

タカセ ヒロカ

氏名(本籍)	高瀬 ひろか(熊本県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博第33号
学位授与年月日	平成28年3月9日
学位授与の条件	学位規程第4条第1項該当者
学位論文の題名	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
論文審査委員	主査 教授 北河 修治 副査 教授 中山 尋量 副査 教授 北川 裕之 副査 教授 向 高弘

## 論文内容の要旨

ミスフォールディングした蛋白質が二次構造として $\beta$ シート構造を持つ線維状の凝集体、すなわち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]。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血清アミロイドA(SAA)である。炎症時におけるSAA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SAA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 [2]。しかしながら、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く、AAアミロイドーシスの発症にはSAAの血中濃度上昇以外の因子の関与も考えられる。

そこで本研究では、SAAアイソフォーム、グリコサミノグリカン(GAG)、脂質に注目し、これらが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企図した。

### 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

アミノ酸104残基からなるSAAには、分子の中間領域に相当する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、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が [3]、その詳細は不明である。

そこでまず、SAA分子中のN末端領域および中間領域を含む断片化ペプチドを作製し、アミロイド線維に特異的に結合し蛍光を発する色素、チオフラビンT(ThT)を用いてSAAペプチドの線維形成能を評価した。その結果、SAA分子のN末端領域に相当するSAA(1-27)ペプチドをヘパリン存在下、pH4.0の緩衝液中でインキュベートしたときに、ThT蛍光の増大が観察された(図1A)。このとき、SAA(1-27)ペプチドは円二色性(CD)測定より $\beta$ シート構造を形成していることが示された(図1B)。また透過型電子顕微鏡(TEM)観察の結果、SAA(1-27)ペプチドは短い直線的な線維を形成してい

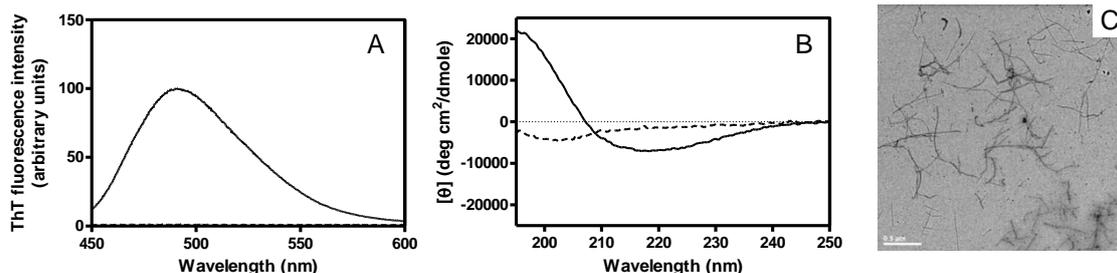


図 1. (A)、(B) ヘパリン存在下 (実線)、非存在下 (破線) における SAA (1-27) ペプチドの ThT 蛍光スペクトル (A)、CD スペクトル (B) (pH 4.0、37°C)、(C) ヘパリン存在下 (pH 4.0) における SAA (1-27) ペプチドの TEM 画像

た (図 1 C)。SAA の線維形成についてはこれまで N 末端から十数残基のみが必須と報告されてきた [4]。本研究結果からも SAA 分子の N 末端領域の SAA (1-27) ペプチドが酸性条件下、ヘパリンの添加により *in vitro* において線維を形成することが示された。この条件下において、各 SAA アイソフォームの中間領域に相当する SAA1.1、1.3 および 1.5 (43-63) ペプチドの線維形成能を評価した。その結果、各 SAA (43-63) ペプチドで観察された ThT 蛍光強度は SAA1.1 > SAA1.5 > SAA1.3 の順となった (図 2 A)。SAA1.1 および 1.5 (43-63) ペプチドの CD 測定では典型的な  $\beta$  シート構造のスペクトルではなかったものの、一部  $\beta$  シート構造が含まれることが示唆された (図 2 B)。また TEM 観察の結果、SAA1.1 (43-63) ペプチドは長く曲線的な線維を形成していた (図 2 C)。

