

- Yamada, M., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S., & Okumura, T. (2008) *Nitric Oxide-Biol. Chem.*, 18, 105-112.
- 15) Matsui, K., Nishizawa, M., Ozaki, T., Kimura, T., Hashimoto, I., Yamada, M., Kaibori, M., Kamiyama, Y., Ito, S., & Okumura, T. (2008) *Hepatology*, 47, 686-697.
- 16) Tanaka, H., Uchida, Y., Kaibori, M., Hijikawa, T., Ishizaki, M., Yamada, M., Matsui, K., Ozaki, T., Tokuhara, K., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S., & Okumura, T. (2008) *J. Hepatol.*, 48, 289-299.
- 17) Hijikawa, T., Kaibori, M., Uchida, Y., Yamada, M., Matsui, K., Ozaki, T., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., & Okumura, T. (2008) *Shock*, 29, 740-747.
- 18) Zuker, M. (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31, 3406-3415.
- 19) Robb, G.B., Carson, A.R., Tai, S.C., Fish, J.E., Singh, S., Yamada, T., Scherer, S.W., Nakabayashi, K., & Marsden, P.A. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 37982-37996.
- 20) Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppo, G., & Stutz, F. (2007) *Cell*, 131, 706-717.
- 21) Asirvatham, A.J., Gregorie, C.J., Hu, Z., Magner, W.J., & Tomasi, T.B. (2008) *Mol. Immunol.*, 45, 1995-2006.

西澤 幹雄¹, 奥村 忠芳^{2,3}

¹立命館大学生命科学部生命医科学科,

²立命館大学総合理工学研究機構,

³関西医科大学医化学教室)

The revival of natural antisense transcripts

Mikio Nishizawa¹ and Tadayoshi Okumura^{2,3} (¹Department of Biomedical Sciences, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, Nojihigashi 1-1-1, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan; ²The Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan University, Nojihigashi 1-1-1, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan; ³Department of Medical Chemistry, Kansai Medical University, Fumizono 10-15, Moriguchi, Osaka 570-8506, Japan)

トランスサイレチンの構造変化と細胞毒性

1. はじめに

タンパク質が凝集して線維状になった物質はアミロイド線維とよばれ、異常なアミロイド沈着が個々の臓器に障害を与える。アミロイド線維はβシート構造に富んだ構造を有し、幅が10~20nmで長さは数μmにも達する。また、コンゴレッド色素に染色され、偏光顕微鏡下で黄緑色の偏光を示す。アミロイド沈着が原因と考えられる疾患はアミロイドーシスと呼ばれ、原因となるタンパク質やペプチドは現在までに20種類以上知られている。ところが一

方で、アミロイドーシスとは直接関係のないタンパク質でも実験条件によっては凝集してアミロイド線維になることから、アミロイド線維はタンパク質がとりうる一般的な構造の一つであると考えられている。ここでは、代表的なアミロイドタンパク質であるトランスサイレチン (TTR) に関する近年の研究を紹介したい。

2. トランスサイレチンとアミロイドーシス

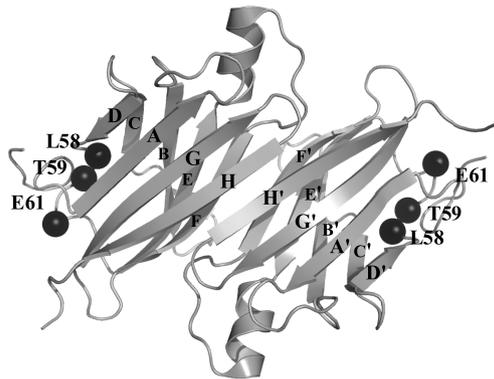
TTRは、127アミノ酸残基からなる分子量14kDaのタンパク質で、四量体として血中に存在しチロキシンとレチノール結合タンパク質の輸送を行う。TTRの血中濃度は0.2~0.3mg/mlであり、90%以上が肝臓で産生されるが、脳室脈絡叢、網膜、脾臓などにおいても産生される。TTR遺伝子に変異を受けやすい遺伝子で、これまでに100種類以上の変異体が発見されており、その大部分がアミロイドーシスを引き起こす¹⁾。TTRが原因のアミロイドーシスはTTRアミロイドーシスとよばれ、変異型TTRが蓄積するタイプと野生型TTRが蓄積するタイプがある。変異がない場合は高齢で発症するが、変異型TTRが蓄積する場合は20歳代~30歳代で発症するのが一般的である。

