β_2 ミクログロブリンのアミロイド線維の構造と形成機構

大阪大学蛋白質研究所 山口圭一, 後藤祐児

Amyloid fibril formation is a phenomenon common to many proteins and peptides. Clarifying the mechanism of amyloid fibril formation is essential not only for understanding the pathogenesis of amyloidosis but also for improving our understanding of the mechanism of protein folding. Dialysis-related amyloidosis is a common and serious complication among patients on long-term hemodialysis, in which β_2 -microglobulin forms amyloid fibrils. We studied the core of fibrils at single-residue resolution using recently developed H/D exchange method with the dissolution of fibrils by dimethylsulfoxide. The results suggest the mechanism of amyloid fibril formation, in which the core β -sheet formed by a minimal sequence propagates to form a rigid and extensive β -sheet network.

protein misfolding / amyloid fibril / β_2 -microglobulin / dialysis-related amyloidosis /
hydrogen/deuterium exchange / NMR

1. はじめに

タンパク質は、アミノ酸配列に従い特異的な立体構造（ネイティブ構造）を形成して機能を発現する¹⁾。ネイティブ構造は、生理的条件下においてタンパク質が形成する唯一の安定な構造であると考えられてきた。ところが、タンパク質は間違った構造に折りたたまり、病気にかわることが明らかになってきた²⁾。タンパク質の立体構造変化が原因で引き起こされる病気はコンフォメーション病（conformational disease）あるいは、フォールディング病（folding disease）とよばれ、その代表にアミロイドーシス（amyloidosis）がある。アミロイドーシスは、アミロイド線維とよばれる細線維状構造体が体内のさまざまな部位に沈着する疾患の総称であり、アルツハイマー病や、プリオン病、透析アミロイドーシスなど20種類ほどが知られている³⁾。なお、アミロイド線維（amyloid fibril）には、医学用語として繊維ではなく“線維”を用いる。

アミロイド線維はそれを構成するタンパク質の種類によらずいくつかの共通した特徴をもつ²⁾⁻⁴⁾。アミロイド線維は直径5-20 nm、長さ数mmにも及ぶ枝分かれのない線維であり、線維軸と直交する方向に β ストランド（クロス β 構造）が並んでできた細線維が、さらに何本

かより集まっている（Fig.5a）。電子顕微鏡や原子間力顕微鏡で観察すると、約100 nmごとにらせん状の周期構造が見られる。また、アミロイド線維はコンゴーレッド、チオフラビンTなどが結合すると、特異的な分光学的变化を示す。前者がアミロイド線維と結合すると偏光顕微鏡観察により黄緑色の複屈折が見られるようになるのに対し、後者が結合した場合、450 nmの励起光によって480-490 nmあたりに特徴的な蛍光ピークが現れる。しかし、アミロイド線維形成タンパク質に共通した機能やアミノ酸配列はいまだ見いだされていない。

病気とはかわりがないさまざまなタンパク質やペ

Fig.1 Relationship of the sets of foldable and amyloidogenic sequences.

Structure and Formation of Amyloid Fibrils of β_2 -Microglobulin

Kei-ichi YAMAGUCHI, Yuji GOTO

Institute for Protein Research, Osaka University

プチドが、適当な条件下でアミロイド線維を形成することがわかってきた^{2), 5)}。そこで、アミロイド線維形成はポリペプチド鎖の基本的性質と考えられるようになりつつある (Fig.1)。アミロイド線維の形成機構の解明は、アミロイドーシスの予防や治療法開発のために重要である。さらに、アミロイド線維を形成することがタンパク質の本質的な性質であるとする、それを研究することは構造生物学的にも重要である。本稿では、透析アミロイドーシスの原因タンパク質であるβ₂ミクログロブリンについて、最近、筆者らが行った研究を中心にアミロイド線維形成の分子機構について紹介する。

2. 透析アミロイドーシス

長期透析患者に高頻度で発症する合併症に、透析アミロイドーシスがある。本疾患では、β₂ミクログロブリンからなるアミロイド線維が、手根管や肩を中心に全身の関節部位に蓄積し、その結果、関節の痛みや屈折障害を招く⁶⁾。β₂ミクログロブリンは99アミノ酸残基からなる典型的な免疫グロブリンドメイン・フォールドをもつタンパク質であり、分子中央に存在する1本のジスルフィド結合が2層のβシートをつなぎ、安定化している⁷⁾ (Fig.2a)。β₂ミクログロブリンは本来クラスI組織適合性抗原の軽鎖であり、免疫機能には必須のタンパク質である。健常者では、さまざまな細胞から血液中に放出されたβ₂ミクログロブリンは、腎臓で代謝される。腎不全の患者では代謝が行われず、さらに、血液透析患者では透析膜を通過しないため、血中から除去されない。このため、健常者では約1 mg/Lであるβ₂ミクログロブリンの血中濃度が、50 mg/L程度に上昇する。このような状態が10年以上も続くと多くの患者でアミロイド線維の沈着が起きる。β₂ミクログロブリンの血中濃度の上昇がアミロイドーシス発症の第1の危険因子であることは間違いないが、なぜ10年以上経過して発症するのかをはじめ、詳細な機構はわかっていない。