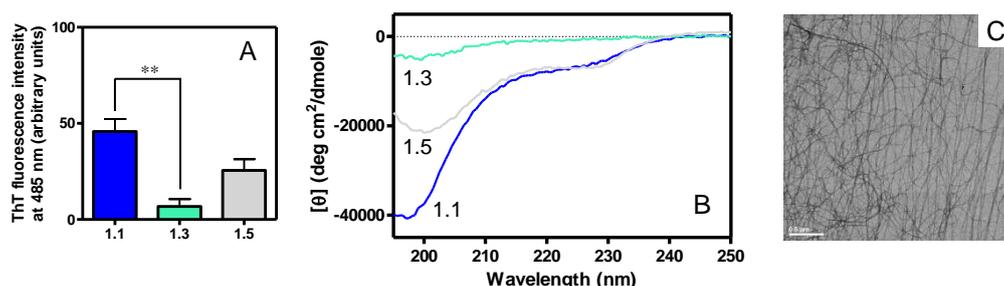


図 2. (A)、(B) ヘパリン存在下 (pH 4.0) における SAA1.1、1.3、および 1.5 (43-63) ペプチドの ThT 蛍光強度 (A) および CD スペクトル (B) (pH 4.0、37°C、Student's t-test \*\*:  $p < 0.01$  ( $n \geq 3$ ))、(C) ヘパリン存在下 (pH 4.0) における SAA1.1 (43-63) ペプチドの TEM 画像

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した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 全長蛋白質をヘパリン存在下、pH 4.0 の緩衝液中でインキュベートした結果、いずれのアイソフォームにおいても ThT 蛍光の増大および  $\beta$  シート構造の形成が認められた。また TEM 観察の結果、SAA 全長蛋白質は球状の凝集体を形成しており、これは線維伸長前の中間体と考えられた。そこで蛋白質濃度を上昇させたところ、線維の伸長が認められた (図 3)。N 末端領域のみに線維形成能を持つ SAA1.3 全長蛋白質の線維形態は直線的であり、一般的なアミロイド線維の形態に似ていた (図 3 A)。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曲線的な太い線維を形成した (図 3 B)。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したと考えられる。他のアミロイド線維において線維の形態によって細胞毒性が異なる

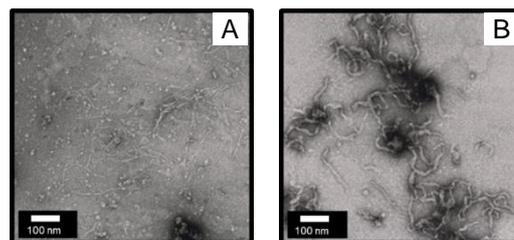


図 3. (A)、(B) ヘパリン存在下 (pH 4.0) の SAA 全長蛋白質の TEM 画像 ((A) SAA1.3 (500  $\mu\text{g/mL}$ )、(B) SAA1.1 (900  $\mu\text{g/mL}$ ))

ことが報告されていることから [5]、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られる。

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。

### SAA の線維形成を促進する GAG の構造要因の検討

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。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ヘパラン硫酸 (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する。SAA の線維形成評価に用いたヘパリンは、イズロン酸もしくはグルクロン酸および *N*-アセチルグルコサミンの二糖で構成され、分子内のアミノ基とヒドロキシ基が高度に硫酸化された GAG である。ほとんどのアミロイド沈着部位から GAG の一つである HS 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 の関与が示唆されている。GAG は細胞外マトリックスを構成する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が、その構造は臓器によって異なり、一様ではない。また SAA 線維は特定の臓器に沈着する傾向があるため、GAG の構造の違いが SAA の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た。

まず、7 種類の GAG を用いて線維形成促進効果を評価した結果、SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに対する線維形成促進効果は GAG に含まれる硫酸基の割合に相関した (図 4 A)。そこで、硫酸基含有量の異なる 5 種類の脱硫酸化ヘパリンを作製し、これらを用いて SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに対する線維形成促進効果を検討したところ、ヘパリンの脱硫酸化の程度が大きいほど ThT 蛍光強度が減少した (図 4 B)。これらの結果から、GAG の SAA に対する線維形成促進効果において、GAG の硫酸基の割合が重要であることが示された。

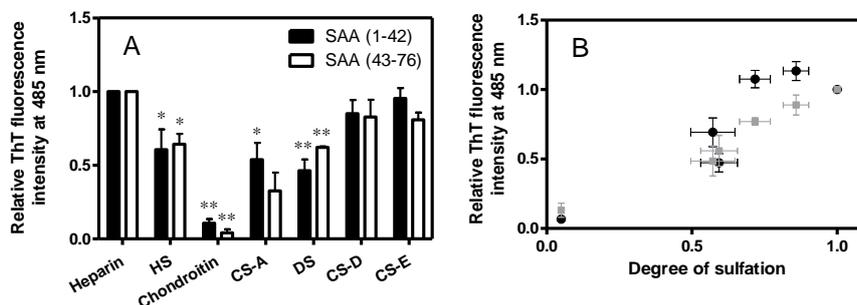


図 4. SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドを 7 種の GAG 分子種 (A) および脱硫酸化ヘパリン (B) 存在下、インキュベート後の ThT 蛍光の相対値 (pH 4.0, 37°C) (HS : ヘパラン硫酸、CS : コンドロイチン硫酸) (● : SAA (1-42) ペプチド、■ : SAA1.1 (43-76) ペプチド) One sample t-test \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  ( $n \geq 3$ )

