倍に上昇する。AA アミロイドーシス発症の原疾患である関節リウマチ患者においては、SAA の血中濃度は最も高く約 700  $\mu\text{g/mL}$  まで上昇し、平均として約 300  $\mu\text{g/mL}$  を示すことが報告されている [27]。また、AA アミロイドーシス患者においては、SAA の血中濃度が 10  $\mu\text{g/mL}$  以下であれば、アミロイド沈着臓器の機能を維持もしくは改善できるが、SAA の血中濃度が 10  $\mu\text{g/mL}$  以上、特に 50  $\mu\text{g/mL}$  以上であれば、アミロイド沈着量が増加し、沈着臓器の機能低下が見られたとの報告がある [12]。このような背景の下、本研究では、炎症時の SAA 濃度範囲である 50  $\mu\text{g/mL}$  で実験を行うこととした。pH の異なる 3 種類の緩衝液 (pH 4.0、pH 5.6、pH 7.4) で SAA (1–27) ペプチドを 1 日インキュベートし、ThT の蛍光を測定した結果、いずれの pH においても蛍光強度の増大は観察されなかった (図 1–2)。この条件においてはペプチドのみによる線維形成は困難であることが示唆された。

AA アミロイドーシス患者の臓器沈着物からは、GAG の 1 つであるヘパラン硫酸 (HS) が検出されている [28]。HS と類似の構造を持つヘパリンの添加により、*in vitro* においてアミロイド形成蛋白質の線維形成が促進されるという報告がいくつかある [29–31]。そこで、上述の条件にヘパリンを添加し、3 種類の pH における ThT 蛍光を評価した (図 1–2)。pH 4.0 の緩衝液中の SAA (1–27) ペプチドでは、ヘパリンの添加により ThT 蛍光の増大が観察された (図 1–2 A)。pH 5.6、pH 7.4 においてはヘパリン存在下においても、非存在下と変わらず ThT 蛍光の増大は観察されなかった (図 1–2 B、C)。

一般に、アミロイド線維の形成過程は、アミロイド形成蛋白質が凝集し、凝集核 (seed) を形成する核形成期、凝集核を起点に蛋白質が集積し線維を形成していく伸長期、線維の伸長が終了した定常期の 3 状態を経ると考えられている [32]。ThT 蛍光は核形成期には観察されず、線維伸長期に増大し、定常期に一定となる。SAA (1–27) ペプチドにヘパリンを添加した際の ThT 蛍光の経時変化をその最大蛍光波長である 485 nm の蛍光強度でモニタリングした結果 (図 1–3 A)、2 h 後においてすでに ThT 蛍光の増大が観察されたことから、少なくとも今回の測定条件では核形成期を観察することはできなかった。この結果は、ヘパリンが凝集核形成時の足場の役割を果たしたことにより、SAA (1–27) ペプチドが効率よく凝集することが可能となり、核形成期を短縮あるいは省略し



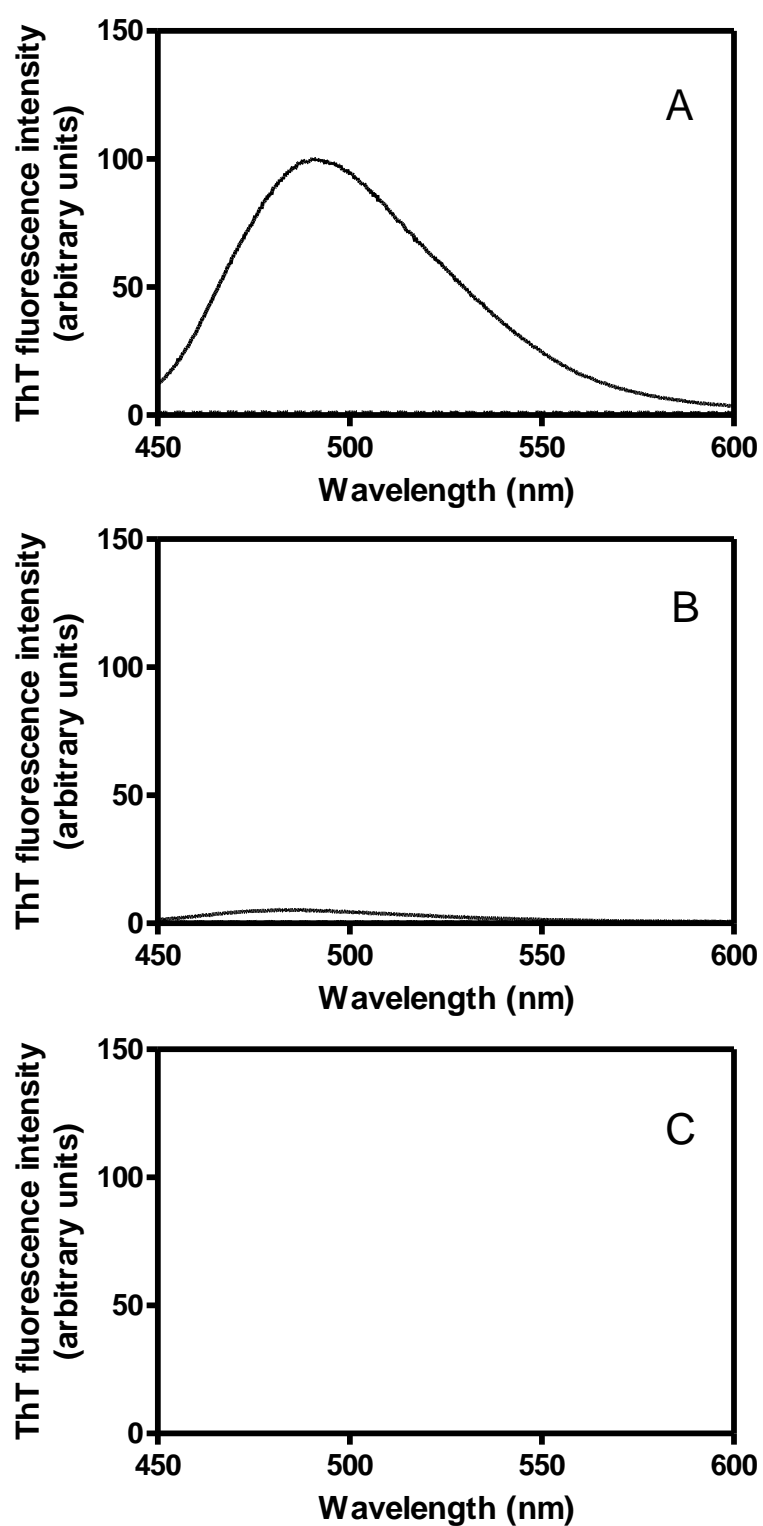


図1-2. pH 4.0 (A)、pH 5.6 (B)、pH 7.4 (C) の緩衝液で1日インキュベートした SAA (1-27) ペプチドに対する ThT の蛍光スペクトル (37°C) (実線：ヘパリン存在下、破線：ヘパリン非存在下)

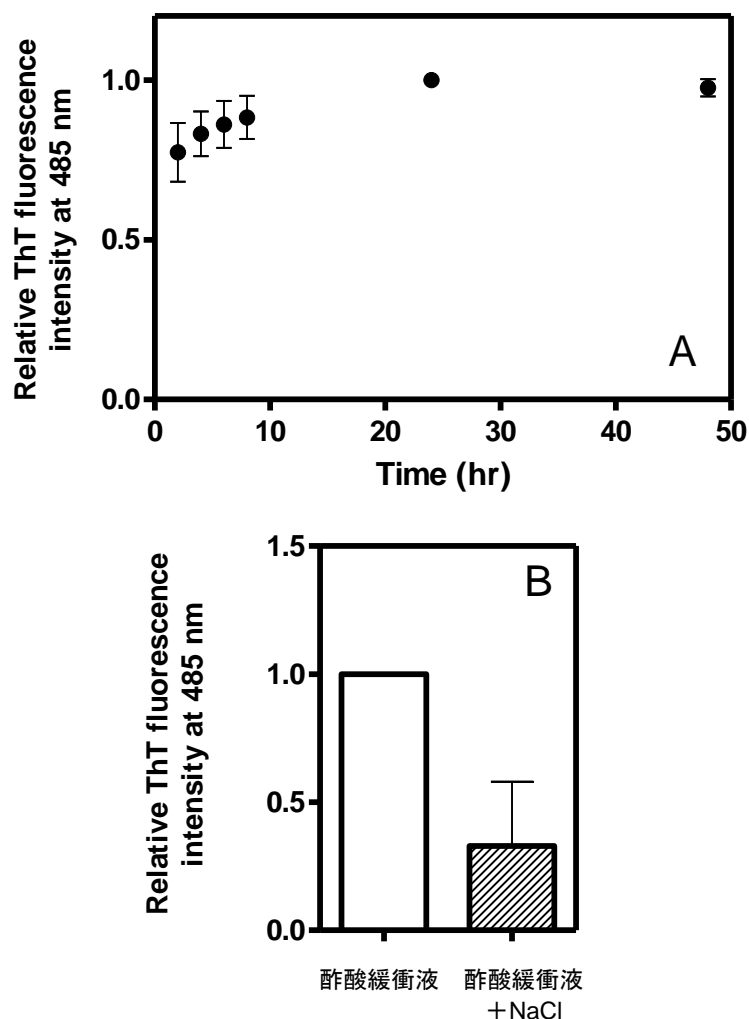


図 1－3. SAA (1－27) ペプチドのヘパリン存在下における ThT 蛍光 (pH 4.0、37°C) (A) ThT 蛍光の経時変化、(B) 塩の影響 (NaCl 150 mM) (各経過時間および塩共存下における ThT の蛍光強度は、ヘパリン添加後 24 時間の蛍光強度を 1 とした相対値として表す)

たためであると推察される。また、24 時間後には定常期に移行していたと考えられる。一方、SAA (1－27) ペプチドの線維形成において、塩の添加により ThT 蛍光強度が著しく減少したため、ヘパリンとペプチド間の相互作用には静電的相互作用が関与していることが示唆された (図 1－3 B)。

pH の異なる 3 種類の緩衝液 (pH 4.0、pH 5.6、pH 7.4) における SAA (1－27) ペプチドの二次構造を評価するため、CD 測定を行った (図 1－4)。ヘパリン非存在下において、全ての緩衝液中の SAA (1－27) ペプチドは 200 nm 付近に極小値を有する CD スペクトルを示し、ランダム構造であった。一方で、ヘパリ

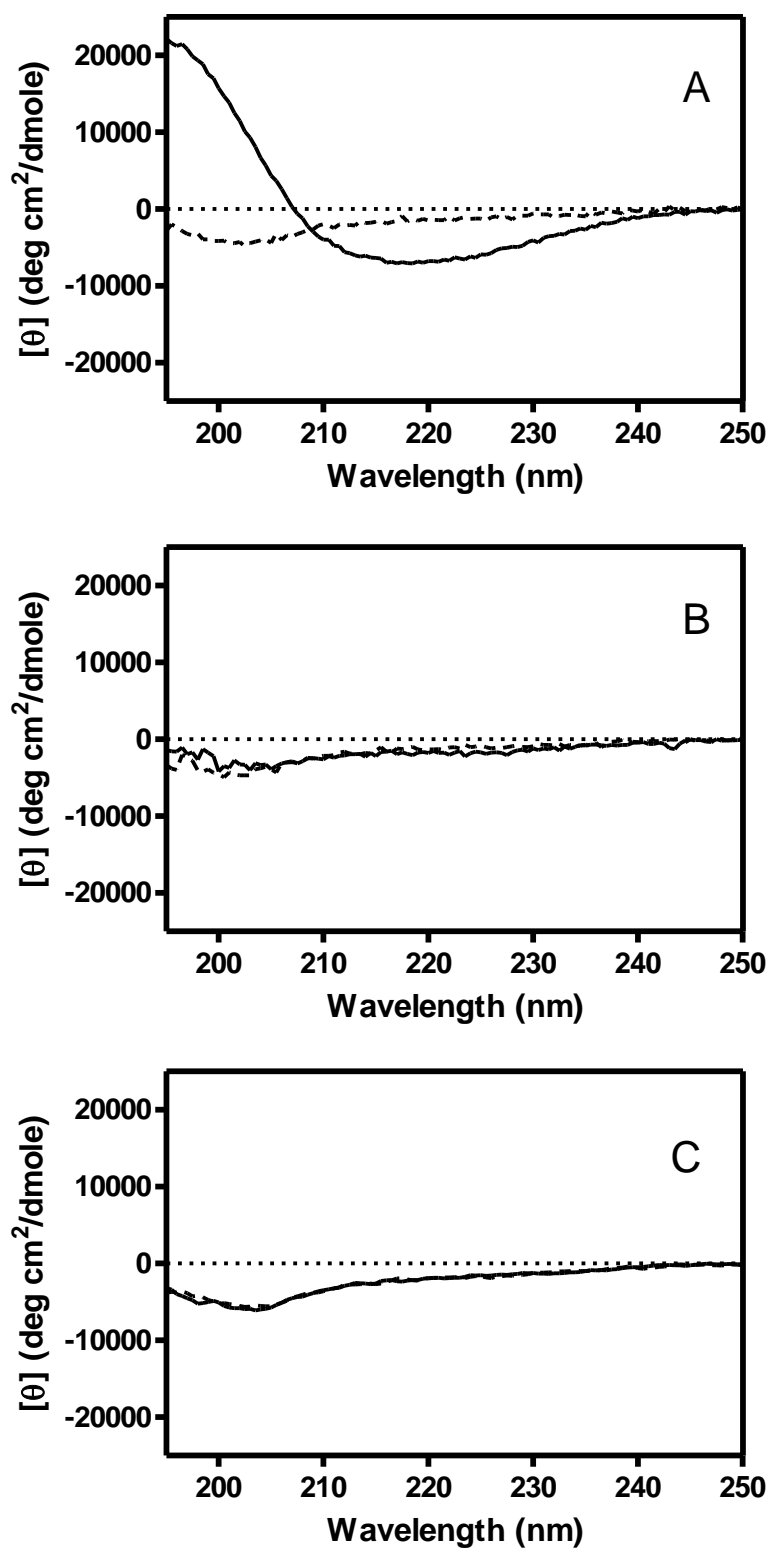


図1-4. pH 4.0 (A)、pH 5.6 (B) pH 7.4 (C) 溶液中における SAA (1-27) ペプチドの CD スペクトル (37°C) (実線：ヘパリン存在下、破線：ヘパリン非存在下)

ン存在下においては、ThT 蛍光の増大が観察された pH 4.0 の SAA (1-27) ペプチドは 220 nm 付近に一つの極小値を有するスペクトルが観察され、 $\beta$  シート構造を形成していた (図 1-4 A)。他の pH 条件下においては、ヘパリン存在下の CD スペクトルはヘパリン添加前と同じであり、SAA (1-27) ペプチドはランダム構造のままであった (図 1-4 B、C)。以上より、pH 4.0 の条件において、SAA (1-27) ペプチドはヘパリンによって  $\beta$  シート構造の形成が促進されることが示された。

ThT 蛍光の増大および、 $\beta$  シート構造の形成が観察された pH 4.0、ヘパリン添加時の SAA (1-27) ペプチドについて TEM 観察を行った。その結果、SAA (1-27) ペプチドは直線的な短い形態の線維を形成していた (図 1-5)。ネガティブコントロールとしてヘパリンを添加していないサンプルについても観察を行ったが凝集体は観察されなかった。

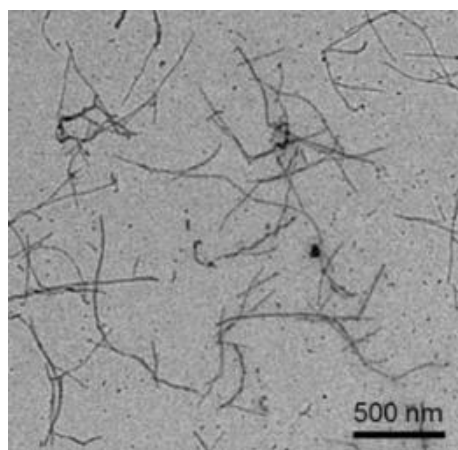


図 1-5. SAA (1-27) ペプチドのヘパリン存在下 (pH 4.0) における TEM 画像

ここまでの検討結果より、*in vitro* において SAA (1-27) ペプチドの線維形成能を比較的短期間に評価するには、ヘパリン存在下、pH 4.0 の緩衝液中で実験することが有効であることが示された。よって、以降は特記しない限りはこの条件下において線維形成能を評価することとした。本条件下で N 末端領域を改変した断片化ペプチドを用いて、SAA 分子の線維形成における N 末端領域の重要性についてさらに検討を進めた。N 末端から十数残基がヘパリンによる線維形成促進効果の影響を受けるのか検討するため、N 末端領域 (1-11 残基) を欠

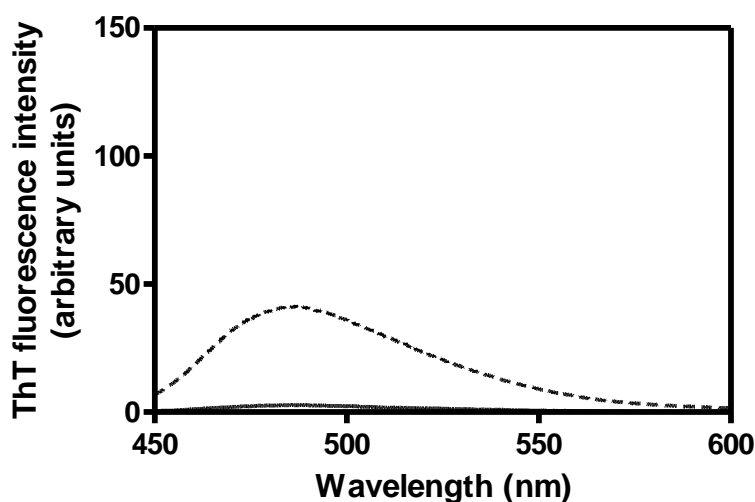


図1-6. SAA (12-27) ペプチド (実線)、SAA (1-27/L7P) ペプチド (破線) のヘパリン存在下における ThT 蛍光 (pH 4.0、37°C)

損した SAA (12-27) ペプチドおよびプロリン残基を N 末端領域の最も疎水性の高い残基 (L7) に置換した SAA (1-27/L7P) ペプチドを用いた。プロリン残基は蛋白質の二次構造形成に必須である水素結合の形成に必要なアミド水素原子を持たず二次構造の形成を阻害することが知られている。図1-6はヘパリン存在下において1日インキュベートした SAA (12-27) および (1-27/L7P) ペプチドに対する ThT の蛍光を示している。SAA (12-27) ペプチドでは ThT 蛍光が観察されず、SAA (1-27/L7P) ペプチドにおいては SAA (1-27) ペプチドと比較して ThT 蛍光が減少した。

図1-7はヘパリン存在下におけるこれら2種類の SAA ペプチドの CD スペクトルを示している。SAA (12-27) ペプチドは 200 nm 付近に極小値を持つランダム構造を示した。SAA (1-27/L7P) ペプチドはランダム構造とは異なる CD スペクトルの波形を示したが、これは SAA (1-27) ペプチドで見られた典型的な  $\beta$  シート構造のものとは異なった。アミロイド形成蛋白質の1つであるヒトアミリンにおいてもプロリンを置換した結果、 $\beta$  シート構造の形成能が減少することが知られている [33]。

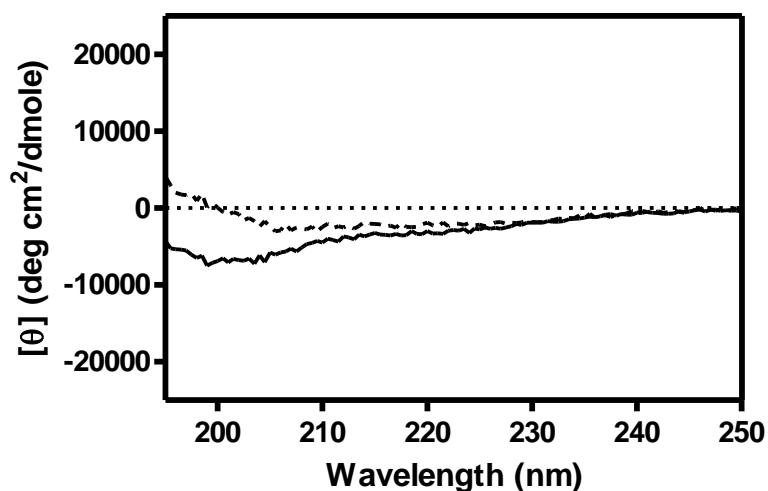


図1-7. ヘパリン存在下、SAA (12-27) ペプチド (実線)、および SAA (1-27/L7P) ペプチド (破線) の CD スペクトル (pH 4.0、37°C)

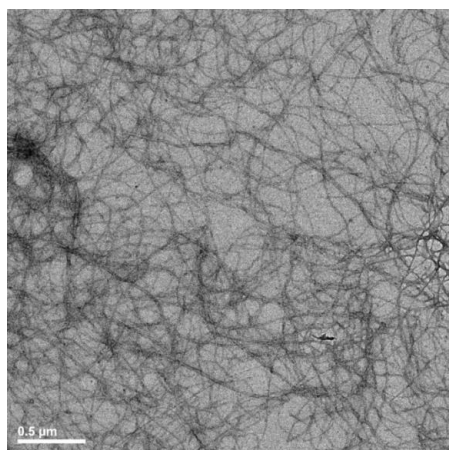


図1-8. ヘパリン存在下 (pH 4.0) でインキュベートした SAA (1-27/L7P) ペプチドの TEM 画像

ThT 蛍光および CD 測定の結果において、ヘパリンを添加することによる変化が観察された SAA (1-27/L7P) ペプチドについて、TEM によりその線維形態を観察した。SAA (1-27) ペプチドで観察された線維形態とは異なり、長く曲線的な線維を形成していた (図1-8)。

以上の結果から、SAA (1-27) ペプチドの中でも N 末端 11 残基部分が線維形成において特に重要であることが示唆された。また、1 残基のアミノ酸の違いが線維形態に影響を与えることが示唆された。

## 2. 各 SAA アイソフォームに対応する中間領域ペプチドを用いたアミノ酸置換が線維形成に及ぼす影響についての比較検討

各 SAA アイソフォームのアミノ酸変異部位である 52 残基目と 57 残基目を含む SAA 分子の中間領域に相当する SAA1.1、1.3 および 1.5 (43–63) ペプチドを用いて、アイソフォーム間の線維形成能について比較検討を行った。各 SAA (43–63) ペプチドを酸性条件下、ヘパリン存在下でインキュベートした後、ThT 蛍光を測定した (図 1–9 A)。その結果、SAA1.1 (43–63) ペプチドでは ThT 蛍光の増大が観察された。一方、SAA1.3 (43–63) ペプチドにおいては ThT 蛍光強度の増大はほとんど観察されなかった。SAA1.5 (43–63) ペプチドにおいては、ThT 蛍光強度の増大は SAA1.1 および SAA1.3 (43–63) ペプチドの中間程度であった。SAA1.1 (43–63) ペプチドにおいて観察される ThT 蛍光について、ヘパリン添加後の経時変化をモニタリングした結果、時間依存的な蛍光強度の増大が観察された。2 h 後から ThT 蛍光強度の増大が観察されていることから、ヘパリンの添加により核形成期が短縮され、すでに伸長期に移行していることが示唆された。また、1 日後には定常域に達していたと考えられる (図 1–9 B)。塩の添加による影響について調べたところ、SAA1.1 (43–63) ペプチドにおいても SAA (1–27) ペプチドと同様に ThT 蛍光強度が減少したことから、SAA1.1 (43–63) ペプチドとヘパリン間の相互作用には静電的相互作用が働いていることが示唆された (図 1–9 C)。

図 1–10 はヘパリン存在下の各 SAA アイソフォームの中間領域ペプチドの CD スペクトルを示している。SAA1.3 (43–63) ペプチドはヘパリンを添加することによる構造変化は起こらず、ランダム構造を示した。これに対して、SAA1.1 (43–63) ペプチドの CD スペクトルは 200 nm 周辺の極小値とともに 220 nm 付近にわずかなふくらみを有していた。SAA1.5 (43–63) ペプチドにおいても、強度は異なるものの、SAA1.1 (43–63) ペプチドと同様の波形の CD スペクトルが観察された。SAA1.1 および SAA1.5 (43–63) ペプチドで観察されたスペクトルの低波長領域における形状は、ランダム構造を示す CD スペクトルの形状とは異なり、220 nm 付近のわずかなふくらみは SAA (1–27) ペプチドが示す CD スペクトルと同様の形状であったことから、中間領域ペプチドの二次構造は  $\beta$  シート構造を一部含むことが予想される。

