


 解説

β 2 ミクログロブリンアミロイド線維の形成及び

熱応答のカロリメトリーによる解析

笹原健二, 後藤祐児

(受取日: 2005年12月28日, 受理日: 2006年2月28日)

Calorimetric Analysis of the Formation and the Thermal Response of β 2 Microglobulin Amyloid Fibril

Kenji Sasahara and Yuji Goto

(Received December 28, 2005; Accepted February 28, 2006)

Amyloid fibril deposition is associated with over 20 degenerative human diseases, including Alzheimer's, Parkinson's, and prion diseases. Although research over the last few years has revealed the morphology and structural features of amyloid fibrils, knowledge about the thermodynamics of amyloid fibril formation and its thermal unfolding is limited. First, we describe the thermodynamic studies of β 2 microglobulin amyloid formation by means of isothermal titration calorimeter. Then, we outline the unique thermal response of its mature amyloid fibrils in comparison with the thermal unfolding of the native form.

1. はじめに

蛋白質は、それぞれ特有の立体構造(天然構造)に折りたたまれてその機能を担う。天然構造は、熱力学的に最も安定な状態であり、蛋白質の唯一規則的立体構造と考えられてきた。このような立場からは、機能をもたない凝集体は研究の対象外であった。ところが近年、蛋白質の天然構造が壊れたり、間違っってフォールディング(ミスフォールディング)をすることが原因で凝集体を形成し、病気の引き起こされる例が多く見つかった。このような病気は、蛋白質の立体構造(コンフォメーション)変化によって引き起こされるので、フォールディング病あるいはコンフォメーション病として注目されている。^{1,2)} これらの凝集体の中には、蛋白質がコンゴレッド色素で橙赤色に染色され、偏光顕微鏡下で緑色偏光を呈する幅約10 nmで枝分かれのない線維構造をつくって体内に沈着している例が多くある

(Fig.1)。これをアミロイド線維(医学用語として繊維ではなく線維をもちいる)とよび、アミロイド線維の沈着する疾患をアミロイド病(あるいはアミロイドーシス)と総称する。¹⁻³⁾

約20種類のアミロイド病と、その原因となる蛋白質あるいはペプチドが知られている。アルツハイマー病(A β ペプチド)、透析アミロイドーシス(β 2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)などのほか、狂牛病やクロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病もアミロイド病と考えられている。カッコ内は原因蛋白質であり、それらの多くは生命機能を支える重要な蛋白質であることがわかる。さらには、アミロイド線維はアミロイドーシスにかかわる蛋白質だけでなく、疾病と関係しないさまざまな蛋白質やポリアミノ酸によっても形成されることがわかってきている。⁴⁾ このことは蛋白質が天然構造を形成

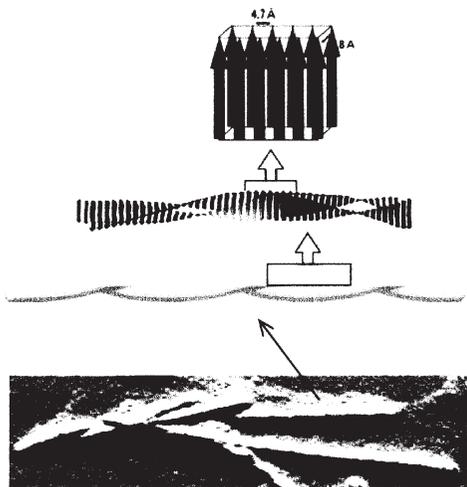


Fig.1 Schematic illustration showing how the peptides associate to form amyloid fibrils. Amyloid fibrils as shown by atomic force microscopy images are formed with several pieces of protofilament that consist of β -sheets. The strands of β -sheets are continuously hydrogen-bonded in the direction of the long axis of the fibrils (cross β -structure). The distances between β -strands and between the β -sheets are about 4.7 Å and 10 Å, respectively.

