

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域
「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」
研究課題
「アミロイドーシス発症の分子機構解明」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：後藤 祐児
(大阪大学蛋白質研究所 教授)

1 研究実施の概要

アミロイドーシスの研究の歴史は 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。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蛋白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、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)。なお、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。

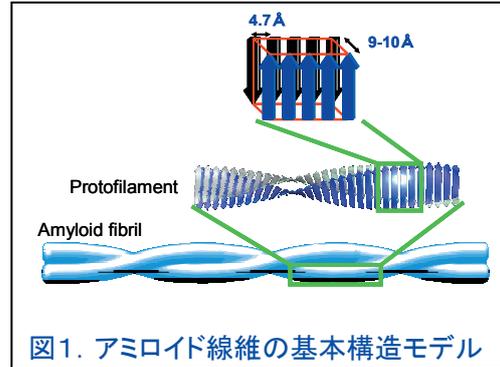


図1. アミロイド線維の基本構造モデル

アミロイド線維の沈着を伴う疾患をアミロイドーシスと呼ぶ。現在、クロイツフェルトヤコブ病やウシ海綿状脳症などのプリオン病、アルツハイマー病、透析アミロイドーシス(図2)、ALアミロイドーシス、家族性アミロイドポリニューロパチーをはじめとする20種類以上のアミロイドーシスが知られている。これらの原因となる前駆体蛋白質は、 $\beta 2$ ミクログロブリンや免疫グロブリン、リゾチーム、インスリンなど、生体機能に重要な役割を果たす蛋白質が多い。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、ポリグルタミンが前駆体)やパーキンソン病(α シヌクレインが前駆体)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蛋白質やモデルペプチドもアミロイド線維を形成する。数多くの蛋白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、「アミロイド線維は蛋白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」という考えが提唱されている。

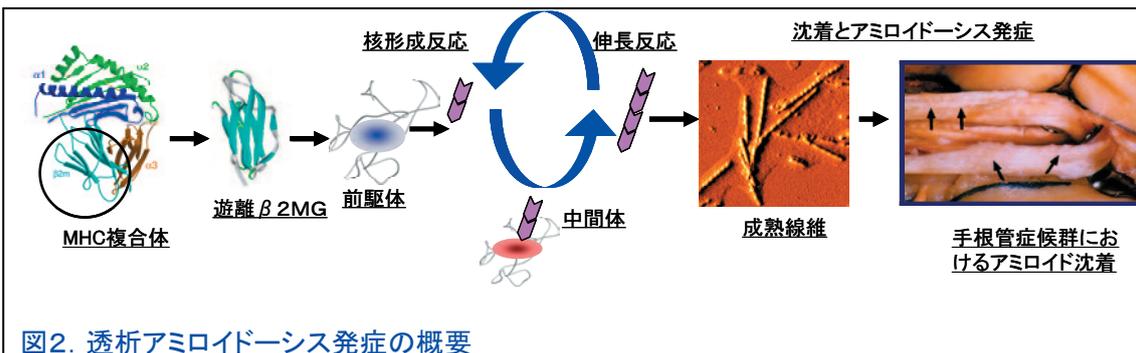


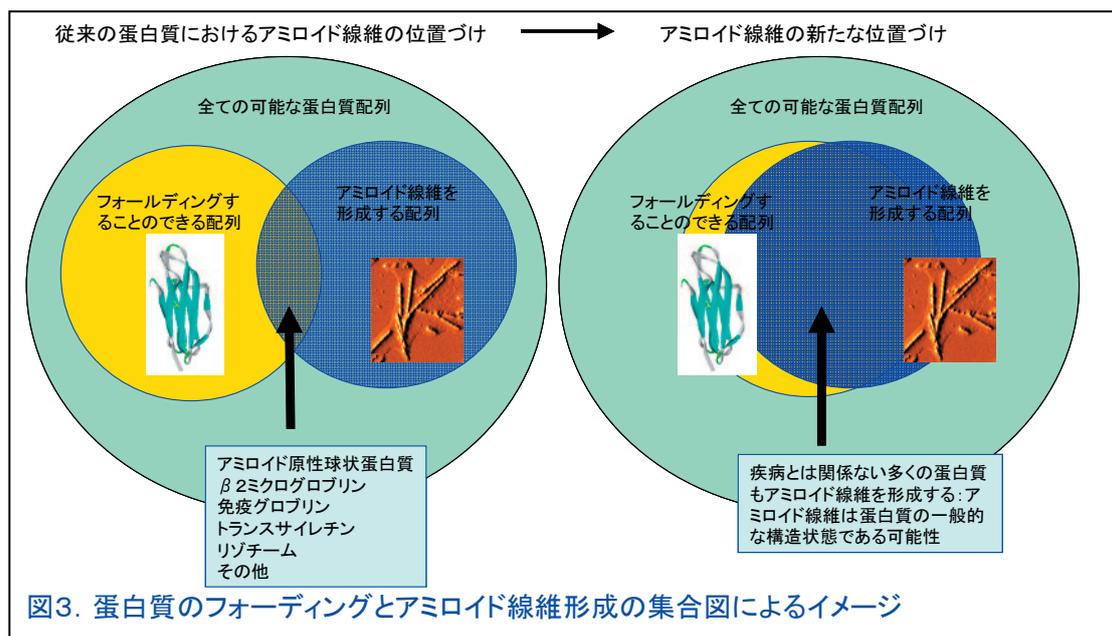
図2. 透析アミロイドーシス発症の概要

アミロイド病とアミロイド線維の研究は、従来、医学の一領域にあり、医学では重要な研究対象ではあるが、蛋白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。他方、1980年代終わりより、蛋白質のフォールディングや構造物性の研究領域において、蛋白質の凝集が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蛋白質の発現実験で、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。さらに、分子シャペロンの研究が 1990 年代に活発に行われたこともあげられる。分子シャペロンは

蛋白質の凝集を抑制し、フォールディングを介助する蛋白質性の因子であり、その対象としての蛋白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るに至った英国のウシ海綿状脳症があげられる。英国では、ウシからヒトに感染する変異型クロイツフェルトヤコブ病が社会問題となり、その原因蛋白質であるプリオン蛋白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。そして1997年には、プリオン説を提唱したPrusinerがノーベル医学生理学賞を受賞した。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蛋白質が、 β シートからなる異常型に変換することにより、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。

これらの状況は、フォールディングや蛋白質物性の研究者の注目するところとなり、フォールディング異常の観点から、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)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、アミロイド研究と蛋白質のフォールディング研究が結びつくことを示した。蛋白質の構造安定性の低下がアミロイド病の発症と結びつくことはトランスサイレチン(Kelly, J. ら、米国)、免疫グロブリン(Fink, A. L.ら、米国)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、蛋白質の構造物性、フォールディング分野でその勢いを増していった。さらにDobsonらによって、病気とは関係しないさまざまな蛋白質もアミロイド線維を形成することが示され、アミロイド線維は蛋白質の一般的な構造状態であることが提唱された。2000年前後より、アミロイド線維は、一般的な蛋白質の構造やフォールディングを考える上で、きわめて重要な構造状態として注目されるようになった(図3)。



後藤は、従来、蛋白質のフォールディング反応や構造安定性に関する研究を行ってきた。1999年、病理学者である内木の交流を契機に、内木とβ2ミクログロブリンのアミロイド線維に関する共同研究を開始した。β2ミクログロブリンが沈着する透析アミロイドーシスは、血液透析医療が普及している国内で特に多発する疾病である。2005年の長期透析患者数は25万人を超え、高齢化が進む日本の社会では、この数は更に増大して行くと予測される。本来、腎臓で分解されるβ2ミクログロブリンは、血液透析では除去されない。このため血中濃度が上昇し、長年にわたる血液透析の結果、組織にアミロイド線維が沈着し、全身性の骨、関節症などの症状を示す。透析歴10年以上では5割以上の患者で発症する。しかし、蛋白質立体構造レベルでの理解は不明であり、根本的な治療法はない。

1999-2002 年にかけて行った内木との共同研究では、蛋白質フォールディングや蛋白質物性に関する実績と知見をもとに、集中的に研究を進めた。その結果、短期間の内に世界的にも高いレベルに達した。アミロイド線維の形成機構を解明し、アミロイドーシスの治療、予防、さらには未知のアミロイドーシス発症の回避を目指すことは、蛋白質の構造物性やフォールディングを研究するものにとって、重要かつ魅力的な研究課題である。そこで、2003 年度から開始した本 CREST 研究では、アミロイドーシスの発症機構を、蛋白質の立体構造と構造物性に基ついで理解することに重点をおいて研究を行ってきた。