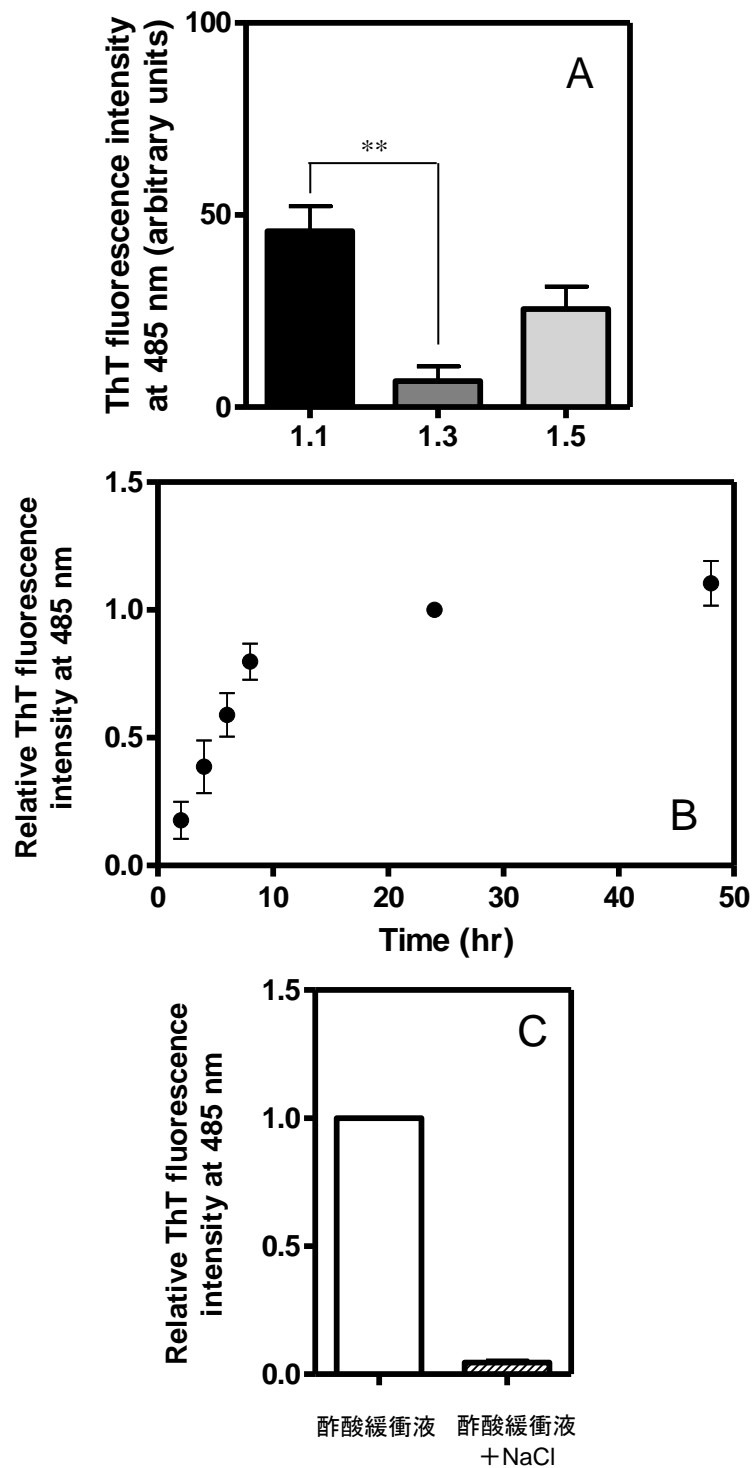


図 1－9. (A) ヘパリン存在下、1 日インキュベートした SAA1.1、1.3 および 1.5 (43－63) ペプチドに対する ThT の蛍光 (pH 4.0、37°C、Student's t-test \*\*:  $p < 0.01$  ( $n \geq 3$ ))、(B、C) ヘパリン存在下の SAA1.1 (43－63) ペプチドに対する ThT の蛍光 (pH 4.0、37°C) (ThT 蛍光の経時変化 (B)、塩の影響 (NaCl 150 mM) (C)) (各経過時間および塩共存下における ThT の蛍光強度は、ヘパリン添加後 24 時間の蛍光強度を 1 とした相対値として表す)



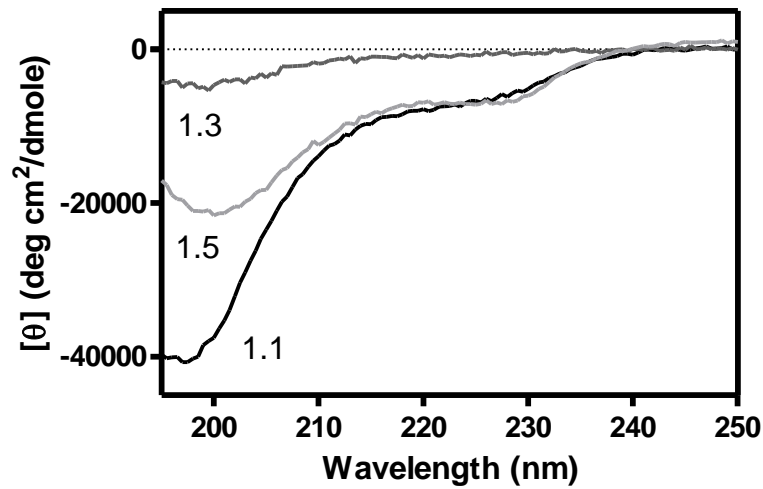


図 1-10. SAA (43-63) ペプチドのヘパリン存在下における CD スペクトル (pH 4.0、37°C)

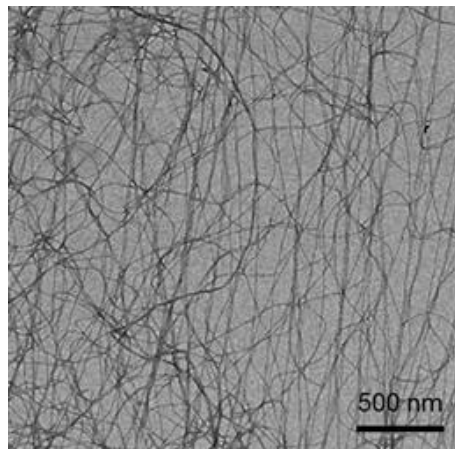


図 1-11. SAA1.1 (43-63) ペプチドのヘパリン存在下 (pH 4.0) の TEM 画像

ThT 蛍光および CD 測定の結果より線維の形成が示唆された SAA1.1 (43-63) ペプチドの線維形態を TEM により観察した結果、長く曲線的な線維を形成していた (図 1-11)。SAA (1-27) ペプチドの直線的な短い線維形態とは異なり、むしろ SAA (1-27/L7P) ペプチドが形成する線維の形態によく似た特徴を有していた。SAA1.1 (43-63) ペプチドは 49 残基目にプロリンを含んでおり、

プロリンが  $\beta$  シート構造の形成を抑制したために典型的な線維とは異なる形態が形成された可能性がある。このようにプロリンを配列中に持つペプチドが長く曲線的な線維を形成する例は  $\alpha$ -シヌクレインにおいても報告されている [34]。

SAA1.1、1.3 および 1.5 (43–63) ペプチドにおいて、アイソフォーム間で線維形成能が異なった理由として、アイソフォーム間でヘパリンへの結合性が異なる可能性を考えた。そこで、SAA1.1、1.3 および 1.5 (43–63) ペプチドとヘパリンとの結合性についてヘパリンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより検討した (図 1–1 3)。pH 4.0 において、各 SAA アイソフォーム (43–63) ペプチドはいずれのペプチドも移動相に溶離液が流れ始めた 107–108 分にピークが観察された (図 1–1 2 B)。これよりヘパリンへの結合性に対してアイソフォームの影響がないことが示唆された。なお、SAA (1–27) ペプチドもヘパリンへの結合能を持つ (図 1–1 2 A)。ヒト SAA 分子の C 末端領域に相当する SAA (77–104) ペプチドは後述のように線維形成能を持たないが、ヘパリンへの結合を確認した (図 1–1 2 C)。SAA 分子の C 末端領域はマウス SAA 由来の断片化ペプチドを用いた検討からも、ヘパリンや HS への結合性を

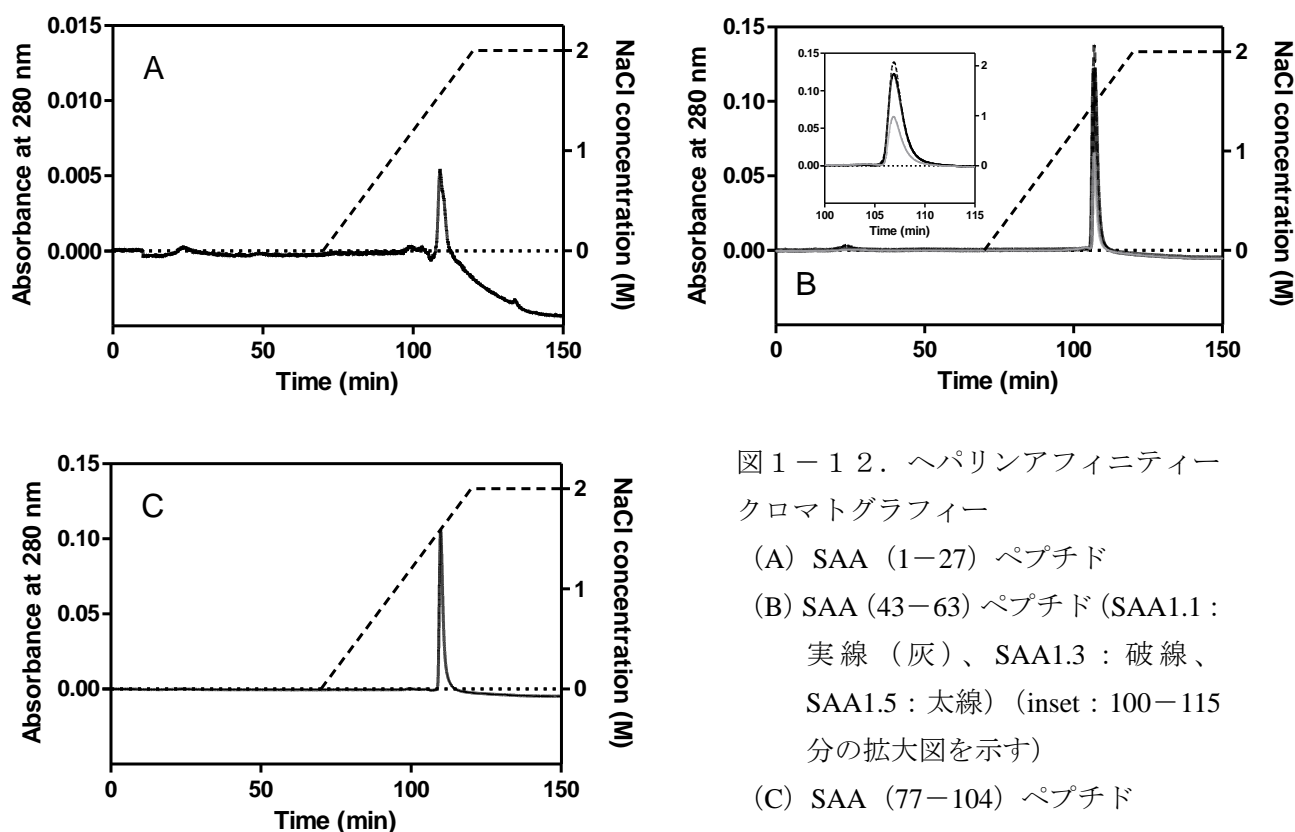


図 1–1 2. ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー

- (A) SAA (1–27) ペプチド
- (B) SAA (43–63) ペプチド (SAA1.1 : 実線 (灰)、SAA1.3 : 破線、SAA1.5 : 太線) (inset : 100–115 分の拡大図を示す))
- (C) SAA (77–104) ペプチド

有する領域であると報告されている [35]。これらの結果より、SAA ペプチドの線維形成能に違いをもたらしたのは、ヘパリンへの結合性ではなく、各ペプチド固有のアミロイド原性によるものであることが示唆された。

### 3. ヘパリンによって誘導される SAA 分子の線維形成領域の検討

ハイドロパシープロットによりヒト SAA のアミノ酸配列を解析した結果、SAA 分子の N 末端領域と中間領域に疎水性領域が存在することが示されている [36]。前項で線維形成能を検討した SAA (1-27) および (43-63) ペプチドは SAA 分子内の疎水性領域に相当する。そこで、前項において未検討な疎水性度の低い領域を含めた SAA1.1 分子全体を 3 つの領域に分けた SAA (1-42)、(43-76)、および (77-104) ペプチドを用いることにより、ヘパリンによって誘導される SAA 分子の線維形成領域の検討を行った。図 1-13A はヘパリン存在下、pH 4.0 の緩衝液において SAA (1-42) ペプチド、SAA1.1 (43-76) ペプチド、および SAA (77-104) ペプチドを 1 日インキュベートした後の ThT 蛍光測定の結果を示している。ヘパリン非存在下では、いずれのペプチドもサンプル調製 1 日後および 6 日後において、ThT 蛍光の増大は観察されず、少なくとも 6 日間では線維は形成されないことが示唆された。ヘパリン存在下では、SAA (1-42) ペプチドおよび SAA1.1 (43-76) ペプチドにおいて、ThT 蛍光の増大が観察された (図 1-13A)。ヘパリン添加 1 日後と 6 日後の ThT 蛍光にはわずかな違いしかなかった。この結果は、SAA (1-27) ペプチドおよび SAA1.1 (43-63) ペプチドの結果と矛盾しない (図 1-2A、1-10A)。ThT 蛍光強度の増大が観察された SAA (1-42) ペプチドおよび SAA1.1 (43-76) ペプチドについて、pH の異なる緩衝液を用いてさらに検討した (図 1-13B)。その結果、SAA (1-42) ペプチドにおいて pH 5.6 の緩衝液中、ヘパリン存在下で 1 日インキュベートした後、SAA (1-27) ペプチドにおいては見られなかった ThT 蛍光の増大が観察されたが、SAA1.1 (43-76) ペプチドにおいては観察されなかった。pH 7.4 の緩衝液においてはヘパリン存在下、いずれのペプチドにおいても ThT 蛍光の増大は観察されなかった。SAA (1-42) ペプチドにおいては、SAA (1-27) ペプチドとは異なる pH 反応性を示したことから、伸長した 28-42 残基部分が pH 反応性に寄与している可能性が示された。

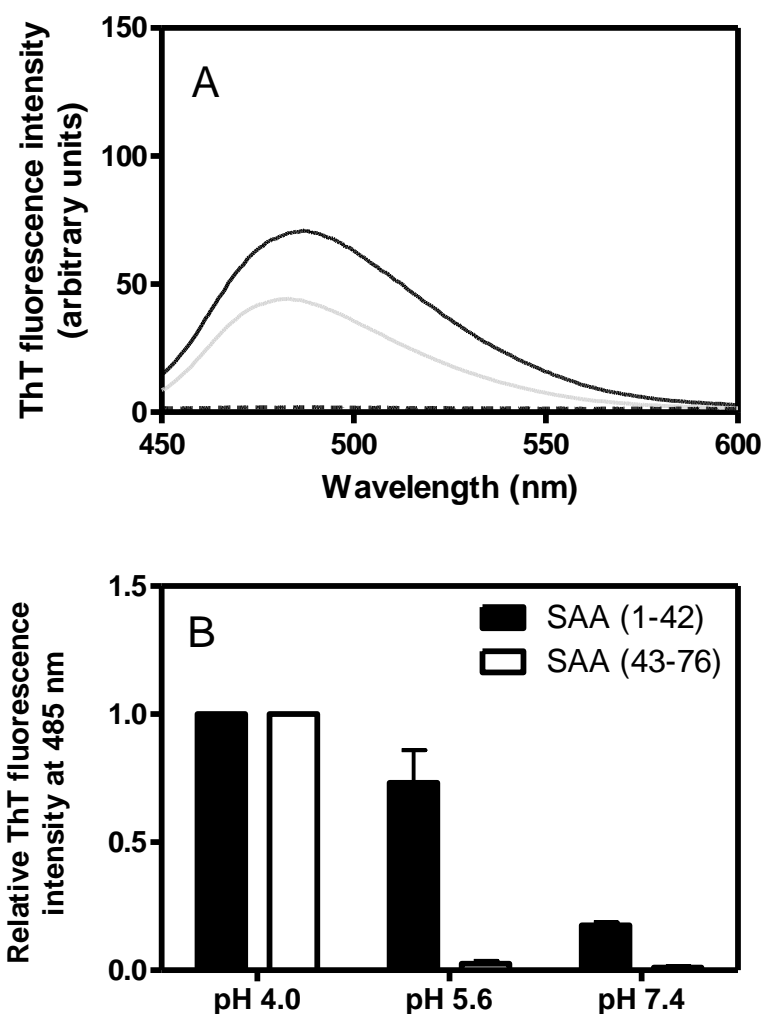


図1-13. (A) pH 4.0、ヘパリン存在下1日インキュベートした SAA (1-42) ペプチド (実線)、SAA1.1 (43-76) ペプチド (実線 (灰))、および SAA (77-104) ペプチド (破線) に対する ThT の蛍光スペクトル (37°C) (B) pH の異なる3種類の緩衝液中でヘパリン存在下1日インキュベートした SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに対する ThT の蛍光 (pH 4.0 緩衝液中での ThT 蛍光強度を1とした相対値として示す)

図1-14、図1-15は pH の異なる3種類の緩衝液中での SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドの CD スペクトルを示している。ヘパリン非存在下では両ペプチドとも、いずれの緩衝液中でもランダム構造であった。ヘパリン存在下、pH 4.0 においては、SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドの CD スペクトルはそれぞれ異なる極小値を示し、いずれも典型的な  $\beta$

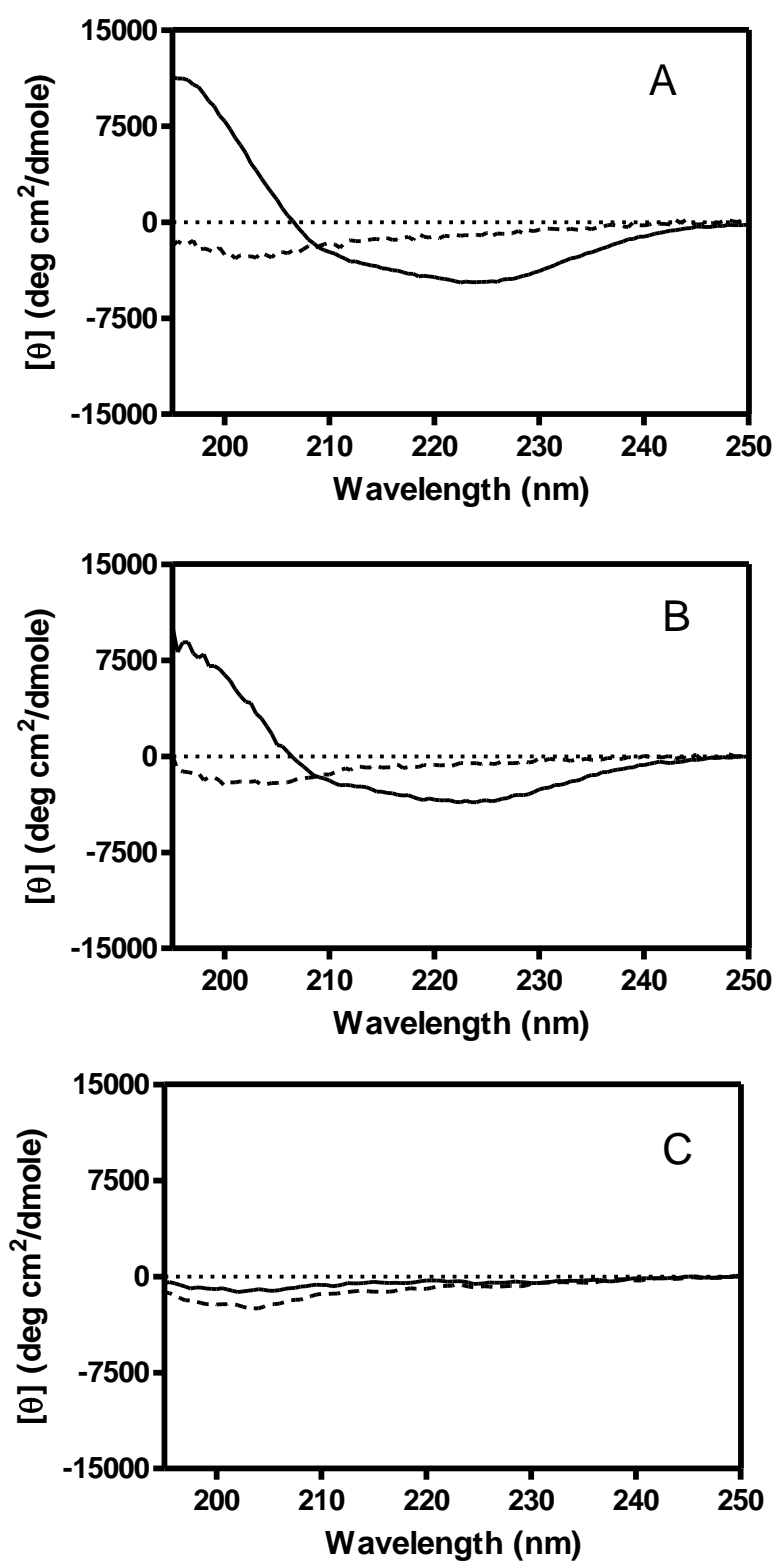


図1-14. ヘパリン存在下（実線）、非存在下（破線）における SAA（1-42）ペプチドの CD スペクトル（37°C）（pH 4.0 : A、pH 5.6 : B、pH 7.4 : C）

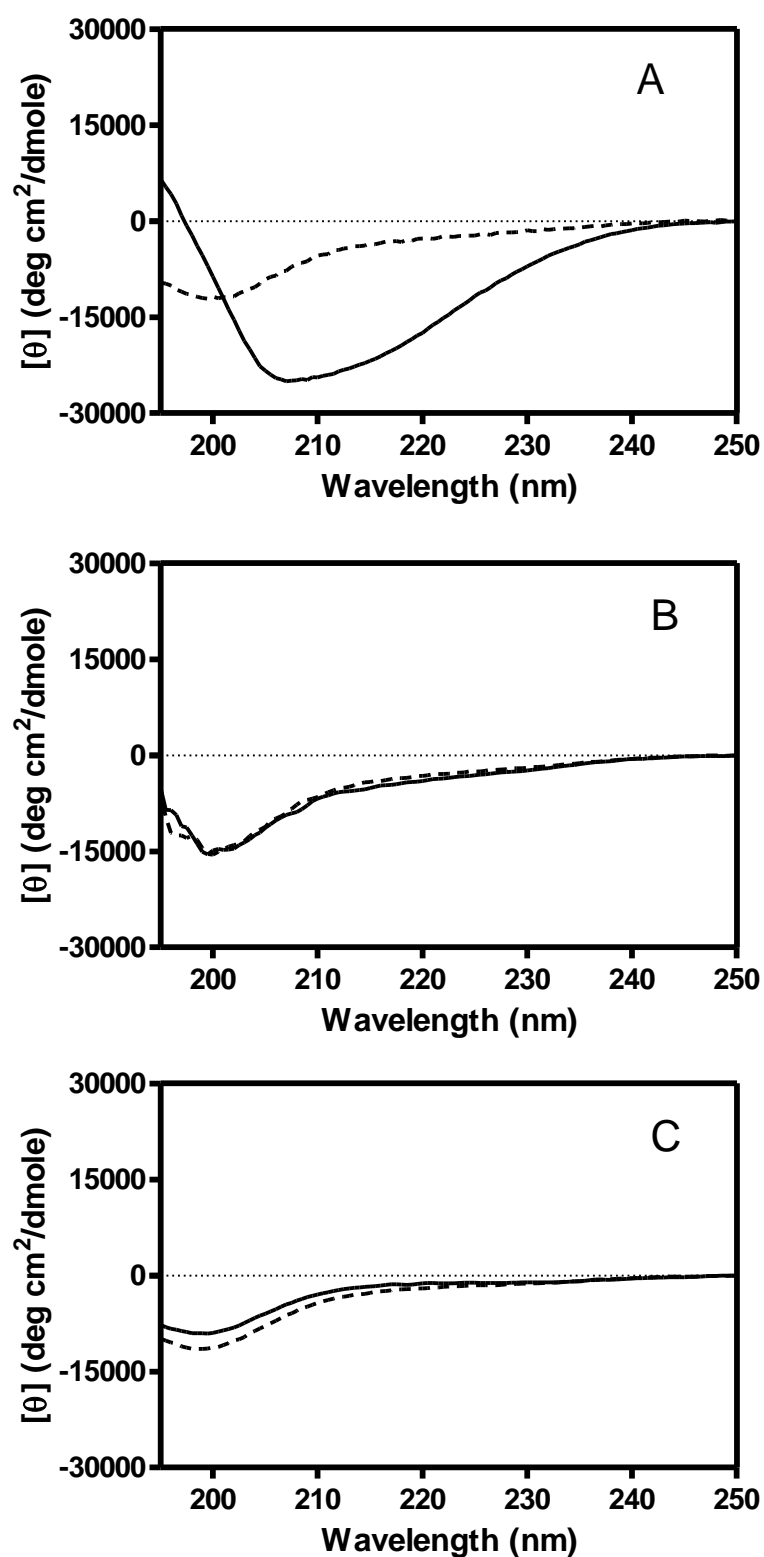


図1-15. ヘパリン存在下（実線）、非存在下（破線）における SAA1.1（43-76）ペプチドの CD スペクトル（37°C）（pH 4.0 : A、pH 5.6 : B、pH 7.4 : C）