3. トランスサイレチンの立体構造

TTRのX線結晶構造解析の歴史は古く、1971年にはBlakeらによって結晶構造が報告されている²⁾。その構造は、βリッチなサブユニットがホモ四量体を形成しており、四量体の中央にチロキシンが結合するポケットが位置している(図1)。トランスサイレチンの単量体分子は、A~Hの8本のβストランドと1本の短いαヘリックスからなり、βストランドD, A, G, HとC, B, E, Fから成るβシートがギリシャキーバレル様のトポロジーを形成している。単量体同士の結合は水素結合によって安定化されており、Hストランドが別の単量体のH'ストランドと6本の水素結合で連結され、FストランドとF'ストランドが2本の水素結合で連結されている。水素結合は二量体と二量体をつなぎとめるためにも重要で、A19, G22, Y114, V122が8本の水素結合を形成し二量体同士を連結させている(図1)。

野生型TTRの立体構造に加えて、アミロイドーシスの原因となる変異型TTRの立体構造も多数報告されており、病原性アミノ酸変異はTTRの立体構造を変化させると提案されている。しかし、アミノ酸変異による立体構造変化はわずかであり、その変化は変異体によって異なっていた。Hornbergらは、23種類の変異型TTRの立体構造と野

二量体構造



四量体構造

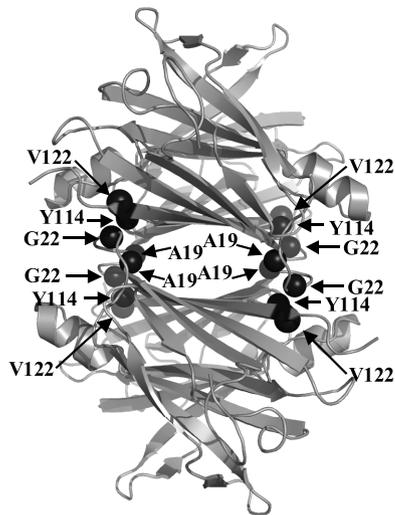


図1 TTRの四量体構造と二量体構造

二量体ではA~Hのβストランドをラベルし、アミノ酸変異を導入したL58, T59, E61を球で示した。四量体構造では、二量体と二量体を水素結合で連結しているアミノ酸残基を球で表示した。

野生型TTRの立体構造を詳しく比較し、これらのわずかな立体構造変化は有意な変化ではなく、基本的には野生型と変異型で立体構造は同じであると結論している³⁾。しかし、TTRの病原性変異は全てアミロイドーシスを引き起こしているため、病原性変異はTTR分子に対して何か共通した効果をもたらしていると予想される。一方、これまでに行われた*in vitro*の研究は、変異型TTRは野生型TTRよりも不安定であることを明らかにしている⁴⁾。それでは、病原性アミノ酸変異は、TTR分子のどこをどのように不安定化させているのであろうか。

