アミロイド線維形成とタンパク質科学

Amyloid Fibril Formation and Protein Science

後藤祐児
Yuji GOTO

Institute for Protein Research, Osaka University
E-mail: ygoto@protein.osaka-u.ac.jp

Abstract: Amyloid fibrils have been a critical subject in recent studies of proteins since they are associated with the pathology of more than 20 serious human diseases. Moreover, a variety of proteins and peptides not related to diseases are able to form amyloid fibrils, implying that amyloid formation is a generic property of polypeptides. On the basis of various approaches of protein science, increasingly convincing models of amyloid structures, their formation and propagation are emerging. Now, approaches of polymer science will be promising for further advancing our understanding of amyloid fibrils.
Keywords: Amyloid Fibrils / Protein Misfolding / ß2-Microglobulin / Amyloid ß / Dialysis-related Amyloidosis / Alzheimer's Disease

1. はじめに

アミロイド線維の歴史は1854年，Virchow, R.らがヒトの組織から取り出した沈着物にはじまる[1)]。沈着物がヨウ素でんぷん反応を示したことから多糖の蓄積であると考えられ，アミロイド（amyloid）と命名された。約100年後にアミロイドの主成分が微細線維状のタンパク質沈着であることが発見され，アミロイド線維（amyloid fibril）と呼ばれるようになった。さらに10年後の1969年，X線繊維回折によって，アミロイド線維はクロスβシート構造から構成されることが示された。今日，アミロイド線維の中で，ペプチド鎖は，4.7 Åの間隔で線維軸と直交する方向に積み重なっていくことが明らかとなっている（図1）。病理学分野でのアミロイド線維の定義は厳密であり，1）コンゴレッド色素で染色され，偏光顕微鏡下で緑色偏光を呈すること，2）電子顕微鏡観察で，幅10 nm程度で枝分かれのない線維構造が見られること，3）X線回折や円二色性測定によってβ構造であること，などが満たされることが条件となっている。しかし，最近では類似の構造状態もアミロイド線維として取り扱われることが多い。また，医学用語として，「繊維」ではなく，「線維」と表記される（「まとめ」を参照）。

アミロイド線維の沈着を伴う疾患をアミロイドーシス（amyloidosis，あるいはアミロイド病）と呼ぶ。現在，クロイツフェルトヤコブ病やウシ海綿状脳症（BSE）などのプリオン病（プリオンタンパク質），アルツハイマー病（アミロイドβ），透析アミロイドーシス（β2ミクログロブリン），ALアミロイドーシス（免疫グロブリンL鎖），家族性アミロイドポリニューロパチー（トランスサイレチン）をはじめとする約20種類以上のアミロイドーシスが知られている[2)]。カッコ内は原因となる前駆体タンパク質であり，それらの多くは生命機能を支える重要なタンパク質である。従来，細胞外にアミロイド線維沈着を起こすものがアミロイドーシスとされてきたが，今日では，細胞内でアミロイド類似線維の沈着の起きるハンチントン病（ハンチンチン，ポリグルタミン）やパーキンソン病（αシヌクレイン）もアミロイドーシスに含める。また，病気とは関係しない多くのタンパク質やモデルペプチドでもアミロイド線維を形成する。数多くのタンパク質やペプチドがアミロイド線維，あるいはそれに類似した構造を形成することから，アミロイド線維はタンパク質あるいはペプチドのとりうる基本的な構造形態である可能性が高い[3)～5)]。

アミロイドーシスとアミロイド線維の研究は，従来，医学の領域にあり，医学では重要な研究対象ではあるが，タンパク質の構造や物性の研究者にとっては，興味の対象外であった。それがなぜ，現在のようにタン