シート構造とは異なる波形を示していた（図1-14A、図1-15A）。これらの結果はペプチド内に含まれる $\beta$ シート構造以外の他の二次構造の成分の構成が異なることを反映している可能性が考えられる [37]。そこでCDスペクトルの波形から二次構造成分の割合を算出するコンピュータプログラム BeStSel [38] を用いて、ヘパリン存在下の SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドの CD スペクトルの解析を行った。その結果、SAA (1-42) ペプチドは 38.1% の $\beta$ シート構造と 9.2% の $\alpha$ ヘリックス構造を含むと見積もられたのに対して、SAA1.1 (43-76) ペプチドは 17.7% の $\beta$ シート構造を含むものの、それを上回る 42.9% の $\alpha$ ヘリックス構造を含むと見積もられた。一方、pH 5.6 および pH 7.4 においては、pH 5.6 においてヘパリン存在下の SAA (1-42) ペプチドが $\beta$ シート構造を示す（図1-14B）以外は、SAA (1-42) および (43-76) ペプチドはいずれもヘパリン存在下でランダム構造のままであった（図1-14C、図1-15B、C）。

SAA (1-42) ペプチドおよび SAA1.1 (43-76) ペプチドが形成する線維の形態を明らかにするために、AFM 観察を行った。ヘパリン非存在下についても観察を行ったが、凝集体は一切観察されなかった。図1-16は pH 4.0、ヘパリン存在下における SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドの AFM 画像を示している。SAA (1-42) ペプチドはいくつかの画像で短い線維がわずかに観察されたが、ほとんどの画像において主に球状の凝集体が観察された（図

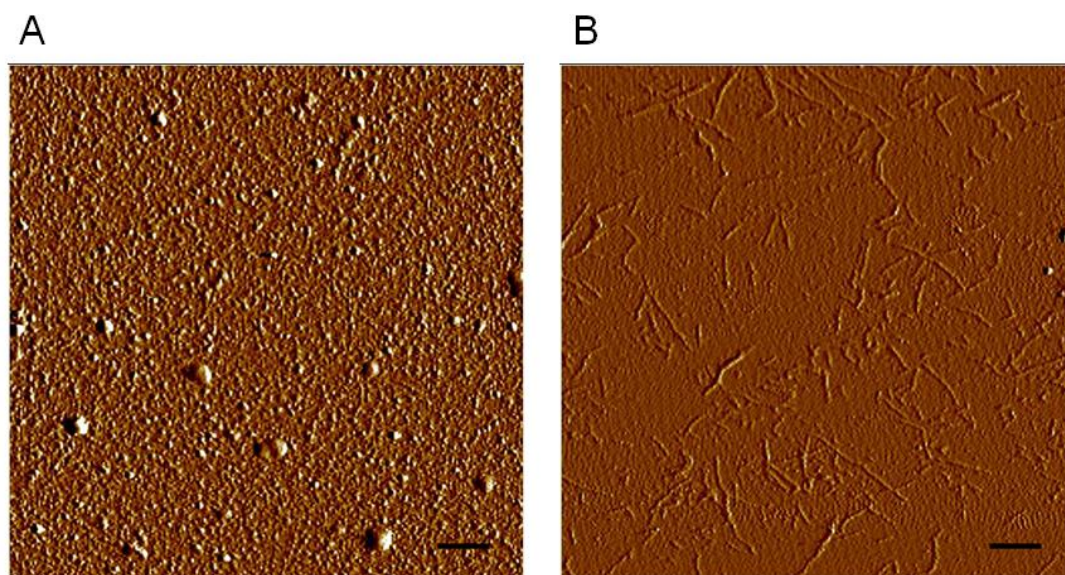


図1-16. (A) SAA (1-42) ペプチドおよび (B) SAA1.1 (43-76) ペプチドのヘパリン存在下の AFM 画像（スケールバー：0.5  $\mu\text{m}$ ）

1-16A)。典型的な線維の形成を示す ThT 蛍光の増大と  $\beta$  シート構造を示す CD スペクトルが観察されたにもかかわらず、このような形態が観察されたことは矛盾しているようにも思われるが、後述するように同じ実験条件において SAA 全長蛋白質でも同じ現象が観察されている。対照的に、SAA1.1 (43-76) ペプチドではねじれた線維が観察された (図 1-16B)。

#### 4. 全長蛋白質を用いた SAA 線維形成におけるアイソフォーム間の比較検討

前項までの検討により SAA1.1 分子の N 末端および中間領域がヘパリンによって線維形成が誘導される領域であることを明らかにした。次に、N 末端領域と、アイソフォーム間で異なる線維形成能を示す中間領域とを併せ持つ全長蛋白質を用いて、各 SAA アイソフォームの線維形成能について検討した。SAA 断片化ペプチドはペプチドの鎖長が短く、溶液中ではペプチド単独では二次構造を形成していなかった。しかしながら、SAA 全長蛋白質は 104 残基から構成されており、溶液中において二次構造を形成することが予想された。そこで、まず溶液中での SAA 全長蛋白質の二次構造を CD 測定によって解析した。全長蛋白質は実験を始める前に 4 M 尿素で変性後、4°C で一晩透析することにより、リフォールディングさせた。図 1-17A は 4°C および 37°C における SAA1.1 の CD スペクトルを示している。4°C では 208 および 222 nm 付近に 2 つの極小値を持つ CD スペクトルが観察され、 $\alpha$  ヘリックス構造を形成していることが示された。一方で、37°C では、ランダム構造であった。37°C で測定後のサンプルを 4°C で測定した場合にも同様に  $\alpha$  ヘリックス構造の形成が示された。SAA1.3 および SAA1.5 においても同様の結果が得られた。37°C において SAA が高次構造を形成することができるのかを検討するため、 $\alpha$  ヘリックス構造の形成を促すトリフルオロエタノール (TFE) を加えて CD スペクトル測定を行った結果、37°C においても TFE 濃度依存的に  $\alpha$  ヘリックス構造の形成度合いが上昇することが示された (図 1-17B)。つまり、SAA 分子は 4°C から 37°C への温度の上昇により高次構造が壊れるが、その状態は不可逆的な変性状態ではなく高次構造を形成する能力を維持していることが示された。

pH の異なる 3 種類の緩衝液において、ヘパリン存在下で SAA1.1 全長蛋白質をインキュベートした結果、pH 4.0 および pH 5.6 において 37°C では ThT 蛍光の増大が観察された (図 1-18A)。高次構造を形成していた 4°C においても、pH 4.0 で ThT 蛍光の増大が観察され、pH 5.6 でも程度は低いものの ThT 蛍光の



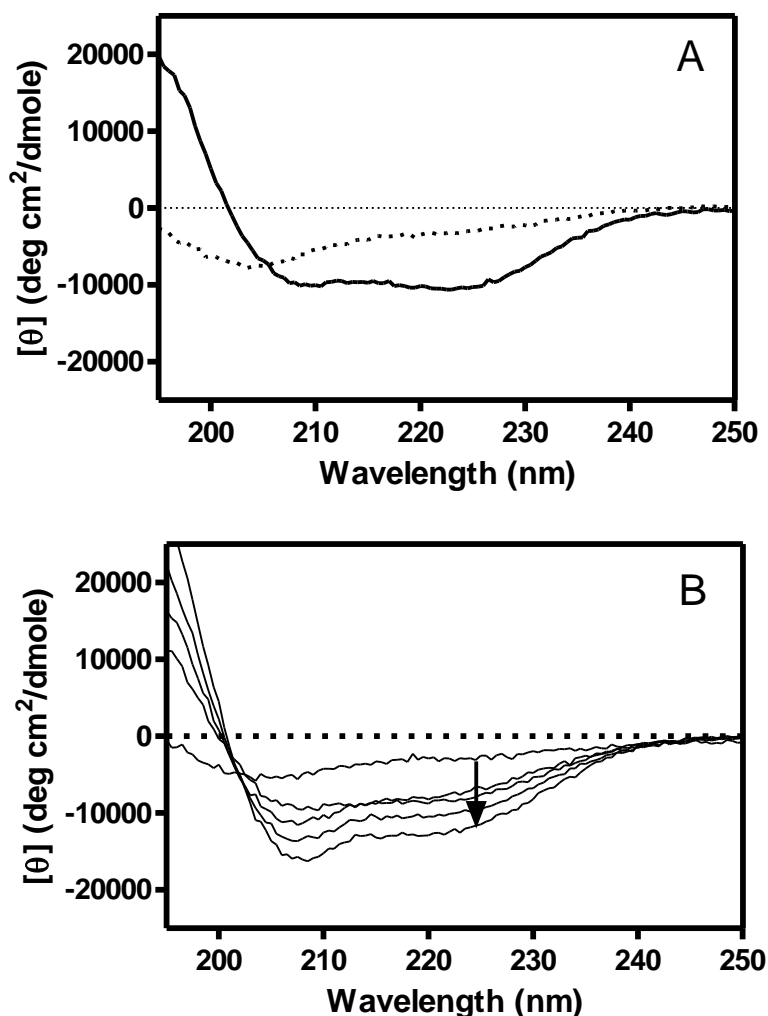


図1-17. (A) SAA1.1 全長蛋白質の CD スペクトル (pH 7.4) (実線: 4°C、破線: 37°C) (B) SAA1.1 全長蛋白質の TFE 存在下の CD スペクトル (37°C) (矢印の方向に TFE 0%、20%、40%、60%、80% の CD スペクトルを示す。)

増大が観察された。pH 7.4 ではいずれの温度においても ThT 蛍光はほとんど観察されなかった。

図1-19 A、B は酸性条件下 (pH 4.0)、37°C および 4°C でのヘパリン非存在下、存在下における SAA1.1 の CD スペクトルを示している。ヘパリン非存在下の両温度の CD スペクトルは pH 7.4 での結果と類似しており、SAA1.1 分子の二次構造に pH は影響を与えないことが示唆された。ヘパリン存在下、37°C でインキュベートした場合、SAA1.1 は  $\beta$  シート構造に特徴的な CD スペクトルを示した (図1-19 A)。一方で、ThT 蛍光の増大が観察されたにも関わらず、ヘパリン存在下 4°C でインキュベートした SAA1.1 分子の二次構造は 208 および

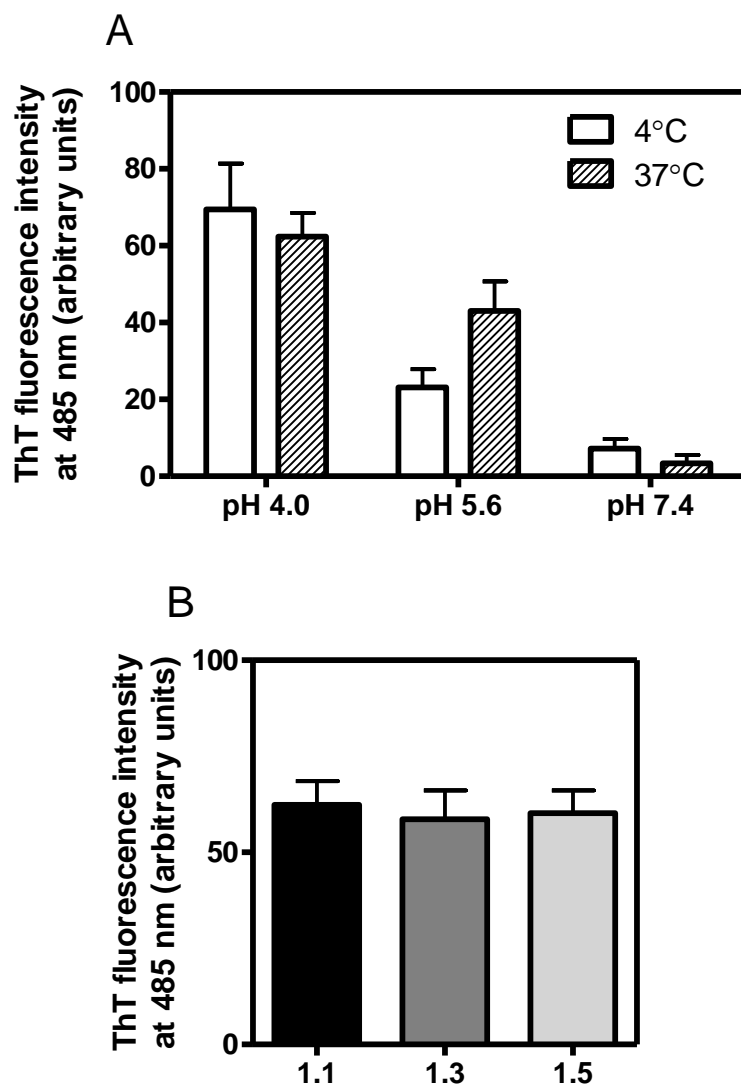


図1－18. (A) 4°C、37°C における SAA1.1 全長蛋白質の異なる pH の異なる緩衝液中での ThT 蛍光、(B) ヘパリン存在下、1 日インキュベートした SAA1.1、1.3 および 1.5 全長蛋白質に対する ThT 蛍光 (pH 4.0、37°C、Student's t-test no significant difference ( $n \geq 3$ ))

222 nm 付近に 2 つの極小値を保持したままであった (図 1－19B)。ThT 蛍光および CD 測定の結果より、SAA1.1 は 37°C および 4°C で線維形成することを示しているが、4°C においてはアミロイド線維の特徴である  $\beta$  シート構造を形成しておらず、典型的なアミロイド線維ではない。 $\alpha$  ヘリックス構造を形成した蛋白質によって構成される  $\alpha$  ヘリカル線維が存在することが知られ [39]、4°C に

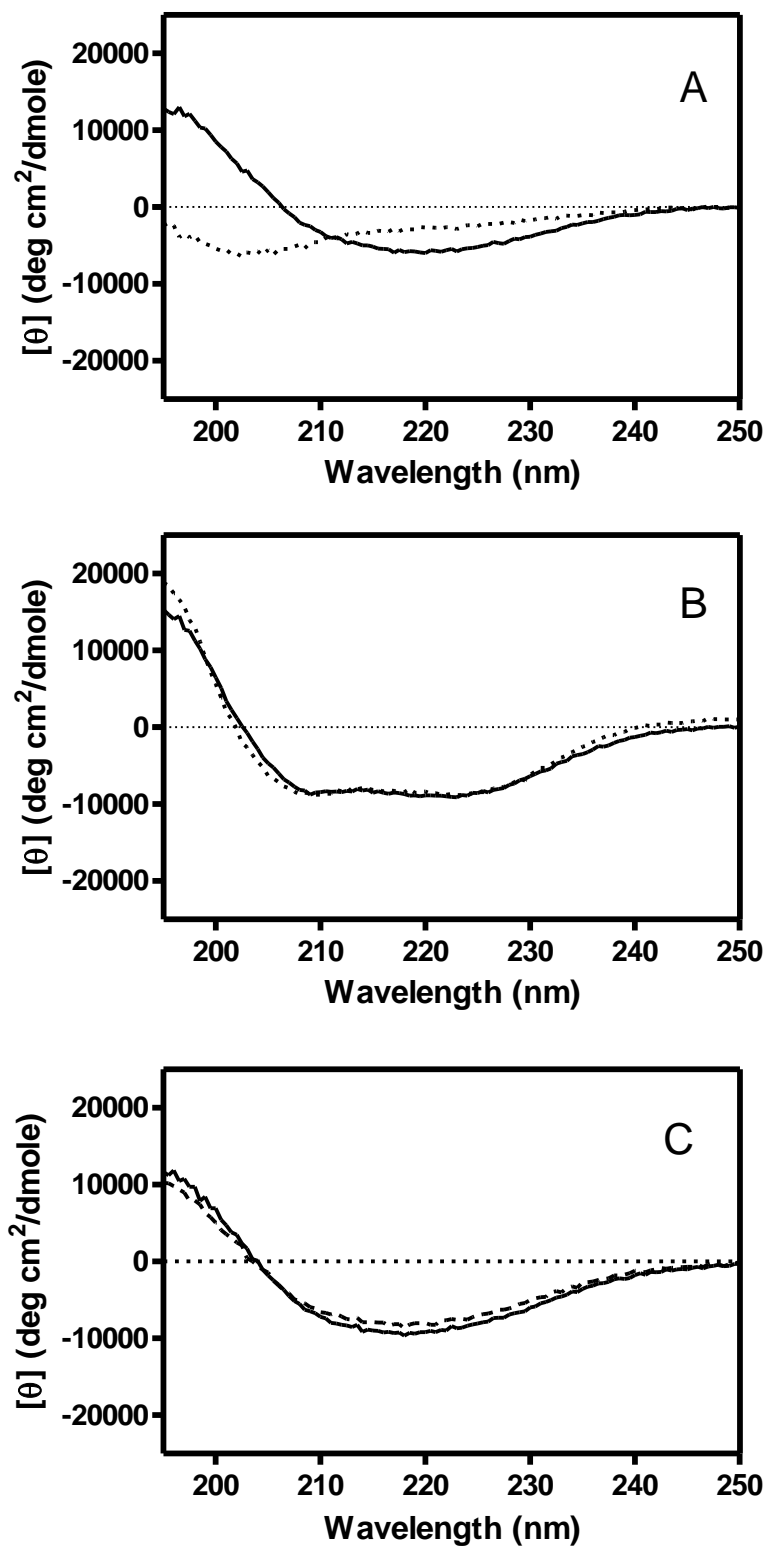


図1-19. SAA1.1 全長蛋白質の CD スペクトル (A) 37°C、(B) 4°C (pH 4.0)  
 (実線：ヘパリン存在下、破線：ヘパリン非存在下)、(C) SAA1.3 (実線) および  
 SAA1.5 (破線) 全長蛋白質のヘパリン存在下における CD スペクトル (37°C、pH 4.0)

においてはそのような線維もしくは線維形成前の  $\alpha$  ヘリカル中間体を形成しているのではないかと考えられる [40]。

次に、酸性条件 (pH 4.0) における 3 つの SAA アイソフォームの ThT 蛍光および CD スペクトルを比較した。SAA1.3 および SAA1.5 においても、37°C において、ヘパリンを添加することによって SAA1.1 と同程度の ThT 蛍光の増大が観察された (図 1-18B)。また、この時の CD スペクトルは両蛋白質共に  $\beta$  シート構造を示した (図 1-19C)。全長蛋白質においては、中間領域の断片化ペプチドを用いた検討により観察された図 1-9A、図 1-10 で示されたようなアイソフォーム間の線維形成能の違いは観察されなかった。

pH 4.0、37°C、ヘパリン存在下で形成される SAA 全長蛋白質の線維の形態を TEM によって観察した (図 1-20)。SAA1.1 は蛋白質濃度 50  $\mu\text{g/mL}$  において、ThT 蛍光の増大や  $\beta$  シート構造の形成が観察された条件下でインキュベートしたにもかかわらず、球状の凝集体が観察された (図 1-20A)。同様の TEM 画像が同条件下の SAA1.3 および SAA1.5 のサンプルでも観察された。ヘパリンの

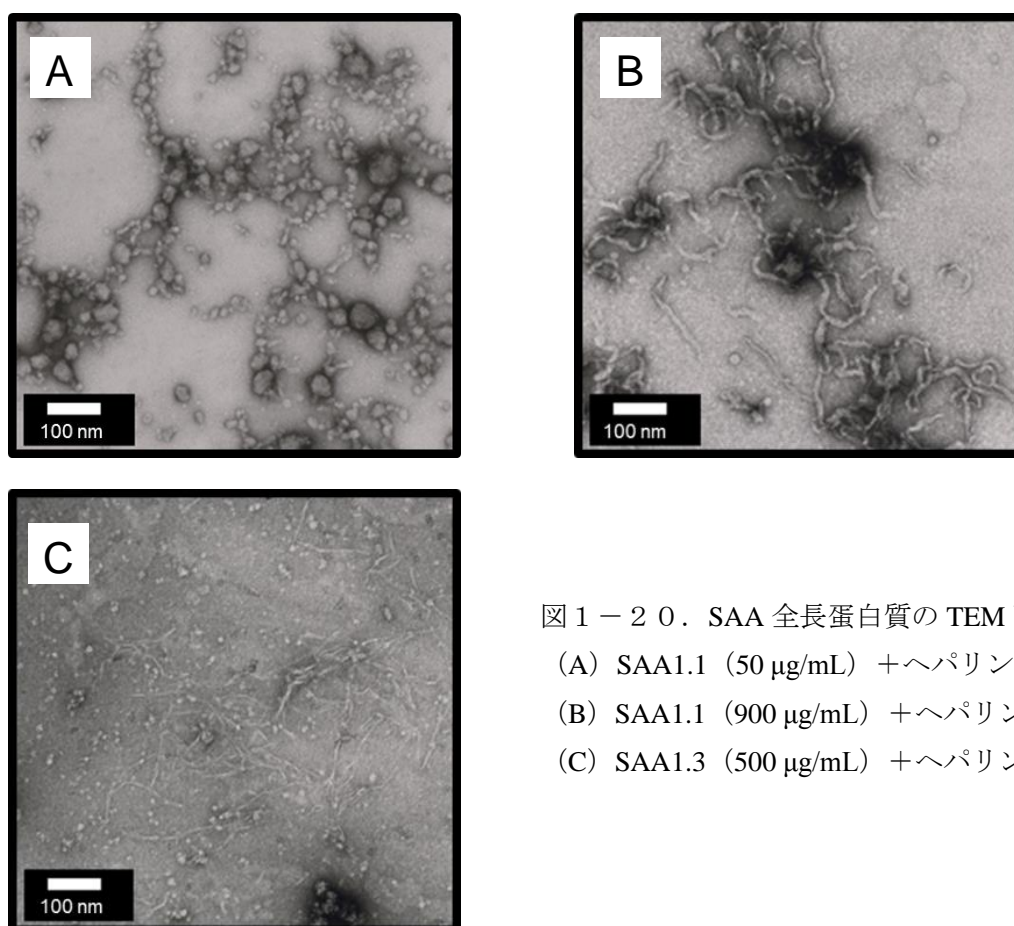


図 1-20. SAA 全長蛋白質の TEM 画像

- (A) SAA1.1 (50  $\mu\text{g/mL}$ ) +ヘパリン
- (B) SAA1.1 (900  $\mu\text{g/mL}$ ) +ヘパリン
- (C) SAA1.3 (500  $\mu\text{g/mL}$ ) +ヘパリン

濃度を変えずに、SAA1.1 濃度を 900  $\mu\text{g/mL}$  まで増加させたところ、ヘパリン添加直後に沈殿が検出された。これは 50  $\mu\text{g/mL}$  の蛋白質濃度の際には観察されなかった現象である。沈殿を懸濁させた溶液からはノイズの大きなスペクトルではあったが ThT 蛍光の増大が観察された。懸濁させた溶液の TEM 観察では、曲線状の線維が観察された (図 1-20B)。一方で、蛋白質濃度を 500  $\mu\text{g/mL}$  にした SAA1.3 溶液では直線的な形態の線維が観察された (図 1-20C)。

## 第4節 考察

pH 4.0 においてのみ ThT 蛍光の増大および  $\beta$  シート構造の形成が観察された SAA (1-27)、SAA1.1 (43-63)、および SAA1.1 (43-76) ペプチドの等電点 (pI) はそれぞれ 4.9、4.8、5.6 であり、一方、pH 4.0 および pH 5.6 において ThT 蛍光の増大および  $\beta$  シート構造の形成が観察された SAA (1-42) ペプチドおよび SAA1.1 全長蛋白質の pI はそれぞれ 6.8、5.9 である。つまり、pI 以下の pH において正に帯電したペプチドが負電荷を有するヘパリンとの相互作用により凝集し、線維が形成されると推察される。ちなみに、AA アミロイドーシス患者の臓器沈着物より主に検出される AA (1-76) ペプチドの pI は 5.6 である。したがって、SAA が原因蛋白質となるアミロイド線維の形成は酸性条件下において起こりやすいと考えられる。しかしながら、生体内においては、場合によっては年単位の長期間を経て線維が形成される。よって本章のような短期間の観察期間のみで、中性条件下において SAA が必ずしも線維を形成しないと断定することはできず、酸性条件は短期間で線維形成を加速する環境であると捉えるべきであろう。

SAA (1-27)、(1-42) ペプチドおよび SAA1.1 全長蛋白質の濃度 50  $\mu\text{g/mL}$  をそれぞれモル濃度に換算すると 15.3  $\mu\text{M}$ 、9.9  $\mu\text{M}$  および 4.2  $\mu\text{M}$  に相当する。一定濃度のヘパリンに対するペプチドの分子数が多い SAA (1-27) ペプチドにおいては線維状の凝集体が観察されたのに対して、分子数が少ない SAA (1-42) ペプチドおよび SAA1.1 全長蛋白質においては球状の凝集体が観察された。また、SAA1.1 全長蛋白質においてはヘパリン濃度を一定のまま、蛋白質の分子数を増加させたとき線維状の凝集体が観察された。線維の伸長過程においては、ヘパリンを足場とした蛋白質による凝集核の形成後に、伸長に寄与する遊離の蛋白質の集積により線維が形成されたと考えられる。上述した SAA の血中濃度を低濃度に維持することによるアミロイド沈着臓器の機能の維持もしくは改善は、

