

「アポリポタンパク質によるアミロイドーシス発症の分子機構解明と制御法の開発」

京都薬科大学 薬品物理化学分野

斎藤 博幸

1 研究の背景と目的

アミロイドーシス (アミロイド病) は、原因となる前駆タンパク質が線維状の構造を持つアミロイドとして神経系や組織に沈着し、細胞・組織・臓器の機能障害を引き起こす病態の総称である。例えば、アルツハイマー病の特徴の一つである老人斑は、アミロイド β と呼ばれるアミノ酸約 40 残基からなるペプチドタンパク質の線維状凝集体であり、また、透析アミロイドーシスでは、長期透析患者の骨関節組織に β_2 -ミクログロブリンに由来するアミロイド線維が沈着し骨関節障害を発症する。このようなタンパク質のアミロイド線維形成は、通常のタンパク質が天然型から構造転換することで起こりうる普遍的な現象であると考えられている。

アポリポタンパク質は、血中や脳内での細胞外コレステロール輸送を制御しているタンパク質群であり、例えば、高密度リポタンパク質 (HDL) の構成タンパク質であるアポ A-I やアポ A-II、アポ C は、血漿 HDL 粒子の産生や成熟などの代謝過程を相互に調節している。ところが、これらのアポリポタンパク質は、その可逆的な脂質結合機能ゆえに不安定で柔軟な高次構造を有しており、変異や酸化などの修飾によってアミロイド線維化を起こしやすい。実際、ヒトアポ A-I では、家族性アミロイドーシス (アミロイドポリニューロパチー III 型) の原因となる遺伝子変異が 20 種類近く知られている。また、アポ C 群のなかで、リポタンパク質リパーゼ活性化因子アポ C-II が強いアミロイド線維形成性を有することが古くから知られているが、動脈硬化促進因子として近年注目されているアポ C-III についても遺伝的アミロイドーシス変異が新たに報告されている。さらに、脳内 HDL の主要タンパク質であるアポ E は、アルツハイマー病発症危険因子として注目され、アミロイド β との相互作用が広く研究されているが、他のアミロイドタンパク質の凝集・線維化にも関与しているようである。これらアポリポタンパク質アミロイドは動脈硬化巣の形成や進展にも深く関与しており、アポリポタンパク質によるアミロイド線維形成の分子機序解明は、アミロイドーシスのみならず動脈硬化症やアルツハイマー病などの疾患の予防・治療法開発においても重要な課題である。

以上の背景から本研究では、主にアポリポタンパク質の遺伝的変異がアミロイドーシス疾患を引き起こす分子メカニズムについて、特に脂質や糖鎖などの体内因子によるアミロイド線維形成・組織沈着・毒性発現機構の物理化学的・生化学的・細胞生物学的解析から明らかにすることを目的とした。また、疾患組織部位でのアミロイド線維高感度検出や *in vivo* イメージングへの適用を指向した新規アミロイド抗体を開発することで、アミロイドーシスに対する新たな診断・治療法開発につながる成果を目指した。

2 研究方法・研究内容

アミロイドタンパク質・ペプチドの作製: アミロイドーシス変異ヒトアポ A-I は、既報の方法 (*JBC* 288, 2848-2856, 2013) に基づき大腸菌発現系を用いて発現・精製した。また、線維化領域を含むアポ A-I フラグメントペプチドは Fmoc 固相合成法により作製した (*FEBS Lett.* 588, 389-394, 2014)。アポリポタンパク質アミロイド線維は、タンパク質やペプチドを回転混和しながら 37 °C で 1 週間インキュベートすることで調製した。

脂質膜環境でのアミロイド線維化の評価: 脂質膜環境として卵黄ホスファチジルコリン (PC)、酸性リン脂質であるホスファチジルセリン (PS)、及びコレステロール (Chol) か