透析アミロイドーシスは、透析医療の盛んな我が国で特に頻発している病気である。そして、透析アミロイドーシスは、優れた医療の引き起こした思いもなかった合併症であり、医原病の1つである。さまざまなタンパク質がアミロイド線維を形成することを考えると、β₂ミクログロブリンのような隠れた危険性をもつタンパク質はほかにも数多く存在するはずである。その意味で、透析アミロイドーシスは医療に対する警鐘を鳴らすものである。アミロイドーシス発症の分子機構を解明して、新たな医原病を防ぐことが必要である。

Fig.2 Various conformational states of β₂-microglobulin. (a) The native state with the PDB file 3HLA⁷⁾. The region corresponding to K3 peptide (Ser20-Asn-Phe-Leu-Asn-Cys-Tyr-Val-Ser-Gly-Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Val-Asp-Leu-Leu-Lys41) is labelled gray. (b-c) Electron micrographs of fibrillar states : (b) mature fibrils, (c) immature fibrils and (d) K3 fibrils. The scale bars represent 200 nm. (文献17より許可を得て転載)

3. シード依存性伸長反応

β_2 ミクログロブリンは比較的小さな球状タンパク質であるので、タンパク質の立体構造とアミロイド線維形成との関係を物理化学的な手法で研究するのに適している。このため、近年、著者らははじめいくつかのグループが、活発な研究を展開している^{8)~10)}。アミロイド線維形成はきわめて普遍的な現象であり、 β_2 ミクログロブリンで得られた知見もほかのタンパク質のアミロイド線維に共通すると考えられる。

アミロイド線維を形成する能力をもつタンパク質はアミロイド原性タンパク質 (amyloidogenic protein) とよばれる。内木らは、 β_2 ミクログロブリンをはじめとするいくつかのアミロイド原性タンパク質において、破碎して断片化したアミロイド線維をシードとして用いることによって、比較的短時間でアミロイド線維を形成できることを示した¹¹⁾。シード依存性アミロイド形成反応は、アミロイド線維の形成機構の特徴を反映した重要な反応である。 β_2 ミクログロブリンの例では、まず、患者から精製したアミロイド線維を超音波破碎して線維断片を作製し、これをシードとして用いる。これに酵母あるいは大腸菌で発現した β_2 ミクログロブリンのモノマーを加えると、ただちにアミロイド伸長反応が起きる。ただし、以上の操作はすべて酸性 (pH 2.5) で行う。pH 2.5では β_2 ミクログロブリンは酸変性しており、タンパク質のネイティブ構造が変性することがアミロイド線維形成に必要であることを示す。

4. β_2 ミクログロブリンのさまざまなアミロイド線維

1つのアミロイド原性タンパク質がいくつかの異なる線維状構造を形成することが知られている。 β_2 ミクログロブリンにおいてもいくつかの線維形態を観察することができる。すでに述べたように、酸性でのシード依存アミロイド伸長反応によって、患者から精製したアミロイド線維に近い剛直なアミロイド線維が形成される (Fig.2b)。他方、 β_2 ミクログロブリンを酸性溶液中、高塩濃度下で長時間置くと、シードが存在しない条件下で、くねくねと折れ曲がったフィラメント状のものができる¹²⁾ (Fig.2c)。ここではフィラメントとよぶ。細かいフィラメントはいくら時間が経過しても剛直なアミロイド線維へと変化することはなかった。おそらく、高塩濃度下で分子間の疎水性相互作用が強まり、線維形成におけるさまざまな相互作用のバランスが崩れて、協同的な線維形成ができず、中間的な構造で行き止まってしまったのであろう (アミロイド線維形成の協同

性についてはp.235の用語コラム参照) しながら、このような中間的構造が観測されたことから、アミロイド線維は何本かのフィラメントが寄り集まってできていると推定される。