遊離の蛋白質の減少により新たな線維の形成が抑制されることによる効果であると考えられる。また、SAA (1-42) ペプチドおよび低濃度の SAA1.1 全長蛋白質において観察された球状の凝集体は線維が伸長する前段階の中間体であると考えられる [41]。

SAA1 の各アイソフォームに相当する中間領域ペプチドの線維形成能は、アイソフォーム間で異なった。アミノ酸はそれぞれに異なる二次構造形成傾向を有しており、Val は高い  $\beta$  シート形成傾向を持つ [42]。一般に、アミロイド線維を形成する蛋白質は  $\beta$  シート構造を形成している。SAA1.1 および 1.5 (43-63) ペプチドが 52 残基および 57 残基のいずれかに Val を有するのに対して、SAA1.3 (43-63) ペプチドは両残基に Ala 残基を有しており、 $\beta$  シート構造の形成傾向が異なることが線維形成能に違いをもたらしたのかもしれない。中間領域ペプチドの結果とは異なり、全長蛋白質では ThT 蛍光においてアイソフォーム間で違いは見られなかった。SAA 蛋白質の C 末端領域のヘパリンへの結合が、アイソフォーム間の線維形成能の違いが見られなかった理由として考えられる。SAA 分子の C 末端領域は、AA アミロイドーシス患者の臓器沈着部位からは検出されておらず、線維形成に対して直接的な影響を及ぼさないことが実験結果からも明らかとなっているが、HS/ヘパリンへの結合領域であり、全長蛋白質の線維形成において、C 末端領域のヘパリンへの結合が他の領域のヘパリンへの結合を妨げる可能性がある。C 末端領域が線維形成に与える影響を考慮し、アイソフォーム間の線維形成能を明らかにするには、SAA (1-76) ペプチドを用いた評価が必要であると考えられる。しかしながら、これまで大腸菌による SAA (1-76) ペプチドの発現は、mRNA もしくは産生した蛋白質の安定性が低いことから困難であった。そこで、現在は SAA (1-76) ペプチドの化学合成を行い、これを用いて線維形成能を検討中である。

SAA アイソフォームによる線維形成の違いについて推定した概略図を図 1-21 に示す。N 末端領域のみに線維形成能を持つ SAA1.3 全長蛋白質は直線的な線維形態であり、SAA (1-27) ペプチドが形成する線維の形態と同様に一般的なアミロイド線維の形態に似ていた。一方、N 末端および中間領域の両方が線維形成能を持つ SAA1.1 全長蛋白質は一般的なアミロイド線維の特徴とは異なる太くて曲線的な線維を形成した。すなわち、中間領域のアミノ酸変異による線維形成能の有無が、全長蛋白質の線維形態に影響を及ぼすと示唆される。他のアミロイド線維において、線維の形態によって細胞にもたらす毒性が異なる

ことが知られている [43]。SAA についても線維の形態によって毒性が異なる可能性があると考え、上述のアイソフォーム間の線維形成能の違いとともに、SAA (1-76) ペプチドを用いて検討中である。

本章の結果より、SAA アイソフォームが線維の形成に影響を及ぼすことを明らかとした。しかしながら、日本人においては AA アミロイドーシス発症のリスク因子となる SAA アイソフォームは SAA1.3 と報告されているが、他の人種においては SAA1.1 がリスク因子であるという報告もあり、AA アミロイドーシス発症のリスク因子となる SAA アイソフォームが人種間で異なることが報告されている [44]。そのため、AA アミロイドーシス発症には SAA アイソフォームだけでなく、それ以外の因子も関与している可能性がある。そこで、次章において、線維の臓器沈着物から SAA 線維と共に見つかる GAG について検討することとした。

AAアミロイドーシス  
患者（日本人）

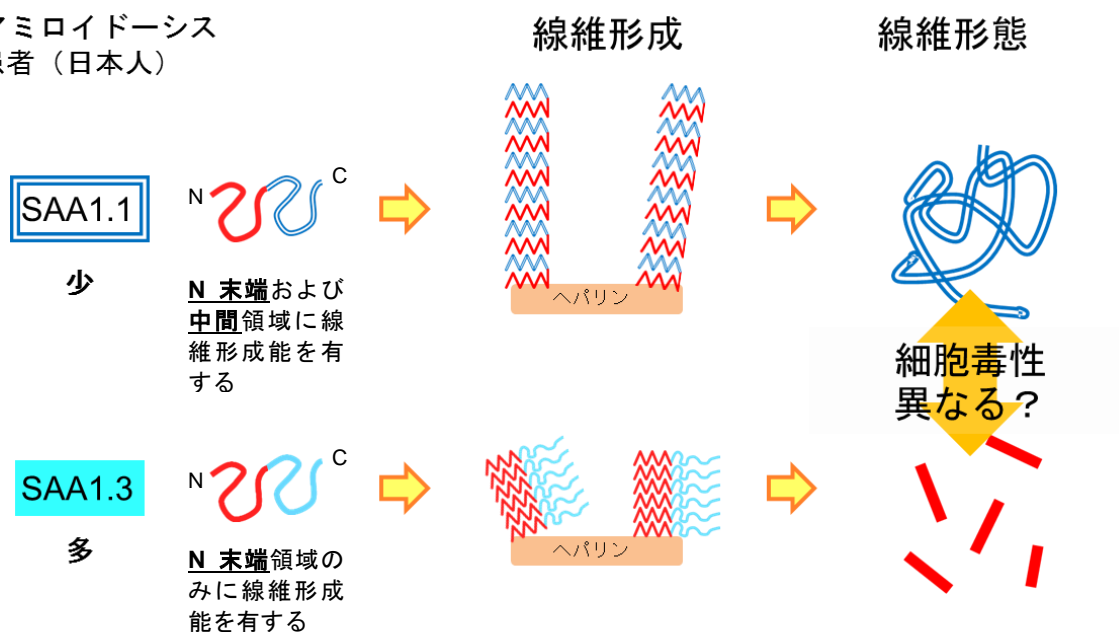


図1-21. SAA アイソフォームによる線維形成の違い（推定図）

## 第2章 SAA の線維形成を促進する GAG の構造要因の検討

### 第1節 緒言

GAG はウロン酸とアミノ糖の二糖単位の繰り返し構造と硫酸基による修飾を共通の特徴とする分岐のない直鎖状の多糖である (図 2-1)。GAG には構成する二糖の種類や硫酸基修飾の割合が異なる HS やコンドロイチン硫酸 (CS) といった種々の分子種が存在し、これらはコア蛋白質に結合し、プロテオグリカンの糖鎖部分として細胞外マトリックスに存在する。アミロイドーシス患者の臓器沈着部位から検出されるのは主に HS であるが、*in vitro* におけるアミロイド形成実験においては GAG の 1 つとしてヘパリンが汎用されている (図 2-2)。その理由として、ヘパリンは分子全体が高硫酸化されているという点で HS とは異なるが、糖鎖骨格を担う二糖構成は HS と同じであるため、HS の類似構造を持つモデル分子として使用しやすいこと、ヘパリンは安価であるため入手が容易であることなどが挙げられる。しかしながら、HS がほとんどの細胞で産生されるのに対して、ヘパリンは結合組織型肥満細胞によってのみ産生され、分泌顆粒内に蓄積されており [45]、臓器沈着部位からは検出されていない。第1章において、ヘパリンが SAA の線維形成に対して促進的に働くことを示したが、細胞外マトリックスに存在する GAG が線維形成を引き起こすのか、さらには、GAG のどのような構造要因が SAA の線維形成の促進に重要であるかは不明である。

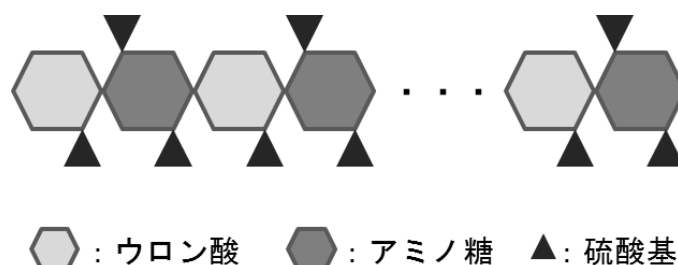


図 2-1. GAG のモデル図



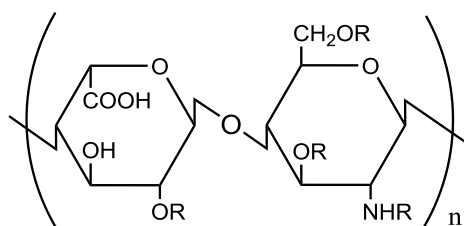


図2-2. ヘパリンの二糖繰返し構造および硫酸化部位  
(R は硫酸基による修飾可能な部位を示す。)

そこで第2章では、糖鎖構造や硫酸基修飾の割合が異なるヘパリンを含めた7種のGAG分子種、化学処理により段階的に硫酸基を脱離させた脱硫酸化ヘパリン、およびアニオン性高分子を用いてSAAの線維形成にGAGのどのような構造的特徴が影響を及ぼすのかを検討した。さらに、断片化ヘパリンを用いて、糖鎖の鎖長がSAAの線維形成に与える影響について検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 実験材料

ヘパリンナトリウム、デキストラン硫酸、ポリビニル硫酸およびコロミン酸はそれぞれCelsus Laboratories、和光純薬、Sigma-Aldrich、ナカライテスクから購入した。HS、デルマタン硫酸(DS)、CS-A、CS-D、CS-E、およびコンドロイチンは生化学工業から購入した。6、12、および20糖から構成されるヘパリン断片(dp6、dp12、dp20)はIduron社から購入した。緩衝液は10 mM 酢酸緩衝液(pH 4.0)を用いた。

### ペプチドの調製

ヒトSAA1.1分子のN末端(1-42残基)および中間(43-76残基)領域に相当するSAA断片化ペプチドを第1章第2節に記載した方法で調製した。

### ヘパリンの脱硫酸(ヘパリンピリジニウム塩の作製と脱硫酸反応)

脱硫酸化ヘパリンは井上らの方法を参考にして調製した[46, 47]。Bio-Rad社のAG 50W-X8 cation exchange columnを用いて、ヘパリンナトリウム塩のナトリウムを除去した後、ピリジンを用いて溶出液の中和を行い、凍結乾燥によりヘパリンピリジニウム塩の白い粉末を得た。硫酸化の割合が異なるヘパリンを

得るために、ヘパリンピリジニウム塩を 5% 含水 dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、20°C で 5 分 (脱硫酸化ヘパリン 1)、20°C で 20 分 (脱硫酸化ヘパリン 2)、50°C で 20 分 (脱硫酸化ヘパリン 3)、50°C で 90 分 (脱硫酸化ヘパリン 4) 反応させた。完全に脱硫酸化されたヘパリンを得るために、ヘパリンピリジニウム塩を 3 : 6 : 1 (v/v/v) の 1,4-dioxane—DMSO—methanol 混合溶液に溶解し、90°C で 2 時間 (脱硫酸化ヘパリン 5) 反応させた。反応後、それぞれの反応液を等量の超純水で希釈し、1.0 M 水酸化ナトリウムの添加により pH 9.0–9.5 になるよう調製した後に、超純水で透析を行った。

### ヘパリン分子中の硫酸基の定量

脱硫酸化ヘパリンの硫酸基含有量は比濁法によって測定した [48]。糖鎖から完全に硫酸基を加水分解するために、それぞれの脱硫酸化ヘパリンに 1.0 M 塩酸を加えたサンプルチューブを密封し、105°C で 5 時間反応させた。塩化バリウム—ゼラチン溶液を加えて混合後、室温で 20 分間静置し、GE Healthcare 社の Ultrospec 1100 pro を用いて、360 nm で硫酸バリウム由来の吸光度を測定した。検量線は濃度既知の硫酸を希釈したサンプルを同様に測定することによって得た。脱硫酸化ヘパリンの硫酸基の割合を未処理のヘパリンに対する相対値として算出した。

### ThT 蛍光、CD および AFM 測定

ThT 蛍光測定用、CD 測定用および AFM 測定用試料の調製およびそれらの測定については、第 1 章第 2 節に記載した方法に準じて行った。測定サンプルの各種 GAG、脱硫酸化ヘパリン、断片化ヘパリンおよびアニオン性高分子の濃度はいずれも 41 µg/mL になるように調製した。各化合物添加時の ThT 蛍光強度はヘパリン添加時の蛍光強度を 1 とした相対値として表した。なお、CD スペクトル測定には日本分光社の J-820 spectropolarimeter を用いた。

## 第3節 結果

### 1. GAG 分子種の線維形成促進効果

図 2-3A は SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドにヘパリンを加えたときの ThT 蛍光に対して、他の 6 つの GAG 分子種を加えたときの ThT 蛍光を比較した結果である。これら GAG は二糖の繰り返し構造の構成によって

HS／へパリンファミリーと CS／DS ファミリーの 2 つの主なファミリーに分けられる。HS／へパリンファミリーはグルクロン酸 (GlcA) もしくはイズロン酸 (IdoA) および *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の二糖で構成される。SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに HS を添加後 1 日インキュベートしたサンプルからはそれぞれ ThT 蛍光強度の増大が観察されたが、へパリンを添加したときと比べると低い蛍光強度を示した。図 2-3 B、C は HS 存在下における SAA (1-42) ペプチドの CD スペクトルと AFM 画像を示しており、実験条件は第 1 章でへパリンを用いたときと同じである。HS 存在下における SAA (1-42) ペプチドの CD スペクトル (図 2-3 B) は、図 1-14 A に示すへパリン存在下とは極小値が異なり、 $\beta$  シート構造が示す典型的なスペクトルに近い波形となった。この波形をコンピュータプログラム BeStSel を用いて解析した結果、HS 存在下における SAA (1-42) ペプチドの二次構造は  $\beta$  シート構造 46.8%、 $\alpha$  ヘリックス構造 8.5%を含むことが見積もられ、へパリン存在下に比べ  $\beta$  シート構造の割合が約 10%増加した。また、AFM 画像からも HS 存在下における SAA (1-42) ペプチドでは直線的な短い線維が観察され、図 1-16 A のへパリン存在下で観察された球状の凝集体とは異なった。へパリンと HS は基本的な糖鎖骨格が同じであるものの、この 2 つの間には線維形成に影響を及ぼす糖鎖骨格以外の違いが存在することが示唆された。一方、CS／DS ファミリーは GlcA もしくは IdoA および *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の二糖で構成される。SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに対して、CS-D および CS-E の添加はへパリンの添加と同等の ThT 蛍光強度の増大をもたらしたが、CS-A および DS はへパリンに比べると ThT 蛍光の増加割合は小さいものの、ThT 蛍光の増大が観察された。GAG を構成する糖の種類が異なっても SAA の線維形成に対する促進的な効果が失われることはなかった。しかしながら、化学処理により硫酸基が除かれているコンドロイチンの添加時には SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドのどちらのサンプルからも顕著な ThT 蛍光の増大は観察されなかった。

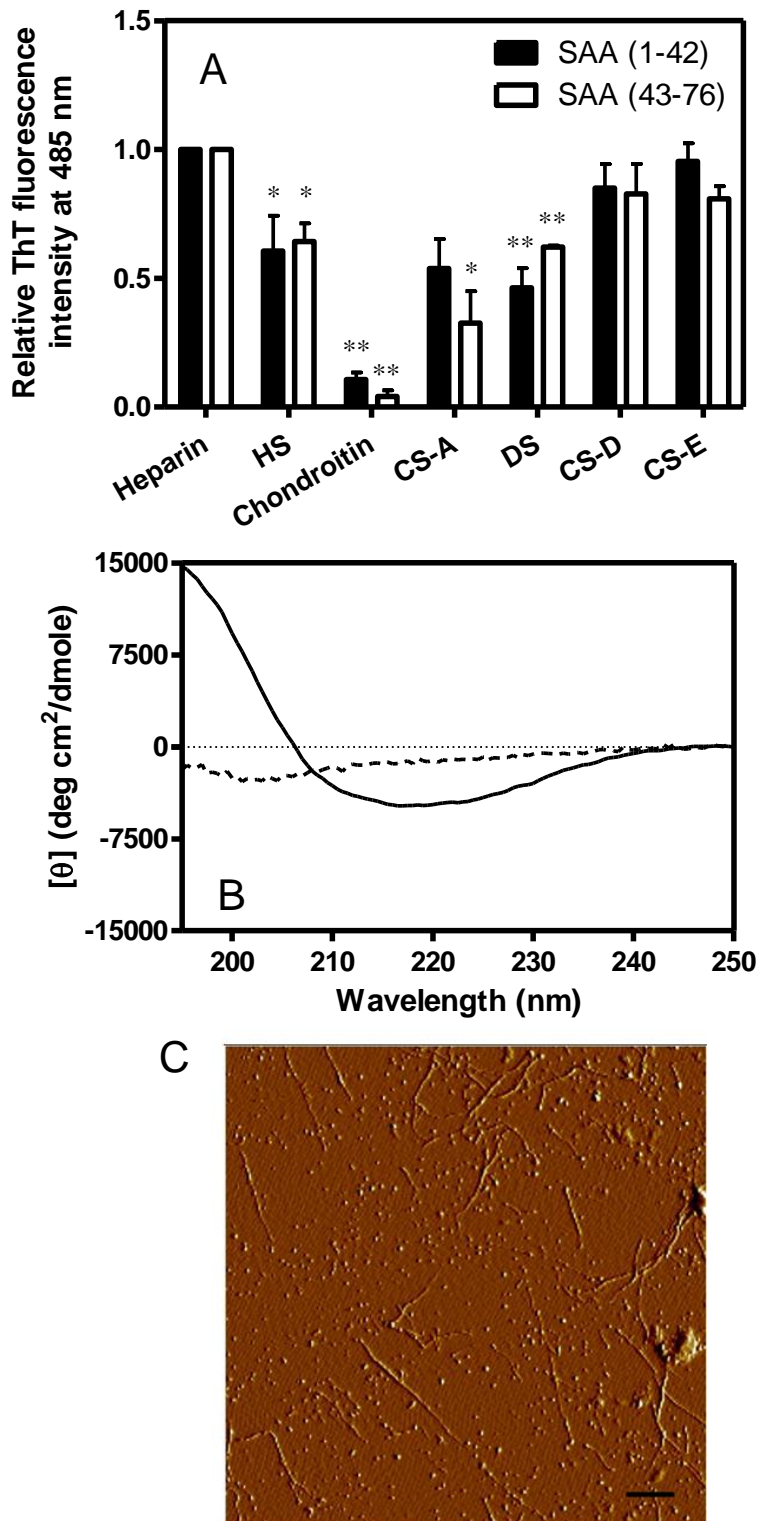


図2-3. (A) SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドの GAG 分子種存在下の ThT 相対蛍光強度 (One sample t-test \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  ( $n \geq 3$ )), (B) SAA (1-42) ペプチドの CD スペクトル (実線: HS 存在下、破線: ペプチドのみ)、(C) SAA (1-42) ペプチドの HS 存在下における AFM 画像 (スケールバー:  $0.5 \mu\text{m}$ ) (A) - (C) は全て pH 4.0、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベートした。

GAG 分子種間には、単糖の構成だけではなく硫酸基においても違いがある。例えば、ヘパリンは HS に比べて二糖単位の硫酸基の割合が高い。CS/DS ファミリーのメンバーは硫酸基の割合が異なり、硫酸基含有量の少ない方から CS-A、DS、CS-D、CS-E となる。これらのことより、ThT 蛍光の増加割合はヘパリンを含めこれら GAG 分子種の硫酸基含有量と相関していると考えた。

## 2. 脱硫酸化ヘパリンの線維形成促進効果

線維形成に及ぼす GAG 分子の硫酸基含有量の効果を直接的に評価するために、異なる硫酸基含有量を有する 5 つの脱硫酸化ヘパリン 1-5 を準備した。今回脱硫酸化ヘパリン 1-4 に対して行った反応はグルコサミンのアミノ基に結合した硫酸基を脱離させる方法であり、最も過酷な反応条件で行った脱硫酸化ヘパリン 4 ではほとんど全てのアミノ基の硫酸基が脱離したと推測される。完全脱硫酸反応を行った脱硫酸化ヘパリン 5 ではヒドロキシ基に修飾された硫酸基も脱離し、硫酸基含有量は検出限界値以下となった。SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに脱硫酸化ヘパリン 1-5 を添加した結果、ThT 蛍光はヘパリン分子中の硫酸基の割合と共に徐々に減少した (図 2-4)。これらの結果は SAA の線維形成が GAG の硫酸基割合によって影響を受けることを示唆している。

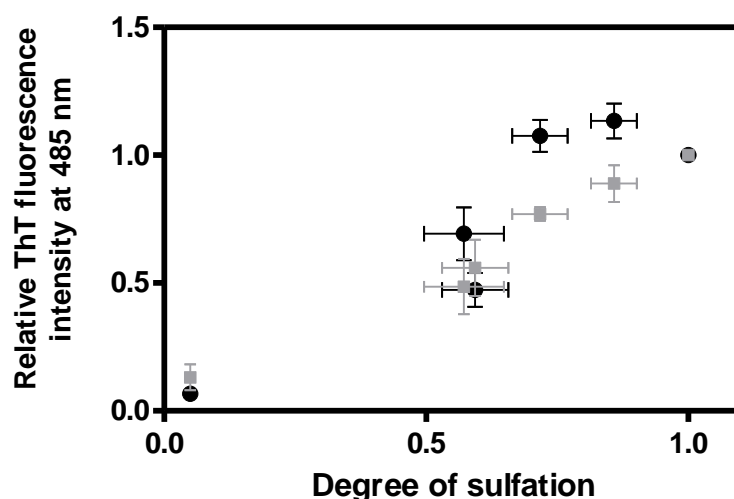


図 2-4. SAA (1-42) ペプチド (●) および SAA1.1 (43-76) ペプチド (■) の脱硫酸化ヘパリン存在下の ThT 相対蛍光強度

### 3. アニオン性高分子の線維形成促進効果

GAG は分子全体が硫酸基修飾されたアニオン性高分子である。そこでさらに、糖構造や酸性官能基の種類が異なるアニオン性高分子を用いて、線維形成に影響を及ぼす GAG の構造について検討した。図 2-5 は用いた 3 種のアニオン性高分子の構造式を示している。デキストラン硫酸は硫酸化グルコースの重合体であり、GAG と同様に分子内に糖構造と硫酸基を併せ持っている。ポリビニル硫酸は硫酸化アルキル鎖の重合体であり、糖構造は持たないが分子全体が高度に硫酸化されている。コロミン酸は *N*-アセチルノイラミン酸の重合体であり、糖構造を持つが硫酸基を持たず、カルボキシ基を持っている。SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドにアニオン性高分子を加えたときの ThT 蛍光強度をヘパリン添加時の相対値として表したグラフを図 2-6 A に示し、それぞれの CD スペクトルを図 2-6 B、C に示している。デキストラン硫酸は SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに対してヘパリンと同等の ThT 蛍光の増大効果を示し、それぞれのペプチドの CD スペクトルはヘパリンを添加した時とよく似ていた。ポリビニル硫酸は、SAA (1-42) ペプチドに対してはヘパリンと同等の ThT 蛍光の増大効果をもたらし、CD スペクトルもヘパリン添加時とほとんど同じ形状のスペクトルを示した。一方、SAA1.1 (43-76) ペプチドに対してはポリビニル硫酸がヘパリン以上の ThT 蛍光の増大効果をもたらし、CD スペクトルは極小値が高波長側に移動した。カルボキシ基を有するコロミン酸添加時には SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドにおいて、ThT 蛍光と CD スペクトルのどちらにおいてもペプチドのみの時と比べて変化は観察されなかった。これらの結果から GAG 分子の二糖の骨格構造よりも硫酸基の存在が SAA の線維形成の促進に重要であることが示された。