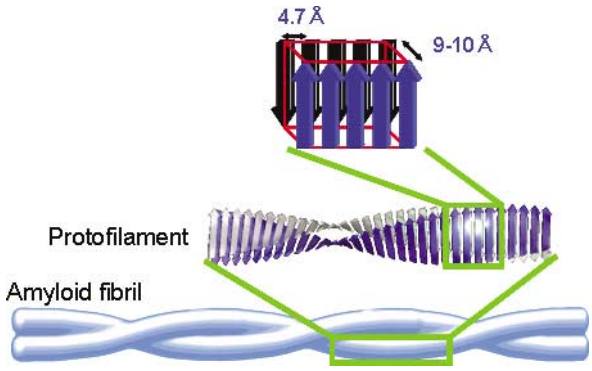

図1　アミロイド線維の構造モデル

後藤祐児　Yuji GOTO

大阪大学蛋白質研究所
［565-0871］吹田市山田丘3-2
教授，理学博士．
専門はタンパク質科学．

©2009 The Society of Polymer Science, Japan

パク質科学の重要な研究課題となるに至ったか，その経緯を振り返ってみたい。

2. タンパク質研究とアミロイド研究の接点

本来，一次元的なタンパク質ポリペプチドが折りたたまれて機能的な立体構造（天然構造あるいはネイティブ構造）を形成する反応をフォールディング反応とよぶ。Anfinsen, C. B.（1972年，ノーベル化学賞）は，リボヌクレアーゼAを用いて，タンパク質の天然構造が熱力学的に最も安定な状態であることを示した（アンフィンゼンのドグマ）[6]。以来，フォールディング反応の詳細な分子機構を研究することは，タンパク質の物性の基礎的な研究課題となった。このような中，1980年代終わりより，タンパク質の凝集が特に注目されるようになった。これは当時，フォールディング中間体として注目されていたモルテングロビュール（molten globule）状態が凝集しやすい状態であったこと，大腸菌を用いた組み換えタンパク質の発現実験で，封入体（inclusion body）と呼ばれる凝集体がしばしば観察されたこと，などが背景にあった。分子シャペロンの研究が1990年代から活発に行われたこともあげられる。分子シャペロンはタンパク質の凝集を抑制し，フォールディングを介助するタンパク質性の因子であり，その対象としてのタンパク質の凝集を理解する必要があった。

別の大きな要因として，1995年に世界的に注目された英国のBSEがあげられる。英国では，ウシからヒトに感染する変異型BSEが社会問題となり，その原因タンパク質であるプリオンタンパク質の正常型の立体構造解析が，Wüthrich, K.（2002年ノーベル化学賞）らのグループにより進められた[7]。そして1997年には，プリオン説を提唱したPrusiner, S. B.がノーベル医学生理学賞を受賞した[8]。彼の説では，主にαヘリックスから構成される正常型プリオンタンパク質が，βシートからなる異常型に変換したことにより，プリオン病が発症する。さらに異常プリオンは伝播する。発症した個体では異常プリオンがアミロイド沈着として検出されることから，アミロイド線維が興味の対象となった。アルツハイマー病に伴なってアミロイドβペプチドが形成するアミロイド線維も注目を集めた。

3. タンパク質研究者の参入

これらの背景は，フォールディングやタンパク質物性の研究者の注目するところとなり，1990年中頃よりフォールディング異常，異常凝集体の観点から，アミロイド線維の研究が盛んになった。1997年，それまで，リゾチームのフォールディング研究を精力的に行ってきたDobson, C. M.（英国ケンブリッジ大学）らは，アミロイド線維形成がアミノ酸変異リゾチームの熱安定性の低下と相関することを発表し，アミロイド研究とタンパク質のフォールディング研究が結びつくことを示した[3]。タンパク質の構造安定性の低下がアミロイドーシスの発症と結びつくことは，免疫反応を担う免疫グロブリン，あるいは肝臓で合成される血漿タンパク質であり，甲状腺ホルモンの前駆体サイロ