共同研究者として、内木、樋口、桑島が参加した。内木は、基礎医学・病理学的立場から、アミロイド線維形成を阻害、あるいは分解することのできる一群の化合物の探索とその分子機構に焦点を当てて研究を行った。感染性のアミロイドーシスはプリオン病だけであるが、試験管内でのアミロイド線維の形成機構の実験から、他のアミロイドーシスでも感染、伝播の可能性を研究することが重要である。そこで、樋口は、マウスモデルを用いて、アミロイドーシスの伝播に関する研究を行った。アミロイド線維は原因蛋白質のミスフォールディングによって生じる。したがって、フォールディングとミスフォールディングを対比させて研究することが必要である。そのような観点から、桑島は、アミロイド原性蛋白質の天然構造へのフォールディング反応、分子シャペロンとの相互作用に関する研究を担当した。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究の第一の目的は、アミロイドーシスの原因となるアミロイド線維形成を、蛋白質のフォールディング問題の一環として蛋白質の構造物性の観点から研究し、アミロイドーシス発症の分子機構を解明することである。これにより、アミロイドーシスの治療、予防の基盤を確立する。さらにはアミロイド線維の物性を利用して、ナノ材料開発の基盤を確立する。平成 14(2002)年 11 月の研究開始時にチーム全体として以下の具体的な研究項目(目標)と実施方法、担当者を設定し、各研究グループが協力して研究を進めることとした。

(a) アミロイド線維の構造物性と形成機構: 透析アミロイドーシスの原因蛋白質である β 2ミクログロブリン、アルツハイマー病に関わるアミロイド β ($A\beta$) ペプチドを中心に、アミロイド線維の立体構造解析を進める(後藤)。アミロイド線維形成反応、構造安定性や溶媒効果、天然構造へのフォールディング反応、分子シャペロンの果たす役割などの研究を行い、アミロイド線維形成の機構を明らかにする(後藤、桑島、内木)。透析アミロイドーシスおよびアルツハイマー病をモデル疾患に選び、種々の生体分子の線維形成・分解過程への影響を解析する(内木)。

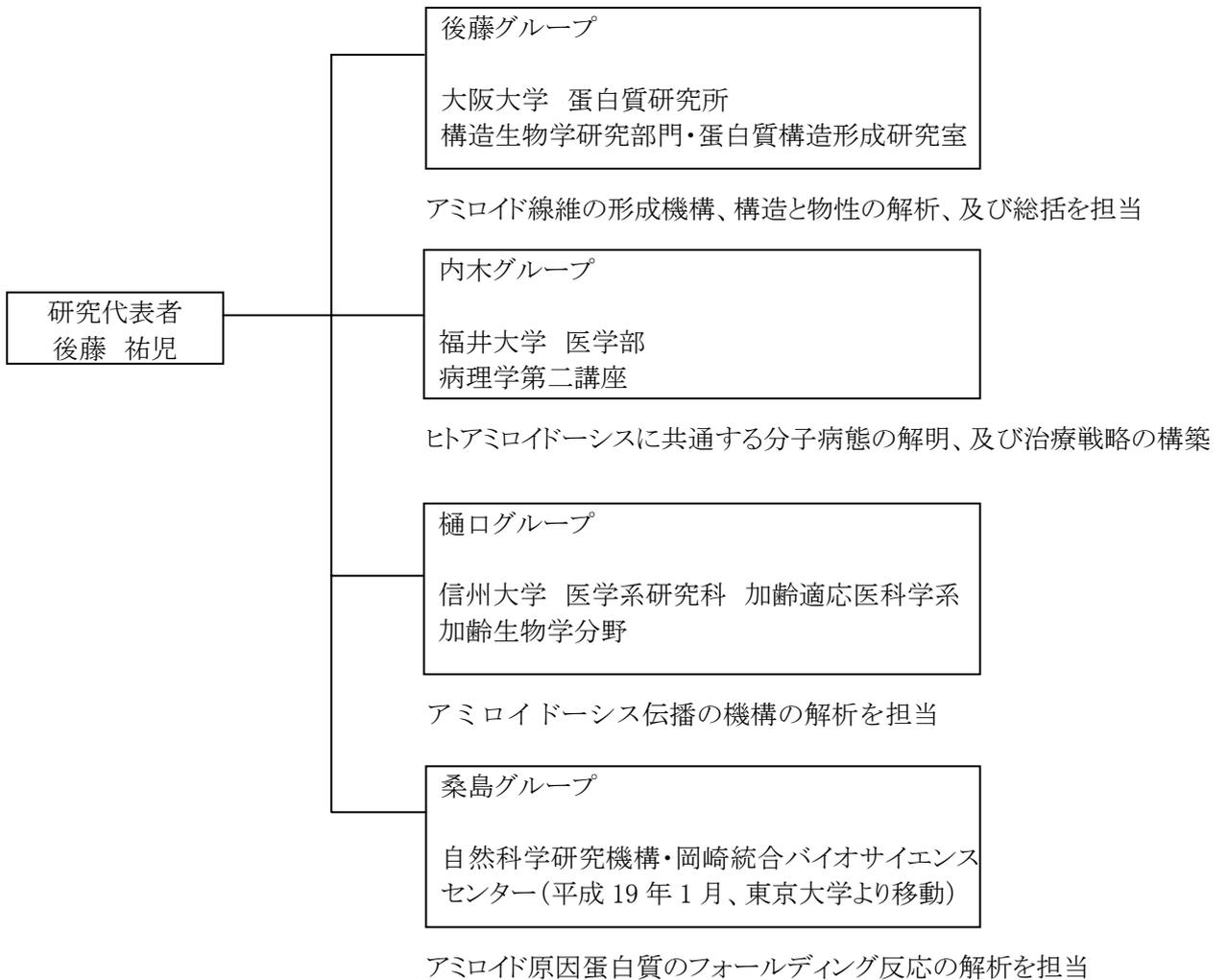
(b) アミロイドーシス伝播の機構: 試験管でのアミロイド線維形成反応と、マウスを用いたアミロイドーシス発症、伝播の機構の関係を解明する(樋口)。また、ヒト β 2ミクログロブリンを過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、アミロイドーシス発症の機構を解析する(樋口)。

(c) アミロイド線維を溶解する薬物の開発: アミロイド線維の構造物性と形成機構をもとに、線維形成を促進・抑制する生体分子、並びにアミロイド線維を分解あるいは形成を抑制する薬物や溶媒を探索する(内木)。開発した薬物の効果をアミロイドーシスのモデルマウスを用いて検証する(樋口)。

(d) アミロイド原性蛋白質予測と検証: 天然蛋白質の立体構造情報やアミロイド線維の立体構造をもとに、アミロイドーシスを発症するリスクをもつアミロイド原性蛋白質を予測、検証する(後藤)。

(e) アミロイド線維を利用したナノ材料の創製: アミロイド線維は、危険性を制御できるならば、ナノテクノロジーの素子として活用できる可能性がある。このための基盤を開拓する(後藤)。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 アミロイド線維の形成機構と構造物性(大阪大学 後藤グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

(1)-1 全反射蛍光顕微鏡を用いた伸長と形態解析 (Ban et al., 2003, 2004, 2006a-b)

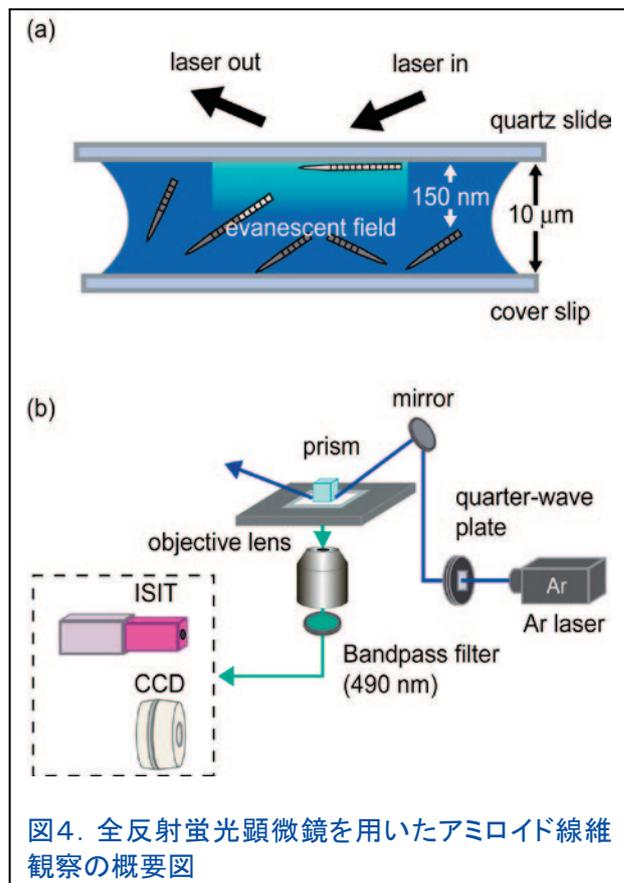
*in vitro*でのアミロイド線維の研究の多くは、電子顕微鏡や円偏光二色性、蛍光測定、X線線維回折などによって行われてきた。最近では、凝集体でも試料として使用することができる固体核磁気共鳴が威力を発揮して、注目されている。一方、アミロイド線維は巨大な複合体であるので、原子間力顕微鏡や蛍光顕微鏡によって、線維の直接観察を行うことが可能である。直接観察によって、アミロイド線維の形態や伸長方向、伸長速度といった他の手法では容易に得られない情報を即座に得ることができる。これらの情報は、アミロイド線維の形成機構を解く重要な鍵となる。本研究では、全反射顕微鏡を用いてアミロイド線維を直接、かつリアルタイムに観察する独自の手法を開発し、アミロイド線維の形成機構、その特徴を研究した。