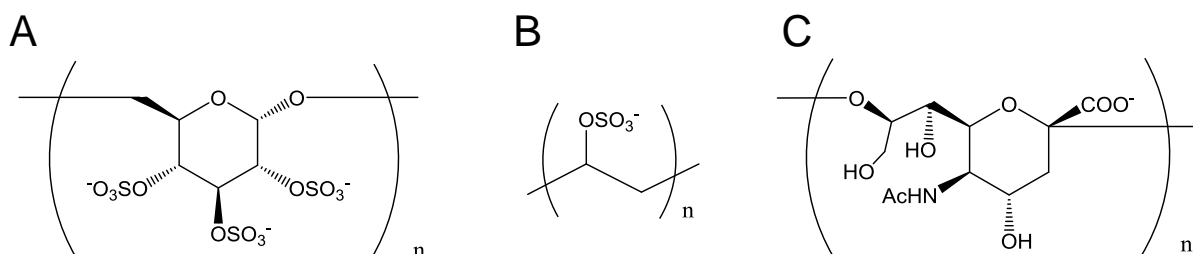


図 2-5. アニオン性高分子の構造式

(A) デキストラン硫酸、(B) ポリビニル硫酸、(C) コロミン酸

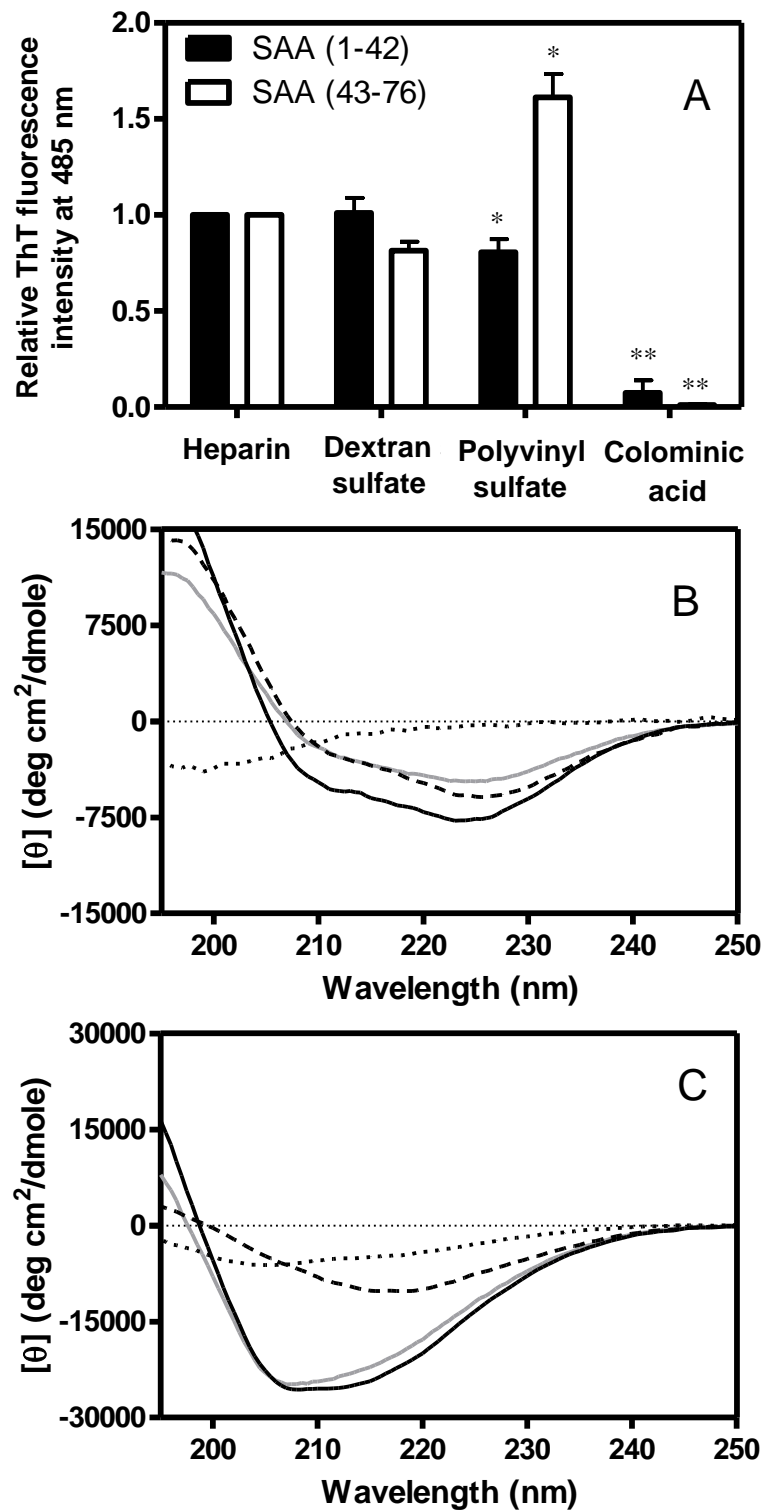


図2-6. (A) SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドのアニオン性高分子存在下の ThT 相対蛍光強度 (One sample t-test \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  ( $n \geq 3$ )), SAA (1-42) ペプチド (B) および SAA1.1 (43-76) ペプチド (C) の CD スペクトル (pH 4.0, 37°C) (実線: デキストラン硫酸存在下、破線: ポリビニル硫酸存在下、点線: コロミン酸存在下、実線 (灰色): ヘパリン存在下)

#### 4. 断片化ヘパリンの線維形成促進効果

HS は他の GAG に比べて硫酸基含有量が低い [49]、図 2-3A のように SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに対して比較的高い ThT 蛍光強度の増大効果を示した。HS 分子は糖鎖の一部が高度に硫酸化された高硫酸化ドメインを分子内に有すると報告されている [50]。ヘパリンは HS と同じ二糖繰り返し構造を有しており、分子全体が高硫酸化された構造であるため、異なる鎖長に断片化されたヘパリン (dp6、dp12、dp20) を HS 分子内の高硫酸化ドメインのモデルとして使用した。図 2-7 は SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに断片化ヘパリンを加えたときの ThT 蛍光強度を、全長のヘパリン添加時に対する相対値として表したグラフである。SAA (1-42) ペプチドにおいて、dp20 存在下の ThT 蛍光強度はヘパリン存在下とほぼ同程度であったが、dp12、dp6 と糖鎖の鎖長が短くなると共に ThT 蛍光強度は減少した。SAA1.1 (43-76) ペプチドは断片化ヘパリン存在下の SAA (1-42) ペプチドに比べて ThT 蛍光が低く、dp6 および dp12 の添加によって観察された ThT 蛍光の増加はわずかであった。

dp20 存在下の SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドの CD スペクトルはヘパリン添加時とほぼ同じであったが、dp6 添加時にはペプチドのみの時の CD スペクトルとほとんど同じであった (図 2-8)。dp12 存在下においては、SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドの CD スペクトルは実験毎に  $\beta$

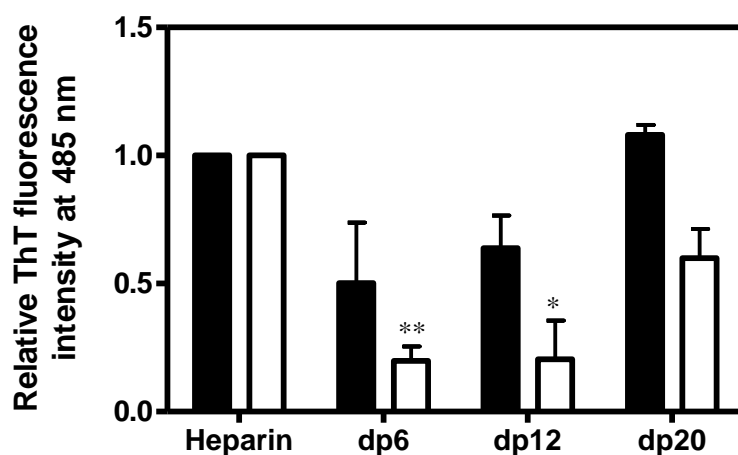


図 2-7. SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドの断片化ヘパリン存在下の ThT 相対蛍光強度 (One sample t-test \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  ( $n \geq 3$ ))



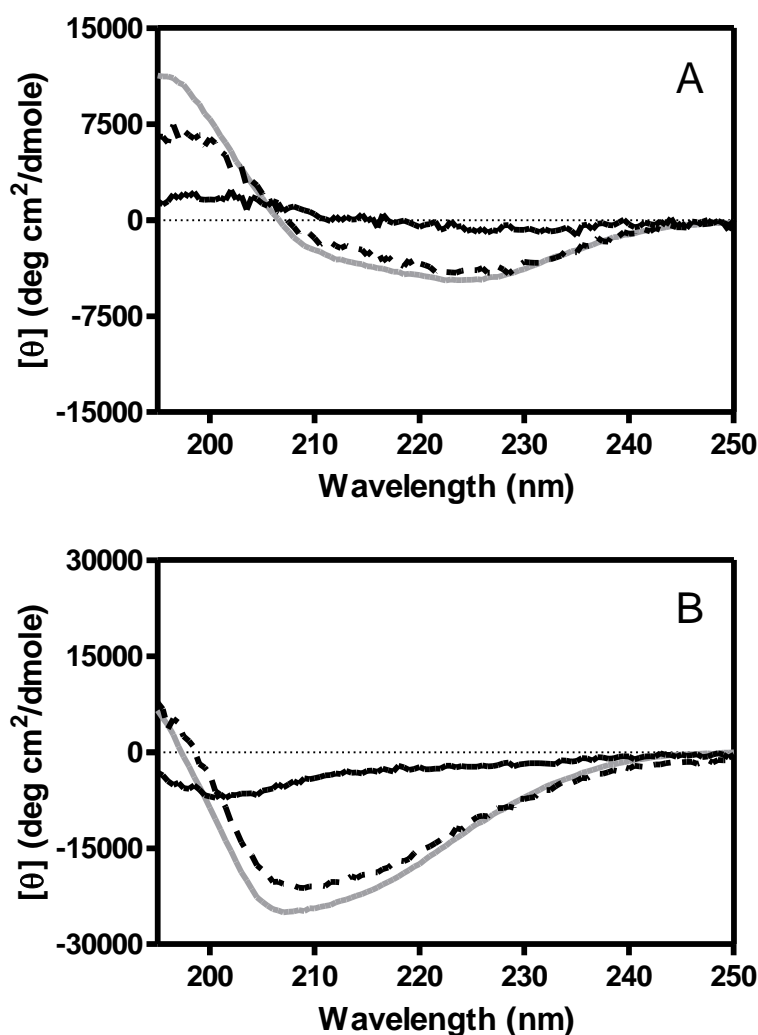


図2-8. SAA (1-42) ペプチド (A) および SAA1.1 (43-76) ペプチド (B) の CD スペクトル (pH 4.0、37°C) (実線 (黒色) : dp6 存在下、破線 : dp20 存在下、実線 (灰色) : ヘパリン存在下)

シート構造やランダム構造を示し、定まらなかった。以上の結果は HS が線維形成を促進するためには 12 糖以上の単糖によって構成された高硫酸化ドメイン構造が必要であることを示唆している。ヘパラーゼの発現を亢進させたマウスを用いた *in vivo* 実験において、ヘパラーゼを高発現した臓器では HS の鎖長が短くなり、アミロイド沈着が見られなかったとの報告がある [51]。これは、高硫酸化ドメインを含む HS 分子の鎖長が線維形成に影響を及ぼすことを示している。

## 第4節 考察

近年、種々の GAG 分子種を用いて、マウス SAA 全長蛋白質の線維形成に GAG が影響を及ぼすことが報告されているが、その構造的要因については明らかになっていなかった [52]。本章の研究結果から、ヒト SAA の線維形成に対して促進効果をもたらす GAG の構造要因の 1 つが、硫酸基であることが明らかとなった。デキストラン硫酸やポリビニル硫酸の添加による線維形成促進効果は、GAG 分子の二糖の骨格構造が線維形成には必須ではないことを裏付けている。SAA 以外のいくつかのアミロイド形成蛋白質の線維形成においても、GAG の硫酸基が促進的な働きを示すことが示唆されている [53, 54]

HS の硫酸基含有量はヘパリン以外の他の GAG と比べても少ない [49] が、第 1 章で述べたようにヘパリン存在下では SAA (1-42) ペプチドは球状の凝集体を形成していたのに対して、HS 存在下においては、SAA (1-42) ペプチドは短く直線的な線維を形成していた。ヘパリンは分子全体に SAA との相互作用を示す硫酸基が存在するのに対して、HS 分子内には、低硫酸化領域によって区切られた部分的に高度に硫酸化された高硫酸化ドメインが存在する [50]。第 1 章において、線維が形成されるには、線維の伸長に寄与する遊離の蛋白質が存在することが必要であると考察した。同様に、ヘパリンは分子全体に SAA との相互作用を示す硫酸基が存在し、ヘパリンの分子全体に SAA が凝集するために遊離の SAA が減少し、線維が伸長されなかったと考えられる。一方、HS は高硫酸化ドメインのみに SAA が局在すると考えられ、それによって HS に結合しない遊離の SAA が増加し、線維の伸長が効率的に進んだと考察した。したがって、生体内において SAA の線維形成が促進される際には硫酸基が集積した高硫酸化ドメインが重要であることが示唆された。

断片化ヘパリンを用いた検討により、線維形成に影響を与えるには、高硫酸化ドメインの長さも重要であることが示唆された。dp12 の添加時に SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドの CD スペクトルが定まらなかったが、ThT 蛍光強度の増大や  $\beta$  シート構造の形成が観察される場合もあったことから、線維形成を促進することが可能な高硫酸化ドメインは 12 糖程度以上の長さが必要であると考えられる。線維形成を促進するのに必要な硫酸化ドメインの鎖長は、トランスサイレチン、筋肉ホスファターゼ、ゲルゾリンでも示されているが、その鎖長は蛋白質によって異なる [31, 55, 56]。HS には分子内に約 14-16 糖の長さの高硫酸化ドメインが存在すると報告されている [57]。この長さが

SAA の線維形成を促進するのに十分な長さであるために、HS が AA アミロイドーシス患者の組織沈着部位から線維と共に検出されるのかもしれない。

SAA の線維形成において GAG の硫酸基との相互作用が促進的に働くことから、この相互作用を阻害することは AA アミロイドーシスの予防もしくは治療につながると考える。事実、*in vivo* において、硝酸銀により炎症を引き起こし、アミロイド増強因子 (AEF) によりアミロイドーシスを誘発したマウスに対し、ポリビニル硫酸を経口投与した結果、マウス脾臓におけるアミロイドの沈着量がコントロール群に比べて減少したとの報告がある [58]。また、低分子量の GAG 模倣分子がアミロイドーシスの治療薬として開発されている [59, 60]。SAA においては、dp12 以上の鎖長が線維形成の促進効果をもたらすこと、また GAG 分子の二糖の骨格構造が SAA との相互作用に必須の構造ではないことから、低分子量の GAG 模倣分子を用いることにより、線維形成を促進させることなく、SAA と生体内 GAG との相互作用を阻害し、その結果、組織へのアミロイド沈着を抑えることが出来るのではないかと考える。以上のように本章において行った SAA と GAG との相互作用についての分子レベルでの検討は、AA アミロイドーシスの治療へ向けた合理的な薬剤設計の基盤を提供することになると考える。

第1章において、ヒト SAA アイソフォームが AA アミロイドーシス発症のリスク因子になり得ることが示唆されたように、マウスにおいてもアイソフォームで疾患発症リスクが異なると考えられている。しかしながら、AA アミロイドーシス感受性マウスの CBA/J マウスと AA アミロイドーシス耐性マウスの CE/J マウスでは、発現する SAA アイソフォームのみならず、GAG の発現も異なることが知られている [61]。ヒトにおいても人種間で AA アミロイドーシス発症のリスク因子となる SAA アイソフォームが異なる理由、特定の臓器にのみ SAA 線維が沈着する理由や慢性炎症性患者における AA アミロイドーシス発症が個人間で異なる理由が、GAG の分布や硫酸基修飾の割合を解析することによって解明できるかもしれない。

## 第3章 SAA の線維形成に脂質が与える影響

### 第1節 緒言

SAA は HDL 構成蛋白質として、生体内において主に脂質に結合した状態で存在する。これまでの研究より、4°C において、SAA は  $\alpha$  ヘリックス構造が豊富な六量体を形成することが示された [62]。また、X 線結晶構造解析の結果から、SAA はアポリポ蛋白質に共通の構造モチーフである four-helix bundle 構造を持つことが知られている [63]。しかし、これらの結果は、いずれも生体環境とは異なる温度条件や脂質非存在下での実験結果であるため、必ずしも生体内における SAA の構造を反映しているとは限らない。実際に、第1章の図1-17において、SAA 分子が生理的温度である 37°C では二次構造を保持していないことをすでに明らかにしている。また、生体内では脂質に結合することで、脂質非存在下とは異なる高次構造を形成している可能性も考えられる。

第1章および第2章では、遊離型 SAA を用いて、GAG が SAA の線維形成に及ぼす影響について評価した。線維形成能を有することが示された SAA の N 末端領域はリン脂質からなるリポソームへの結合能を持つ [19] ことから、SAA と脂質との疎水性相互作用を介した両者の結合に伴って SAA の高次構造が変化し、それによってアミロイド線維の形成に影響を及ぼすことが考えられる。

そこで第3章では、断片化ペプチドおよび全長蛋白質を用いて脂質が SAA の線維形成に及ぼす影響について検討を行った。まず初めに、脂質ミセルを用いて検討を行うとともに、生体内における SAA の構造を反映した SAA-HDL モデル粒子を作製し、それを用いた検討も併せて行った。さらに、遊離および SAA-HDL モデル粒子中の SAA を用いて、熱に対する構造安定性を比較することにより、脂質によってもたらされる高次構造の変化について検討した。

### 第2節 実験材料および方法

#### 実験材料

Lysophosphatidylcholine (lysoPC) は Sigma-Aldrich、lysophosphatidic acid (lysoPA) は Avanti Polar Lipids、dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) は NOF Corporation

から購入した。緩衝液としては 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、もしくは 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) を用いた。他の全ての試薬は特級を使用した。

#### ペプチドと蛋白質の調製

SAA (1-27) ペプチド、SAA1.1 (43-63) ペプチド、SAA 全長蛋白質を第 1 章第 2 節に記載した方法で調製した。

#### 脂質ミセルの調製

クロロホルムに溶解した lysoPC もしくは lysoPA を必要量容器に移し、溶媒を除去させながら容器の内壁に脂質の薄膜を形成させ、一晚真空乾燥することで完全にクロロホルムを除去した。脂質の薄膜を超純水で水和させ、懸濁液を作製した。脂質の定量は酵素法もしくはバートレット法 [64] により行った。

#### DMPC クリアランス評価

クロロホルムを除去して形成した DMPC の薄膜をリン酸緩衝液で水和させ、多重膜リポソームの懸濁液を得た。液体窒素による凍結および温水による融解を繰り返すことで一重膜リポソームを作製した。可溶性アポリポ蛋白質と DMPC リポソームを、そのゲル液晶相転移温度でインキュベートするとディスク状の HDL 様粒子が形成される。この HDL 作製法を自己集合法という [65]。SAA を DMPC リポソームと 1 : 1 (w/w) の割合で混合し、Hitachi F-7000 spectrophotometer を用いて直角方向に散乱する光の強度を測定することにより、可溶化挙動を追跡した[66]。励起および蛍光波長は 600 nm に設定し、全ての測定は DMPC リポソームのゲル液晶相転移温度である 24.6°C で行った。得られたデータを指数関数  $Y = A \exp^{-kt} + B$  を用いてフィッティングした。Y は 600 nm での散乱光強度、A は濁度の変化 (pool size)、k は速度定数、t は時間、B は反応が終了したと仮定した時点において残存する濁度を示している。

#### HDL モデル粒子の作製

SAA と DMPC から構成される HDL モデル粒子は、DMPC クリアランス評価と同じように自己集合法によって作製した。脂質と蛋白質の質量比が 1 : 1 になるよう SAA を加え、24.6°C で 2 h インキュベートした。自己集合法により作製した SAA-DMPC 混合液から SAA-DMPC 複合体を分離するためゲル濾過クロ

マトグラフィーを行った。カラムは Superdex 200 column (60×1.6 cm) を使用し、Bio-Rad 社の Biologic FPLC を用いて流速 1 mL/min で溶出させた。溶出液は 280 nm の吸光度をモニタリングしながら 1 mL ずつ分取した。

#### 動的光散乱法 (DLS)

測定は Malvern 社の Zetasizer Nano ZS を用いて、室温もしくは 37°C で行った。粒子径は粒子の個数基準による粒子径分布から算出した平均値によって決定した。

#### 非変性濃度勾配ゲル電気泳動法 (NDGGE)

HDL モデル粒子を分離するために非変性 4%–20% Tris-glycine 濃度勾配ゲル電気泳動法を用いた。ゲルは Thermo Fisher Scientific 社の GelCode Blue Stain Reagent を用いた染色、もしくは PVDF 膜に転写後 Western blotting により解析した。Sigma-Aldrich 社の polyclonal rabbit anti-human SAA1 antibody を一次抗体として濃度 5 µg/mL で使用し、Cell Signaling Technology 社の HRP-linked goat anti-rabbit IgG を二次抗体として 1 : 1000 の希釈倍率で使用した。粒子径は GE Healthcare 社の high molecular weight protein standards との比較によって求めた。なお、この分子量マーカーに含まれる各球状蛋白質の粒子径は既に示されている [67]。

#### 透過型電子顕微鏡 (TEM)

作製した HDL モデル粒子 (蛋白質濃度 20–50 µg/mL) 1 µL を親水処理後のカーボン加工した銅グリッド (400 メッシュ) に滴下した。グリッドに等量の 2 % (w/v) モリブデン酸アンモニウムを加えて試料をネガティブ染色し、余分な溶液をろ紙を用いて慎重に取り除いた。作製した試料の観察には JEM-2200FS transmission electron microscope を使用した。

#### CD および ThT 蛍光測定

CD および ThT 蛍光測定については、第 1 章第 2 節に記載した方法に準じて行った。なお、CD スペクトル測定は日本分光社の J-820 spectropolarimeter を用いて、特記しない限り、37°C で行った。脂質結合能評価のための CD 測定用サンプルは lysoPC もしくは lysoPA、ペプチドもしくは蛋白質の濃度がそれぞれ 1 mM、

50  $\mu\text{g/mL}$ になるよう調製した。脂質存在下における線維形成能評価のための ThT 蛍光および CD 測定用サンプルは ThT を 10  $\mu\text{M}$ 、ヘパリンを 0 もしくは 41  $\mu\text{g/mL}$ 、lysoPC もしくは lysoPA を 0 もしくは 1 mM、ペプチドもしくは蛋白質の濃度が 50  $\mu\text{g/mL}$  になるよう調製した (CD 測定用サンプルは ThT を含まない)。なお、ThT 蛍光は遊離型の SAA 断片化ペプチドおよび全長蛋白質にヘパリン添加時の蛍光強度を 1 とした相対値として表す。

### Trp 蛍光測定

蛍光測定は F-7000 spectrophotometer を用いて行った。特記しない限り、測定は全て 37°C で行い、セルは層長 4×4 mm の石英セルを用いた。得られた結果は適切なブランクサンプルを差し引くことによって補正した。SAA の 18 残基目、54 残基目、および 86 残基目に位置する Trp 残基が発する蛍光を、295 nm で励起し、300–420 nm までをモニタリングした。

## 第3節 結果

### 1. リゾリン脂質を用いた評価

脂質への結合能および線維形成能を併せ持つ SAA (1–27) ペプチドおよび脂質へは結合せず線維形成能を有する SAA1.1 (43–63) ペプチドを用いて、線維形成に対して脂質が及ぼす影響を検討した。当初、リポソームに結合した SAA (1–27) ペプチドにヘパリンを共存させることにより線維形成に及ぼす脂質の影響を評価したが、リポソームもしくはペプチドの凝集に由来すると考えられる沈殿が析出して白く濁り、ThT 蛍光や CD 測定といった分光学的手法による評価が困難であった。そこで、リポソームに比べて粒子径の小さな脂質ミセルを用いることとした。疎水性基として 1 本の炭素鎖を持つリゾリン脂質の 1 つである lysoPC の臨界ミセル濃度 (CMC) は超純水中で 7  $\mu\text{M}$  であると報告されている [68]。酢酸緩衝液中に約 5 mM となるよう加えたときの lysoPC は DLS で粒子径を測定したところ、約 7 nm であり、典型的な球状ミセルとして存在していた (図 3–1)。まず、lysoPC ミセルへの結合性を評価するため SAA 断片化ペプチドに含まれる Trp の蛍光をモニタリングした。親水性環境下では Trp 残基の分子運動が制限されずエネルギーが周囲へ分散されるため Trp 蛍光スペクトルは長波長側に観察されるのに対して、Trp 残基が疎水性環境下 (低極性)、もしくは運動がより制限された環境下に置かれたときに Trp 蛍光スペクトルは短波