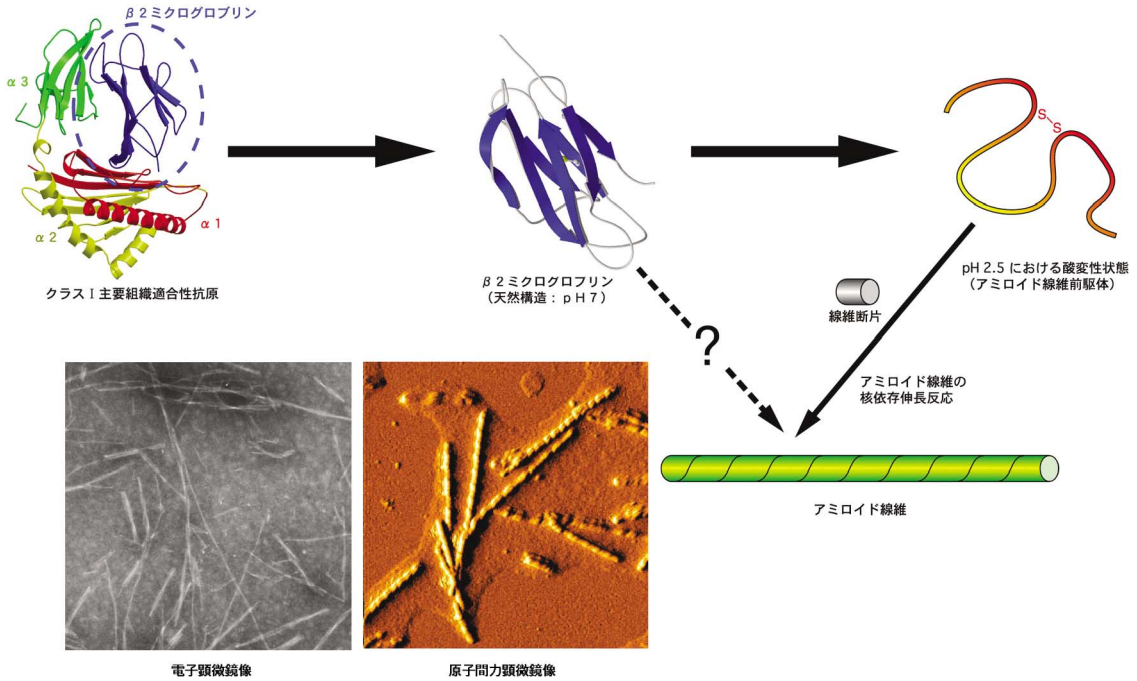

図2　β2ミクログロブリンの構造とアミロイド線維形成モデル．
下はアミロイド線維の電子顕微鏡（左）と原子間力顕微鏡（中）画像

©2009 The Society of Polymer Science, Japan

キシンと結合してその輸送を担うトランスサイレチンでも報告され，今日，一般的な現象と考えられている。アミロイド研究の潮流は，勢いを増していった。このような研究の具体例として，私たちが取り組んできたβ2ミクログロブリンの研究を紹介したい。

少し大きな病院に行けば人工透析の看板を目にする。人工血液透析は重い腎疾患の患者に対して，腎臓が行っている血液透析機能を人工的に行う医療である。国内では現在，約25万人が血液透析医療を受けており，国内で特に普及した医療である。ところが10年以上の長期透析患者の多くに主根管症候群と呼ばれる肩や手首の痛みや運動障害があらわれる。原因はβ2ミクログロブリンが形成するアミロイド線維の沈着である。β2ミクログロブリンは，生体が自己非自己の区別を行う際に作用するクラスⅠ主要組織適合性抗原の一成分であり，免疫系を中心に全身の細胞表面に存在する。β2ミクログロブリンは定常的に代謝され，血液中に排出された後，腎臓に集まり，分解される。血液透析患者ではこの分解ができず，さらに99アミノ酸残基からなり分子量約1万のβ2ミクログロブリンは，透析膜を透過せず，血液透析で除去できない。このためβ2ミクログロブリンの血中濃度が50 mg/lに上昇する。この状態が10年，20年と続く。その結果，多くの患者でβ2ミクログロブリンはアミロイド線維となって沈着する（図2）。タンパク質は大きな構造変化を引き起こし，アミロイド線維を形成すると考えられる。アミロイド線維は，タンパク質と水との相互作用という観点から，天然構造とは大きく異なっていると予想される。しかし，どのような仕組みによってこの構造変化や沈着が起きるのか，その詳細は不明である[9]。

4. アミロイド線維伸長のリアルタイム観察

アミロイド線維は，核形成と成長の二段階で形成される。物質の結晶成長と本質的に同じ現象である。アミロイド線維形成を理解するには，これらを直接観察することが重要である。アミロイド線維に特異的に結合する蛍光色素であるチオフラビンTと全反射顕微鏡を組み合わせることによって，線維の伸長反応を一分子レベルで観察することができる[10)～13)]。

全反射蛍光顕微鏡法は，蛍光色素標識されたタンパク質の一分子観察を目的として開発された方法であり，全反射照明の利用により，通常の蛍光顕微鏡観察で問題となる背景光を最小に抑えることができる。蛍光プローブとして使うチオフラビンTは，溶液中に単独で存在すると微弱な蛍光しかださないが，アミロイ