(a) アミロイド線維の直接伸長観察

アミロイド線維形成は、結晶成長に似た反応であり、核形成反応と伸長反応の2段階で起きる。つまり、前駆蛋白質が十分な濃度で存在しても核形成は容易には起きない。しかし、一旦核が形成されると、前駆蛋白質の結合による伸長反応は速やかに進行する。また予め形成したアミロイド線維を前駆蛋白質に添加すると、加えた線維は核(シード)として働き、線維形成は急速に起きる

(シード依存性アミロイド線維反応)。

我々は、全反射蛍光顕微鏡と蛍光色素チオフラビン T を組み合わせることによって、一線維レベルでアミロイド線維の伸長過程を観察する方法を考案した(図4)。全反射蛍光顕微鏡法は、蛍光色素標識された蛋白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、溶液中に単独に存在する場合、微弱な蛍光しかださないが、アミロイド線維と結合すると、強い蛍光を発する。チオフラビン T は、アミロイド線維に対する特異性が高いので、アミロイド線維の検出試薬として広く普及している。これらの特徴を組み合わせることにより、個々の線維の伸長過程を観察することが可能となる。また、蛍光プローブとしてチオフラビン T を用いるので、簡便かつ一般性の高いことも特徴のひとつである。本研究では、この手法を用いて、 $\beta 2$ ミクログロブリンと $A\beta$ ペプチドの線維形成反応を解析した。



(b) A β (1-40)アミロイド線維の直接伸長観察

アルツハイマー病患者の脳には、老人斑と呼ばれる沈着物が観察される。老人斑の主要成分は、A β の形成するアミロイド線維である。A β は最もよく研究されたアミロイド線維であるが、詳細な伸長機構は不明である。*in vitro*でのA β (1-40)アミロイド線維形成は、 β 2ミクログロブリン線維の場合と異なり、中性pH条件で起きる。中性pHではチオフラビンTの蛍光がより強いために、より鮮明な観察像と高い時間分解能が期待できる。

A β (1-40)のアミロイド線維形成反応をリアルタイム観察したところ、シードの輝点から放射状に、かつ延々と線維の伸長していく様子が鮮明に観察された(図5)。このような放射状で極めて長い線維の形成は、試験管内で伸長させたアミロイド線維では観察されなかった。したがって、石英スライドガラス表面が、シードの凝集や前駆蛋白質との相互作用を通じて、アミロイド線維形成に大きく影響したと考えられる。一線維の伸長速度を解析したところ、一定速度で伸長は進んだ。そこで、酵素反応の定常状態に似た線維伸長モデルを立てた。シード、あるいは既に形成されたアミロイド線維を酵素と考え、A β モノマーを基質と考える。まずアミロイド線維とモノマーが結合し、酵素-基質複合体に当たる線維中間体を形成する。その後、コンフォメーション変化を起こし、1モノマー分子に相当するだけアミロイド線維が伸長すると考えられる。定常状態では線維中間体の濃度は低く観測できないが、今後、速い速度論的実験や他の構造解析手法を組み合わせることによって、線維中間体の構造解析を進めることができると期待できる。

また、リアルタイムの観察によって、A β (1-40)線維の柔軟性を示す画像や、1本の線維が3本のフィラメントから形成されることを示す画像を得ることができた(図5b, d)。蛍光顕微鏡の欠点は構造分解能が低いことであるが、このように、アミロイド線維の極めて長い特徴によって、低分解能を補う以上の重要な知見を得ることができた。

(c) A β (1-40)の球状構造体、スフェルライト

アミロイド線維は、生体内で他の蛋白質や脂質、糖鎖などと共存しており、これらの生体分子が線維形成に関与している可能性が高い。特に、脂質膜はA β (1-40)アミロイド線維の形成と細胞毒性に深く関連することから、両者の相互作用が注目されている。蛍光顕微鏡観察に使う石英スライドガラスは、その表面特性をシラン化合物による化学修飾や高分子ポリマーによる交互積層膜により変え

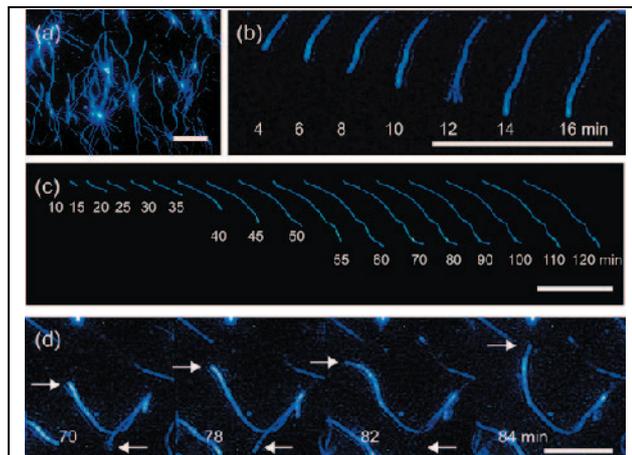


図5. A β アミロイド線維形成反応の直接観測

(b)の画像より、線維が3本のプロトフィラメントからなることがわかった。また(d)の画像より、線維はある程度の柔軟性をもつことがわかった。

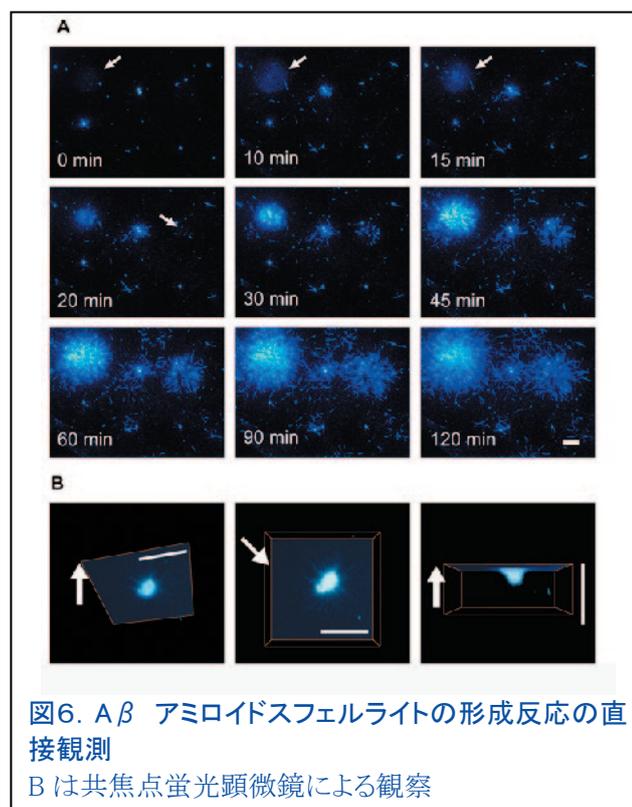


図6. A β アミロイドスフェルライトの形成反応の直接観測

Bは共焦点蛍光顕微鏡による観察

ることができるので、脂質膜のモデル表面として適している。化学構造や特性の異なる11種類のモデル表面上で、Aβ(1-40)アミロイド線維のシード依存性伸長を観察したところ、疎水性の高い表面やプラス電荷を持つ表面では、線維伸長が阻害されることが判った。これに対して、マイナス電荷を帯びた表面では、線維伸長が促進された。特に強くマイナス電荷を帯びたポリマー表面では、直径30 μm程の大きな球状構造体が観察された(図6)。この球状構造体に含まれる線維の形状や伸長速度は、石英ガラス基板上で伸長する線維と変わらないことから、全体的な形状は異なるが、含まれる線維は同じであることが示唆された。さらに両者のアミロイド線維をより高い解像度を持つ電子顕微鏡で観察したところ、形状は同じであった。また観察されたような球状構造体は、スフェルライト(spherulite)と呼ばれ、様々な蛋白質が形成する特異的な凝集構造として知られている。老人斑に蓄積したAβ凝集体もスフェルライトとしての性質を示す。本研究において、Aβ(1-40)が単独でスフェルライトを形成したことは、アルツハイマー病発症の分子機構を理解する上でも重要な発見である。