次に異なる鎖長に断片化されたヘパリン (dp6、dp12、dp20) を用いて SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに対する線維形成促進効果を評価したところ、ヘパリンの鎖長に依存した線維形成促進効果が示された (図 5 A)。dp6 添加時においては  $\beta$  シート構造への二次構造変化が観察されず、鎖長の短いヘパリンは線維形成促進効果を示さなかった。以上の結果は、GAG が SAA 線維の形成を促進するためにはある程度の鎖長以上の硫酸化された単糖によって構成されるドメイン構造が必要であることを示唆している。HS 分子内には糖鎖の一部が高度に硫酸化された高硫酸化ドメインが存在すると報告されている [6]。したがって、他の GAG に比べて硫酸基含有量が少ない HS [7] が SAA 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のは、HS 分子内に高硫酸化ドメイン構造を有しているためであると考えられた。

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 (図 5 B) 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。

その結果、硫酸基を持つデキストラン硫酸およびポリビニル硫酸は SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドに対する線維形成促進効果を示したが、カルボキシ基を有するコロミン酸ではその効果は認められなかった (図 5 C)。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。

以上の結果より、ヒト SAA の線維形成に対して促進効果をもたらす GAG の構造要因の一つが硫酸基であることが明らかとなり、さらに硫酸基含有量だけでなく、高硫酸化ドメイン構造が SAA の線維形成の促進には重要であることが示唆された。SAA においては、短い鎖長では線維形成が促進されないこと、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。また、GAG が SAA の線維形成に対して直接的に促進効果を示すことが明らかになったことから、生体内における GAG の分布や硫酸基修飾の割合の違いが SAA 線維の沈着臓器の特異性や AA アミロイドーシス発症の個人差につながるリスク因子となる可能性があると考えられた。

### SAA の線維形成に脂質が与える影響

SAA は高密度リポ蛋白質 (HDL) の構成蛋白質として、生体内では主に脂質に結合した状態で存在する。蛋白質分子において、線維を形成しやすい領域には疎水性の高いアミノ酸残基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。線維形成能を有することが示された SAA の N 末端領域は中性リン脂質からなるリポソームへの結合能を持つ [8] ことから、SAA と脂質と

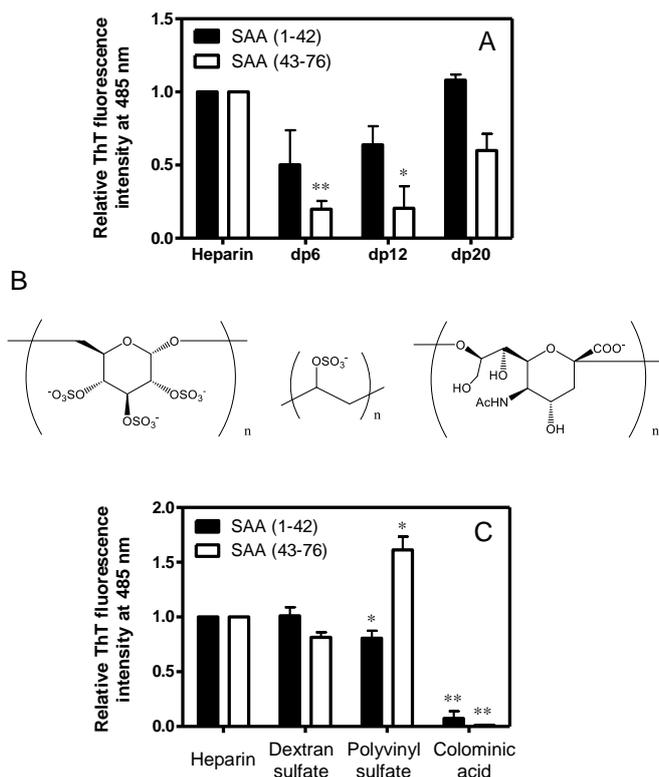


図 5. (A)、(C) SAA (1-42) および SAA1.1 (43-76) ペプチドを断片化ヘパリン (A) およびアニオン性高分子 (C) 存在下、インキュベート後の ThT 蛍光の相対値 (pH 4.0, 37°C, One sample t-test \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  ( $n \geq 3$ )), (B) 使用したアニオン性高分子の構造式