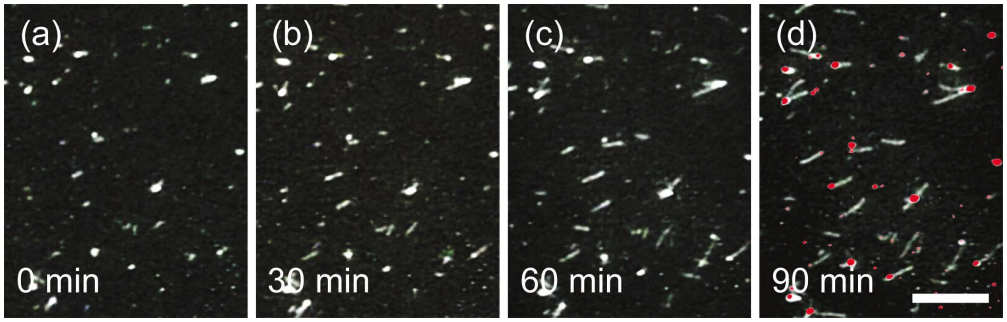

図3　全反射蛍光顕微鏡を用いたβ2ミクログロブリンのアミロイド伸長反応の観察（文献10より）

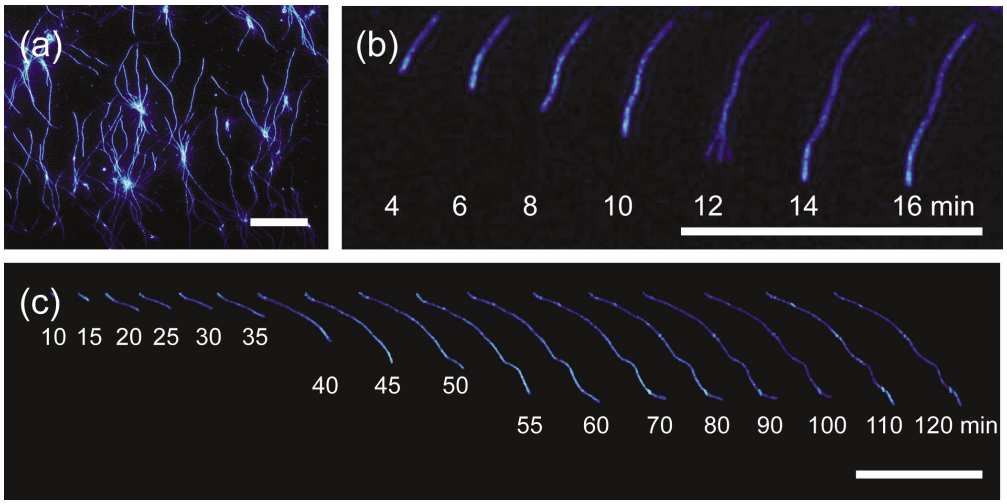

図4　全反射蛍光顕微鏡を用いたAβのアミロイド線維伸長反応の観察（文献11より）

©2009 The Society of Polymer Science, Japan

ド線維と結合すると，強い蛍光を発する。

酸性pH条件下，石英スライドガラス上でのβ2ミクログロブリン線維の伸長過程を示す（図3）。伸長反応のリアルタイム観察では，まずシードの輝点が見える。時間とともにこの輝点から線維が伸長していく。ほとんどの線維の伸長は，一方向に進んだ。このような観察によって線維伸長の詳細を議論することが可能となった。

アルツハイマー病患者の脳には，老人班と呼ばれる沈着物が観察される。老人斑の主要成分は，アミロイドβ（Aβと略される）と呼ばれる40あるいは42残基のペプチドが形成するアミロイド線維である。Aβアミロイド線維形成は，β2ミクログロブリン線維の場合と異なり，中性pH条件でも容易に起きる。中性pHではチオフラビンTの蛍光がより強いために，より鮮明な観察像を得ることができた（図4）。

5. アミロイド線維研究の課題

図3，4に示すようなアミロイド線維伸長のリアルタイム画像を見ていると興味は尽きない。いったい線維の成長端で何が起きているのだろうか。いつ，どのような条件でこのような特異的な線維構造ができるのだろうか。それがどのようにして疾病を引き起こすのだろうか。現在，特に重要な成果と未解決の問題として，以下の点があげられる。

5.1 アミロイド線維の基本構造の解明

アミロイド線維はタンパク質によらずクロスβシートを基本とする極めて共通した構造をもっている。βシートやαヘリックスといった基本二次構造がさまざまに組み合わさることによって形成される天然構造とは対照的である。「タンパク質の天然構造が進化の過程で形成された構造に対して，アミロイド線維はポリペプチド鎖が高分子鎖としてとる基本的な構造ではないか」と提案されている[14]。しかし，その詳細な原子構造や，異なったタンパク質の作るアミロイド線維の構造上の違いなどは不明である。固体NMR[15),16]，溶液NMRと重水素交換を組み合せた方法[17]，電顕，X線結晶解析[18),19] など，さまざまな解析手法によって解析が進められている。