らなる SUV リポソームを用い、アミロイド結合プローブであるチオフラビン T (ThT) の蛍光変化によりアポ A-I の線維化挙動を評価した。形成したアミロイド線維の形態は透過型電子顕微鏡 (TEM) および全反射蛍光顕微鏡により観察した。アポ A-I の二次構造は円偏光二色性 (CD) 測定により、脂質結合熱力学パラメータは等温滴定型カロリメトリー (ITC) により評価した。また、線維化領域付近にシステイン変異を導入し環境感受性蛍光プローブであるアクリロダンを標識することで、脂質膜相互作用に伴うアポ A-I 局所環境の変化を検出した。また、脂質環境プローブである Laurdan や DPH を用いて脂質膜疎水部の構造評価を行った。

アミロイド線維特異的モノクローナル抗体 (mAb) の作製 : アポ A-I アミロイド特異抗体の開発を目的として、BALB/c マウスをアミロイド線維-KLH コンジュゲートで 2 週間毎に反復免疫し、最終免疫日の 3 日後に回収した脾細胞をポリエチレングリコール存在下で NS1 ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを調製した。HAT 選択後、ELISA にて抗アミロイド線維抗体産生ハイブリドーマを選別し、限界希釈法により単クローン化した。抗体の反応性は、抗マウス IgG あるいは IgM 抗体を固相化した 96-well プレートにハイブリドーマ上清を添加して各 mAb を固定した後、ビオチンラベルしたアポ A-I タンパク質のモノマーおよびアミロイド線維の捕捉量を測定する ELISA 法により評価した。

3 研究成果

脂質膜環境でのアポ A-I アミロイド形成機構の解明

チオフラビン T 蛍光測定 (Fig. 1) により、脂質膜組成として酸性リン脂質である PS が存在すると、線維核形成過程に相当するラグタイムを著しく延長させ、アポ A-I の線維形成を強く抑制することが示された。一方、コレステロールの存在は線維化のラグタイムを短縮し、線維形成を促進した。120 時間インキュベーション後の透過型電子顕微鏡観察においても、中性の PC 脂質膜上ではアミロイド線維が観察されるのに対し、PS を 30% 含有する脂質膜上では線維形成が見られなかった (Fig. 2)。

そこで、PS による線維化抑制メカニズムを明らかにするため、まずアポ A-I 二次構造に及ぼす脂質組成の影響を CD 測定によって評価した。その結果、PS が存在すると脂質膜結合時の α ヘリックス形成性が向上し、 α ヘリックス構造の塩酸グアニジン変性安定性も増大することが示された。さらに、線維化領域ペプチドを用いて PS による局所的な α ヘリックス形成性の変化を評価したところ、Iowa (G26R) 変異を含む線維化領域ペプチドであるアポ A-I 8-33/G26R において、PS による α ヘリックス形成の増大が確認された。一方、Iowa 変異を含まない線維化領域ペプチドであるアポ A-I 44-65 では、PS による二次構造変

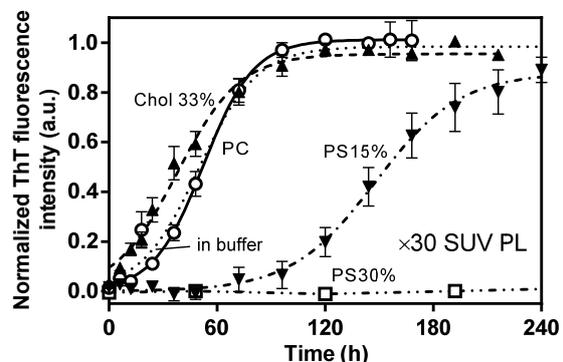


Fig. 1. Time courses of thioflavin T fluorescence for fibril formation of apoA-I 1-83/G26R in the presence of SUV. Phospholipid (PL)/apoA-I weight ratio was 30. Dotted line, in buffer; ○, PC SUV; ▲, PC/Chol (2/1) SUV; ▼, PC/PS (17/3) SUV; □, PC/PS (7/3) SUV. Protein concentration was 50 $\mu\text{g/ml}$. a. u., arbitrary units.