4. 病原性変異による動的構造の変化

著者らは、重水素交換と二次元NMRを組み合わせた方法を使って、病原性変異がTTRの立体構造に及ぼす影響を調べた⁵⁾。タンパク質の主鎖アミド水素は溶媒の水素と交換するため、溶媒を重水に変えると主鎖アミド水素は重水素に交換される。しかし、水素結合を形成しているアミド水素は重水素に交換されにくい。また、大きく揺らいでいる変性ポリペプチド鎖の場合にはアミド水素はすばやく重水素に交換される。我々は、野生型TTRと4種類の変異型TTR (L58H, L58R, T59K, E61K)について、各アミノ酸残基の重水素交換速度を測定しプロテクションファクターを求めた。これらの変異型TTRは、すべてTTRアミロイドーシスの原因となる変異体であり、ストランドDとEの間のループで変異が起きている。プロテクションファクターは、変性したポリペプチド鎖中でのアミノ酸残基の交換速度とタンパク質中での交換速度の比で表され、プロテクションファクターの値が大きい場合にはアミド水素が重水素交換から保護されていることを示している。

たった一つのアミノ酸変異であるが、プロテクションファクターは野生型TTRと変異型で大きく異なっていた。変異体では、TTR分子のさまざまな部位でプロテクションファクターが小さくなっていたが、特にGストランドとA, Bストランド間のループ領域で低下していることが示された。A19, G22, Y114, V122は二量体と二量体を水素結合によって連結しているが、変異体ではV122のプロテクションファクターが著しく低下していた。G22とY114については、野生型では大きなプロテクションファクターを示すが、変異体では重水素交換から保護されていなかった(図1)。これらの結果は、病原性アミノ酸変異は二量体と二量体のインターフェースの構造を不安定化していることを示している。一方、単量体と単量体を水素結合によって結びつけているE89, V94, Y116, T118, A120は、野生型と変異体のどちらの場合でも重水素交換から保護されていなかった。したがって、いったん二量体に解離してしまうと、単量体への解離は頻繁に起きると予想される⁵⁾。

5. TTR変異体による神経細胞死

TTRアミロイドーシスの病原性変異は二量体構造への解離を促進すると考えられたので、次に、生理的条件下で二量体として存在するS112I変異体について研究した。その結果、S112I変異体は不安定であり生理的条件下で凝集

しやすいことがわかった。また、S112Iは線維状ではなく球状の凝集物になることもわかった⁶⁾。近年の研究によって、アルツハイマー病などいくつかのアミロイドーシスでは、神経細胞死を起こすのはアミロイド線維ではなく未成熟の線維や球状凝集体であると提案されている⁷⁾。したがって、S112I変異体の球状凝集体も神経細胞死を起こすのではないかと予想された。著者らは、神経芽細胞腫(IMR32細胞)を使ってS112I変異体の球状凝集体が細胞死を誘導することを示した。一方、野生型TTRはIMR32細胞の生存に影響を与えなかった。また、S112I変異体による神経細胞死がアポトーシス様の細胞死であることもわかった⁶⁾。

TTR変異体による神経細胞死はいくつかのグループによって研究され、細胞死誘導の分子メカニズムやアミロイドーシスとの関連が報告されている。Anderssonらは、TTRによるアポトーシス様の神経細胞死は、アミロイド線維形成過程の初期段階にある未成熟の線維TTRによって起こり、成熟したアミロイド線維は細胞死を起こさないと報告している⁸⁾。また、カタラーゼによって阻害されることから、TTRによる神経細胞死はフリーラジカルが関与していると提案している。TTRアミロイドーシス患者の生検試料でも、脂質の過酸化反応やDNAの酸化的損傷が増加しており、酸化ストレスの関与が指摘されている⁹⁾。一方で、直径が100nm以下のオリゴマー化したTTRを培養神経細胞に加えると、電位依存性カルシウムチャンネルを介してカルシウムイオンが細胞外から流入し、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇していることも明らかにされている(図2)¹⁰⁾。また、変異型TTRは脂質ラフトに強く結合し生体膜の流動性を増加させると報告されている。したがって、オリゴマーTTRが脂質ラフトに結合すると、電位依存性カルシウムチャンネルの活性に影響を与えて細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し神経細胞死が誘導されているのかもしれない¹⁰⁾。アルツハイマー病においても、アミロイドβが電位依存性カルシウムチャンネルを介してカルシウムイオン濃度を上昇させることでアポトーシス様の神経細胞死を誘導すると提案されている¹¹⁾。これは、TTRアミロイドーシスとアルツハイマー病が共通の発症機序によって起きている可能性を示唆しており興味深い結果である。