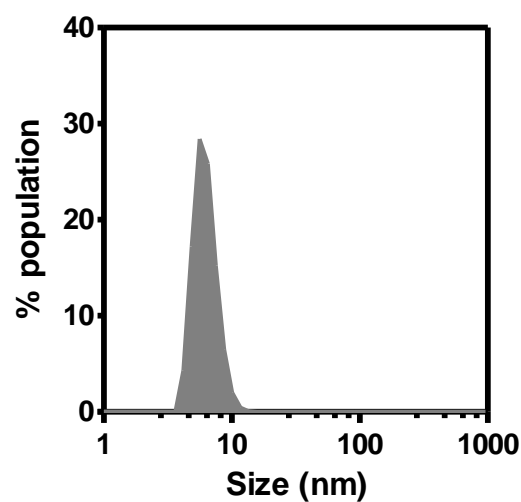


図3-1. pH 4.0 緩衝液における lysoPC 懸濁液の DLS 解析

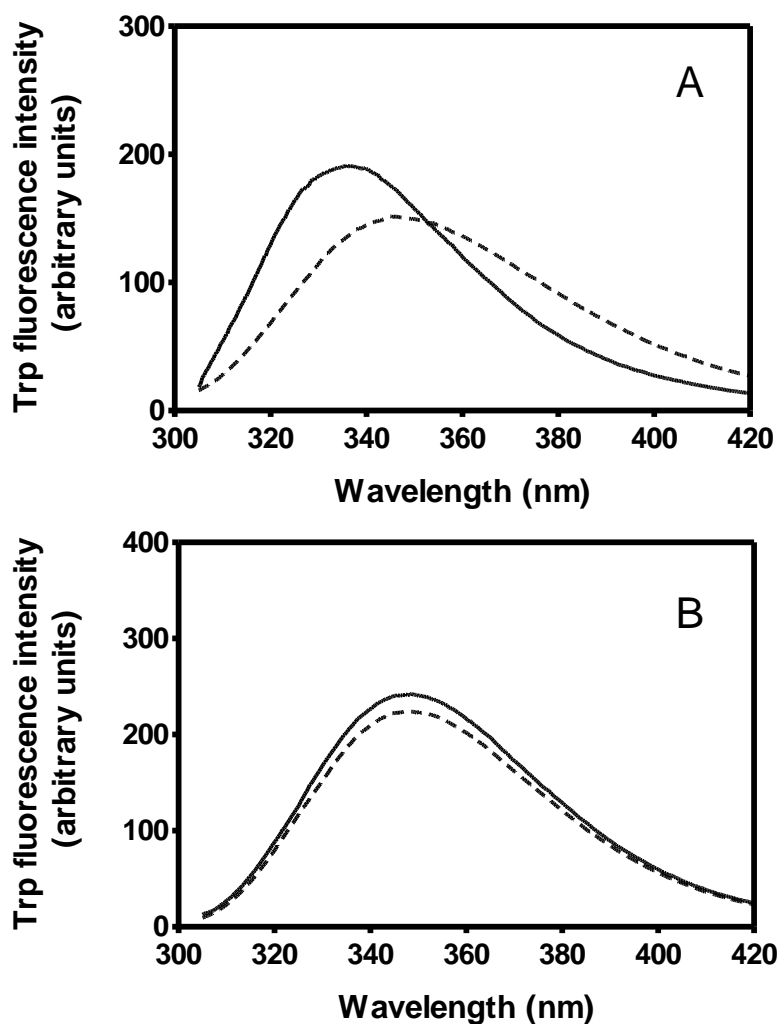


図3-2. lysoPC 存在下の SAA (1-27) ペプチド (A) および SAA1.1 (43-63) ペプチド (B) の Trp 蛍光 1.1 (37°C、pH 4.0) (実線：lysoPC 存在下、破線：lysoPC 非存在下)



長側にシフトする [69]。SAA (1-27) ペプチドの Trp 蛍光は酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中では  $345.3 \pm 2.9$  nm の最大蛍光波長 (WMF) を示したのに対して、lysoPC ミセルを添加した結果、WMF は  $335.9 \pm 4.1$  nm へとブルーシフトし、蛍光強度が増大した (図 3-2 A)。一方、SAA1.1 (43-63) ペプチドは lysoPC ミセルの存在下においても、Trp 蛍光波長のシフトや蛍光強度の変化は観察されなかった (図 3-2 B)。

アポリポ蛋白質の脂質への結合には、 $\alpha$  ヘリックス構造の形成を伴う。そこで脂質非存在下ではランダム構造を示す SAA ペプチドに、脂質ミセルを添加した際の二次構造の変化を CD 測定により観察した。SAA (1-27) ペプチドは lysoPC ミセル存在下では 208 nm と 222 nm に極小値を持つスペクトルを示し、 $\alpha$  ヘリッ

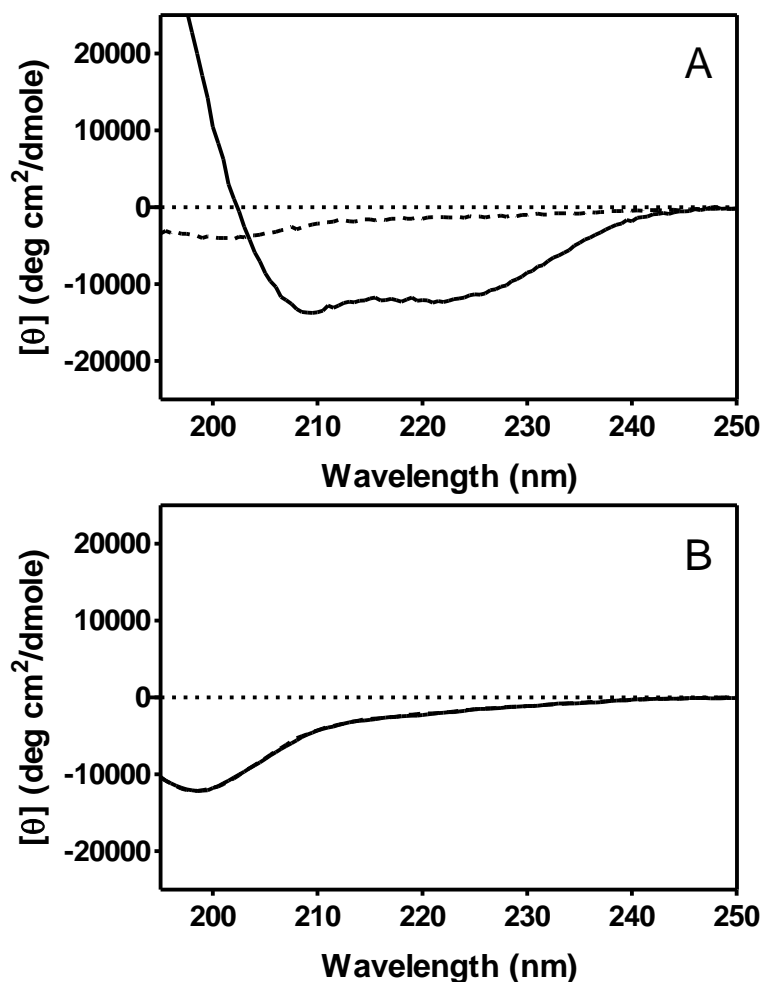


図 3-3. lysoPC ミセル存在下の SAA (1-27) ペプチド (A) および SAA1.1 (43-63) ペプチド (B) の CD スペクトル (37°C、pH 4.0) (実線 : lysoPC ミセル存在下、破線 : lysoPC ミセル非存在下)

クス構造を形成することが分かった（図3-3A）。一方、SAA1.1（43-63）ペプチドは lysoPC ミセル存在下においてもランダム構造を示したままで二次構造の変化は観察されなかった（図3-3B）。

lysoPC ミセル存在下において、線維形成促進効果を有するヘパリンを共存させることにより SAA ペプチドの線維形成に対して脂質が及ぼす影響について評価した。酸性条件下（pH 4.0）、SAA（1-27）および SAA1.1（43-63）ペプチドに lysoPC ミセルを添加した後にヘパリンを加え、37°C で1日インキュベートし、ThT の蛍光を測定した（図3-4）。lysoPC ミセル非存在下のペプチドに

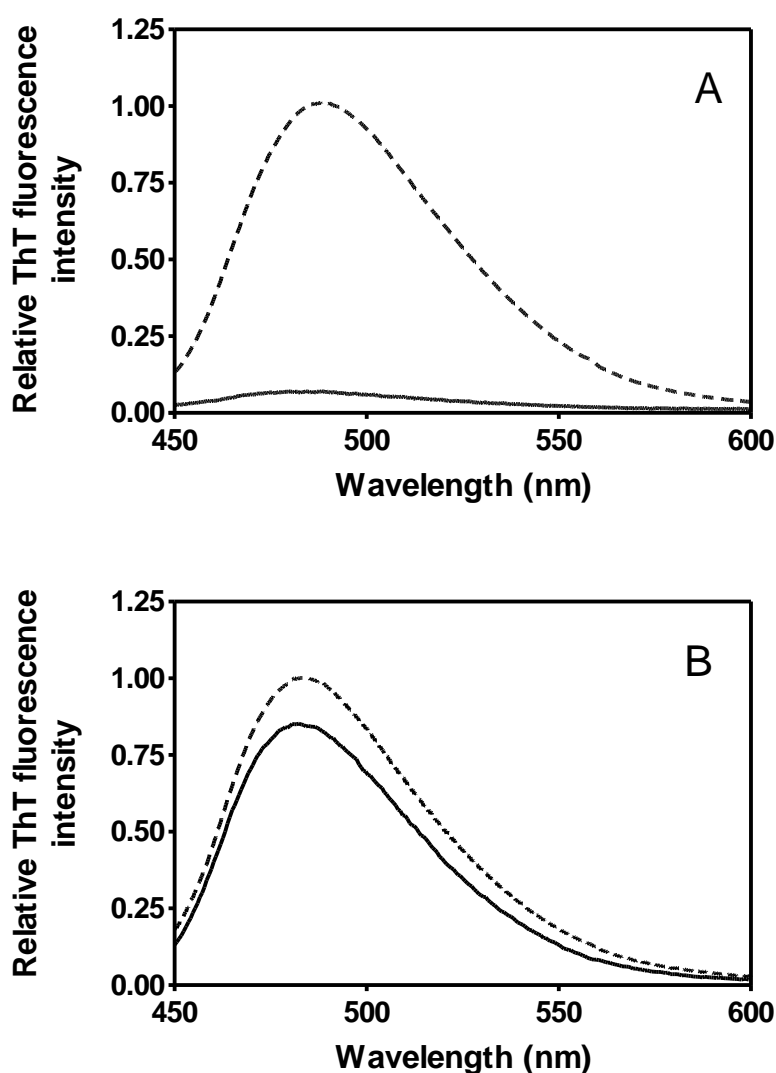


図3-4. lysoPC ミセル存在下の SAA（1-27）ペプチド（A）および SAA1.1（43-63）ペプチド（B）にヘパリンを共存させたときの ThT 蛍光スペクトル（37°C、pH 4.0）（実線：lysoPC ミセル存在下、破線：lysoPC ミセル非存在下）

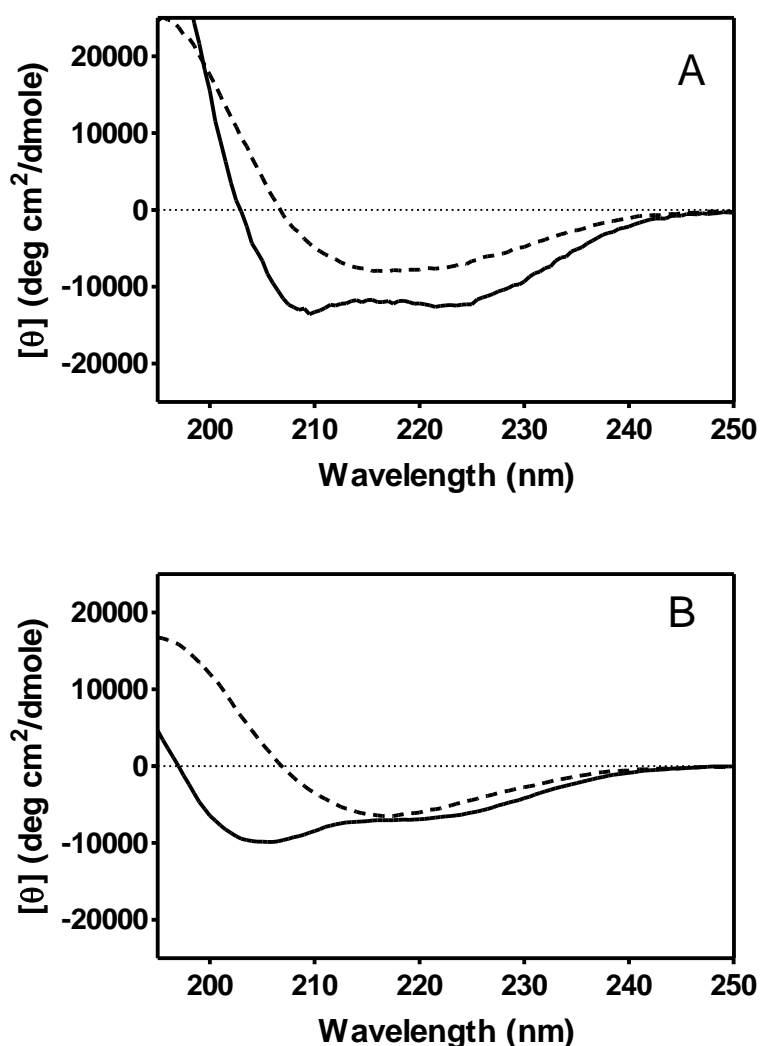


図3-5. 各種濃度の lysoPC 存在下の SAA(1-27) ペプチド(A) および SAA1.1(43-63) ペプチド(B) にヘパリンを共存させたときの CD スペクトル (37°C、pH 4.0) (実線: lysoPC ミセル存在下、破線: lysoPC ミセル非存在下)

ヘパリンを加えることによって ThT 蛍光強度が増大したが、lysoPC ミセル存在下の SAA(1-27) ペプチドでは ThT 蛍光の上昇は認められなかった (図3-4A)。この時、CD スペクトルはヘパリン非添加時と同様に  $\alpha$  ヘリックス構造を示した。(図3-5A)。つまり、SAA(1-27) ペプチドは脂質に結合して  $\alpha$  ヘリックス構造を形成することにより線維の形成が抑制されたと考えられる。一方、SAA1.1(43-63) ペプチドでは、lysoPC 存在下でも ThT 蛍光強度の増大が認められた (図3-4B)。この時、CD スペクトルはヘパリン非添加時 (図3-

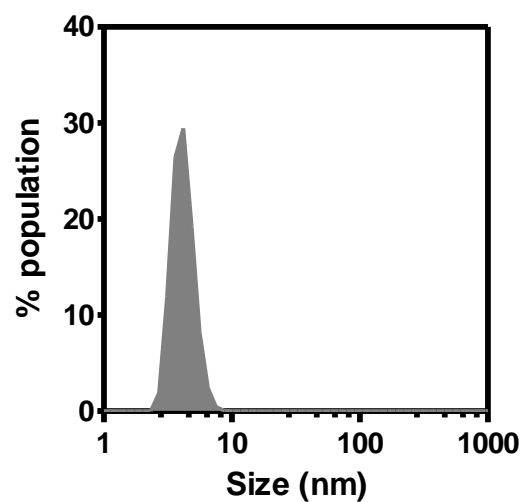


図3-6. pH 4.0 緩衝液における lysoPA 懸濁液の DLS 解析

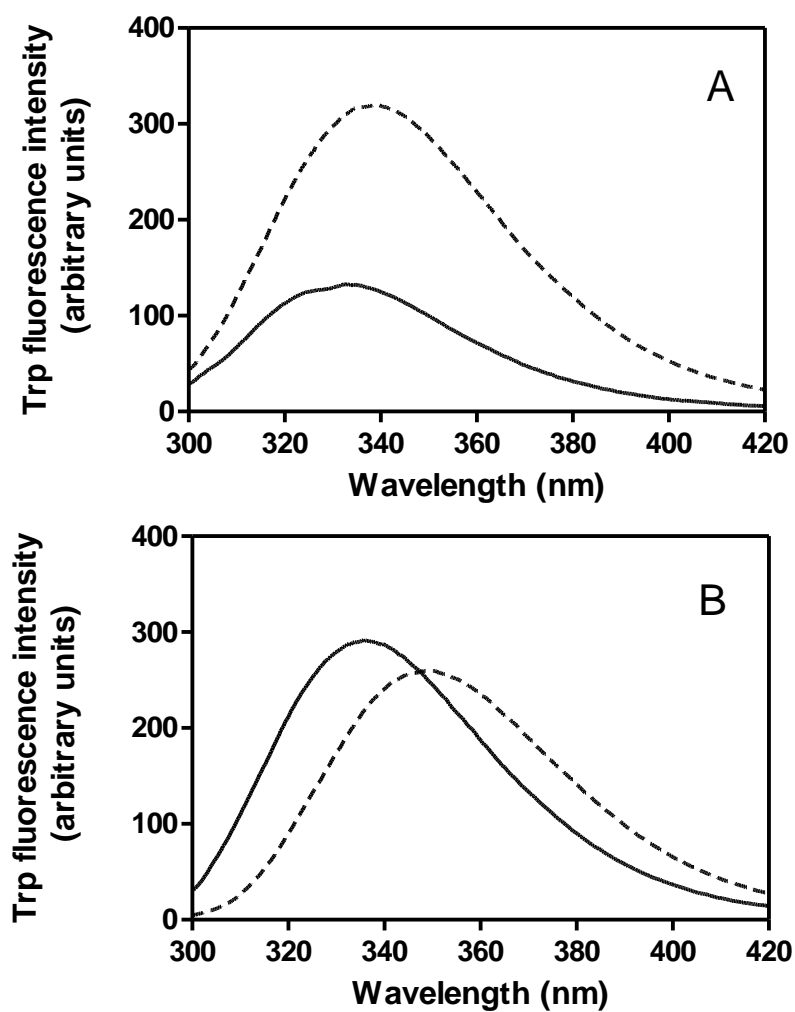


図3-7. lysoPA 存在下（実線）および非存在下（破線）の SAA（1-27）ペプチド（A）および SAA1.1（43-63）ペプチド（B）の Trp 蛍光 1.1（37°C、pH 4.0）

3 B) とは異なる波形を示し、BeStSel を用いて二次構造解析したところ約 30% の  $\beta$  シート構造を含むと見積もられた (図 3-5 B)。つまり、ミセルを添加しても SAA1.1 (43-63) ペプチドは脂質に結合しないため、線維の形成がほとんど抑制されなかったと推察された。

HDL を構成する脂質は PC のみに限らない。そこで、次に酸性リン脂質である lysoPA を用いて、SAA (1-27) および SAA1.1 (43-63) ペプチドの線維形成に脂質組成の変化が及ぼす影響を評価した。使用したオレイン酸含有 lysoPA の CMC は超純水中で約 346  $\mu$ M であるため [70]、lysoPA の濃度は CMC 以上となる 1 mM になるよう調製した。DLS で粒子径を測定した結果、約 4 nm であり (図 3-6)、酢酸緩衝液中で lysoPA は球状ミセルとして存在していると考えら

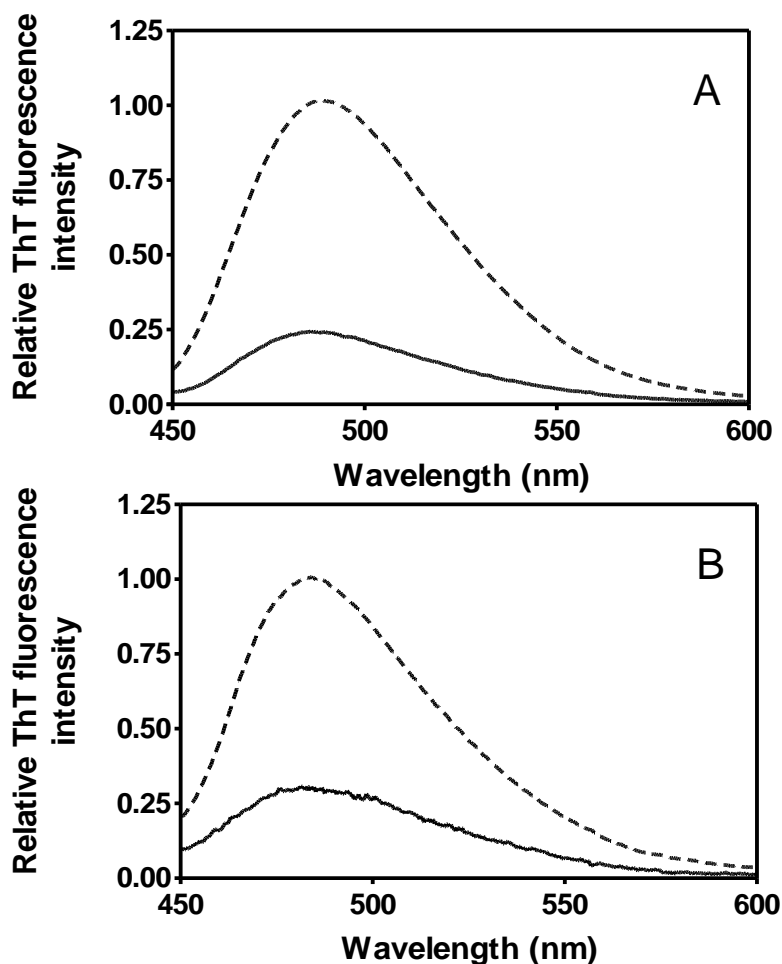


図 3-8. SAA (1-27) ペプチド (A) および SAA1.1 (43-63) ペプチド (B) をヘパリンおよび lysoPA ミセル共存下 (実線: 黒色)、ヘパリン存在下 (破線: 黒色) でインキュベートしたときの ThT 蛍光スペクトル (37°C、pH 4.0)

れる。SAA (1-27) および SAA1.1 (43-63) ペプチドに lysoPA ミセルを添加したときの Trp 蛍光の変化を調べたところいずれのペプチドにおいても WMF のブルーシフトが観察された (図 3-7)。よって、両ペプチドが lysoPA ミセルに対して結合能を持つことが示唆された。そこで lysoPA ミセルに結合した状態の各ペプチドにヘパリンを加えて線維形成能を評価した。その結果、いずれの場合もミセル非存在下に比べて、ThT 蛍光強度の減少が観察された (図 3-8)。CD スペクトルは、SAA (1-27) ペプチドでは典型的な  $\alpha$  ヘリックス構造の波

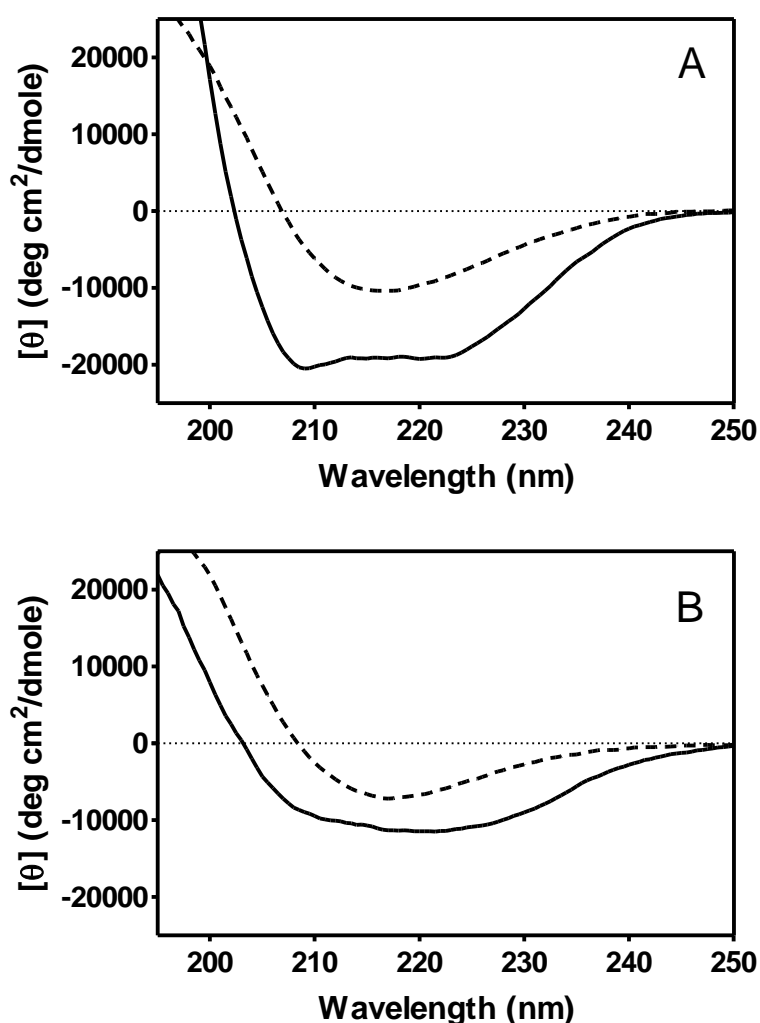


図 3-9. SAA (1-27) ペプチド (A) および SAA1.1 (43-63) ペプチド (B) をヘパリンおよび lysoPA ミセル共存下 (実線: 黒色)、ヘパリン存在下 (破線: 灰色)、でインキュベートしたときの CD スペクトル (37°C、pH 4.0)

形を示し（図3-9A）、SAA1.1（43-63）ペプチドにおいても BeStSel により解析した結果、 $\beta$ シート構造の割合が減少し、 $\alpha$ ヘリックス構造の割合が増加していることが示された。ThT および CD 測定の結果より、SAA（1-27）および SAA1.1（43-63）ペプチドが lysoPA ミセルに結合することによって線維の形成が抑制されることが示唆された。また、中性リゾリン脂質であるリゾホスファチジルエタノールアミンおよび酸性リン脂質であるリゾホスファチジルセリンから構成されるミセル存在下においても、それぞれ lysoPC および lysoPA ミセル存在下と同様の結果を示したことから、SAA ペプチドの脂質結合性や線維形成能に対して脂質の電荷が影響する可能性が考えられる。