の相互作用に伴って高次構造が変化し、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。

そこでまず、SAA 断片化ペプチドの線維形成に脂質が与える影響を分光学的に評価するために、粒子径の小さいリゾリン脂質ミセルを用いたところ、SAA (1-27) ペプチドは、中性のリゾホスファチジルコリン (lysoPC) からなるミセルに結合し、二次構造は  $\alpha$  ヘリックス構造となった。この状態にヘパリンを添加しても ThT 蛍光強度の増大は認められず、二次構造も  $\alpha$  ヘリックス構造のままであったことから、lysoPC ミセル存在下において、SAA (1-27) ペプチドの線維形成が抑制された

と示唆された。一方、SAA1.1 (43-63) ペプチドは lysoPC ミセルに結合せず、lysoPC ミセル存在下でも線維の形成がほとんど抑制されなかった。しかし、酸性リン脂質であるリゾホスファチジン酸 (lysoPA) からなるミセルには両ペプチドとも結合し、その結果、ヘパリン添加による線維形成が抑制された。

脂質ミセルを用いた検討結果より、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されたが、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 [9]。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。まず、中性リン脂質である dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) によって構成された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 SAA が有するかを調べるために、クリアランスアッセイを行った。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 粒子の散乱光が時間に伴い減少し、粒子が小さくなることが示された (図 6 A)。SAA-DMPC 混合液をゲル濾過クロマトグラフィーで分離したところ、保持時間約 55 分付近に大きなピークが認められた。ピークフラクションに存在する粒子を動的光散乱法 (DLS)、非変性濃度勾配ゲル電気泳動法 (NDGGE) および TEM 観察により評価したところ、約 10 nm の大きさのディスク状粒子であることがわかった。組成解析の結果、本粒子中の DMPC と SAA の比率は約 16 : 1 であり、また CD スペクトルから粒子中の SAA は 37°C で  $\alpha$  ヘリックス構造を形成していることが示された (図 6 B)。これらの結果から、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。

得られた SAA-HDL モデル粒子中の SAA の構造安定性を評価するために、 $\alpha$  ヘリックス構造の温度依存性を評価した。その結果、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シフトし、構造安定性が向上していることが示された (図 7 A、B)。しかしながら SAA-HDL モデル粒子に酸性条件下、ヘパリンを添加し、37°C でインキュベートしたところ、遊離型の SAA に匹敵する ThT 蛍光強度の増大が観察され (図 7 C)、CD スペクトルから  $\beta$  シート構造の形成が示唆された。ヘパリン

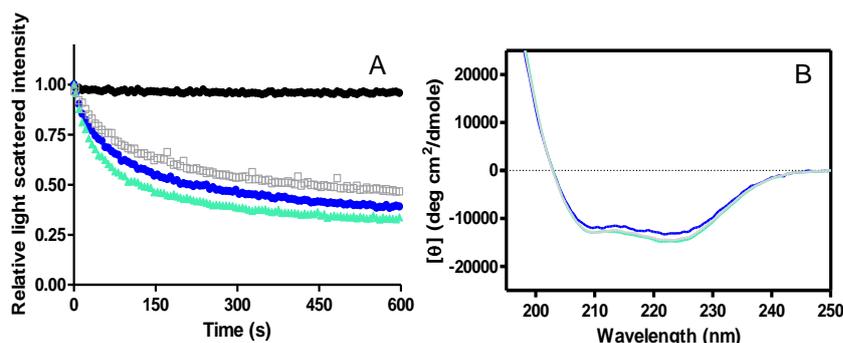


図 6. (A) SAA 全長蛋白質による DMPC リポソームのクリアランス (24.6°C) (SAA1.1: ●、SAA1.3: ▲、SAA1.5: □)、(B) SAA-HDL モデル粒子中の SAA 全長蛋白質の CD スペクトル (37°C) (SAA1.1: 青色、SAA1.3: 水色、SAA1.5: 灰色)、