他方、 β_2 ミクログロブリンをプロテアーゼで限定分解し、得られる部分ペプチドのアミロイド線維形成について調べたところ、Ser20-Lys41 からなる22残基のペプチド (K3) 単独でも、全長 β_2 ミクログロブリンと類似したアミロイド線維を形成することが明らかとなった¹³⁾。この領域はアミロイド線維形成において重要であり、線維形成の引き金になると考えられる。K3ペプチドはシードを必要とせず、自発的に重合してアミロイド線維を形成する。電子顕微鏡を用いて観察すると、 β_2 ミクログロブリンの剛直な線維に似た直線状の細長いアミロイド線維が形成されていた (Fig.2d)。K3ペプチドがフレキシブルなフィラメントを形成することはなかった。

なお、全長 β_2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成反応はpH 2付近に極大があるのに対して、K3の最適pHは中性付近にあった¹⁴⁾。全長 β_2 ミクログロブリンが酸性条件下でのみアミロイド線維を形成するのは、中性では β_2 ミクログロブリンがネイティブ構造を形成しており、K3領域が表面に露出しないためだと考えられる。よって、ネイティブ構造の崩壊あるいは不安定化によりK3の領域が露出し、核形成の成立などの条件さえ整えば、中性pHにおいても β_2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成が起きると予想される。

5. アミロイド線維の構造解析

上で述べた3種類の線維の構造を比較すれば、アミロイド線維形成を理解する手がかりを得ることができる。しかしながら、アミロイド線維は非結晶であるためX線結晶構造解析を用いることはできない。また、高分子重合体であるため溶液NMR解析にも適さない。現在、固体NMRがアミロイド線維の構造を原子分解能で調べることができる方法である¹⁵⁾。他方、球状タンパク質では、ペプチド結合を形成するアミドプロトンの水素/重水素交換とNMR解析を組み合わせることが盛んに行われている。水素結合を形成して α ヘリックスや β シートなどの2次構造に関与しているアミドプロトンの交換速度は、数千から数百万倍まで遅くなる。つまり、重水素との交換反応を追跡することにより、タンパク質分子の固さ・やわらかさを残基ごとに調べることができる。このため、重水素交換を、高分子重合体であるアミロイド線維の解析に利用することを考えた^{16), 17)}。

β_2 ミクログロブリンのアミロイド線維の構造と形成機構

Fig.3 ^1H - ^{15}N -HSQC spectra of β_2 -microglobulin dissolved in 95 % (v/v) d_6 -DMSO, 5 % (v/v) D_2O and 0.2 % (v/v) d_2 -dichloroacetate (pD 5.0). (a) Reference spectrum obtained for the sample that was not subjected to exchange, (b) mature fibrils after 204 hours from the start of the exchange, and (c) immature flexible filaments after 204 hours. (文献 17より許可を得て転載)

ジメチルスルホキシド [$(\text{CH}_3)_2\text{S} = \text{O}$; DMSO] は強い極性溶媒であり、高濃度のDMSOはアミロイド線維を溶かす能力が高い。都合のよいことにDMSOはタンパク質のアミドプロトンと交換する水素原子を含まないので、重水素交換反応を停止することにもなる。DMSOによるアミロイド線維溶解と溶液NMRを組み合わせることによって、アミロイド線維の構造を残基レベルで解析することができる。まず、アミロイド線維の重水素交換を行う。次にアミロイド線維を遠心分離回収し、凍結乾燥する。95 % (v/v) DMSO, 5 % (v/v) D_2O , pD 5.0に溶解後、NMRスペクトルを測定して、重水素交換反応を定量する。

この手法を用いて、 β_2 ミクログロブリンの形態が異なる2種類の線維構造（剛直なアミロイド線維とフレキシブルなフィラメント）とK3ペプチドのアミロイド線維に対して、重水素交換実験を行った。DMSO中での重水素交換の定量は、 β_2 ミクログロブリンは ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル (Fig.3), K3ペプチドは ^1H - ^1H TOCSYスペクトルを測定して行った。K3ペプチドは残基数が少ないので、 ^1H - ^1H TOCSYスペクトル上でもピークの重なりが少なく、重水素交換を追跡することができる。通常の酸変性タンパク質では、重水素交換はきわめて速く進み、数時間でほとんどのピークは消失する。8日間交換を行ったアミロイド線維 (Fig.3b) やフィラメント (Fig.3c) で多くのピークが観測できたことは、これらの構造が交換から強く保護されていることを示す。

一定時間後の重水素交換の割合をアミノ酸残基に対してプロットし、全長アミロイド線維、全長フィラメント、K3アミロイド線維を比較した (Fig.4)。3種類のアミロイド線維はそれぞれに特徴的な強度の減少を示した。