脂質結合能を有する N 末端領域と結合能を持たない中間領域を同時に含む

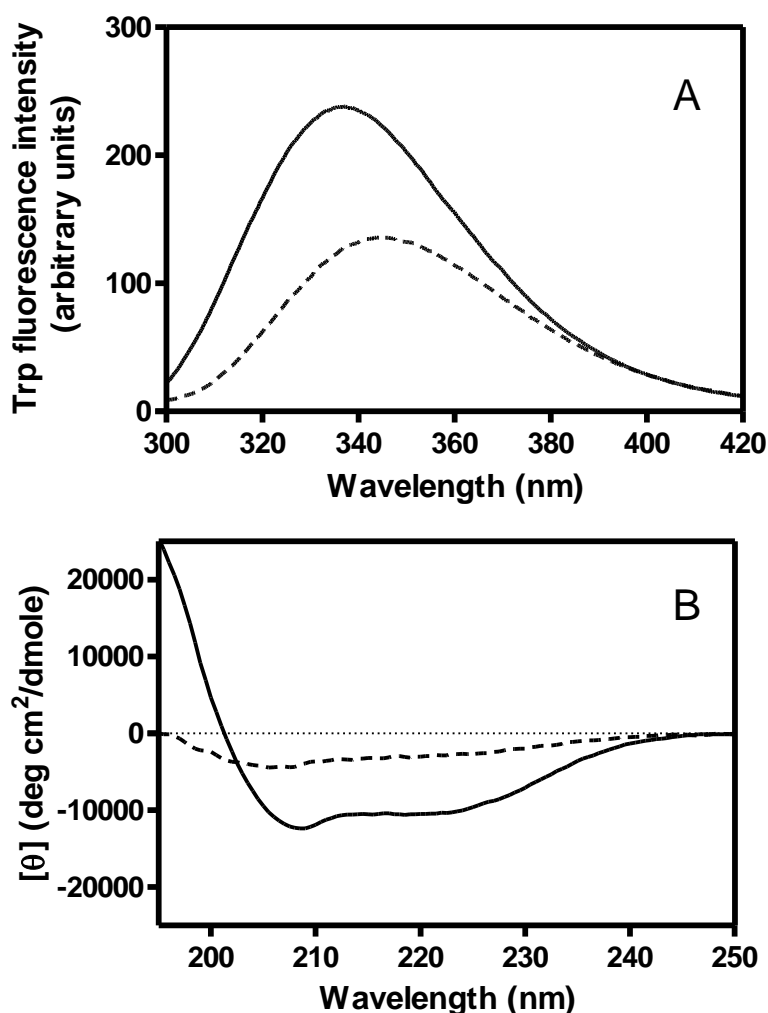


図3-10. lysoPC ミセル存在下（実線）、非存在下（破線）の（A）SAA1.1 全長蛋白質の Trp 蛍光スペクトルおよび（B）CD スペクトル（37°C、pH 4.0）

SAA1.1 全長蛋白質の Trp 蛍光は、酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中では約 345 nm の WMF を示した。ここに、lysoPC ミセルを添加すると WMF が約 10 nm 短波長側へとブルーシフトし、蛍光強度が増大した (図 3-10 A)。この時の CD スペクトルから SAA1.1 全長蛋白質は  $\alpha$  ヘリックス構造を形成していることが分かった (図 3-10 B)。そこで、lysoPC ミセル存在下においてヘパリンを添加したところ、ミセル非存在下に比べて、ThT 蛍光強度が減少した (図 3-11 A)。また、CD スペクトルの結果から、SAA1.1 は二次構造として  $\alpha$  ヘリックス構造を

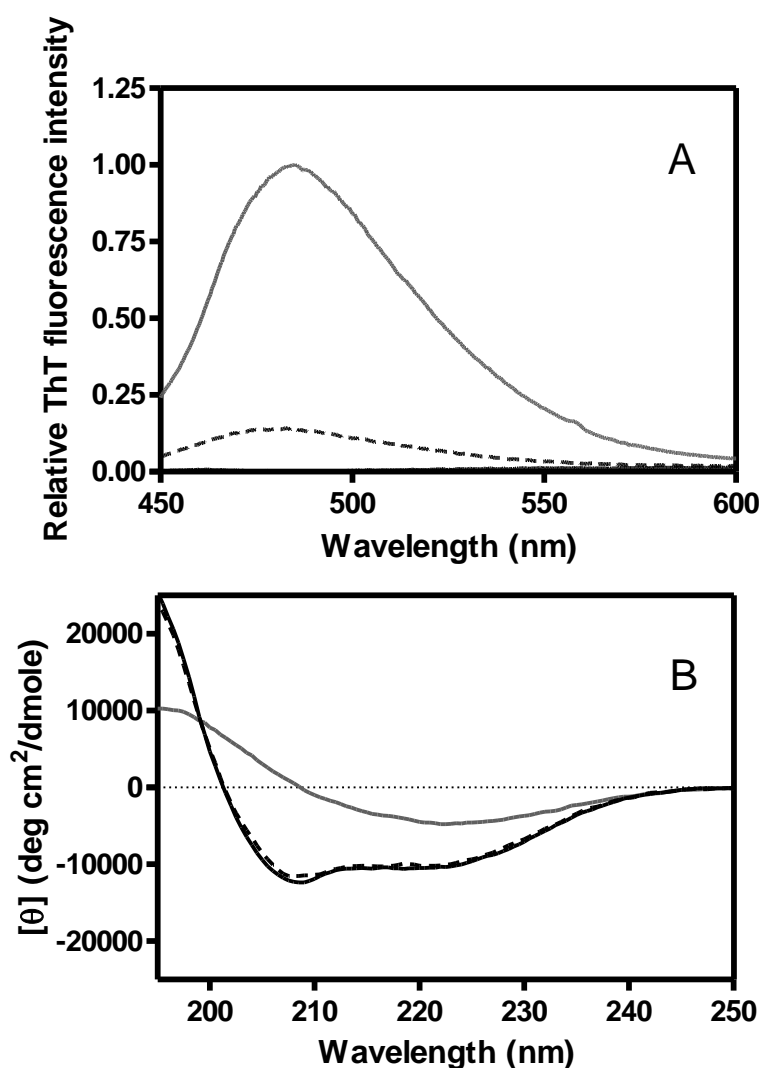


図 3-11. lysoPC ミセル存在下 (実線: 黒色)、ヘパリンおよび lysoPC ミセル共存下 (破線: 黒色)、ヘパリン存在下 (実線: 灰色)、でインキュベートしたときの SAA1.1 全長蛋白質に対する ThT の蛍光スペクトル (A) および SAA1.1 全長蛋白質の CD スペクトル (B) (37°C、pH 4.0)



形成していた。したがって全長蛋白質においても脂質への結合が線維の形成を抑制することが示された (図 3-11B)。

## 2. SAA-HDL モデル粒子の作製

前項までの結果より、SAA の脂質への結合が線維形成に対して抑制的に作用することが示唆された。しかしながら、膜モデル粒子のサイズや形態がアミロイド線維形成に影響を及ぼすことが報告されている [71]。そこで、生体内における SAA の構造をより反映させるために、HDL に結合した SAA を用いた検討を計画した。多くの報告のあるアポ A-I やアポ A-II による HDL モデル粒子の作製方法 [72] を応用し、これまでに報告されていなかった SAA-HDL モデル粒子の作製を試みた。また、第 1 章において線維形成に影響を及ぼすことが示唆された SAA アイソフォームについて、脂質への結合性や脂質結合時の構造が線維形成に影響を及ぼす可能性があるのではないかと考え、SAA-HDL モデル粒子の形成過程と形成後の粒子の特徴、および構造安定性についてアイソフォーム間での比較を行った。

まず、SAA がアポ A-I やアポ A-II のように DMPC リポソームからディスク状の HDL 様粒子を形成する能力(クリアランス能)を有するのかを調べるために、クリアランスアッセイを行った。リポソームを含む溶液は照射する光に対する散乱光が大きいと白く濁って見える。そこに、可溶性アポリポ蛋白質を加え、脂質との相互作用によって粒子径が約 10 nm のディスク状の HDL 様粒子が形成されると、その溶液は散乱光が小さく透明になる。なお、このようにして形成されるディスク状の HDL 様粒子は、生体内において新生直後の HDL に似ていると考えられている。SAA と DMPC リポソームとの相互作用によって変化する散乱光強度の減少(クリアランス)をモニタリングした結果を図 3-12 に示している。DMPC リポソームの散乱光は、蛋白質を添加しなければほとんど変化することなく一定であった。SAA を蛋白質と脂質の質量比が 1:1 となるよう添加すると、DMPC 粒子の散乱光が粒子の大きさの変化に伴い減少し、SAA がクリアランス能を有していることが明らかとなった。しかし、脂質と蛋白質を 2:1 (w/w) でインキュベートしたときには散乱光の変化は観察されなかった。アポ A-I やアポ A-II では脂質と蛋白質の比率が 10:1 においても HDL 様粒子を形成するのに比べて [72]、SAA は高い蛋白質比率を必要としていた。クリアラ

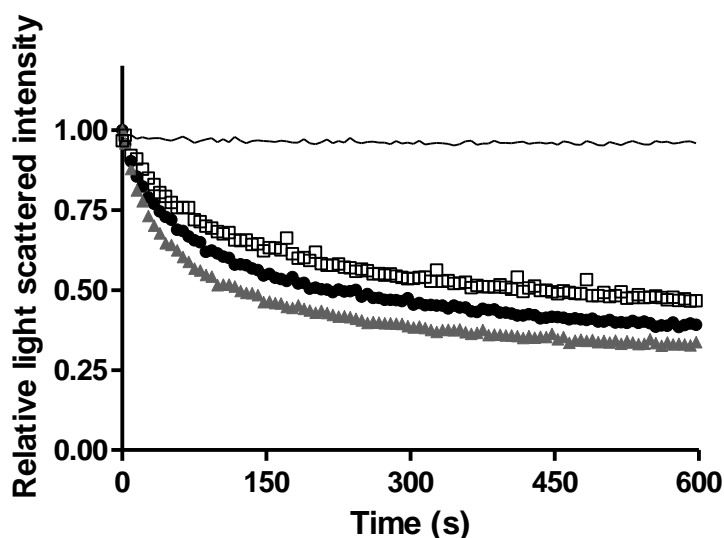


図3-12. SAAアイソフォームによるDMPC粒子の可溶化 (24.6°C)  
(SAA1.1 : ●、SAA1.3 : ▲、SAA1.5 : □)

表3-1. SAAアイソフォームによるDMPC粒子による濁度のクリアランスに関する  
動態パラメータ

	$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$A \text{ (fraction)}$
SAA1.1	$0.54 \pm 0.18$	$0.52 \pm 0.04$
SAA1.3	$0.66 \pm 0.09$	$0.56 \pm 0.10$
SAA1.5	$0.45 \pm 0.05$	$0.46 \pm 0.06$

ンス曲線の指数関数によるフィッティングから得られたパラメータを比較したところ、アイソフォーム間で顕著な違いは見られなかった (表3-1)。

得られたDMPC-SAA複合体をゲル濾過クロマトグラフィーで分析した。図3-13AはDMPC-SAA混合物の代表的な溶出プロファイルであるが、独立した実験によって得られたデータは高い再現性を示し、55分付近に1つの大きなピークが得られた。ピーク付近の各フラクションについて蛋白質および脂質の定量を行った結果、その両方が各フラクションより検出されたことから、このピークはDMPC-SAA複合体に由来すると考えられた。DLSによってピークフラクションの粒子径を測定した結果、粒子径は約10 nmであった (表3-2)。また、非変性4%–20% Tris-glycine 濃度勾配ゲル電気泳動法を用いてSAA-HDLモデル

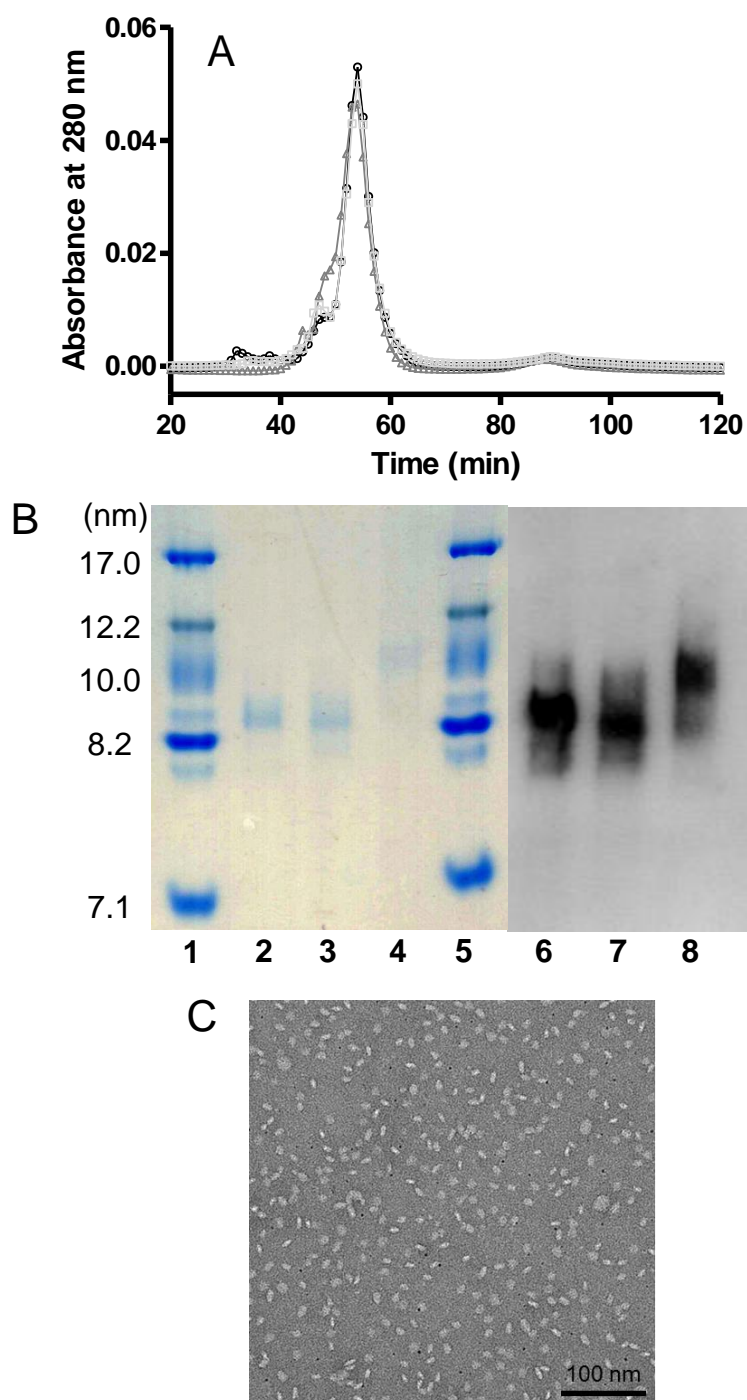


図3-13. (A) DMPC-SAA 混合物を 280 nm の吸光度でモニタリングした相対的ゲル濾過溶出プロファイル (SAA1.1 : ○、SAA1.3 : △、SAA1.5 : □) (B) SAA-DMPC から構成される HDL モデル粒子の非変性ゲル電気泳動解析(レーン 1-5: GelCode Blue Stain Reagent を使って検出、レーン 6-8: ウェスタンブロッティングにより検出、レーン 1,5 : 分子量マーカー、レーン 4,8 : SAA1.1-HDL、レーン 3,7 : SAA1.3-HDL、レーン 2,8 : SAA1.5-HDL) (分子量マーカーに対応する粒子径をスケールとして示す。) (C) SAA1.1-HDL の TEM 画像

表3-2. SAA および DMPC で構成される HDL モデル粒子の特徴

	粒子径 (nm)		HDL モデル粒子の構成
	DLS	NDGGE	SAA に対する脂質のモル比
SAA1.1	10.0±0.9	10.2	16.9±6.3
SAA1.3	9.8±1.3	8.7	16.2±3.1
SAA1.5	9.1±1.4	9.2	17.3±6.9

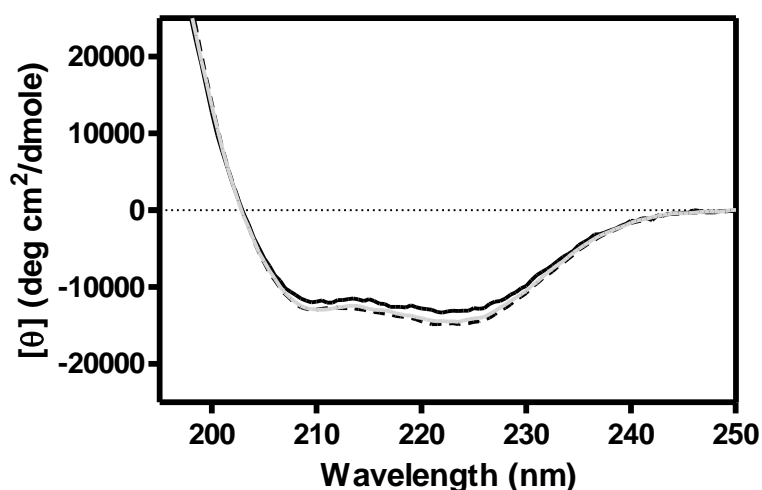


図3-14. SAA-HDL モデル粒子中の SAA 全長蛋白質の CD スペクトル (SAA1.1: 実線 (黒)、SAA1.3: 破線、SAA1.5: 実線 (灰)) (37°C)

粒子の大きさを評価したところ、SAA-HDL モデル粒子が粒子径約 8.2–10.0 nm であることがわかった。さらに、TEM 画像で観察された粒子は約 10 nm の均一な大きさで、円形と長方形の形態が混在しており、ディスク状であることが分かった (図3-13C)。SAA-HDL モデル粒子の組成解析の結果、HDL モデル粒子の DMPC と SAA の比率は約 16 : 1 であり、SAA アイソフォーム間で形成する HDL モデル粒子の特徴に違いは見られなかった (表3-2)。また HDL モデル粒子結合時の SAA の二次構造は 37°C で  $\alpha$ ヘリックス構造を形成しており、アイソフォーム間での違いは見られなかった。(図3-14)。以上の結果から、今回得られた粒子は SAA-HDL モデル粒子になり得ると考えた。

### 3. SAA-HDL モデル粒子を用いた評価

SAA-HDL モデル粒子中の SAA の構造安定性を評価するために、 $\alpha$  ヘリックス構造形成時に特徴的な極小値、222 nm の $[\theta]$ 値の温度依存性を評価した。遊離型の SAA では、低温からゆるやかな傾斜を持つ変性曲線が観察され、生理的温度の 37°C で大部分が高次構造を形成していないことが分かった (図 3-15 A)。一方、SAA-HDL モデル粒子中の SAA の変性曲線は遊離型と比較して高温側へと著しくシフトし、37°C でそのほとんどが  $\alpha$  ヘリックス構造を維持していた (図 3-15 B)。その後、急激に変性が進行し、約 60°C ではほとんどが変性した。

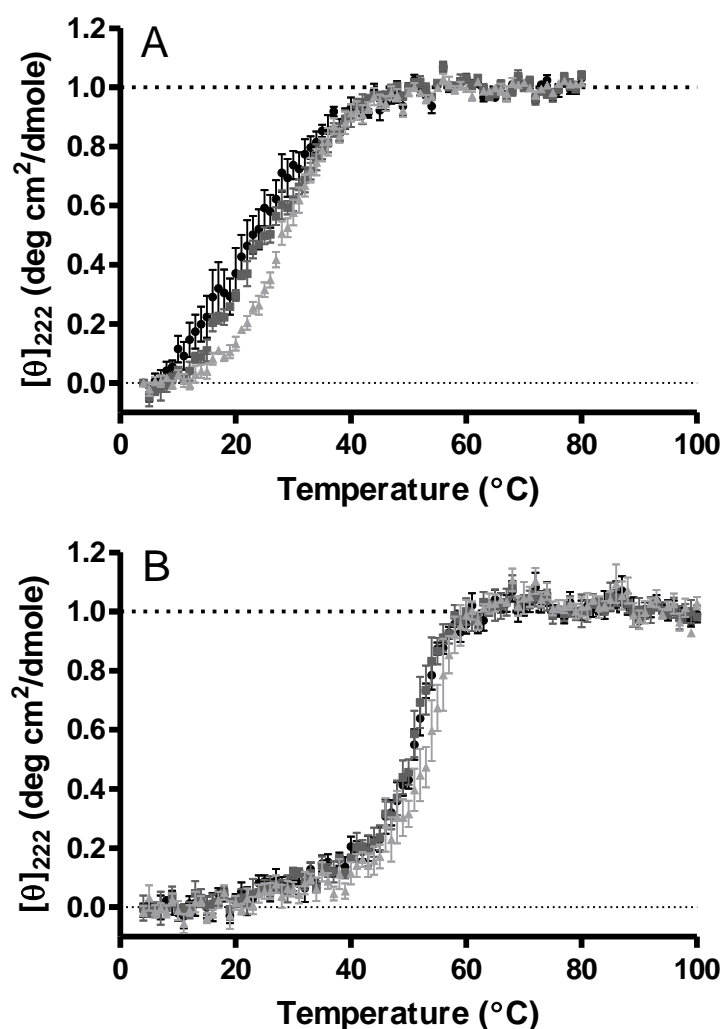


図 3-15. 遊離 (A) および SAA-HDL モデル粒子中 (B) の SAA アイソフォームの熱変性曲線 (222 nm での平均残基モル橢円率をモニタリング) (SAA1.1 : ●、SAA1.3 : ▲、SAA1.5 : ■)

表 3-3. 遊離および SAA-HDL モデル粒子中の SAA アイソフォームの熱変性パラメータ

	$T_{1/2}$ (°C)	
	遊離型	SAA-HDL モデル粒子
SAA1.1	$23.4 \pm 3.8$	$50.1 \pm 0.5$
SAA1.3	$26.1 \pm 1.0$	$49.8 \pm 1.0$
SAA1.5	$28.7 \pm 1.1$	$52.4 \pm 1.3$

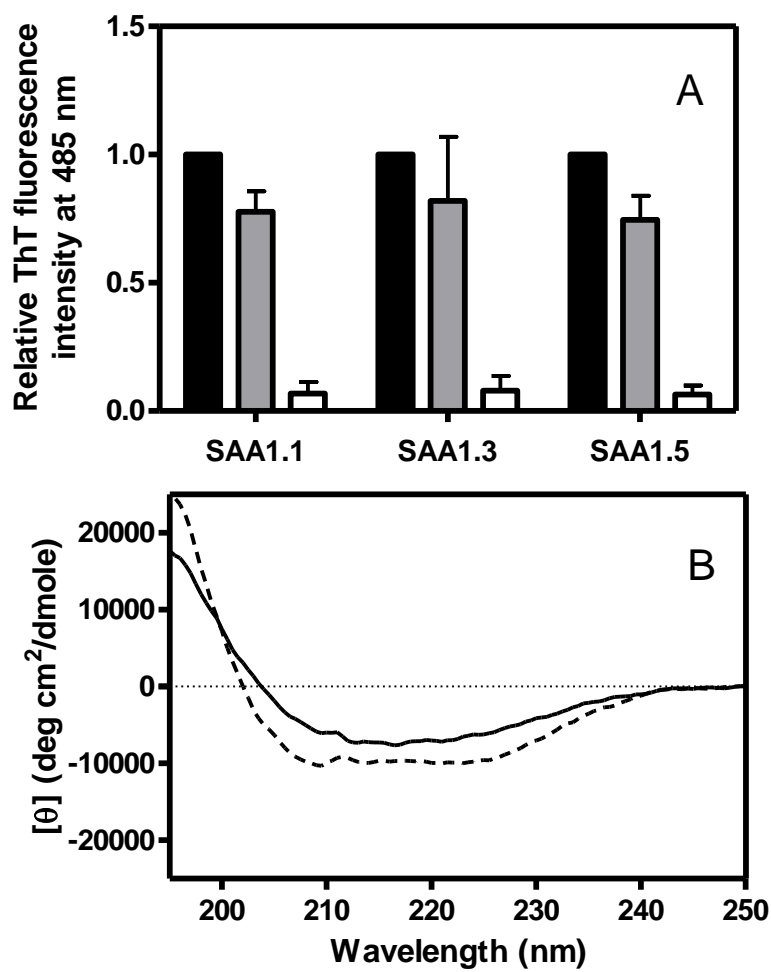


図 3-16. (A) ヘパリン存在下における遊離型（黒）および SAA-HDL モデル粒子中（灰）の SAA、ヘパリン非存在下における SAA-HDL モデル粒子中（白）の SAA をそれぞれ pH 4.0 でインキュベートしたときの ThT 蛍光強度 (37°C、pH 4.0、Student's t-test no significant difference (n=3))、(B) SAA1.1 蛋白質のヘパリン存在下（実線）、非存在下（破線）における CD スペクトル (37°C、pH 4.0)

SAA-HDL モデル粒子中の SAA の  $T_{1/2}$  値 (50% の蛋白質が変性する温度) は遊離型の SAA に比べて高く (表 3-3)、SAA は HDL に結合をすることにより安定性が向上していることがわかる。なお、遊離および SAA-HDL モデル粒子中の SAA のいずれの場合も SAA アイソフォーム間の熱安定性における違いはわずかであった。