表 1. 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

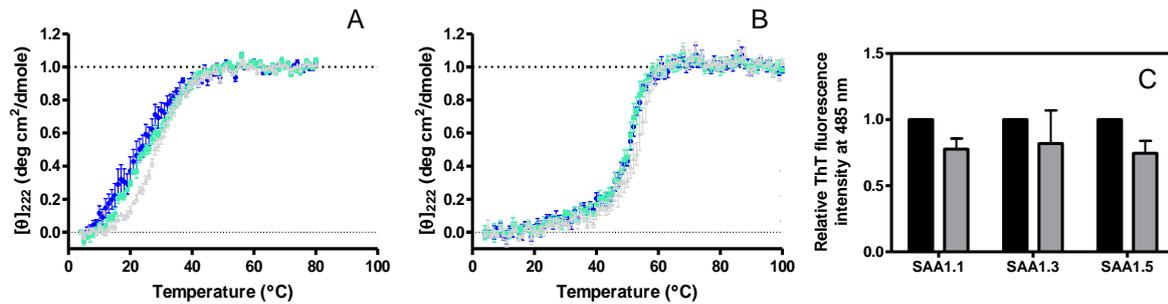


図7. (A)、(B) 遊離型 (A) および SAA-HDL モデル粒子中 (B) の SAA アイソフォームの熱変性曲線 (SAA1.1 : ●、SAA1.3 : ▲、SAA1.5 : □)、(C) ヘパリン存在下における遊離型 (黒) および SAA-HDL モデル粒子中 (灰) の SAA をそれぞれ pH 4.0 でインキュベートしたときの ThT 蛍光強度 (37°C、pH 4.0、Student's t-test no significant difference (n=3))

は HDL 粒子から SAA 蛋白質を解離させるとの報告があり [10]、HDL モデル粒子およびヘパリン共存下で観察された ThT 蛍光の増大および  $\beta$  シート構造への変化は、ヘパリンによって解離させられた遊離型の SAA が線維を形成したことを意味すると考えられる。今回作製した SAA-HDL モデル粒子の特徴から、HDL モデル粒子を構成する SAA 分子の数が他のアポリポ蛋白質に比べて多いと見積もられた。これは SAA 分子中の脂質結合に寄与する  $\alpha$  ヘルックス構造を形成する領域が少ないためにより多くの分子が HDL 粒子の形成に必要なためと考えられる。したがって、SAA 分子中には 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こととなり、HDL への結合に関与していない領域に対して GAG が相互作用しやすくなった可能性があると考えられた。

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顕著な違いは見られなかった (図 6、図 7、表 1)。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構成脂質の違いにより SAA1.1 (43-63) ペプチドの脂質結合性が異なる結果が得られたことから、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の違いが生じる可能性が考えられる。

以上の結果から、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られる。上述のように本研究により 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られる。

## 参考文献

1. Merlini, G. *et al.*, *N Engl J Med* **349** (2003) 583-596.
2. Gillmore, J. D. *et al.*, *Lancet* **358** (2001) 24-29.
3. Baba, S. *et al.*, *Hum Mol Genet* **4** (1995) 1083-1087.
4. Uhlar, C. M. *et al.*, *Eur J Biochem* **265** (1999) 501-523.
5. Zako, T. *et al.*, *Biophys J* **96** (2009) 3331-3340.
6. Gallagher, J. T., *J Clin Invest* **108** (2001) 357-361.
7. Ueno, M. *et al.*, *J Biol Chem* **276** (2001) 29134-29140.
8. Ohta, S. *et al.*, *Chem Phys Lipids* **162** (2009) 62-68.
9. Caillon, L. *et al.*, *Biochim Biophys Acta* **1828** (2013) 2091-2098.
10. Noborn, F. *et al.*, *J Biol Chem* **287** (2012) 25669-25677.

## 論文審査の結果の要旨

炎症に伴い血中濃度の上昇するタンパク質である血清アミロイド A (SAA) は、慢性炎症性疾患の重篤な合併症である AA アミロイドーシスの原因となる。本学位論文では、SAA 分子の 1 残基のアミノ酸置換によって生じるアイソフォーム、ほとんどのアミロイド沈着部位から検出されるグリコサミノグリカン (GAG)、生体内で SAA が結合する脂質に注目し、これらが SAA のアミロイド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することで、AA アミロイドーシス発症の分子基盤を解明することを目指した。まず、アミノ酸置換が存在する SAA 分子の中間領域における線維形成能がアイソフォーム間で異なることを明らかにし、この置換が AA アミロイドーシス発症のリスク因子として直接的に働く可能性を示した。また、GAG の硫酸基含有量や高硫酸化ドメイン構造が SAA の線維形成の促進に重要であることを示した。一方、リゾリン脂質ミセルへの結合に伴う  $\alpha$  ヘリックス構造の形成が、SAA の線維形成に対して抑制的に作用することを示した。そこでさらに、生体内における SAA の構造をより反映した SAA-HDL モデル粒子を構築することで、脂質組成の影響を評価する上での基盤を確立した。

以上のように、本研究は SAA の線維形成機構の一端を分子レベルで明らかにするとともに、AA アミロイドーシス発症機構の解明に向けた新たな展望を切り開いた。

上記の論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。