するのと同様に、アミロイド線維も蛋白質の一般的な構造形態であることを示唆するものである。

(線維についての) X線回折の結果から、アミロイド線維の立体構造としては、主鎖の方向が線維軸とほぼ直行するクロス β シートが基本となる。この β シートが何層か積み重なるように集合してプロトフィラメントが形成され、それらがさらに集合して螺旋構造を形成するというイメージができあがりつつある (Fig.1)。^{1,5)} 興味深いことは、このようなアミロイド線維の基本構造が、それを構成する蛋白質の種類に依存しないということである。“どのような機構でアミロイド線維が形成されるのか?”, 線維形成機構は謎に包まれている。

2. 透析アミロイドーシスと $\beta 2$ ミクログロブリン

アミロイド線維は長期透析患者でも見られ、その場合には、本来、クラスI主要組織適合性抗原の成分である $\beta 2$ ミクログロブリン($\beta 2$ m)がアミロイドを形成する。⁶⁾ $\beta 2$ 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蛋白質で、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。 $\beta 2$ mは、さまざまな細胞から血液中に放出されるが、健常者では腎臓で代謝される。とこ

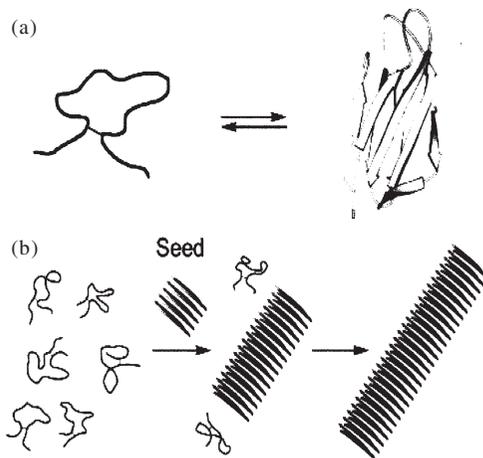


Fig.2 Representation of the alternative folding processes of $\beta 2$ m. Taken from a literature.⁸⁾ (a) folding of the native globular state. (b) Seed-dependent amyloid fibril extension. The acid-unfolded $\beta 2$ m molecules extend the seeds taking up the ordered cross- β sheet structure.

ろが、長期血液透析患者では、 $\beta 2$ mの血中濃度が長期間にわたって上昇することが原因で、アミロイド線維が沈着し、主根幹症候群とよばれる肩や手首の痛みや運動障害を伴う症状があらわれる。 $\beta 2$ mのアミロイド線維は、幅が10~15 nm、長さが1~2 μ mの針状構造をとり (Fig.1)、このような針状の形態はさまざまな蛋白質のアミロイド線維に共通している。 $\beta 2$ mがミスフォールディングしてアミロイド線維を形成すると考えられるが、生体内で線維ができるしくみはわかっていない。著者らは、モデル蛋白質として透析アミロイドーシスの原因となる $\beta 2$ mを用い、そのアミロイド線維形成反応を研究してきた。

3. $\beta 2$ mアミロイド線維伸長反応の熱力学的解析

アミロイド線維の形成は核形成と伸長反応からなる多分子重合反応であり、球状蛋白質が天然構造を形成する一分子反応とは根本的に異なる (Fig.2)。^{3,7)} モノマーのアミロイド原性蛋白質だけが存在しても核形成はまれにしか起こらないが、すでに形成されたアミロイド線維の断片を加えると、すみやかに反応は進行する (Fig.2(b))。試験管の中では、患者から精製した $\beta 2$ mアミロイド線維を超音波破碎して線維断片を作り(シード)、酸変性した $\beta 2$ mを加えるとアミロイド線維を形成することができる(中性条件では天然構造が安定のため通常この反応は起こらない)。アミロイド線維の断片が鋳型として働き、核形成の段階をスキップすることがわかる。Kardosらは、滴定型熱量計(VP-