SousaらはTTRの組織沈着がTTRアミロイドーシスの進行とどのような関係があるのかについて、進行度の異なる患者の生検試料を収集し詳細に調べて報告している¹²⁾。彼らはTTRを免疫染色で検出し、アミロイド線維はコン

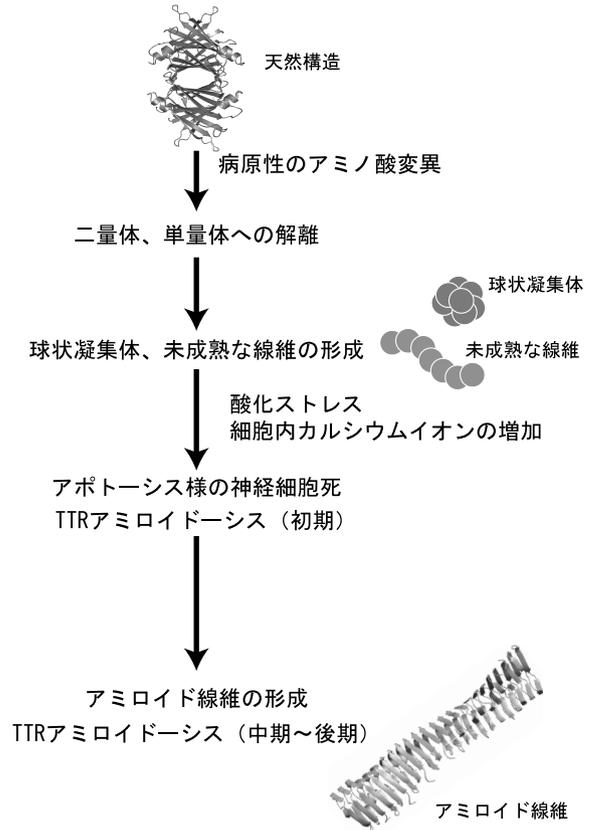


図2 TTRの様々な構造状態とTTRアミロイドーシスの関係

グレッド染色することで、蓄積したTTRの形態を免疫電子顕微鏡で調べている。その結果、アミロイドーシスの症状が表れる前の段階で、すでにTTRが蓄積しており、炎症性サイトカインとして知られるマクロファージコロニー刺激因子が神経細胞とその周辺で発現していることが明らかになった。興味深いことに、初期段階での凝集物は球状の凝集物であり、コングレッドで染色されないためアミロイド線維とは異なると考えられる。さらに、TTRがアミロイド線維になって蓄積するのは、アミロイドーシスの症状がかなり進んだ段階であると報告されている(図2)。これらの結果から考えると、TTRアミロイドーシスの症状が表れる前の段階において、すでにTTRは線維とは異なる球状の凝集物となって蓄積し、神経細胞死を引き起こしていると考えられる¹²⁾。

6. おわりに

TTRの動的構造を詳細に調べることは、天然構造が壊れて凝集体になる過程を明らかにして、アミロイドーシスの病態を解明するために重要である。また、TTRの凝集

体が細胞や組織へ及ぼす影響も *in vitro* と *in vivo* の両面から研究され、アミロイド線維になる前の未成熟な線維や球状凝集体が神経細胞死を起こしていることがわかった。しかし、近年の研究で提案されている未成熟な線維や球状凝集体の詳細について、例えば、これらの凝集体の中でのTTRの立体構造については詳細な情報がほとんど得られていない。TTRアミロイドーシスに関する研究が今後さらに進展し、予防薬や治療薬の開発に結びつくことを期待したい。