剛直な全長アミロイド線維では、N末端を除く広範囲のアミドプロトンが交換から強く保護されていた (Fig.4a)。しかし、C末端の保護の程度は、中央部分より低い。アミロイド線維のプロテアーゼ分解などの結果¹⁸⁾と比較すると、C末端は線維形成にかかわっていない可能性が高い。また、 β_2 ミクログロブリンのネイティブ状態について重水素交換実験を行うと、おもに β シートのコア領域だけが交換から保護されていた¹⁹⁾。剛直なアミロイド線維では、それに加えてループ領域も交換から強く保護されている。つまり、アミロイド線維では、ネイティブ構造のループ領域も β シートを形成し、水素結合で安定化されている可能性が高い。

他方、高塩濃度下で形成したフレキシブルなフィラメントでは、重水素交換から保護されている領域が狭く、Val37-Lys48とSer57-Asp69付近の2カ所だけが強く保護されていた (Fig.4b)。別の言い方をすると、 β_2 ミクログロブリンとK3ペプチドの剛直なアミロイド線維では80 %以上の残基が保護されていたが、フレキシブルなフィラメントでは30 %程度しか保護されていなかった。フィラメントでは線維形成にかかわっている残基が少なく、このため剛直な形状を保てないと考えられる。また、この2つの部位は疎水性が高い領域と一致す

Fig.4 The ratios of peak height with and without exchange in deuterated buffer plotted against residue number. (a) Mature fibrils, (b) immature flexible filaments and (c) K3 fibrils. The exchange time was indicated in hour. The position of the cysteine residues involved in the disulfide bond (Cys25-Cys80) and the residues, for which data were not available, are indicated by closed and open circles, respectively. Hydrophobicity profile calculated using the scale of Kyte and Doolittle²¹⁾ is shown in (b). The locations of secondary structures obtained from the X-ray structure are indicated on the top of the figure. (文献17より許可を得て転載)

る。高塩濃度下で強まった疎水性相互作用によって、フレキシブルなフィラメントが形成されたのであろう。これに対して、K3ペプチドのアミロイド線維では、ペプチド全体が同様に重水素交換から保護されていた (Fig.4c)。フレキシブルな領域が削除され、ペプチド全体が強固な水素結合ネットワークを形成していると考えられる。

球状タンパク質のアミドプロトンの重水素交換は、各残基について1次反応に従うことが多い。ところが、アミロイド線維の重水素交換反応を詳細に解析するとその機構は複雑であった。つまり、交換反応は単純な1次反応とはならず、約8日の交換反応で交換しなかった分画は、さらに反応時間を長くしても交換しなかった。これより、アミロイド線維を構成するタンパク質分子は、交換から比較的強く保護された状態と、きわめて強く保護された状態の少なくとも2つの混合状態にあることがわかった。

6. アミロイド線維のモデル

線維構造の中で環境の異なるモノマー分子が共存することは、アミロイド線維が数本のプロトフィラメントがより合わさった超分子構造体であることとよく合っている。同じモノマー分子でも、線維の表面にあるものと線維の内部に存在するものが存在し、内部にある分子のアミドプロトンは周りの溶媒との接触がまったくなく、重水素交換からきわめて強く保護されているのであろう (Fig.5a)。これはアミロイド線維の超分子構造がもたらす基本的な特徴であり、球状タンパク質とは基本的に異なる。

次に、K3 (Ser20-Lys41) ペプチドのアミロイド線維、全長 β_2 ミクログロブリンのフレキシブルなフィラメントと剛直な線維を比べると、アミロイド線維の形成機

Fig.5 Schematic models of amyloid fibrils. (a) A model consistent with the biphasic fibrillar H/D exchange kinetics. Amyloid fibrils are formed with several pieces of protofilament. Dotted lines indicate hydrogen bonds. Outer sides of protofilaments, shown in light color, can be exchanged relatively easily, while the inner side of the protofilaments, shown in dark color, are not subject to H/D exchange. (b) Protected and unprotected regions of different states: K3 fibril (left), immature filament (middle), and mature fibril (right). The distinct core regions among the three fibrillar states suggest that, firstly, the β -sheet cores are formed in K3 region, and then propagate to the rest of the molecule. (文献17より許可を得て転載)

構を推定することができる。まず、K3領域は単独でもアミロイド線維を形成することから、K3領域は線維形成の開始点となる可能性が高い。K3領域で形成された水素結合ネットワーク (β シート構造) は分子全体に広がり、全長 β_2 ミクログロブリンの剛直なアミロイド線維が形成されると推定される (Fig.5b)。