ITC, Micro Cal社製)を用いて、以下のように $\beta 2$ mアミロイド線維形成に伴う熱量を測定することにはじめて成功した。⁸⁾

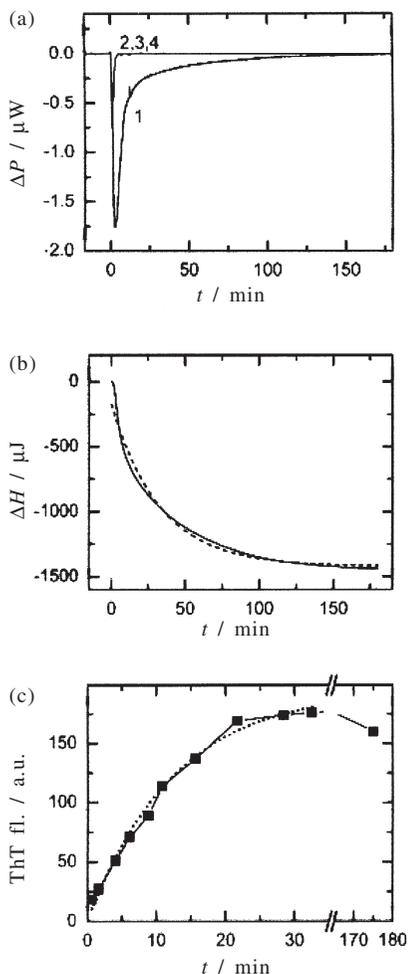


Fig.3 Kinetics of $\beta 2$ m amyloid fibril extension monitored by ITC at 37°C (taken from a literature.⁸⁾). (a) Heat effect on the fibril extension followed the injection of seeds at a final concentration of $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ into 0.1 mg ml^{-1} $\beta 2$ m monomer solution (line 1). Overlapped three lines represent the reference measurements, i.e., buffer to buffer (line 2), buffer to monomers (line 3), and seeds to buffer (line 4). (b) Enthalpy change of the extension reaction as a function of time (continuous line). Dotted lines represent the exponential fitting curve. (c) Fibril extension reaction of $\beta 2$ m under the same experimental conditions observed by thioflavin T(ThT) fluorescence. Dotted line represents the exponential fitting curve

滴定型熱量計のセルに酸変性した $\beta 2$ m (pH 2.5)を入れておき、これにシリンジを通してシードを加える。このときアミロイド線維の伸長が起こり、これに伴う“発熱”が観測される (Fig.3(a))。線維形成反応に伴う希釈熱や混合熱を補正することで、線維形成反応のエンタルピー変化が得られる (Fig.3(b))。一方で、アミロイド線維の伸長反応は蛍光色素チオフラビンT(ThT)を用いて簡便に定量することができる (Fig.3(c))。チオフラビンTはアミロイド線維が存在しないと微弱な蛍光しかださないが、アミロイド線維に結合すると強く発光する。線維形成反応のエンタルピー変化の時間経過とアミロイド線維に特異的なチオフラビンTの蛍光によって追跡した時間経過がよく一致することから、ITCで得られた反応熱がアミロイド形成反応を反映したものであることがわかる。

以上のようにアミロイド線維伸長反応の測定をさまざまな温度で行い、アミロイド線維形成に伴う各温度でのエンタルピー変化 (ΔH)、 ΔH の温度依存性から熱容量の変化 (ΔC_p)を求めた。更に、反応が平衡に達した後、反応液を遠心し、残った上澄み液中の蛋白質濃度を求めることによって線維形成反応に伴う見かけのギブスエネルギー変化 (ΔG)を求めた。これらの値を、天然構造をとっている $\beta 2$ mの熱変性に伴う熱力学的パラメーターと比較した (Table 1)。Table 1において特に注目すべき特徴は、各温度でのエンタルピー変化が、アミロイド線維で著しく小さいこと、アミロイド線維はモノマー分子が高度に会合した状態であるにも関わらず、熱容量の変化が、天然構造とアミロイド線維でよく似ていることである。これらのことから、アミロイド線維内部のパッキングの程度は天然構造よりも低いことが推定される。更にTable 1より、 10°C における線維形成反応に伴う見かけのギブス自由エネルギー変化 (ΔG)は、エントロピー項 ($-T\Delta S$)によって支配され、アミロイド線維形成の駆動力として、エントロピーがより重要な役割を果たしていると考えられる。最近、木下らは、エントロピー的排除体積効果に基づいた理論をアミロイド線維形成反応に応用している。小粒子集団(溶媒)の中に大粒子(溶質分子)が進入すると、小粒子が入れない排除空間ができ、大粒子同士が接触すると、小粒子集団の並進エントロピーが増加する。この効果は、エントロピー的排除体積効果とよばれる。^{9,10)} 以上のような熱力学的解析を、異なる蛋白質から形成されたアミロイド線維に対しても進めることによって、アミロイド線維構造形成の熱力学的機構に迫ることができると期待している。

