

研究課題名 : NMR 法による Transthyretin のアミロイド形成機構の解明

所属研究機関名 : 富山医科薬科大学

研究者氏名 : 水口 峰之

・研究成果の概要

研究の趣旨・目的

Transthyretin は、不溶性フィブリルを形成することによってアミロイド病を引き起こすことが知られている。Transthyretin が天然構造をとっているときにはアミロイド線維は形成されないが、部分的に立体構造が壊れた中間体構造に変化するとアミロイド線維が形成され、家族性アミロイドポリニューロパシーや老人性全身性アミロイドーシスなどのアミロイド病を引き起こす。したがって、transthyretin のアミロイド線維形成を阻害する薬剤を開発するには、天然構造ではなく変性中間体の構造を明らかにする必要がある。また、家族性アミロイドポリニューロパシーは transthyretin 変異体によって引き起こされるので、アミノ酸変異と立体構造・安定性変化の関係についても詳細に調べる必要がある。本研究では、アミロイド線維形成の原因となっている transthyretin の立体構造について、核磁気共鳴(NMR)法を用いて調べることにより、transthyretin のアミロイド線維形成機構を分子レベルで明らかとし、アミロイド形成阻害剤開発の基礎を構築する。

研究計画の概要

1. Transthyretin の大量発現系の構築と transthyretin の発現・精製

Transthyretin の大腸菌による大量発現系を構築し、transthyretin の $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体および $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ ラベル体を作製する。

2. Transthyretin の変性状態の NMR による構造解析

Transthyretin の酸変性状態について NMR を用いて研究する。pH2.0 の条件下で transthyretin 分子のどこが構造を保持しているのか調べる。

3. Transthyretin 変異体の安定性・構造解析

家族性アミロイドポリニューロパシーの原因となっている transthyretin 変異体を作製し、構造安定性、アミロイド形成、立体構造について研究する。変異体がアミロイド症を引き起こす仕組みを分子構造と構造安定性の観点から明らかとする。

4. Transthyretin 変性中間体の NMR による構造解析

Transthyretin は pH4.5 付近で変性中間体となり凝集体を形成する。変性中間体について NMR を用いて研究し、どのような構造が凝集体形成にとって重要なのか明らかとする。

5. アミロイド形成阻害剤の設計と相互作用解析

1 - 4 の研究結果からアミロイド形成阻害剤を設計し、transthyretin のアミロイド形成を阻害する化合物を作り出す。さらに、transthyretin との相互作用について明らかとし、より強く結合する物質をデザインする。

研究計画の詳細報告

(単位:百万円)

研究項目	所要経費					
	13年度	14年度	15年度	16年度	17年度	合計
1. Transthyretin の大量発現系の構築と transthyretin の発現・精製	9.6					9.6
2. Transthyretin 変性状態の NMR による構造解析		10.3	2.0			12.3
3. Transthyretin 変異体の安定性・構造解析		7.0	4.0			11.0
4. Transthyretin 変性中間体の NMR による構造解析			3.3			(3.3)
5. アミロイド形成阻害剤の設計と相互作用解析						
所要経費(合計) (間接経費を含む)	9.6	17.3	9.3			(36.2)

研究成果の概要

研究成果の概要

Transthyretin の大量発現系の構築と transthyretin の発現・精製

NMR 等の物理化学的測定法を用いて研究するには、タンパク質を高収率で得ることができる大量発現系の構築が必要不可欠である。本研究では、transthyretin のアミノ酸配列をコードする DNA を大腸菌に最適なコドンで設計・合成した。合成 DNA から発現プラスミドを構築し大腸菌を形質転換することによって、LB 培地 1リットルあたり 130 ~ 200 ミリグラムの transthyretin 試料を得ることに成功した。極めて高収率の発現系を構築できたので、transthyretin の $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体および $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ ラベル体を大量に作製することができた。

Transthyretin の変性状態の NMR による構造解析

Transthyretin の変性状態について詳しく調べるために、酸変性状態 (pH2.0) の transthyretin について重水素交換と二次元 NMR 法を用いて調べた。pH2.0 の状態で重水素交換反応を行い、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルを用いてどのアミノ酸残基が重水素交換から保護されているのか調べた。その結果、pH2.0 の状態で重水素交換から強く保護されている部位は、dimer-dimer 相互作用部位のストランド A 及びストランド B 周辺であることが判明した。また、pH4.5 において最も不安定とされている Val71, Glu41, Val93 が pH2.0 では比較的軽水素交換から保護されており、このような pH の違いによる構造変化がアミロイド形成に重要であることが示唆された。