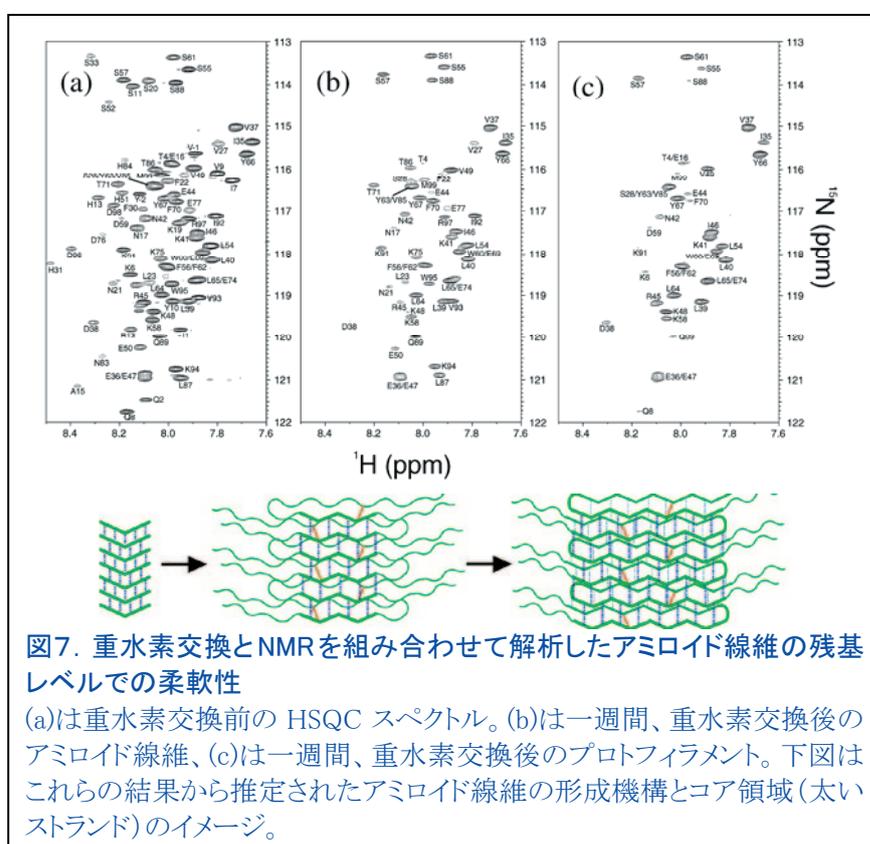
(d) アミロイド超分子構造とその分類

次に、同様の実験をシード非存在下でおこなった。すると、周囲の環境に依存して、スフェルライト以外にも、様々な興味深い形態が出現した。これらの結果から、線維伸長段階に比べ、核形成段階が環境の影響を強く受けることが示唆された。今後、このようなさまざまな形態の生じる機構や必要条件を理解できれば、生体内の線維沈着における細胞表面の役割を理解することができると期待される。

(1) -2 アミロイド線維の原子レベル構造解析

(a) 溶液 NMR を用いた構造解析 (Yamaguchi et al., 2004; Hoshino et al., 2007)

溶液 NMR 測定を駆使することで、間接的ではあるがアミロイド線維内におけるモノマー分子の構造状態の情報を得ることができる。溶液 NMR は球状蛋白質の研究の強力な手法である。特に、水素-重水素交換反応を用いることにより、蛋白質の柔軟性をアミノ酸残基レベルで調べることができる。アミロイド線維は巨大分子であることから、溶液 NMR の手法を直接適用することができな



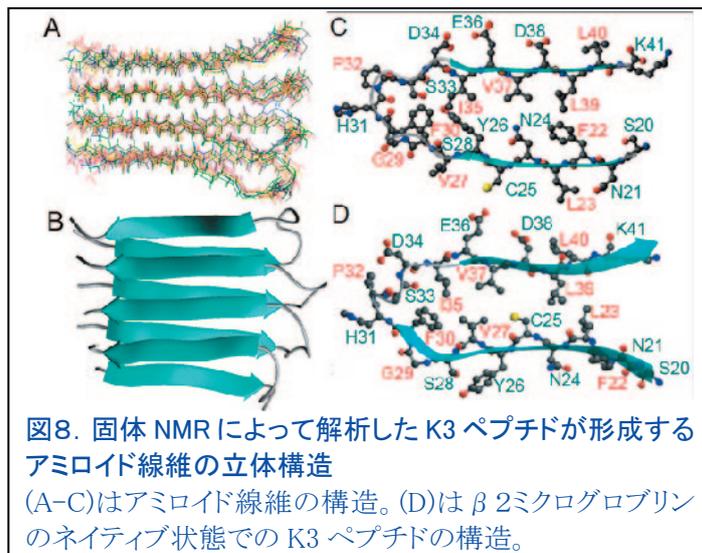
い。しかし我々は、アミロイド線維がジメチルスルホキシド [(CH₃)₂SO ; DMSO] (80%) に可溶であることに着目した。そして DMSO によるアミロイド線維の溶解と溶液 NMR を組み合わせることにより、残基レベルの構造解析手法を考案した(Hoshino et al., 2002)。具体的には、まずアミロイド線維の重水素交換反応を行い、アミロイド線維を回収する。回収したアミロイド線維を凍結乾燥し、DMSO に溶解する。溶解によって蛋白質は脱重合しモノマーになるので、NMR 測定が可能

となる。DMSO は交換性のプロトンを含まないため、余計な重水素交換反応を防ぐという利点もある。我々の開発したこの手法は、アミロイド線維の構造安定性を知る特に有効な手法として世界的に普及している。この方法を用いて、 β 2ミクログロブリンのアミロイド線維に加え、酸性 pH、高塩濃度で形成されるフレキシブルなプロトフィラメント、 β 2ミクログロブリンの K3 ペプチドの形成する剛直な線維など、異なる構造状態の重水素交換反応を行った(図7)。なお、K3 ペプチドは、 β 2ミクログロブリンを限定分解して得られる部分ペプチド Ser20-Lys41 (22 アミノ酸残基)である。

その結果、全長のアミロイド線維では N 末端、C 末端以外の広範囲のアミドプロトンが交換から保護されていたのに対し、フレキシブルなプロトフィラメントでは、コア領域と考えられる一部だけが交換から保護されていた。また、K3 フラグメントの形成する剛直な線維では、ほぼ全領域が交換から保護されており、この領域は、フレキシブルなプロトフィラメントで保護された領域に一致した。以上の結果から、K3 フラグメントがアミロイド形成の特に重要なコア領域であり、まず、この領域に β シートが形成されることによってフレキシブルなプロトフィラメントに似た中間体が形成され、さらにそれが周辺に広がることによってアミロイド線維が完成することを提唱した。

(b) 固体 NMR を用いた構造解析 (Iwata et al., 2006)

アミロイド線維の構造研究手法として、特に固体 NMR が注目されている。本研究では、 β 2ミクログロブリンの K3 フラグメントの立体構造を、固体 NMR によって解析した(図8)。なお、 β 2ミクログロブリンは 99 アミノ酸残基からなり、ネイティブ構造では 7 本の β ストランドから構成される免疫グロブリンフォールドをとる。K3 ペプチドは、N 末端側から 2 番目と 3 番目の β ストランドの領域を含んでおり、アミロイド線維原性が高い。この K3 ペプチドは、20% (w/w) トリフルオロエタノール、酸性条件下で、全長の β 2ミクログロブリンと比較して、均質で細いプロトフィラメントを形成する。



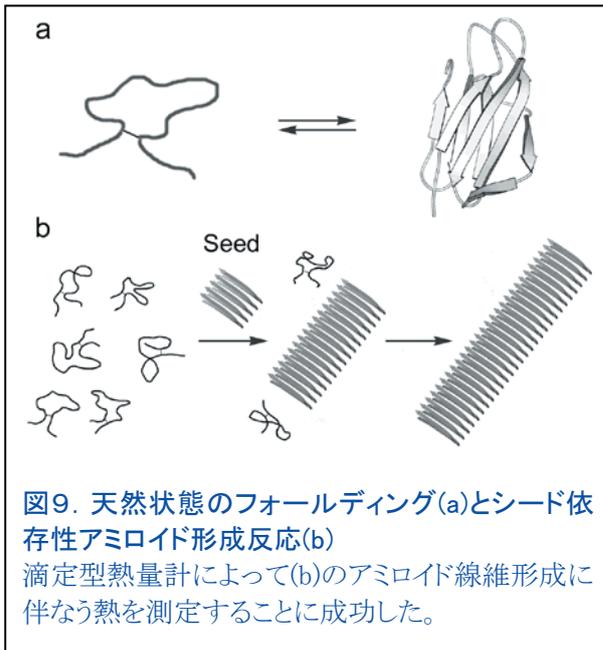
K3 プロトフィラメントの固体 NMR を測定し、帰属された化学シフト値、及び核間距離情報から、K3 プロトフィラメントの 3 次元モデルを構築した。各分子は、「 β -ループ- β 」の基本構造を形成する。この基本構造を、ネイティブ状態における K3 領域の結晶構造(図 8D)と比較すると、K3 プロトフィラメントでは Ser20-Ser28 の β ストランドの側鎖の向きが反転している。また、プロトフィラメントの 2 本の β ストランドは、ループを介して線維軸方向に 1/2 ストランド分ずれている。その結果、分子間水素結合は、線維軸方向に配向した異なる分子間で形成されていた。

同様な β -ループ- β 構造は、A β 、転写活性化因子 CA150 蛋白質の部分ペプチド、HET-s プリオンなどが形成する線維でも報告されており、 β -ループ- β 構造はアミロイド線維の基本構造であると考えられる。

(1) -3 アミロイド線維の構造物性の解析

(a) 滴定型熱量計 (ITC) を用いた解析 (Kardoz et al., 2005)

我々は、滴定型熱量計を用いて、 β 2ミクログロブリン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。滴定型熱量計のセルに酸変性した β 2ミクログロブリン (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。その結果、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(図9)。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。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。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。