4. $\beta 2$ mアミロイド線維の熱応答

これまで球状蛋白質の天然構造に関して、DSCを用いた熱測定が行われ、構造安定化の熱力学的機構が詳細に研

Table 1 Unfolding thermodynamic parameters of the native $\beta 2 m$ and of the amyloid form.⁸⁾

$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$		$-T\Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$		$\Delta G^a / \text{kJ mol}^{-1}$		$\Delta C_p / \text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	
	Native	Amyloid	Native	Amyloid	Native	Amyloid	Native	Amyloid
10	23.2 ± 5	-14.2 ± 3	2.6 ± 1.8	52.6 ± 3	25.8 ± 1.8	38.4 ± 0.3		
25	107.2 ± 5	57.6 ± 2	-83.3 ± 4	-15.9 ± 2	23.9 ± 0.9	41.7 ± 0.2	5.6 ± 0.4	4.78 ± 0.21
37	174.7 ± 8	124 ± 3	-155.6 ± 6.5	-80 ± 3	19.1 ± 0.4	43.9 ± 0.2		

^a For the native, the thermodynamic parameters were estimated from thermal transition curves followed by CD spectroscopy. For the amyloid form, the apparent ΔG values were used as an estimation.

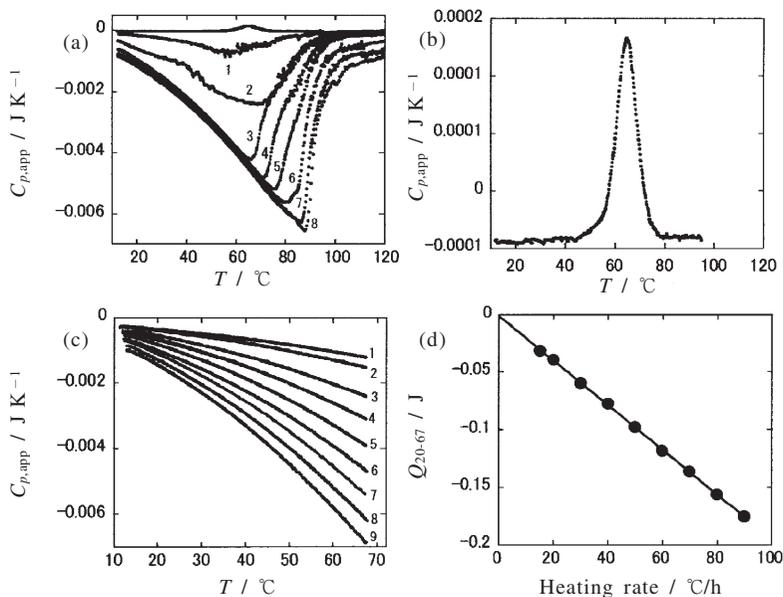


Fig.4 Thermal response of $\beta 2 m$ amyloid fibrils measured by DSC at pH 2.5 (taken from a literature¹³⁾ and partly modified). (a) Representative DSC thermograms of $\beta 2 m$ amyloid fibril solution. The fibril concentrations were varied from 0.015 to 0.28 mg ml⁻¹; 1:0.015, 2:0.025, 3:0.04, 4:0.075, 5:0.125, 6:0.17, 7:0.2, 8:0.28 mg ml⁻¹. The heating rate was 60 °C/h. (b) DSC thermogram of native $\beta 2 m$ at pH 7.0. The $\beta 2 m$ concentration and heating rate were 0.125 mg ml⁻¹ and 40 °C/h, respectively. (c) DSC thermograms of $\beta 2 m$ amyloid fibrils (0.1 mg ml⁻¹) from 10 °C to 68 °C at various heating rates. Heating was performed twice at each heating rate. The heating rates were 1:15, 2:20, 3:30, 4:40, 5:50, 6:60, 7:70, 8:80, and 9:90 °C/h. (d) Heating rate dependence of Q_{20-67} . The Q_{20-67} values were evaluated over the temperature range from 20 °C to 67 °C on the basis of the area calculation and plotted as the negative values (exothermic reaction).