7. おわりに

アミロイド線維の研究は、驚くべき勢いで展開している。極低温電子顕微鏡⁴⁾や固体NMR¹⁵⁾により、アミロイド線維の立体構造の解析も進んでいる。それでもX線結晶解析や溶液NMR解析に基づくネイティブ構造の詳細な立体構造にはほど遠い。今回、アミロイド線維に対して重水素交換を行うことで、線維形成にかかわっている残基を明らかにすることができた。分解能は低い、構造物性を残基レベルで議論できる点で有用な方法である。

アミロイド線維形成は多くのタンパク質やペプチドに共通した特徴であることは間違いない (Fig.1)。ネイティブ構造がタンパク質の機能を支える華やかな表の世界だとすると、アミロイド線維は病気と関係するタンパク質の裏の世界である。しかしながら、裏の世界のタンパク質も決して暗いだけではない。アミロイド線維は折れ曲がりや枝分かれのない剛直なワイヤーであり、ナノテクノロジーの素材として期待されている。DNAの二重らせんは特徴的な構造を活かし、電流を流すことができる。同様にアミロイド線維を利用したナノワイヤーの試みも報告されている²⁰⁾。DNAは4つの塩基からなるが、タンパク質は20種類のアミノ酸からなり、その組み合わせ次第では可能性は大きく広がる。線維を形成するタンパク質のアミノ酸配列を操作することにより、太さや硬さの異なるさまざまな形態のアミロイド線維を作れるのではないかと想像する。さらに、アミロイド線維の形態を自在に操ることができれば、複雑な材料への応用も期待できる。

謝 辞

本稿で紹介した著者の研究は、加藤秀典博士 (奈良先端科学技術大学院大学)、星野 大博士 (蛋白質研究所)、内木宏延教授・長谷川一浩博士 (福井大学) らとの共同研究による成果であり、これらの方々に感謝致します。

文 献

- 1) 後藤祐児, 谷澤克行 (2000) タンパク質の分子設計 (後藤・谷澤編), pp.1-35, 共立出版.
- 2) Dobson, C. M. (2003) *Nature* **426**, 884-889.
- 3) 樋口京一 (2001) 分子シャペロンによる細胞機能制御 (永田, 森, 吉田編), pp.164-174, シュプリンガーフェアラーク東京.
- 4) Jiménez, J. L. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9196-9201.
- 5) Ohnishi, S., Koide, A. and Koide, S. (2000) *J. Mol. Biol.* **301**, 477-489.
- 6) Gejyo, F. *et al.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**, 701-706.
- 7) Bjorkman, P. J. *et al.* (1987) *Nature* **329**, 506-512.
- 8) Rasano, C. *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* **335**, 1051-1064.
- 9) McParland, V. J., Kalverda, A. P., Homans, S. W. and Radford, S. E. (2002) *Nature Struct. Biol.* **9**, 326-331.
- 10) Kad, N. M. *et al.* (2003) *J. Mol. Biol.* **330**, 785-797.
- 11) Naiki, H. *et al.* (1997) *Amyloid* **4**, 223-232.
- 12) Hong, D. P., Gozu, M., Hasegawa, K., Naiki, H. and Goto, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 21554-21560.
- 13) Kozhukh, G. V. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **277**, 1310-1315.
- 14) Ohhashi, Y., Hasegawa, K., Naiki, H. and Goto, Y. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 10814-10821.
- 15) Tycko, R. (2003) *Biochemistry* **42**, 3151-3159.
- 16) Hoshino, M. *et al.* (2002) *Nature Struct. Biol.* **9**, 332-336.
- 17) Yamaguchi, K. *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* **338**, 559-571.
- 18) Monti, M. *et al.* (2002) *Protein Sci.* **11**, 2362-2369.
- 19) Katou, H. *et al.* (2002) *Protein Sci.* **11**, 2218-2229.
- 20) Scheibel, T. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4527-4532.
- 21) Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

山口圭一

山口圭一(やまぐち けいいち)

大阪大学蛋白質研究所溶液学部門 博士後期課程2年

2001年広島大学理学部化学科卒業、03年大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻博士前期課程修了。

研究内容：アミロイド線維形成機構の解明

趣味：テニス

連絡先：〒565-0871 吹田市山田丘3-2

E-mail: keiichi@protein.osaka-u.ac.jp

後藤祐児(ごとう ゆうじ)

大阪大学蛋白質研究所 教授

1982年大阪大学大学院理学研究科修了、理学博士。徳島大学医学部、大阪大学理学部を経て、98年より現職。

研究内容：タンパク質の構造安定性、フォールディング、ミスフォールディング

連絡先：〒565-0871 吹田市山田丘3-2

E-mail: ygoto@protein.osaka-u.ac.jp