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測定することによって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)を求めた。これらの値を、天然構造を

とっている β 2ミクログロブリンの熱変性に伴う熱力学的パラメータと比較した。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。以上のことから、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を提唱した。

(b) 示差走査型熱量計(DSC)を用いた解析 (Sasahara et al., 2005, 2006, 2007)

球状蛋白質の天然構造に関しては、DSCを用いた熱測定が盛んに行われ、構造安定化の熱力学的機構が詳細に研究されてきた。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。我々は、DSC(VP-DSC Micro Cal社製)を用いて β 2ミクログロブリン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(図10)。

β 2ミクログロブリンアミロイド線維は、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。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°C付近に戻った(図10左)。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。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(0.04mg/ml)では、熱分解前の $C_{p,app}$ の温度依存性が飽和する現象である。

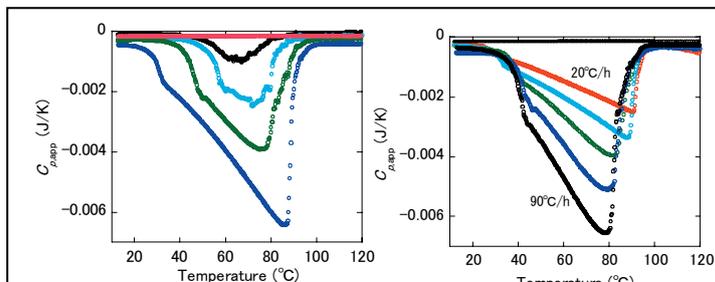


図10. 示差走査型熱量計によって測定したアミロイド線維の熱応答
 左図は蛋白質濃度依存性、右は走査速度依存性。

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(図10右)。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。線維分解前に観察さ

れる発熱過程は、平衡熱力学では取り扱うことのできない速度論的な現象である。同様な現象は A β (1-40) でも観測された。他方、このような速度論的な現象は、 β 2 ミクログロブリンや A β (1-40) のアモルファスな凝集物に対しては、観察されなかった。走査速度に依存する速度論的な現象は、3 種類の異なるアミロイド線維(β 2 ミクログロブリン, A β (1-40), A β (25-35)) に対して観察されたことから、アミロイド線維に特有な現象である。

(c) 圧力に対するアミロイド線維の応答 (Chatani et al., 2005, 2006)

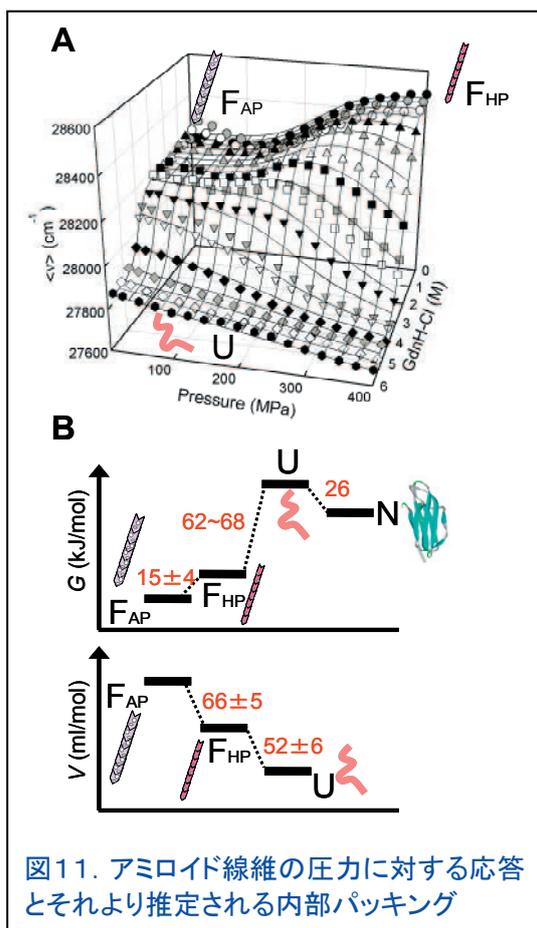


図11. アミロイド線維の圧力に対する応答とそれより推定される内部パッキング

蛋白質分子の構造変化はポリペプチド鎖を構成する原子同士のパッキングや水和状態の変化を伴う。このため、圧力によって蛋白質は構造変化を誘導し、たいていの場合、立体構造を壊す(変性)作用を示す。圧力はこれまでも蛋白質の構造変化の誘導因子として用いられ、空隙や水和に関する数々の重要な情報を明らかにしてきた。アミロイド線維形成はミスフォールディングが引き金となるため、加圧によって誘導される蛋白質の構造変化とアミロイド化の関連がわかれば、アミロイド形成に必要な構造変化の実態に迫ることができる。さらに、アミロイド線維では、ポリペプチド鎖が非共有結合によって重合しており、その重合過程にも体積変化があると思われる。アミロイド線維の高圧実験は、顕著な展開を見せている。

我々は、 β 2 ミクログロブリンのアミロイド線維構造が、圧力によってより秩序だった別の線維構造へと転移することを発見した(図11)。加圧に伴い著しい ThT 蛍光の上昇が見られ、さらに、トリプトファン蛍光スペクトルの短波長シフトを伴うことが判明した。これらの結果は、アミロイド線維が加圧によって、より密に詰まり、強い ThT 蛍光を示す別のアミロイド線維構造に転移したことを意味する。

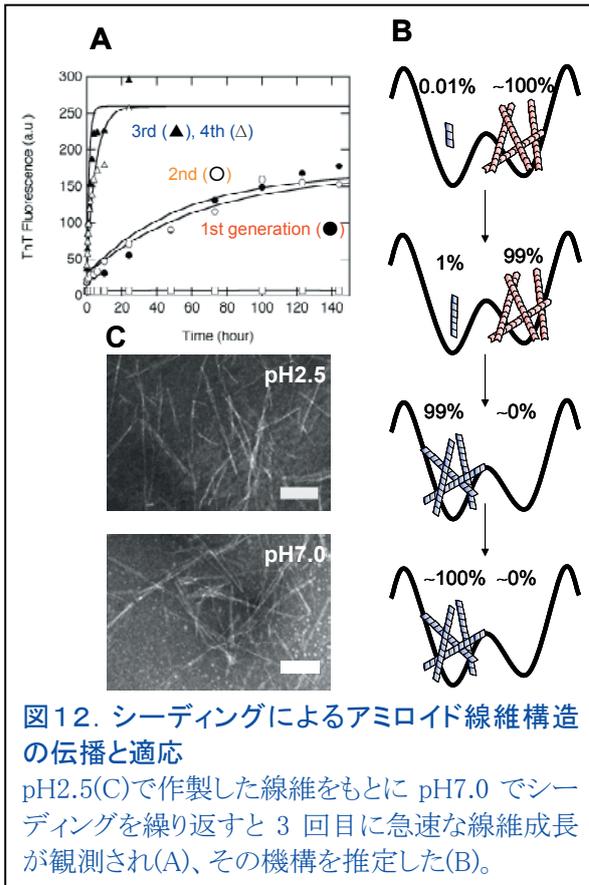
通常の天然構造では、アミノ酸側鎖同士がもっとも密にパッキングすることによって最適な相互作用をしている。これに対してアミロイド線維構造は、クロス β 構造という主鎖間の水素結合が優勢に形成

される構造である。このような状況で、アミノ酸側鎖のパッキングや相互作用をポリペプチド鎖全領域で最適化するの、困難であろう。滴定型熱量計を用いてアミロイド線維形成に伴う熱量を測定することによって得られたエンタルピー変化も、隙間の多い構造を示唆する。

(1) 4 アミロイド線維の伝播と適応 (Yamaguchi et al., 2005; Ban et al., 2006; Kihara et al., 2006)

アミロイド線維は、クロス β 構造という特徴的な構造を持つことから、よく似た形状を示すことが多い。しかしながら、同じ前駆蛋白質のアミロイド線維であるにも関わらず、条件の違いにより、しばしば異なる構造形態が観察される。特に興味深いことに、いくつかの蛋白質において、この構造多形がシーディング反応を介して伝播することが報告されている。この線維構造の多形と伝播が、プリオン病で示唆される「ひとつのプリオン蛋白質による異なった病態の存在と伝播」の分子機構ではないかと考えられている。

シーディング反応を介した構造伝播は、いつまでも繰り返されるであろうか。我々は、 β 2 ミクログロブリンのアミロイド構造伝播を詳細に調べた(図12)。酸性 pH 条件下で形成したアミロイド線維は、中性 pH 条件下では不安定で、脱重合し、天然構造にリフォールディングしてしまう。しかしな