究されてきた。特に小さな球状蛋白質に関しては、変性に伴う熱容量変化は露出表面積変化と良い相関があることが見出されてきた。^{11,12)} これに対してアミロイド線維の熱応答に対する詳細な研究はほとんど行われておらず、天然構造との比較は興味深い研究テーマである。著者らは、DSC (VP-DSC, Micro Cal 社製) を用いて $\beta 2 m$ アミロイド線維の熱分解に伴う熱容量変化を調べ、以下のように球状蛋白質の熱変性では見られない現象をいくつか見出した。¹³⁾

$\beta 2 m$ アミロイド線維は、pH 2.5 においてシード存在下での伸長反応により形成された。異なる濃度のアミロイド

水溶液を熱量計の試料セルに、緩衝液を対照セルに入れ、10 °C から 120 °C まで走査させ、試料溶液全体の見かけの熱容量 ($C_{p,app}$) を測定した。(Fig.4(a), 蛋白質溶液は緩衝液より熱容量が小さいので $C_{p,app}$ は負の値をとる)。比較として天然構造をとる $\beta 2 m$ の熱変性曲線を示し、Fig.4(b) に拡大した。アミロイド線維水溶液の $C_{p,app}$ は、温度の上昇とともに大きく減少し (発熱反応)、60 °C から 90 °C 付近で最小値を示し、その後 0 付近に戻った。CD 測定の結果と比較することにより、この最小値はアミロイド線維の熱分解開始温度に対応し、高温側での $C_{p,app}$ の大きな上昇は、線維

の熱分解過程に対応することがわかった。熱分解に伴う $C_{p,app}$ の大きな上昇は、球状蛋白質の熱変性に伴う熱容量変化と比較して桁違いに大きな変化であった。アミロイド線維の熱分解に伴う吸熱ピークは、 $C_{p,app}$ の大きな変化に隠れるためか検出されなかった。熱分解開始前の $C_{p,app}$ は温度変化に対して可逆的であるが、熱分解が終わり $C_{p,app}$ が0近くまで戻った後、温度を下げ再走査しても発熱過程は観測されなかった。これは、120℃においてアミロイド線維が完全に熱分解したことを示す結果である。Fig.4(a)で注目する点は、線維濃度と共に発熱量は大きく増加するが、ある濃度以上 (0.04 mg ml⁻¹) で熱分解前の $C_{p,app}$ の温度依存性が飽和する現象である。このことは、アミロイド線維水溶液の $C_{p,app}$ は濃度で規格化できないことを意味する。

次に、アミロイド線維が熱分解を開始する前の $C_{p,app}$ の走査速度依存性を詳細に調べた (Fig.4(c))。走査速度が小さくなるにつれて、 $C_{p,app}$ の温度依存性は小さくなり、明確な走査速度依存性を示すことがわかる。ここで発熱過程に伴う熱量 (Q_{20-67}) を20℃から67℃の温度範囲で $C_{p,app}$ 変化に伴う面積計算から求め、得られた Q_{20-67} 値を走査速度に対してプロットした (Fig.4(d))。結果は、きれいな直線を示し、走査速度を0に外挿すると、 Q_{20-67} はほぼ0を通過した。線維分解前に観察される発熱過程が、平衡熱力学では取り扱いできない速度論的な現象であることを明確に示す結果である。

5. Aβ アミロイド線維の熱応答

β2 m 以外のアミロイド線維でも、速度論的な現象が観察されるかどうかを確かめるため、アミロイドβ ペプチド (Aβ) から形成されたアミロイド線維の熱応答を調べた。Aβ は、アルツハイマー病患者の脳に形成される老人斑の主成分であり、40と42のアミノ酸残基よりなる2種類のアミロイド線維が一般に報告されている (それぞれのペプチドをAβ(1-40)、Aβ(1-42)と略す)¹⁴⁾。著者らは、Aβ(1-40)と、そのなかで比較的疎水性の高いフラグメントAβ(25-35)でアミロイド線維を形成させ、DSC測定を行った (Fig.5(a))。β2 m アミロイド線維の場合と同様に、温度上昇と共に発熱反応が観察され、ある濃度以上で $C_{p,app}$ の温度依存性が飽和した。 $C_{p,app}$ に負のピークが観察され、100℃以上で0付近にもどり、線維が熱分解することがわかる。熱分解前の $C_{p,app}$ に走査速度依存性が観察され、20℃から67℃の発熱過程に伴う熱量 (Q_{20-67}) を走査速度に対してプロットすると直線性を示した (Fig.5(b))。β2 m アミロイド線維と同様に、発熱過程が速度論的な現象であることがわかる。このような速度論的な現象は、β2 m やAβのアモルファスな凝集物に対しては、観察されなかった (未発表データ)。走査速度に依存する速度論的な現象は、3種