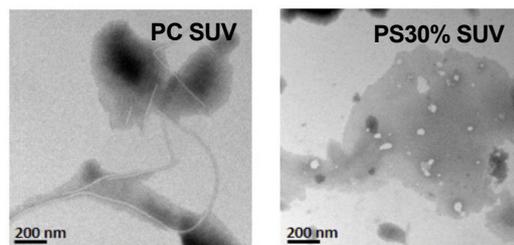


Fig. 2. TEM images of apoA-I 1-83/G26R after 120 h incubation in the presence of SUV. Scale bar represents 200 nm.

化は見られなかった。

次に、アポ A-I と脂質膜との相互作用様式を評価するため、Iowa 変異付近の L22 位に標識したアクリロタン分子の蛍光特性変化を検出した。その結果、PS によってアクリロタン分子の最大蛍光波長が長波長側にシフトし、Iowa 変異周辺が親水的な環境に移行していることが示された。これは、本来、両親媒性 α ヘリックスの疎水面と脂質膜間の疎水性相互作用によって駆動されるアポ A-I の脂質膜結合において、PS を含有する脂質膜では PS 頭部の負電荷とアポ A-I 分子の正電荷との静電的相互作用が優勢となり、アポ A-I の両親媒性 α ヘリックスが脂質膜の界面領域から親水部付近に移行していることを示唆する。さらに、ITC 測定より PS の存在は負の結合エンタルピー ΔH を低下させるとともにアポ A-I の結合量を著しく増大させることが示され (Table 1)、PS を含有する脂質膜とアポ A-I との相互作用様式が、疎水性相互作用から静電的相互作用へと変化していることを支持する結果であった。

以上の結果から、酸性リン脂質である PS は頭部の負電荷とアポ A-I の Iowa 変異を含む線維化領域との静電的相互作用により α ヘリックス構造を安定化させることで、アポ A-I のアミロイド線維化領域の β 構造転移・線維形成を抑制すると考えられた。すなわち、生体膜脂質組成はアポ A-I と脂質膜との相互作用様式を変化させることでアポ A-I のアミロイド線維形成を制御している可能性が示された。また、この相互作用様式の制御にはアミロイドーシス変異を含む線維形成領域が重要であることが明らかとなった。

Table 1. Thermodynamic parameters of binding of apoA-I 1-83/G26R to SUVs at 25 °C

SUV	K_d ($\mu\text{g/ml}$)	B_{max} (amino acids/ mol PL)	ΔG^a (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S^b$ (kcal/mol)
PC	1.1 ± 0.5	0.14 ± 0.03	-11.9 ± 0.3	-20.3 ± 0.8	-8.4 ± 0.8
PC/Chol (2/1)	3.8 ± 0.4	0.12 ± 0.02	-11.1 ± 0.1	-24.6 ± 0.1	-13.5 ± 0.1
PC/PS (17/3)	1.0 ± 0.9	0.28 ± 0.07	-12.1 ± 0.6	-12.4 ± 0.1	-0.3 ± 0.6
PC/PS (7/3)	0.5 ± 0.4	0.53 ± 0.19	-11.6 ± 0.1	-11.6 ± 0.1	0.9 ± 0.5

^a Free energy was calculated according to $\Delta G = -RT \ln 55.5(1/K_d)$.

^b The entropy of binding was calculated from $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

アミロイド線維構造特異抗体の開発

我々はこれまで、エピトープ領域の異なる種々の抗ヒトアポ A-I モノクローナル抗体を新規に作製し、HDL 形成に伴うアポ A-I の微小構造変化を検出可能な構造特異抗体を見出している (Sci. Rep. 7, 2988, 2017)。本研究では、アポリポタンパク質が形成するアミロイド線維を特異的に認識する新たな構造特異抗体の開発を目的とした。

スクリーニングにより、アポ A-I アミロイド線維特異的な mAb を産生する 4 種類のハイブリドーマクローン候補 (#A4-18, #B7-5, #B37-9, #B40-5) が得られた。これら mAb のアポ A-I アミロイド線維に対する反応性を、我々が以前に作製した抗アポ A-I 抗体 #126-7 (エピトープ領域: 44-65 残基内) を対照として ELISA で比較した (Fig. 3)。その結果、#126-7 はアポ A-I のモノマーとアミロイド線維のいずれにも高い反応性を示したのに対し、今回新たに得られた 4 種類の抗体はいずれもアミロイド線維には高い反応性を示したが、モノマーにはほとんど反応が見られなかった。すなわち、今回得られた抗体はアポ A-I の一次配列をエピトープとしないアミロイド線維構造特異抗体であることが示された。