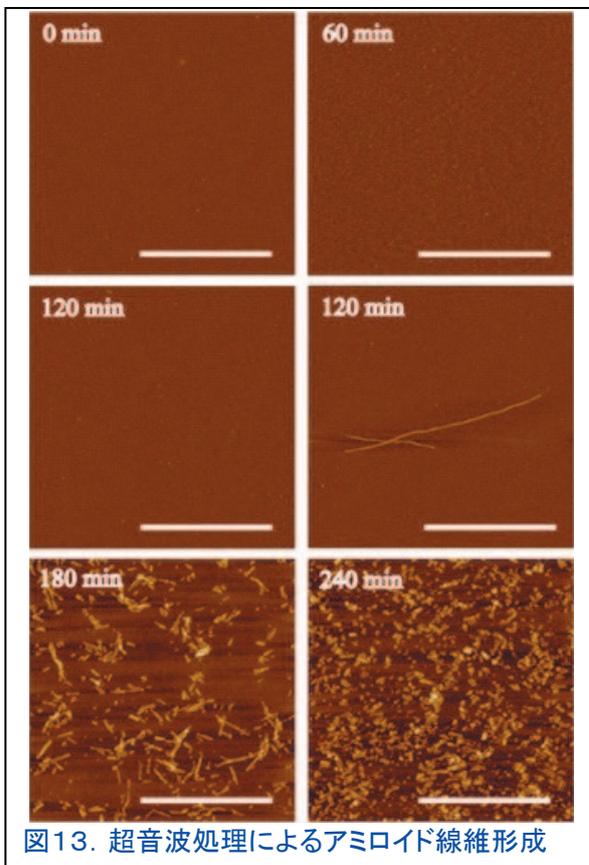
がら、低濃度の SDS を加えて線維を安定化すると、時間はかかるが、中性条件下でもアミロイド線維を形成することができる。できあがったアミロイド線維をシードとして中性条件下で何度も伸長反応を行う。すると、何回かの繰り返しの後に、突然、線維形成は速くなった。

一見、不思議な現象ではあるが、再現性があり、偶然ではない。そしてこの現象は、伸長速度が異なる 2 種類のアミロイド線維の競争伸長モデルによって容易に説明することができた。つまり、 $\beta 2$ ミクログロブリンのアミロイド線維には、中性 pH に適した伸長速度の速い線維と、酸性 pH 条件に適した伸長速度の遅い線維の 2 種類が存在する。中性酸性で作製したアミロイド線維を中性 pH に移したとき、ほとんどが酸性に適応した線維で、線維伸長は遅い(0.026 s^{-1})。しかし、伸長を繰り返すと、中性に適応した線維の伸長速度(1.3 s^{-1})は酸性線維よりも 50 倍速いため、次第にその割合が増えていく。2 種類の線維の伸長速度が大きく異なると、ある段階で、突然、中性に適した線維の割合が線維の大半を占めるようになる。

同様の線維構造の適応現象は、 $\beta 2$ ミクログロブリンの Ser20-Lys41 に相当する 22 アミノ酸残基のペプチド K3 でも観察された。この場合、2 種類の線維の伸長速度は約 6 倍異なる。シーディングを繰り返すと、徐々に太い線維から細い線維への構造変化の起きることが、原子間力顕微鏡観察から示された。アミロイド線維の構造的な特徴は、鋳型であるシードによって伝播するが、線維伸長速度の違いにより、環境に適した線維へと変化していくのは一般的な現象であろう。このような適応現象は、アミロイドーシスの発症と進行の過程でも重要な役割を果たしていると予想される。

(1) - 5 アミロイド線維形成と結晶形成反応の類似 (Ohhashi et al., 2005)

アミロイド線維形成は、物質の結晶形成に実によく似ている。そのことを示す重要な証拠として、我々は、モノマー $\beta 2$ ミクログロブリンに対して超音波処理を行うことにより、アミロイド線維の形成することを発見した(図 13)。アミロイド線維と比較すると、モノマーの蛋白質溶液はしばしば過飽和状態にあり、攪拌、超音波などのさまざまな刺激によってアミロイ



ド線維形成が促進される。結晶形成との類似性をふまえて、アミロイド線維形成の特徴を以下のように整理できる。

「シード(鋳型)に依存したアミロイド線維形成」は、アミロイドの形成機構を考える上で、本質的な特徴である。これに加え、「線維構造の多形」が重要な特徴として注目されている。両方とも、結晶形成と共通する。これら「シード依存構造形成」と「構造多形」という2つの特徴が合わさったとき、「異なったアミロイド構造の伝播」や「アミロイド構造の適応」が起きる。これらは球状蛋白質のフォールディング反応では存在しないものであり、構造形成原理の基本的な違いに起因する。これらの状況は、[図14](#)に示す組木パズルでうまく例えることができる。

全反射蛍光顕微鏡や原子間力顕微鏡による直接観察は、これらのアミロイド線維に特徴的な現象の観察に適した方法である。蛍光顕微鏡によるリアルタイムでの伸長画像を見ていると、アミロイド線維の伸長端での反応に対する理解が、正に手の届くところに来ているように思われる。他の手法を併用することにより、もう少し解像度を上げることができれば原子レベルの実態さえ見ることができそうである。

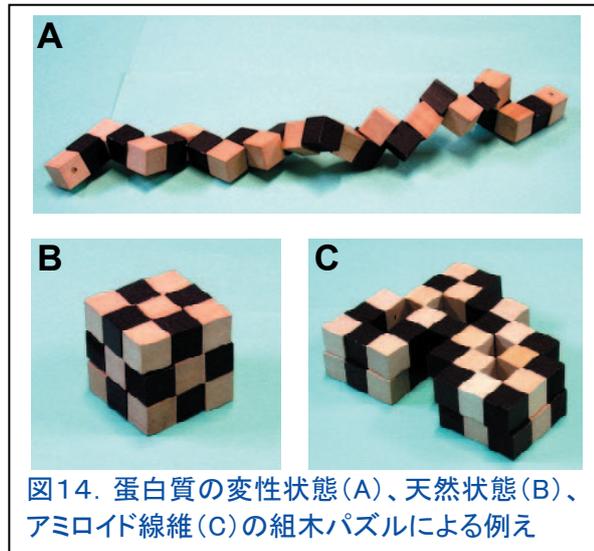


図14. 蛋白質の変性状態(A)、天然状態(B)、アミロイド線維(C)の組木パズルによる例え

(2) 研究成果の今後期待される効果

アミロイドーシスの多くは、高齢化社会や高度医療化社会において特に深刻な疾病であり、緊急の医学的対策や、一層の基礎研究が必要である。蛋白質科学の第一人者である Dobson, C.M. (英国ケンブリッジ大学)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。言わば、アミロイドーシスは、高齢化社会や高度医療化社会がもたらした疾病である。ポストゲノム時代において、蛋白質科学と医学が融合してこれに取り組むことは世界の潮流になりつつある。



図15. 蛋白質科学と医学の融合によるアミロイド構造生物学の発展

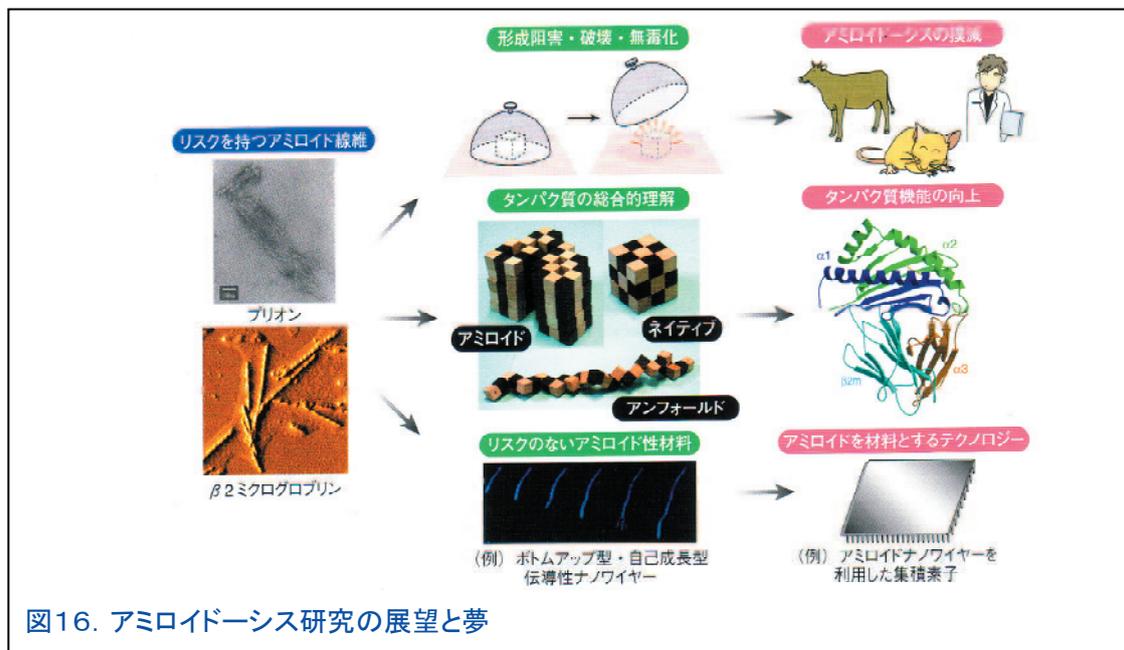
アミロイド線維は、単結晶を作らない超分子会合体であるため、従来のX線結晶解析や溶液NMRなどの方法を適用することは困難である。他方、さまざまな構造解析の方法を組み合わせることによって、原子レベルでの構造や、形成機構を明らかにすることが可能となってきた。このような世界的な流れによって、「アミロイド構造生物学」の新たな地平が開かれようとしている。我々はこのような状況において、特に、①蛍光顕微鏡によるアミロイド線維の一線維観察、②溶液NMRと水素交換反応による線維形成中間体の解析、③固体NMRによる構造解析などによって、アミロイド線維の原子立体構造とその多様性の実体に向かってきた。本研究によって、アミロ