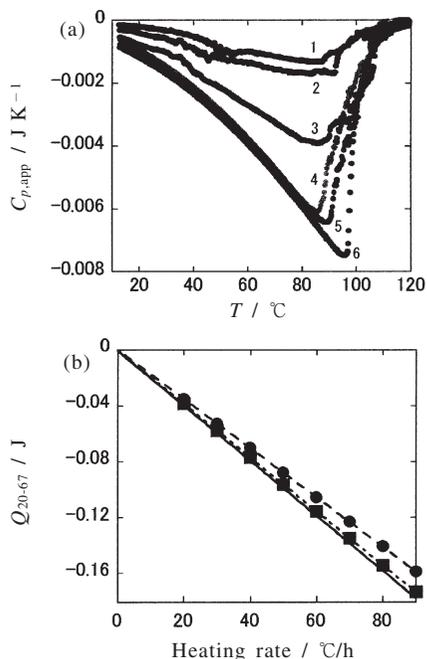


Fig.5 Kinetic thermal response of Aβ amyloid fibrils at pH 7.2 (taken from a literature¹³⁾ and partly modified). (a) DSC thermograms of Aβ(1-40) amyloid fibril solutions. The fibril concentrations were varied from 0.02 to 0.17 mg ml⁻¹; 1:0.02, 2:0.04; 3:0.07, 4:0.09, 5:0.13, 6:0.17. The heating rate was 60 °C h⁻¹. (b) Heating rate dependence of Q_{20-67} . ■: Aβ(1-40) amyloid fibrils (0.09 mg ml⁻¹); ●: Aβ(25-35) amyloid fibrils (0.04 mg ml⁻¹). The continuous line is for β2 m amyloid fibrils (0.1 mg ml⁻¹) and the same as that in Fig.4(d).

類の異なるアミロイド線維 (β2 m, Aβ(1-40), Aβ(25-35)) に対して観察されたことから、現在のところアミロイド線維特有な現象と考えている。

6. 今後の展望

なぜアミロイド線維の熱応答に走査速度に依存した大きな $C_{p,app}$ の減少を伴うのか? 蛋白質の重合体であるアミロイド線維自体に走査速度に依存した $C_{p,app}$ の大きな温度依存性があるとは考えにくい。一般に、蛋白質同士の会合や蛋白-DNAの会合に負の熱容量変化を伴うことが知られている。これは会合に伴って疎水性残基の露出表面積が減少する効果や、会合面で水分子が強く束縛され、水分子自体の熱容量が減少することが考えられる。^{15,16)} 事実、アミロイド線維は、熱で会合 (凝集) する傾向があり、場合によ

っては更に何本かのプロトフィラメントが集合して高次構造を形成する可能性もある。^{13,17,18}あるいは、球状蛋白質の水和構造と異なったアミロイド線維の独特な水和構造が関係しているかもしれない。アミロイド線維は、アミノ酸側鎖がパッキングした天然構造と異なり、主鎖のペプチド結合の相互作用で形成されるクロスβシートに支配される構造である。^{1,4,5}したがって、線維表面には多くの水素結合の露出や親水性残基、疎水性残基の独特な配列が引き起こされ、特異な水和構造を形成することが予想される。今後、水和構造の検出や冷却に伴う C_p -app 曲線を含め、速度論的現象をより詳細に解明していきたい。