5.2 アミロイド線維の基本的な形成機構の解明

アミロイド線維の形成は物質の結晶形成に類似した反応であり，アミロイド核形成と伸長反応の2段階からなる。天然構造の自発的な分子内構造形成とは全く異なり，アミロイド線維は分子間相互作用によって強固に安定化されており，より安定な立体構造である可能性が高い。また，分子間相互作用をもたらす構造の多様性によって，プリオン感染の分子機構を説明することができる[20),21]。しかし，原子レベルでの形成機構や，核形成反応の詳細は不明である。

5.3 アミロイドーシスを引き起こすリスクをもつ前駆タンパク質の普遍的存在

先にも述べたように，病気とは全く関係のない様々なタンパク質がアミロイド線維を形成する。このことは，私たちがアミロイドーシスを発症するリスクを含むタンパク質と共存している可能性を示唆する。透析アミロイドーシスは，正にその例である。透析アミロイドーシスは，血液透析という優れた医療がもたらした，思いもしなかった疾病である。透析アミロイドーシスのような医原病を未然に防ぐには，リスクの高いタンパク質を知ることが必要である[22]。

5.4 アミロイドーシスの感染

以上のような研究をもとに生じている深刻な懸念は，アミロイドーシスの感染，伝播（transmission）である[23),24]。現実には，感染性のアミロイドーシスは，プリオン病だけである。他方，アミロイド線維の試験管内での形成実験は，アミロイド線維が，物質の結晶成長と同じようにシーディングによって伝播することを示す。つまり，既にできあがった線維の断片を，アミロイドを形成していない別のアミロイド原因タンパク質溶液に加える（シーディングと呼ばれる）。そのタンパク質溶液が過飽和の状態にあれば，シーディングによって，アミロイド線維が容易に生成する。実際，アミロイド発症能を高めたマウスを用いた実験では，アミロイド線維が感染の原因となる。最近では，非伝播性と分類された他のアミロイドーシスでも「アミロイド線維による伝播」の起きることが示唆されている。アミロイドーシスの感染・非感染の仕組みを明らかにすることが重要である。

5.5 機能性アミロイド：ナノテクノロジーへの利用

アミロイド線維の均質性や剛直性，ボトムアップ型形成機構を，自己組織化，ナノテクノロジーの素材として利用しようとする試みが広がっている[25]。アミロイド線維は，外部環境やアミノ酸配列を工夫することにより，形成や破壊を制御することが可能である。アミロイド線維をナノワイヤーの鋳型に利用することができるかもしれない。また，アミロイド線維が液晶として挙動することも報告されている。アミロイド線維は，溶液の流れによって配向し，特徴的な偏光特性を示すようである[26]。夢は広がる。最近では，アミロイド線維が生体に有利に働いている場合も示唆されており，これらを含めて「機能性アミロイド（functional amyloid）」という用語が提唱されている[27),28]。

6. おわりに

アミロイドーシスは，高齢化社会や高度医療社会において特に深刻な疾病である。前出のDobsonによると，「アミロイドーシスは，人類の進化が終わった後で生じた病気（post-evolutionary disease）」である[3]。いわば，アミロイドーシスは，高齢化社会や高度医療社会がもたらした疾病である。これを解決し，さらに

©2009 The Society of Polymer Science, Japan

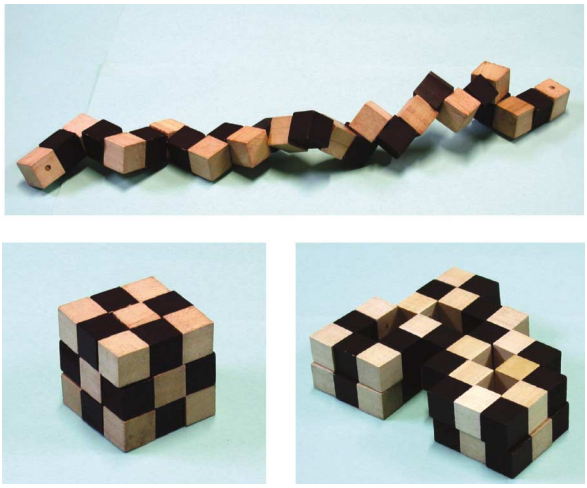

図5　組木パズルを用いたタンパク質の変性状態（上），天然構造（下左），アミロイド線維（下右）のイメージ

は共生への道を開くことは，科学の重要な研究課題である。現在，さまざまな分野の研究者の参入によって，アミロイド線維のタンパク質科学研究は，正に佳境に入りつつある。医学領域において長年にわたって謎であったアミロイドーシスの実体が，タンパク質の物理化学の問題として明らかになりつつある。今後は高分子科学の貢献に大きな期待がかかる。