イド構造生物学の台頭に寄与してきたと自負している。

他方、当初の目標とした「アミロイド原性蛋白質の予測と検証」、「アミロイド線維を利用したナノ材料の創製」については研究の進捗は十分とはいえず、いっそうの研究の推進が必要である。

今後は、医学と蛋白質科学のさらなる連携によって、アミロイド研究はさらに大きく発展すると期待できる。その中で、アミロイド構造生物学の重要な柱となると期待される方法論を図15にまとめた。我々が取り組んできた固体および溶液 NMR、各種顕微鏡の手法を用いた構造解析、アミロイド線維の構造物性の研究に加え、毒性や病気における役割を研究することが重要である。そして、アミロイド線維形成の原理を理解するには、理論的な研究も必須である。例えば、興味深いプロテオミクスの、理論的研究課題として、“アミロイド原性の予測”がある。蛋白質全体の中で、アミロイドを作りやすい前駆体蛋白質はどの位あるのだろうか。透析アミロイドーシスのような疾病を予防するためには、ヒトの蛋白質のアミロイド原性を知ることが必要である。

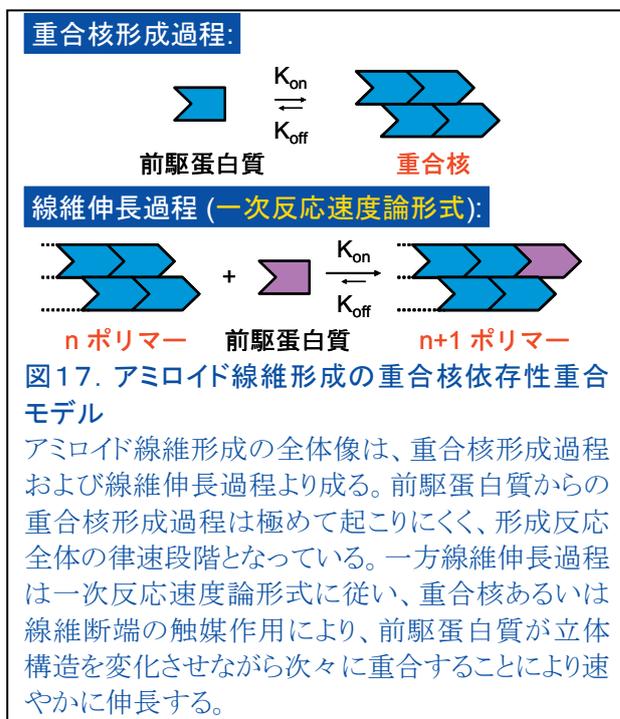
他方、アミロイド線維の形成には蛋白質が変性することが必要である。そして生体内には、natively unfolded protein (あるいは intrinsically disordered protein) と呼ばれる構造をとっていない蛋白質やペプチドが大量に存在する。ところがこれらの蛋白質は必ずしもアミロイドを形成しない。なぜ、それらはそもそも変性しているにも関わらずアミロイドを形成しないのか、プロテオミクスと理論が協力したアミロイド研究に期待がかかる。



以上の研究が医学の領域と連携して進めば、アミロイド線維形成の機構、アミロイドーシス発症の分子機構の理解が大きく進むであろう(図16)。そして、これらの進展は、将来的には、アミロイドーシスの予防と治療、蛋白質の構造・物性の総合的理解に基づく高機能蛋白質の開発などに貢献するものと期待できる。さらには、アミロイド線維は、均質性、剛直性からナノテクノロジーの機能性素子としての活用が期待される。最近ではナノワイヤーの鋳型としてアミロイド線維を用いた報告がある。また高分子の液晶のようにアミロイド線維が液晶の性質を示したという報告もある。アミロイド線維の形成機構が明らかになれば、その構造や物性を自在にコントロールできるようになり、ナノ材料として利用することも可能になるだろう。本研究は、これらの研究発展の基盤形成に大きな貢献をしたと考える。引き続き、この分野の発展に貢献していきたい。

3. 2 ヒトアミロイドーシスに共通する分子病態の解明、及び治療戦略の構築(福井大学 内木グループ)

(1) 研究実施内容及び成果



本グループはこれまでに、長期血液透析患者に発症する $\beta 2$ -ミクログロブリン($\beta 2$ -m)アミロイドーシス、及びアルツハイマー病をモデル疾患に選び、アミロイド線維形成過程を説明する重合核依存性重合モデル、及び線維伸長過程を説明する一次反応速度論モデルを構築した(図17)。今回本グループは、 $\beta 2$ -m アミロイドーシスおよびアルツハイマー病をモデル疾患として、種々の生体分子の線維形成・分解過程への影響を解析した。得られたデータを統合し、個々の疾患に固有の発症機構と共に、蛋白質フォールディング病発症に共通する分子機構を明らかにすることを目指した。また、アミロイド線維の構造物性と形成機構をもとに、線維形成を促進・抑制する生体分子、並びにアミロイド線維を分解あるいは形成を抑制する薬物や溶媒を探索し、治療薬開発への糸口をつかむことを目指した。

(1) - 1 $\beta 2$ -ミクログロブリン ($\beta 2$ -m) アミロイド線維形成・沈着の分子機構解明

わが国では現在 25 万人以上の患者が透析治療を受け、透析患者の多くが透析導入の十数年後、手根管症候群、破壊性脊椎関節症などの全身関節症状を主症状とする $\beta 2$ -m アミロイドーシスを発症する。現在の $\beta 2$ -m アミロイドーシスに対する治療法は、内科的、整形外科的対症療法にとどまっており、病態解明、及びこれを踏まえた治療法の開発が医学上急務となっている。

$\beta 2$ -m アミロイド線維の試験管内伸長反応の至適 pH は著しい酸性域にあり、中性 pH 域では線維伸長を認めない。それどころか、酸性 pH 域で伸長したアミロイド線維は中性 pH 域で不安定化し、容易に $\beta 2$ -m モノマーに脱重合する。本グループは以上のデータより、生体内には中性 pH 域でアミロイド線維形成反応を促進し、かつ線維を安定化する生体分子環境が存在すると仮定し、以下の実験を行った。

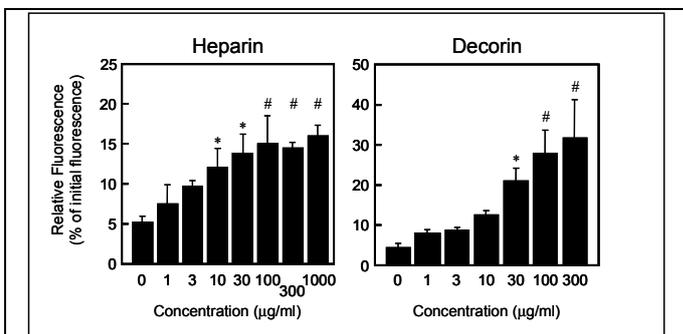


図18. ヘパリンおよびデコリンによる中性 pH での $\beta 2$ -m アミロイド線維の脱重合抑制

$\beta 2$ -m アミロイド線維をヘパリンおよびデコリンと共に pH 7.5、37°C で 24 時間インキュベート後、チオフラビン T 蛍光測定、及び電顕観察を行った。

の実験を行った。

まず図18に示すように、 $\beta 2$ -m アミロイド線維の脱重合が、血液透析時に多用されるヘパリン、及びアミロイド好発沈着部位である関節軟骨に含まれるデコリンにより濃度依存性に抑制されることを見いだした(Yamaguchi et al. Kidney Int. 64(3):1080-1088, 2003)。ヘパリンおよびデコリンは線維表面に均一に結合し、線維構造を安定化させると考えられる。

またヘパリンで安定化した $\beta 2$ -m アミロイド線維を、 $\beta 2$ -m モノマーと共に 20%トリフルオロエタノール (TFE) 存

在下に pH 7.5、37°C で 48 時間インキュベートしたところ、TFE 存在下での伸長反応がヘパリンの濃度に依存して増強され、伸長線維量に比例してヘパリンの線維への結合が増加することを見いだした (Yamamoto et al. J. Am. Soc. Nephrol. 15(1):126-33, 2004)。ヘパリンは線維表面に均一に結合し、線維構造を安定化させることにより伸長反応を促進していると考えられる。

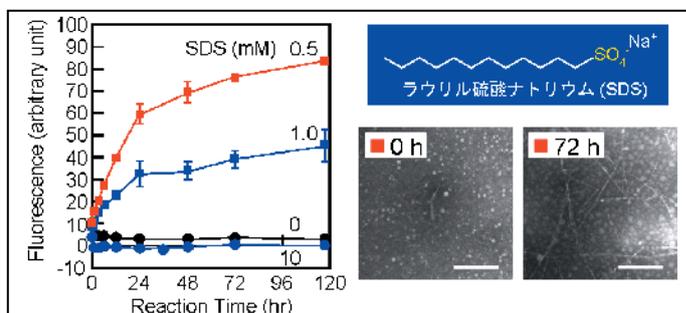


図19. ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) による中性 pH でのβ2-m アミロイド線維の伸長反応促進