これまで、球状蛋白質の熱変性データから、蛋白質の安定性に及ぼす水和に関する知見が得られてきた。^{11,12} 重要なことは、アミロイド線維の熱応答を考える場合、これまでの知見では説明できないということである。したがって、速度論的な熱応答への水和の役割を明らかにすることは、蛋白質と水との相互作用という観点から、新たな研究テーマと考える。アミロイド線維が蛋白質の一つの構造形態である以上、疎水的相互作用、静電的相互作用や水素結合といった天然構造で作用するのと同様な相互作用が関与することは間違いない。ただし、それだけでは蛋白質の種類に依存しないで形成される、規則的な線維構造は説明できず、新たな考え方が必要である。著者らのカロリメトリーを用いたアミロイド線維の解析は、まだ1歩を踏み出したところであるが、速度論的な熱応答を通して、アミロイド線維の水和を詳細に調べることで、線維形成機構の謎に迫れるのではないかと考えている。

文 献

- 1) M. Stefani and C. M. Dobson, *J. Mol. Med.* **81**, 678 (2003).
- 2) 後藤祐児, 実験医学 **21**, 898 (2003).
- 3) 長谷川一浩, 山口 格, 内木宏延, 細胞工学 **20**, 1495 (2001).
- 4) M. Fandrich and C. M. Dobson, *EMBO J.* **21**, 5682 (2002).
- 5) R. Tycko, *Biochemistry* **42**, 3151 (2003).
- 6) S. Yamamoto and F. Gejyo, *Biochim. Biophys. Acta* **1753**, 4 (2005).
- 7) H. Naiki and F. Gejyo, *Method Enzymol.* **309**, 305 (1999).
- 8) J. Kardos, K. Yamamoto, K. Hasegawa, H. Naiki, and Y. Goto, *J. Biol. Chem.* **279**, 55308 (2004).
- 9) 木下正弘, 後藤祐二, 現代化学 **4**, 27 (2005).
- 10) M. Kinoshita, *Chem. Phys. Lett.* **387**, 54 (2004).
- 11) G. I. Makhatadze and P. L. Privalov, *Advan. Protein Chem.* **47**, 307 (1995).

- 12) A. D. Roberson and K. P. Murphy, *Chem. Rev.* **97**, 1251 (1997).
- 13) K. Sasahara, H. Naiki, and Y. Goto, *J. Mol. Biol.* **352**, 700 (2005).
- 14) 柳澤勝彦, 蛋白質核酸酵素 **47**, 344 (2002).
- 15) W. E. Stites, *Chem. Rev.* **97**, 1233 (1997).
- 16) S. Bergqvist, M. A. Williams, R. O'Brein, and J. E. Ladbury, *J. Mol. Biol.* **336**, 829 (2004).
- 17) J. Kardos, D. Okuno, T. Kawai, Y. Hagihara, N. Yumoto, T. Kitagawa, P. Zavodszky, H. Naiki, and Y. Goto, *Biochim. Biophys. Acta* **1753**, 108 (2005).
- 18) N. M. Kad, S. L. Myers, D. P. Smith, D. A. Smith, S. E. Radford, and N. H. Thomson, *J. Mol. Biol.* **330**, 785 (2003).

要 旨

アミロイド線維は、アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病をはじめとするヒトの約20種類の病気に共通して見られ、その構造や物性が注目されている。さらにアミロイド線維は、その形態や構造的特徴から蛋白質の普遍的な構造状態である可能性が高い。しかし、アミロイド線維形成及びその熱変性に関する熱力学的解析の報告例は非常に少ない。この解説では、最初に、ITC測定から得られるβ2ミクログロブリンのアミロイド線維形成に伴う熱力学的パラメーターについて述べる。次に、アミロイド線維の熱応答が天然状態の熱変性挙動と著しく異なり、走査速度に依存する速度論的な現象であることを報告する。

笹原健二 Kenji Sasahara

大阪大学蛋白質研究所 & 科学技術振興機構 戦略的基礎研究推進事業, Institute for Protein Research, Osaka Univ. & JST/CREST, TEL. 06-6879-8615, e-mail: sasahara@protein.osaka-u.ac.jp
研究テーマ: 生物物理学

後藤祐児 Yuji Goto

大阪大学蛋白質研究所 & 科学技術振興機構 戦略的基礎研究推進事業, Institute for Protein Research, Osaka Univ. & JST/CREST, TEL. 06-6879-8614, e-mail: ygoto@protein.osaka-u.ac.jp
研究テーマ: 生物物理学