

学 校 名	神 戸 薬 科 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	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		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①血清アミロイドA ②グリコサミノグリカン ③AAアミロイドーシス			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
北 川 裕 之	薬 学 部 生 化 学 研 究 室	教 授	研究代表者・研究の総括及び・糖鎖の生化学的な解析

○研究分担者

[illegible]

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) 翻訳後修飾された SAA と GAG 鎖との相互作用メカニズムの解明

① 大腸菌発現系により得たリコンビナントのSAAタンパク質、およびSAA分子中でアミロイド原性が高いN末端領域からなる合成ペプチドを用い、SAAの化学修飾（アセチル化・カルバモイル化・酸化）がアミロイド線維形成能やGAG鎖との相互作用に及ぼす影響を、速度論的・熱力学的な解析手法を用いて調べた。

② アミロイド線維が沈着した*EXTL2*ノックアウトマウスの組織やマクロファージ由来のGAGを高速液体クロマトグラフィーで生化学的に解析した。

(2) GAG 鎖を介した AA アミロイドーシス発症に関わる SAA の翻訳後修飾の同定

解析された様々な翻訳後修飾を受けた SAA 分子のうち、GAG 鎖と相互作用のあるものについて、アミロイド線維を形成させ細胞毒性を評価した。また、二次構造の差異が認められた試料について、コンフォメーション特異的抗体を利用した凝集体の立体構造評価を行い、さらに透過型電子顕微鏡 (TEM) を利用した凝集体の形態観察を行った。

(3) AA アミロイドーシス患者サンプルを用いた *EXTL2* の発現解析

ヒト疾患においても *EXTL2* 遺伝子の発現が重要な役割を果たすことを推測するために、AAアミロイドーシス患者サンプルとコントロール検体を用いて*EXTL2*遺伝子の発現を解析した。

3. 研究の成果

(1) 翻訳後修飾された SAA と GAG 鎖との相互作用メカニズムの解明

① リコンビナントタンパク質およびフラグメントペプチドの化学修飾（アセチル化・カルバモイル化・酸化）を行い、化学修飾されたアミノ酸を質量分析により同定した。我々の実験条件下ではSAAタンパク質のカルバモイル化は分子全体にわたって5か所で起こっていたが、SAAペプチドを用いた結果より、N末端アミノ基のカルバモイル化のみで全長タンパク質と同様の線維形成挙動を示した。また、リコンビナントタンパク質には、そのN末端に余分なメチオニン残基が存在し、それが酸化を受けるが、N末端にメチオニンを含まないSAAペプチドを用いた結果より、アミノ酸配列中の17および24残基目のメチオニン酸化が線維形成に大きく影響することが示唆された。

② アミロイド線維が沈着した*EXTL2*ノックアウトマウスの組織やマクロファージ由来のGAGを高速液体クロマトグラフィーで生化学的に解析した。*EXTL2*ノックアウトマウスの組織ではグリコサミノグリカンの量と硫酸化パターンが変化していること、特に、*EXTL2*ノックアウトマウスのマクロファージでは、内因性のダメージ関連分子パターンとして作用することが知られているデルマタン硫酸の合成が上昇していることがわかった。

(2) GAG 鎖を介した AA アミロイドーシス発症に関わる SAA の翻訳後修飾の同定

解析された様々な翻訳後修飾を受けたSAA分子のうち、GAG鎖と相互作用のあるものについて、アミロイド線維を形成させ細胞毒性を評価した。まず、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、SAAペプチドのアセチル化やカルバモイル化修飾により線維形成能に差異が認められていたにもかかわらず、いずれも同様に濃度依存的な細胞毒性を示した。一方、LDHアッセイを用いて評価したところ、いずれの試料もHEK293に対する毒性を示さなかった。そこで、アミロイド線維添加時の細胞の様子を顕

微鏡で観察したところ、MTTを加えたときにのみ細胞外にホルマザン結晶と思われる突起物が出現した。すなわち、アミロイド線維の非添加時には認められない異常現象が起こることから、アミロイド線維が細胞に対して「毒性」を示していると考えられるが、「細胞死」のような明確なものではないことが示された。

(3) AAアミロイドーシス患者サンプルを用いたEXTL2の発現解析

市販されている倫理審査承認済みのAAアミロイドーシス患者検体（腎臓：2検体、大腸3検体）を用いてEXTL2の発現を免疫組織染色およびリアルタイムPCR法を用いて調べた。コントロール検体ではEXTL2の発現が認められたが、AAアミロイドーシス患者検体ではEXTL2の発現が検出限界以下まで低下していることが免疫組織染色、リアルタイムPCR法によって明らかになった。

4. 研究の反省・考察

(1) SAAの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タンパク質凝集体の形態と細胞に対する毒性については、他のアミロイド原性タンパク質において様々な議論がなされている。したがって、SAAの翻訳後修飾が細胞毒性に及ぼす影響を調べる以前に、SAAの凝集体がもたらす細胞毒性メカニズムを詳細に明らかにする必要がある。そのうえで、細胞に対する特異性なども考慮しながら、翻訳後修飾の影響について調べる。

(2) グリコサミノグリカン(GAG)の影響について

①これまでに、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。2021年度に実施した実験により、AAアミロイドーシス患者の検体（倫理審査承認済の市販品）でEXTL2の発現が顕著に低下していることが示された。さらに、検体数を増やすために、神戸大学医学部附属病院腎臓内科との共同研究の実施を検討し、腎生検により採取した検体を解析するための倫理審査の手続きを行い、検体を解析する準備を整えた。

②SAA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、非アルコール性脂肪性肝炎モデルを用いて、Extl2ノックアウト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る予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

田中将史 「SAA分子の特徴とアミロイド原性」 第8回日本アミロイドーシス学会学術集会、2021年11月

(3) 出版物

なし