作製した SAA-HDL モデル粒子を酸性条件下、37°C で 1 日インキュベートし、ThT 蛍光を測定した (図 3-16A)。HDL モデル粒子のみをインキュベートした際には ThT 蛍光強度の増大は観察されなかったが、ヘパリン共存下においては、遊離型の SAA と同等の蛍光強度の増大が観察された。また SAA-HDL モデル粒子中の SAA は  $\alpha$  ヘリックス構造の形成を示す CD スペクトルであったのに対して、ヘパリン共存下においては  $\beta$  シート構造の形成が示唆された (図 3-16B)。なお ThT 蛍光強度、CD スペクトルについてはアイソフォーム間で大きな相違は認められなかった。ヘパリンは HDL 粒子から SAA 蛋白質を解離させるとの報告があり [73]、図 3-16 で観察された ThT 蛍光の増大および  $\beta$  シート構造の形成はヘパリンによって解離させられた遊離型の SAA が線維を形成したと考えられる。

## 第4節 考察

他のアミロイド形成蛋白質において脂質への結合が線維形成に対して抑制的に働くことが知られている。例えば  $\alpha$ -シヌクレインでは、脂質に結合して  $\alpha$  ヘリックス構造を形成することにより、アミロイド線維の形成が抑制されていることが報告されている [74]。またアポ A-I では、脂質に結合することで  $\alpha$  ヘリックス構造を形成し、線維の形成が抑制されるが、1 残基のアミノ酸変異により  $\alpha$  ヘリックス構造の形成傾向が低くなると脂質存在下においても線維を形成するとの報告もある [75]。本研究のリゾリン脂質を用いた結果から SAA も同様に脂質に結合すると  $\alpha$  ヘリックス構造を形成し、線維形成が抑制されることが明らかとなった。

分子内に  $\alpha$  ヘリックス構造を形成する領域を 10 個有するアポ A-I は、160 分子の POPC と 2 分子のアポ A-I からなる HDL モデル粒子を形成すると報告されている [76]。一方、本研究において作製した SAA-HDL モデル粒子は、DMPC160 分子と SAA10 分子によって構成されると見積もられた。すなわち、SAA (104 残基) が HDL モデル粒子を形成するには、アポ A-I (243 残基) とのアミノ酸

残基数之比よりも多くの SAA 分子が必要であった。これは SAA 分子内の脂質結合に寄与する  $\alpha$  ヘリックス構造形成領域が少ないためであると考えられる。したがって、SAA は HDL 結合時において脂質に結合していない領域が多く存在するために、HDL への結合に関与していない領域に対して GAG が相互作用にすることにより SAA が脂質から解離する可能性があると考えられた（図 3-17）。また、中性リン脂質から構成される HDL モデル粒子においては SAA アイソフォーム間で二次構造や線維形成能に違いは見られなかった。これは SAA 分子内における脂質結合領域（N 末端領域）や HS/ヘパリン結合領域（C 末端領域）がアイソフォーム間で共通であるためと考える。しかし、リゾリン脂質を用いた検討では SAA1.1（43-63）ペプチドの脂質結合性とその構成脂質の違いにより異なった。したがって、SAA-HDL モデル粒子において、脂質組成が異なった時にアイソフォーム間で違いが見られるのか現在検討中である。

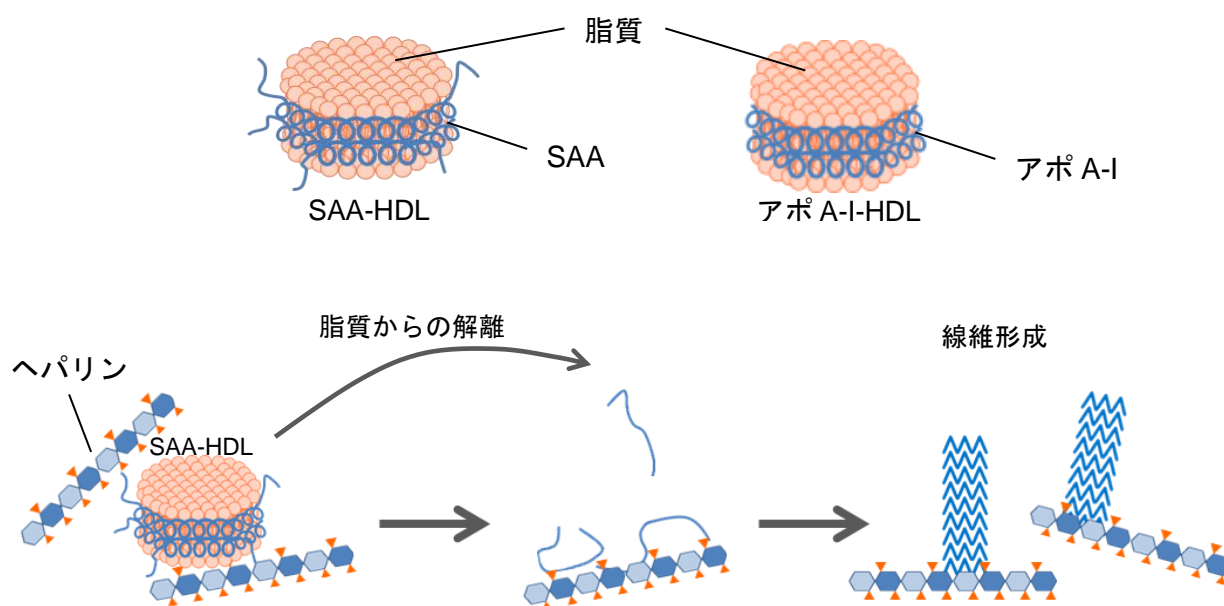


図 3-17. SAA-HDL モデル粒子中の SAA の線維形成過程（推定図）



## 総括

本研究では *in vitro* 実験系を用い、疾患調節因子と考えられる SAA アイソフォーム、GAG、脂質が SAA の線維形成に及ぼす影響について検討を行うことにより、AA アミロイドーシス発症の分子基盤について解明を試み、以下の知見を得た。

### 1. SAA アイソフォームのアミノ酸変異が線維形成に及ぼす影響

SAA の各アイソフォームに相当する中間領域ペプチドの線維形成能および全長蛋白質において SAA アイソフォームが形成する線維の形態が異なったことから、SAA の線維形成がアイソフォーム間で異なることが分子レベルで明らかとなった。今回得られた中間領域の線維形成能の違いは、本領域が AA アミロイドーシス発症に対し、リスク因子として直接的に働く可能性を示すものと考えられる。

### 2. SAA の線維形成を促進する GAG の構造要因の検討

各種の GAG、脱硫酸化ヘパリンおよびアニオン性高分子を用いた検討より、SAA の線維形成に促進的な効果をもたらす GAG の構造要因として、糖骨格ではなく硫酸基の存在が重要であることが示された。さらに断片化ヘパリンを用いた検討より、HS が持つ高硫酸化ドメイン構造が SAA 線維の形成促進において重要であることを明らかとした。また、特定の臓器にのみ SAA 線維が沈着する理由や慢性炎症性患者が AA アミロイドーシスを発症する原因が、生体内における GAG の分布や硫酸基修飾の割合を解析することによって解明できる可能性が示された。

### 3. SAA の線維形成に脂質が与える影響

脂質ミセルを用いることにより、SAA は脂質へ結合して  $\alpha$  ヘリックス構造を形成することで、その構造が安定化し、その結果、 $\beta$  シート構造への二次構造の変化が妨げられ、線維の形成が抑制されることを明らかとした。一方、自己集合法により SAA を構成成分とする HDL モデル粒子の作製に成功した。また本粒子を用いることにより、SAA は HDL への結合安定性が低く、GAG が存在すると SAA の脂質からの解離が促され、その結果、線維が形成される可能性が示

された。

上述の結果から、**GAG** への結合が **SAA** 線維の形成促進因子として、一方、脂質への結合が線維形成抑制因子として、**AA** アミロイドーシスの発症に影響を及ぼすことが示唆された。これまで **AA** アミロイドーシスの発症に寄与するリスク因子としては **SAA** アイソフォーム以外の言及はほとんどなかったが、**SAA** アイソフォームの保有頻度だけでなく、**GAG** や脂質についても生体内における分布の割合や構成する組成が個人間や疾患時において異なることが、**AA** アミロイドーシス発症のリスク因子となる可能性が考えられる。したがって炎症時における **GAG** や脂質の変動を解析し、その違いが **SAA** の線維形成に及ぼす影響を評価することで、**AA** アミロイドーシス発症機構の解明に向けた新たな知見が得られる可能性があると考ええる。

以上、本研究により **SAA** の線維形成機構の一端を明らかにすることに成功した。今回得られた知見は **AA** アミロイドーシス発症機構のさらなる解明に向けて意義ある情報を提供するものと考ええる。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました本学薬品物理化学講座 向高弘教授に深く感謝の意を表します。

本研究論文の審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました製剤学講座 北河修治教授、機能性分子化学講座 中山尋量教授、生化学講座 北川裕之教授に深謝致します。

本研究の機会を与えて頂き、幾多の有益な御助言と御指導を賜りました本学薬品物理化学講座 田中将史講師に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、数々の有益な御助言と御指導を賜りました本学薬品物理化学講座 萩森政頼講師、放射線管理室 安岡由美講師に心より感謝致します。

本研究を行うにあたり、多大な御協力を賜りました自治医科大学臨床検査医学講座 山田俊幸教授、大阪大学蛋白質研究所蛋白質有機化学研究室 川上徹准教授、京都薬科大学薬品物理化学分野 斎藤博幸教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、実験試料の作製に対する御協力や論文作成に対する有益な御助言を賜りました本学薬品化学講座 宮田興子教授、上田昌史准教授、生化学講座 灘中里美講師に心より御礼申し上げます。

本研究に対し、終始実験に御協力頂きました本学薬品物理化学講座 宮川幸子学士、山本亜季学士、朝日麻理香学士、西村彩佳学士、長谷川純子学士、渡部志織学士、高橋早苗学士、田中宏輔学士、中田まり学士、古地大輝学士、尾上奈帆さん、竹下晴香さん、仲西貴和子さん、沖野希さん、奥村友貴さん、中村友紀さんをはじめとする薬品物理化学講座の諸氏に心から感謝致します。

最後に、これまでの研究生活を終始温かく見守り、励まし続けてくれた両親、友人に心から感謝致します。

## 参考文献

1. Merlini, G., and Bellotti, V. (2003) Molecular mechanisms of amyloidosis, *N Engl J Med* **349**, 583-596.
2. Carrell, R. W., and Lomas, D. A. (1997) Conformational disease, *Lancet* **350**, 134-138.
3. Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M. J., and Westermark, P. (2014) Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis, *Amyloid* **21**, 221-224.
4. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班 (2010) アミロイドーシス診療ガイドライン 2010, 1-48.
5. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu Rev Biochem* **75**, 333-366.
6. Yumura, W., Matsumura, O., and Sugino, N. (1991) [Current topics on amyloidosis--clinical statistical studies in Japan], *Nihon Rinsho* **49**, 779-787.
7. van der Heijden, R. A., Bijzet, J., Meijers, W. C., Yakala, G. K., Kleemann, R., Nguyen, T. Q., de Boer, R. A., Schalkwijk, C. G., Hazenberg, B. P., Tietge, U. J., and Heeringa, P. (2015) Obesity-induced chronic inflammation in high fat diet challenged C57BL/6J mice is associated with acceleration of age-dependent renal amyloidosis, *Sci Rep* **5**, 16474.
8. Mutru, O., Laakso, M., Isomaki, H., and Koota, K. (1985) Ten year mortality and causes of death in patients with rheumatoid arthritis, *Br Med J (Clin Res Ed)* **290**, 1797-1799.
9. Reilly, P. A., Cosh, J. A., Maddison, P. J., Rasker, J. J., and Silman, A. J. (1990) Mortality and survival in rheumatoid arthritis: a 25 year prospective study of 100 patients, *Ann Rheum Dis* **49**, 363-369.
10. Hazenberg, B. P., and van Rijswijk, M. H. (2000) Where has secondary amyloid gone?, *Ann Rheum Dis* **59**, 577-579.
11. Elkayam, O., Hawkins, P. N., Lachmann, H., Yaron, M., and Caspi, D. (2002) Rapid and complete resolution of proteinuria due to renal amyloidosis in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab, *Arthritis Rheum* **46**, 2571-2573.
12. Gillmore, J. D., Lovat, L. B., Persey, M. R., Pepys, M. B., and Hawkins, P. N. (2001) Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein, *Lancet* **358**, 24-29.
13. Westermark, G. T., Fandrich, M., and Westermark, P. (2015) AA amyloidosis:

- pathogenesis and targeted therapy, *Annu Rev Pathol* **10**, 321-344.
14. Baba, S., Masago, S. A., Takahashi, T., Kasama, T., Sugimura, H., Tsugane, S., Tsutsui, Y., and Shirasawa, H. (1995) A novel allelic variant of serum amyloid A, SAA1 gamma: genomic evidence, evolution, frequency, and implication as a risk factor for reactive systemic AA-amyloidosis, *Hum Mol Genet* **4**, 1083-1087.
  15. Westermark, P. (1998) The pathogenesis of amyloidosis: understanding general principles, *Am J Pathol* **152**, 1125-1127.
  16. Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimón, A., and Franklin, E. C. (1968) The characterization of soluble amyloid prepared in water, *J Clin Invest* **47**, 924-933.
  17. Buxbaum, J. N., and Linke, R. P. (2012) A molecular history of the amyloidoses, *J Mol Biol* **421**, 142-159.
  18. Uhlar, C. M., and Whitehead, A. S. (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant, *Eur J Biochem* **265**, 501-523.
  19. Ohta, S., Tanaka, M., Sakakura, K., Kawakami, T., Aimoto, S., and Saito, H. (2009) Defining lipid-binding regions of human serum amyloid A using its fragment peptides, *Chem Phys Lipids* **162**, 62-68.
  20. Yamada, T., and Wada, A. (2003) Slower clearance of human SAA1.5 in mice: implications for allele specific variation of SAA concentration in human, *Amyloid* **10**, 147-150.
  21. Yamada, T., Kluve-Beckerman, B., Liepnieks, J. J., and Benson, M. D. (1994) Fibril formation from recombinant human serum amyloid A, *Biochim Biophys Acta* **1226**, 323-329.
  22. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* **193**, 265-275.
  23. Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal Biochem* **87**, 206-210.
  24. Biancalana, M., and Koide, S. (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim Biophys Acta* **1804**, 1405-1412.
  25. Groenning, M. (2010) Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status, *J Chem Biol* **3**, 1-18.
  26. Klajnert, B., Cladera, J., and Bryszewska, M. (2006) Molecular interactions of dendrimers with amyloid peptides: pH dependence, *Biomacromolecules* **7**, 2186-2191.
  27. Targonska-Stepniak, B., and Majdan, M. (2014) Serum amyloid A as a marker of

- persistent inflammation and an indicator of cardiovascular and renal involvement in patients with rheumatoid arthritis, *Mediators Inflamm* **2014**, 793628.
28. Norling, B., Westermarck, G. T., and Westermarck, P. (1988) Immunohistochemical identification of heparan sulphate proteoglycan in secondary systemic amyloidosis, *Clin Exp Immunol* **73**, 333-337.
  29. Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Bryszewska, M., and Cladera, J. (2006) Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases, *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 577-582.
  30. Abedini, A., Tracz, S. M., Cho, J. H., and Raleigh, D. P. (2006) Characterization of the heparin binding site in the N-terminus of human pro-islet amyloid polypeptide: implications for amyloid formation, *Biochemistry* **45**, 9228-9237.
  31. Suk, J. Y., Zhang, F., Balch, W. E., Linhardt, R. J., and Kelly, J. W. (2006) Heparin accelerates gelsolin amyloidogenesis, *Biochemistry* **45**, 2234-2242.
  32. Jarrett, J. T., and Lansbury, P. T., Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?, *Cell* **73**, 1055-1058.
  33. Chiu, C. C., Singh, S., and de Pablo, J. J. (2013) Effect of proline mutations on the monomer conformations of amylin, *Biophys J* **105**, 1227-1235.
  34. Conway, K. A., Harper, J. D., and Lansbury, P. T., Jr. (2000) Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid, *Biochemistry* **39**, 2552-2563.
  35. Ancsin, J. B., and Kisilevsky, R. (1999) The heparin/heparan sulfate-binding site on apo-serum amyloid A. Implications for the therapeutic intervention of amyloidosis, *J Biol Chem* **274**, 7172-7181.
  36. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J Mol Biol* **157**, 105-132.
  37. Yamaguchi, K., Matsumoto, T., and Kuwata, K. (2008) Critical region for amyloid fibril formation of mouse prion protein: unusual amyloidogenic properties of the helix 2 peptide, *Biochemistry* **47**, 13242-13251.
  38. Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y. H., Goto, Y., Refregiers, M., and Kardos, J. (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E3095-3103.
  39. Lazar, K. L., Miller-Auer, H., Getz, G. S., Orgel, J. P., and Meredith, S. C. (2005) Helix-turn-helix peptides that form alpha-helical fibrils: turn sequences drive fibril structure, *Biochemistry* **44**, 12681-12689.
  40. Liu, G., Prabhakar, A., Aucoin, D., Simon, M., Sparks, S., Robbins, K. J., Sheen, A.,

- Petty, S. A., and Lazo, N. D. (2010) Mechanistic studies of peptide self-assembly: transient alpha-helices to stable beta-sheets, *J Am Chem Soc* **132**, 18223-18232.
41. Chimon, S., Shaibat, M. A., Jones, C. R., Calero, D. C., Aizezi, B., and Ishii, Y. (2007) Evidence of fibril-like beta-sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's beta-amyloid, *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1157-1164.
  42. Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974) Prediction of protein conformation, *Biochemistry* **13**, 222-245.
  43. Zako, T., Sakono, M., Hashimoto, N., Ihara, M., and Maeda, M. (2009) Bovine insulin filaments induced by reducing disulfide bonds show a different morphology, secondary structure, and cell toxicity from intact insulin amyloid fibrils, *Biophys J* **96**, 3331-3340.
  44. Booth, D. R., Booth, S. E., Gillmore, J. D., Hawkins, P. N., and Pepys, M. B. (1998) SAA1 alleles as risk factors in reactive systemic AA amyloidosis, *Amyloid* **5**, 262-265.
  45. Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L., and Kjellen, L. (1999) Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme, *Nature* **400**, 773-776.
  46. Inoue, Y., and Nagasawa, K. (1976) Selective N-desulfation of heparin with dimethyl sulfoxide containing water or methanol, *Carbohydr Res* **46**, 87-95.
  47. Ogamo, A., Metori, A., Uchiyama, H., and Nagasawa, K. (1989) Reactivity toward chemical sulfation of hydroxyl groups of heparin., *Carbohydr Res* **193**, 165-172.
  48. Dodgson, K. S., and Price, R. G. (1962) A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides, *Biochem J* **84**, 106-110.
  49. Ueno, M., Yamada, S., Zako, M., Bernfield, M., and Sugahara, K. (2001) Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence, *J Biol Chem* **276**, 29134-29140.
  50. Gallagher, J. T. (2001) Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu, *J Clin Invest* **108**, 357-361.
  51. Li, J. P., Galvis, M. L., Gong, F., Zhang, X., Zcharia, E., Metzger, S., Vlodavsky, I., Kisilevsky, R., and Lindahl, U. (2005) In vivo fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6473-6477.
  52. Aguilera, J. J., Zhang, F., Beaudet, J. M., Linhardt, R. J., and Colon, W. (2014)

- Divergent effect of glycosaminoglycans on the in vitro aggregation of serum amyloid A, *Biochimie* **104**, 70-80.
53. Castillo, G. M., Lukito, W., Wight, T. N., and Snow, A. D. (1999) The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation, *J Neurochem* **72**, 1681-1687.
  54. Bourgault, S., Solomon, J. P., Reixach, N., and Kelly, J. W. (2011) Sulfated glycosaminoglycans accelerate transthyretin amyloidogenesis by quaternary structural conversion, *Biochemistry* **50**, 1001-1015.
  55. Noborn, F., O'Callaghan, P., Hermansson, E., Zhang, X., Ancsin, J. B., Damas, A. M., Dacklin, I., Presto, J., Johansson, J., Saraiva, M. J., Lundgren, E., Kisilevsky, R., Westermark, P., and Li, J. P. (2011) Heparan sulfate/heparin promotes transthyretin fibrillization through selective binding to a basic motif in the protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5584-5589.
  56. Motamedi-Shad, N., Monsellier, E., and Chiti, F. (2009) Amyloid formation by the model protein muscle acylphosphatase is accelerated by heparin and heparan sulphate through a scaffolding-based mechanism, *J Biochem* **146**, 805-814.
  57. Walker, A., and Gallagher, J. T. (1996) Structural domains of heparan sulphate for specific recognition of the C-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin (HEPII), *Biochem J* **317** ( Pt 3), 871-877.
  58. Kisilevsky, R., Lemieux, L. J., Fraser, P. E., Kong, X., Hultin, P. G., and Szarek, W. A. (1995) Arresting amyloidosis in vivo using small-molecule anionic sulphonates or sulphates: implications for Alzheimer's disease, *Nat Med* **1**, 143-148.
  59. Dember, L. M., Hawkins, P. N., Hazenberg, B. P., Gorevic, P. D., Merlini, G., Butrimiene, I., Livneh, A., Lesnyak, O., Puechal, X., Lachmann, H. J., Obici, L., Balshaw, R., Garceau, D., Hauck, W., Skinner, M., and Eprodisate for, A. A. A. T. G. (2007) Eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis, *N Engl J Med* **356**, 2349-2360.
  60. Gandhi, N. S., and Mancera, R. L. (2010) Heparin/heparan sulphate-based drugs, *Drug Discov Today* **15**, 1058-1069.
  61. Sugumaran, G., Elliott-Bryant, R., Phung, N., Vitseva, O., Kuberan, B., and Lech, M. (2004) Characterization of splenic glycosaminoglycans accumulated in vivo in experimentally induced amyloid-susceptible and amyloid-resistant mice, *Scand J Immunol* **60**, 574-583.
  62. Patke, S., Srinivasan, S., Maheshwari, R., Srivastava, S. K., Aguilera, J. J., Colon, W., and Kane, R. S. (2013) Characterization of the oligomerization and aggregation of human Serum Amyloid A, *PLoS One* **8**, e64974.



63. Lu, J., Yu, Y., Zhu, I., Cheng, Y., and Sun, P. D. (2014) Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 5189-5194.
64. Bartlett, G. R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography, *J Biol Chem* **234**, 466-468.
65. Pownall, H. J., Massey, J. B., Kusserow, S. K., and Gotto, A. M., Jr. (1978) Kinetics of lipid-protein interactions: interaction of apolipoprotein A-I from human plasma high density lipoproteins with phosphatidylcholines, *Biochemistry* **17**, 1183-1188.
66. Palgunachari, M. N., Mishra, V. K., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Adeyeye, S. O., Alluri, S., Anantharamaiah, G. M., and Segrest, J. P. (1996) Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity. Implications for HDL assembly, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 328-338.
67. Nichols, A. V., Krauss, R. M., and Musliner, T. A. (1986) Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis, *Methods Enzymol* **128**, 417-431.
68. Stafford, R. E., Fanni, T., and Dennis, E. A. (1989) Interfacial properties and critical micelle concentration of lysophospholipids, *Biochemistry* **28**, 5113-5120.
69. Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S., and White, S. H. (2000) How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother?, *Anal Biochem* **285**, 235-245.
70. Li, Z., Mintzer, E., and Bittman, R. (2004) The critical micelle concentrations of lysophosphatidic acid and sphingosylphosphorylcholine, *Chem Phys Lipids* **130**, 197-201.
71. Caillon, L., Lequin, O., and Khemtouri, L. (2013) Evaluation of membrane models and their composition for islet amyloid polypeptide-membrane aggregation, *Biochim Biophys Acta* **1828**, 2091-2098.
72. Auton, M., Bassett, G. R., Gillard, B. K., and Pownall, H. J. (2013) Free cholesterol determines reassembled high-density lipoprotein phospholipid phase structure and stability, *Biochemistry* **52**, 4324-4330.
73. Noborn, F., Ancsin, J. B., Ubhayasekera, W., Kisilevsky, R., and Li, J. P. (2012) Heparan sulfate dissociates serum amyloid A (SAA) from acute-phase high-density lipoprotein, promoting SAA aggregation, *J Biol Chem* **287**, 25669-25677.
74. Zhu, M., and Fink, A. L. (2003) Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation, *J Biol Chem* **278**, 16873-16877.
75. Mizuguchi, C., Ogata, F., Mikawa, S., Tsuji, K., Baba, T., Shigenaga, A., Shimanouchi, T., Okuhira, K., Otaka, A., and Saito, H. (2015) Amyloidogenic

- Mutation Promotes Fibril Formation of the N-terminal Apolipoprotein A-I on Lipid Membranes, *J Biol Chem* **290**, 20947-20959.
76. Davidson, W. S., and Thompson, T. B. (2007) The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins, *J Biol Chem* **282**, 22249-22253.