

AA アミロイドーシス発症制御因子の解明

ーアミロイドーシスの病態に関わる糖鎖合成制御因子と翻訳後修飾ー

1. 研究の目的

(1) アミロイド前駆タンパク質の変異や翻訳後修飾と糖鎖に着目し、AA アミロイドーシスの進展への関与を調べる。病理学的な解析から、AA アミロイドーシス患者組織で、翻訳後修飾を受けた SAA 分子や細胞外マトリクス成分である硫酸化糖鎖の一種、グリコサミノグリカン (GAG) が検出されていることから、これらがアミロイドーシスの病態に深く関わる可能性が示唆されているが、その分子基盤は不明であるため、本研究で明らかにする。

2. 研究の計画

- (1) AA アミロイドーシスの進展に関わる GAG 鎖を調べる。
 - ①GAG合成異常を起こした遺伝子改変マウスを用いて、アミロイドーシスの進展に関連する GAGの詳細な情報を得る。
 - ②アミロイドーシスの進展に関わるプロテオグリカンを同定する。
- (2) GAG の作用点が既存薬の標的と異なることを確認する。
 - ①GAG は SAA の発現亢進には影響を与えないことを確認する。
- (3) SAA 分子の翻訳後修飾が GAG 鎖によるアミロイド線維形成に及ぼす影響を調べる。
 - ①GAGの添加によるアミロイド線維の形成過程を経時的に追跡するとともに、円二色性 (CD) 分散計などを利用した二次構造評価を行う。
 - ②線維の形成、とりわけ二次構造の差異が認められた試料について、凝集体の立体構造評価、凝集体の形態観察を行う。

3. 研究の成果

- (1) 糖鎖合成制御因子について
 - ① アミロイド線維の沈着部位にヘパラン硫酸が共局在していることを確認した。GAGを過剰に合成する遺伝子改変マウスでは、アミロイド線維の沈着が増加し、アミロイド線維に共沈着したヘパラン硫酸が増えていた。
アミロイド沈着が起きた臓器及び起きていない臓器からGAGを粗精製し、HPLC分析を行った。アミロイドが沈着した肝臓のGAGでは、ヘパラン硫酸の硫酸化の程度が上昇していた。
 - ② 腹腔マクロファージやマクロファージ細胞株を用いて、炎症時に発現上昇が見られるプロテオグリカン調べたところ、スモール・ロイシンリッチ・プロテオグリカンの発現が誘導されることがわかった。
 - ③ アミロイド線維の沈着亢進が認められた GAG を過剰に合成する遺伝子改変マウスにおいても、AA アミロイドーシスを誘発した時、SAA の発現上昇は野生型と同程度であったことから、GAG の作用点が既存薬の標的と異なることが確認された。
- (2) 翻訳後修飾の影響について
 - ①過酸化水素により SAA タンパク質の酸化処理を行った。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法 (MALDI-TOF MS) を用いて質量の変化を調べたところ、酸化を受けやすいアミノ酸として知られるメチオニン 3 残基に対応する酸素 3 原子分の質量の増加を確認した。さらに、酸化処理した SAA タンパク質に酵素 (Asp-N) 消化を施すことにより断片化し MS/MS 解析を行ったところ、少なくともメチオニン 2 残基がメチオニンスルホキシドへ酸化されていること、および SAA 分子 105 残基のうちで MASCOT (タンパク質同定に用いるデータベース) により検出されなかったメチオニンを含む 10 残基中に酸素原子が結合していることを明らかにした。
 - ②チオフラビン T の蛍光測定や CD 測定により、アミロイド線維の形成を評価した。その結果、線維の形成促進因子であるヘパラン硫酸 (HS) を添加しない場合に、SAA 分子の酸化がアミロイド線維の形成を遅延させることを明らかにした。しかし、この結果は、主にリジン残基が修飾を受けるカルバモイル化に比べると、その影響は大きなものではなかった。

③コンフォメーション特異的抗体 (A11, 0C) を用いた解析では凝集体の立体構造の差異を識別することはできていないが、電子顕微鏡像では酸化やカルバモイル化によって異なる線維形態を示す結果となった。

4. 研究の反省・考察

(1) 糖鎖合成制御因子について

①本研究では、*EXTL2* ノックアウトマウスを用いて、*EXTL2* の発現低下によりアミロイドの沈着が促進する現象を見出している。ヒトにおいても、*EXTL2* の発現低下がアミロイドの沈着に関連するかどうかを調べるために、ヒトの臨床検体を用いて *EXTL2* の発現を調べる。

②野生型マウス由来マクロファージと比較し、*EXTL2* ノックアウトマウス由来マクロファージで SAA のアミロイド線維の形成が促進することは調べたが、細胞死に違いがあるかないかは検討中であるため、これを明らかにする。また、SAA のアミロイド線維の形成促進の分子機構を調べる。研究代表者らは、最近、非アルコール性脂肪性肝炎モデルを用いて、*Extl2* 欠損マウスにおいて野生型マウスよりも早い段階で肝細胞がんが発生することを明らかにしたが、この現象の原因は、*Extl2* 欠損下で合成される GAG 鎖が炎症性サイトカインの産生に関わるマクロファージの Toll-like receptor 4-NF κ B 経路を直接活性化することである可能性を考えている (Nadanaka, S., *et al.* (2020) *FASEB J.* 34(6), 8385-8401)。Toll-like receptor 4 が刺激されることによって、炎症誘発性サイトカインや SAA のプロセッシングに関わるインフラマソームの活性化がプライミングされることが報告されているため (Zhong, Z., *et al.* (2018) *Nature* 560, 198-203; Babelova, A. *et al.* (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 24035-24048)、この点に着目し研究を進めようと考えている。

(2) 翻訳後修飾の影響について

①SAA は生体内で主に高密度リポタンパク質 (HDL) をはじめとする脂質に結合した状態で存在する。これまでに、別途、SAA の脂質結合に及ぼす翻訳後修飾の影響についても調べており、本研究のメインテーマではないが、AA アミロイドーシス発症制御因子を考える上で、脂質も欠くことのできない因子の一つであるといえる。

②今回用いた大腸菌発現系により得たリコンビナントの SAA 分子には、生体内の SAA 分子には存在しない余分なメチオニン残基が N 末端に存在する。そこで、化学的処理 (グリオキシル酸によるアミノ基転移反応とジアミンによる除去) によりメチオニンを取り除くことを検討しており、現在までにグリオキシル酸による反応条件を確立した。今後、ジアミンによる除去を行い、N 末端に存在するメチオニン残基の翻訳後修飾が、アミロイド線維の形成に及ぼす影響を調べる。

③これまでの結果より、翻訳後修飾により異なる線維の形態が示唆されており、これらの細胞に対する毒性評価を開始している。しかしながら、MTT アッセイを用いてヒト胎児腎細胞 (HEK293) に対する毒性を評価したところ、バッファー成分などの添加物が毒性を示す結果となった。今後、毒性評価に用いるアッセイや細胞種をかえて同様の実験を行うことで、アミロイド線維自身の毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響を調べる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①灘中 里美¹、田中 将史²、中山 尋量²、北川 裕之¹ (¹神薬大・生化、²神薬大・機能性分子)

「グリコサミノグリカンの合成異常に着目したAAアミロイドーシス発症制御因子の解明」
第39回日本糖質学会 (会期: 2020 年 11 月 21-23 日、誌上開催)

学会HP: <http://www.jscr.gr.jp/?p=contents&id=11>

(3) 出版物

なし