さらに、抗体反応のアポ A-I 濃度依存性を比較したところ、#A4-18 のアミロイド線維に対する解離定数 K_d が 11 nM apoA-I と求まり、抗アポ A-I 抗体である #126-7 ($K_d=3.4$ nM) に匹敵する親和性を持つことが明らかとなった (Fig. 4)。

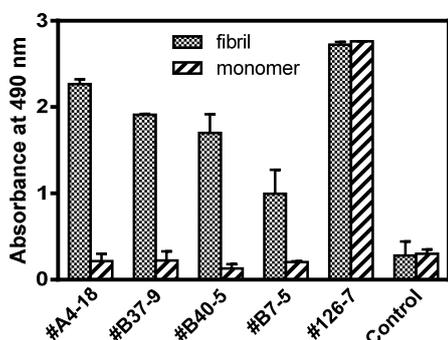


Fig. 3. Reactivity of mAbs against apoA-I 1-83/G26R monomer and fibrils by ELISA. Hybridoma supernatants were added to 96-well microplates coated with anti-mouse IgG antibody, and incubated at 37 °C for 1 h. Biotinylated apoA-I 1-83/G26R monomer or fibrils (100 nM) was added to the wells and incubated at 4 °C for 4 h. After washing, POD-conjugated streptavidin was added and incubated at 37 °C for 30 min. Bound POD activity was determined colorimetrically.

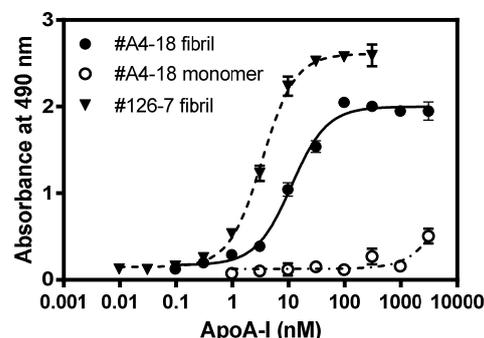


Fig. 4. Reactivity of mAbs #A4-18 and #126-7 against apoA-I monomer and fibrils by ELISA. Hybridoma supernatants of #A4-18 and #126-7 were added to 96-well microplates coated with anti-mouse IgG antibody. After washing, biotinylated apoA-I 1-83/G26R monomer or fibrils was added to the plates with increasing concentrations, and then detected with POD-conjugated streptavidin.

以上の結果より、今回得られた mAb はアポ A-I アミロイド線維を特異的に認識する構造特異抗体であることが示され、今後、これら構造特異抗体を用いたアミロイド線維の特異的かつ高感度な検出系の構築を進める予定である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

高齢化・高度医療化に伴いアミロイド化タンパク質が原因で起こる疾患は増加の一途をたどっているが、その根本的な予防・治療法の開発のためには分子レベルでのアミロイド線維形成機構の解明が重要である。しかしながら、アルツハイマー病アミロイドβや透析アミロイドーシスβ₂-ミクログロブリン等と比較して、アポリポタンパク質の遺伝的変異によるアミロイドーシス疾患発症機序に関する研究は世界的にみても非常に少ない状況であり、分子レベルでのメカニズム全容解明が待たれている。

本研究による成果は、生体膜脂質組成がアポ A-I アミロイド線維形成を制御する重要な因子であることを明らかにした点で、生体内環境でのアミロイド線維形成の分子機構を解明する重要な知見であり、今後、アポリポタンパク質アミロイド線維の臓器選択的沈着・毒性発現のメカニズム解明につながるものと期待される。また、本研究で得られたアポ A-I アミロイド線維構造特異モノクローナル抗体を新たな疾患バイオマーカーとして応用することで、アミロイドーシス疾患の病態解明や診断・治療法の発展に大きく貢献することが期待される。