- 1) Ando, Y., Nakamura, M., & Araki, S. (2005) *Arch. Neurol.*, 62, 1057–1062.
- 2) Hamilton, J.A. & Benson, M.D. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 1491–1521.
- 3) Hörnberg, A., Eneqvist, T., Olofsson, A., Lundgren, E., & Sauer-Eriksson, A.E. (2000) *J. Mol. Biol.*, 302, 649–669.
- 4) Kelly, J.W. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 101–106.
- 5) Takeuchi, M., Mizuguchi, M., Kouno, T., Shinohara, Y., Aizawa, T., Demura, M., Mori, Y., Shinoda H., & Kawano, K. (2007) *PROTEINS*, 66, 716–725.
- 6) Matsubara, K., Mizuguchi, M., Igarashi, K., Shinohara, Y., Takeuchi, M., Matsuura, A., Saitoh, T., Mori, Y., Shinoda, H., & Kawano, K. (2005) *Biochemistry*, 44, 3280–3288.
- 7) Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N., & Sato, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6370–6375.
- 8) Andersson, K., Olofsson, A., Nielsen, E.H., Svehag, S.E., & Lundgren, E. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294, 309–314.
- 9) Macedo, B., Batista, A.R., do Amaral, J.B., & Saraiva, M.J. (2007) *Mol. Med.*, 13, 584–591.
- 10) Hou, X., Aguilar, M.I., & Small, D.H. (2007) *FEBS J.*, 274, 1637–1650.
- 11) Mattson, M.P. (2004) *Nature*, 430, 631–639.
- 12) Sousa, M. M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimarães, A., & Saraiva, M.J. (2001) *Am. J. Pathol.*, 159, 1993–2000.

水口 峰之

(富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学))

Structural changes of transthyretin and cytotoxicity
Mineyuki Mizuguchi (Graduate School of Medicine and
Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani,
Toyama 930-0194, Japan)

Relaxation Dispersion 法の生化学への応用

はじめに

Protein Data Bank (PDB) に登録されているタンパク質の立体構造を眺めると、それらがあたかも静止しているかのような印象を受けるときがある。しかし、実際のタンパク質は、機能を発揮する際に柔軟に構造を変化させる。例えば、酵素では、触媒反応において基質結合部位を大きく変化させる。また天然変性タンパク質では、遊離状態はランダムコイルであるが、ターゲットと結合すると特定の構造に折りたたまれる。タンパク質の機能を解明するためには、構造変化に対する理解が不可欠と言える。しかし、先述したようにPDBに登録された立体構造は、静止した絵であるため、それから構造変化の速度や大きさは求められない。さらに構造変化における中間状態は、往々にして存在比が低すぎるため、従来の手法では感知することすらできない。

このような状況の中、緩和分散法 (relaxation dispersion spectroscopy) と呼ばれるNMR緩和解析法が開発され¹⁾、いくつかのタンパク質の動的な構造情報と機能との相関が明らかにされ始めた。緩和分散法を用いると、マイクロ秒—ミリ秒オーダーの構造変化を解析できるが、この時間領域には生体分子の機能と関連した重要な過程が多く含まれるため、その手法と得られた結果は広い分野から注目を浴びている。緩和分散法の優れた点は、存在比が1%ほどの状態でも、その状態の化学シフトを決定できることである。化学シフトは立体構造に敏感であるため、緩和分散法により大まかな立体構造まで明らかにできる。すなわち、従来法では観測できない低存在比の状態でも、緩和分散法を用いれば、その化学シフトが得られ、そこから構造情報まで得られるというわけである。本稿では、緩和分散法の原理の本質である「化学交換」を概説し、次いで、応用例として「酵素反応」と「天然変性タンパク質の共役した折りたたみと結合」について述べる。

1. 化学交換

緩和分散法は化学交換と呼ばれる現象を定量化するための測定法である。測定の詳細は文献2, 3に譲ることにして、本稿では原理の本質となる化学交換について概説す