つまり，タンパク質は代表的な高分子鎖である。通常の高分子と異なる点は，化学構造的に極めて均質なことである。また，天然に存在するタンパク質の多くは特異的でコンパクトな立体構造のフォールディングすることができる（図5）。これらの特徴に基づきタンパク質は多彩で精巧な機能を発揮する。タンパク質が高機能物質とか生体情報高分子と呼ばれるゆえんである。他方，一般的な高分子鎖がラメラ構造を作る様に分子間相互作用によって積み重なっていったものがアミロイド線維である。このように考えるとアミロイド線維は正に高分子科学の研究対象である。高分子科学のさまざまな手法を導入することにより，アミロイド科学の新世界が開拓されるであろう。

筆者がアミロイド研究をはじめた当初，「アミロイド線維」と表記すべきか「アミロイド繊維」と表記すべきか迷った。そして，医学領域に配慮して「アミロイド線維」と表記することに落ち着いた。しかし，アミロイド研究が高分子科学の領域で重要な課題となったとき，高分子分野の研究者は「アミロイド線維」という表記で納得するであろうか。そのような議論ができるような日の来ることを期待したい。

謝　辞

本稿で述べた筆者の研究は，内木宏延氏，伴匡人氏，八木寿梓氏，蛋白質研究所構造形成研究室メンバーとの共同研究であり，各氏に感謝する。

文　献

1）J. D. Sipe and A. S. Cohen: *J. Struct. Biol.*, **130**, 88（2000）
2）G. T. Westermark and P. Westermark: *Amyloid*, **7**, 19（2000）
3）C. M. Dobson: *Nature*, **426**, 884（2003）
4）V. N. Uversky and A. L. Fink: *Biochim. Biophys. Acta*, **1698**, 131（2004）
5）L. M. Luheshi, D. C. Crowther, and C. M. Dobson: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 25（2008）
6）C. B. Anfinsen: *Science*, **181**, 223（1973）
7）R. Riek, *et al.*: *Nature*, **382**, 180（1996）
8）S. B. Prusiner: *Science*, **252**, 1515（1991）
9）S. Yamamoto and F. Gejyo: *Biochim. Biophys. Acta*, **1753**, 4（2005）
10）T. Ban, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki, and Y. Goto: *J. Biol. Chem.*, **278**, 16462（2003）
11）T. Ban, *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **344**, 757（2004）
12）T. Ban, *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **281**, 33677（2006）
13）T. Ban, K. Yamaguchi, and Y. Goto: *Acc. Chem. Res.*, **39**, 663（2006）
14）M. Fandrich and C. M. Dobson: *Embo J.*, **21**, 5682（2002）
15）A. T. Petkova, *et al.*: *Science*, **307**, 262（2005）
16）C. Wasmer, *et al.*: *Science*, **319**, 1523（2008）
17）M. Hoshino, *et al.*: *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 332（2002）
18）R. Nelson and D. Eisenberg: *Adv. Protein Chem.*, **73**, 235（2006）
19）M. R. Sawaya, *et al.*: *Nature*, **447**, 453（2007）
20）M. Tanaka, P. Chien, N. Naber, R. Cooke, and J. S. Weissman: *Nature*, **428**, 323（2004）
21）R. Wetzel, S. Shivaprasad, and A. D. Williams: *Biochemistry*, **46**, 1（2007）
22）G. G. Tartaglia, *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **380**, 425（2008）
23）A. Solomon, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 10998（2007）
24）B. Zhang, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 7263（2008）
25）D. Hamada, I. Yanagihara, and K. Tsumoto: *Trends Biotechnol.*, **22**, 93（2004）
26）R. Adachi, *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **282**, 8978（2007）
27）D. M. Fowler, A. V. Koulov, W. E. Balch, and J. W. Kelly: *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 217（2007）
28）S. L. Gras, *et al.*: *Biomaterials*, **29**, 1553（2008）

©2009 The Society of Polymer Science, Japan