Transthyretin 変異体の安定性・構造解析

Transthyretin によるアミロイドーシスとアミノ酸変異は密接に関連していると考えられており、これまでに 80 種類以上の変異体が発見されている。家族性アミロイドポリニューロパチーを引き起こしていると考えられている 13 種類の変異体について大腸菌による大量発現系を構築し、変異体の発現・精製を行った。作製した変異体は、V20I, S23N, P24S, L58H, L58R, T59K, E61K, S77Y, I84N, I84T, S112I, Y114H, Y116S である。すべての変異体について構造安定性やアミロイド線維形成について調べたところ、変異体は野生型よりも不安定化しており、より多くのアミロイドを形成することが明らかとなった。しかしながら、不安定化の程度や相対的なアミロイド量には変異体によって差があり、transthyretin の構造や安定性に対する影響は変異によって異なることがわかった。また、生理的条件下において S112I 変異体は四量体ではなく二量体として存在し、Y114H と Y116S は四量体と単量体が混在していた。これらの変異体においては、アミノ酸変異によって四量体構造を保持できなくなっていることがアミロイド線維形成を促進しているものと考えられる。さらに、T59K 変異体については、重水素交換と二次元 NMR によって調べることにより、どのアミノ酸残基が重水素交換反応から保護されているのか調べた。T59K 変異体で強く重水素交換から保護されていたアミノ酸残基は野生型とは異なっていることがわかった。また、変異を導入した T59 周辺のアミノ酸残基以外にも局所的に不安定化されている構造部位がいくつか確認できた。

波及効果、発展方向、改善点等

本研究では transthyretin の大腸菌による大量発現系を構築した。大腸菌に最適なコドンを用いて DNA を設計することによって、極めて高収率な発現系構築に成功した。本研究で構築した発現・精製方法は、本研究プロジェクトの発展のみならず、国内外の transthyretin 研究にとっても有益であると思われる。Transthyretin の発現系構築に関する研究結果は、学会で発表し、また、専門誌にも掲載し広く公表した。家族性アミロイドポリニューロパチーの原因となっている 13 種類の変異体について調べたところ安定性やアミロイド線維の形成しやすさは変異体によって様々であった。しかしながら、アミロイド線維形成量と発症年齢や症状の重篤度とは必ずしも相関が認められなかったことから、アミロイド線維量だけでなく細胞に対する毒性についても調べる必要があると思われる。近年、アミロイド線維よりもタンパク質の変性中間体がアポトーシスを誘導し細胞死を引き起こしているという結果がいくつか報告されている。

本研究でも transthyretin のアミノ酸変異とアポトーシスの関係について検証する予定である。現在、アポトーシス関連の予備実験を行っている。

. 研究成果公表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国 内	0 件	0 件	9 件	9 件
国 際	7 件	0 件	0 件	7 件
合 計	7 件	0 件	9 件	16 件

(2) 特許等出願件数

合計 0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

(3) 受賞等

0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

(4) 主な原著論文による発表の内訳

* 発表者氏名,「発表題目」,文献名,巻(号),頁,(掲載年)の順

国内誌 (国内英文誌を含む)

なし。

国外誌

1. Matsubara, K., Mizuguchi, M. and Kawano, K. : 「Expression of a synthetic gene encoding human transthyretin in *Escherichia coli*」, *Protein Expression and Purification*, **30**, 55-61, (2003)
2. Mizuguchi, M., Kroon, G. J., Wright, P. E. and Dyson, H. J. : 「Folding of a β -sheet protein monitored by real-time NMR spectroscopy」 *Journal of Molecular Biology*, **328**, 1161-1171, (2003)
3. Tada, M., Aizawa, T., Shinohara, Y., Matsubara, K., Miura, K., Yoshida, M., Shitara, K., Kouno, T., Mizuguchi, M., Nitta, K., Hayakawa, Y. and Kawano, K. : 「Role of aromatic residues in the structure and biological activity of the small cytokine, growth-blocking peptide (GBP)」, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 10778-10783, (2003)
4. Miura, K., Kamimura, M., Aizawa, T., Kiuchi, M., Hayakawa, Y., Mizuguchi, M. and Kawano, K. : 「Solution structure of paralytic peptide of silkworm, *Bombyx mori*」, *Peptide*, **23**, 2111-2116, (2002)
5. Tada, M., Kobashigawa, Y., Mizuguchi, M., Miura, K., Kouno, T., Kumaki, Y., Demura, M., Nitta, K. and Kawano, K. : 「Stabilization of protein by replacement of a fluctuating loop: structural analysis of a chimera of bovine α -lactalbumin and equine lysozyme」, *Biochemistry*, **41**, 13807-13813, (2002)
6. Mizuguchi, M., Kobashigawa, Y., Kumaki, Y., Demura, M., Kawano, K. and Nitta, K. : 「Effects of a helix substitution on the folding mechanism of bovine α -lactalbumin」, *Proteins*, **49**, 95-103, (2002)

7. Mizuguchi, M., Fujisawa, R., Nara, M., Nitta, K. and Kawano, K. : 「 Fourier-transform infrared spectroscopic study of Ca²⁺-binding to osteocalcin 」 , *Calcified Tissue International*, 69, 337-342, (2001)

(5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor	合計
<i>Protein Expression and Purification</i>	1.569	1.569
<i>Journal of Molecular Biology</i>	5.388	6.957
<i>Journal of Biological Chemistry</i>	7.368	14.325
<i>Peptide</i>	1.867	16.192
<i>Biochemistry</i>	4.221	20.413
<i>Proteins</i>	3.576	23.989
<i>Calcified Tissue International</i>	2.189	26.178

2000 年の Impact Factor を示した。

NMR法によるTransthyretinのアミロイド形成機構の解明