断片化したβ2-m アミロイド線維を、β2-m モノマーと共に 0-10 mM SDS 存在下に pH 7.5、37°C でインキュベート後、チオフラビン T 蛍光測定、及び電顕観察を行った。

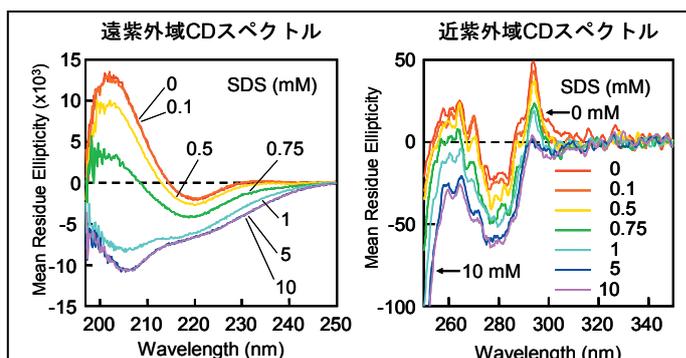


図20. 中性 pH においてβ2-m の立体構造に及ぼす SDS の効果

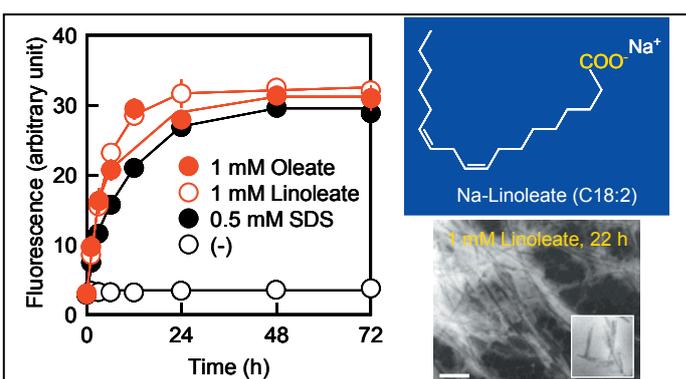


図21. 自由脂肪酸による中性 pH でのβ2-m アミロイド線維の伸長反応促進

SDS で安定化したβ2-m アミロイド線維を、β2-m モノマーと共に 0、0.5 mM SDS あるいは 1 mM 自由脂肪酸(オレイン酸、リノール酸)存在下に pH 7.5、37°C でインキュベート後、チオフラビン T 蛍光測定、電顕観察を行った。

次に本グループは、より生理的条件下に近い中性反応溶液中で線維伸長を惹起するモデル物質を探索した。その結果、図19に示すように、臨界ミセル濃度近傍のラウリル硫酸ナトリウム (SDS) がβ2-m アミロイド線維の伸長反応を促進することを見いだした (Yamamoto et al. Biochemistry 43(34):11075-11082, 2004)。

SDS による伸長反応促進機構を検討したところ、1) SDS が濃度依存性にβ2-m の2次構造(遠紫外域 CD スペクトル)、及び3次構造(近紫外域 CD スペクトル)をアンフォールドさせ、いずれのスペクトルも至適濃度 (0.5-1 mM) の SDS 存在下で移行状態を示すこと(図20)、及び2) β2-m アミロイド線維の脱重合が至適濃度 (0.5-1 mM) の SDS 存在下で抑制されることを見いだした (Yamamoto et al. Biochemistry 43(34):11075-11082, 2004)。SDS はβ2-m モノマーに結合し、天然構造のβ2-m をアミロイド形成中間体にまでアンフォールドさせると共に、線維表面に結合し、線維構造を安定化させることにより中性 pH 域で線維伸長反応を促進すると考えられる。

SDS は陰性に荷電したリン脂質や自由脂肪酸のモデル分子と考えられるため、本グループは様々な脂質分子の線維伸長促進効果をスクリーニングした。その結果、一部のリジン脂質 (lysophosphatidic acid (LPA), lysophosphatidyl glycerol)、各種の自由脂肪酸 (FFAs) (laurate(12:0), myristate(14:0), oleate(18:1), linoleate(18:2)、及び血中 FFA 組成を模倣する混合物である palmitate(16:0):stearate(18:0):oleate:linoleate=3:1:3:2) 等、陰性荷電を有する界面活性物質が伸長反応を促進することを明らかにした (図21) (Ookoshi et al. submitted, Hasegawa et al. submitted)。また線維伸長促進

のメカニズムとして、1) LPA および FFA が $\beta 2$ -m の天然構造を部分的にアンフォールドさせること、2) LPA が線維を安定化させ脱重合を阻害すること、及び 3) LPA が $\beta 2$ -m モノマーからの線維形成も惹起できること等を明らかにした (Ookoshi et al. *submitted*, Hasegawa et al. *submitted*)。

これらの知見に基づき、現在本グループは図22に示す作業仮説を構築している。 $\beta 2$ -m の血中濃度は血液透析患者で著しく増加し、血中、あるいは関節軟骨、腱組織などに存在する様々な生体分子と相互作用する結果、 $\beta 2$ -m は異常構造を獲得し、重合核依存性重合モデルに従いアミロイド線維を形成、組織に沈着すると考えられる。形成したアミロイド線維表面にも様々な生体分子が結合し、線維構造を安定化することによりアミロイド線維沈着を促進すると考えられる。一方で、線維形成の各過程を阻害する生体分子群も存在すると考えられる。

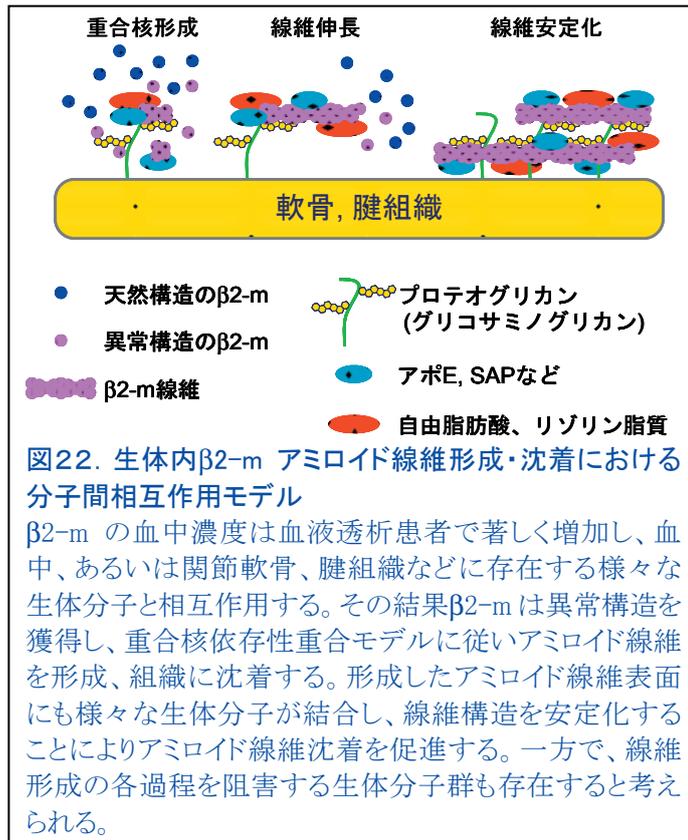


図22. 生体内 $\beta 2$ -m アミロイド線維形成・沈着における分子間相互作用モデル

$\beta 2$ -m の血中濃度は血液透析患者で著しく増加し、血中、あるいは関節軟骨、腱組織などに存在する様々な生体分子と相互作用する。その結果 $\beta 2$ -m は異常構造を獲得し、重合核依存性重合モデルに従いアミロイド線維を形成、組織に沈着する。形成したアミロイド線維表面にも様々な生体分子が結合し、線維構造を安定化することによりアミロイド線維沈着を促進する。一方で、線維形成の各過程を阻害する生体分子群も存在すると考えられる。

(1) - 2 $A\beta$ 蛋白質のアミロイド線維形成・沈着の分子機構解明と有機化合物による凝集抑制

GM1 ガングリオシド、コレステロールを含む DIG 模倣膜が、 $A\beta$ 蛋白質のコンフォーメーションを変化させ、GM1 結合 $A\beta$ 蛋白質が $A\beta$ アミロイド線維形成の重合核として機能すること (Yamamoto et al. *J. Neurochem.* 90(1):62-69, 2004, Hayashi et al. *J. Neurosci.* 24(20):4894-4902, 2004)、アルツハイマー病患者より得られた脳脊髄液が、疾患対照に比べ $A\beta$ アミロイド線維形成促進能が高いこと (Ono et al. *Neurobiol. Dis.* 20(2):233-240, 2005)を明らかにした。また、一群のポリフェノール化合物、ビタミン A 群、非ステロイド系抗炎症薬、及び抗パーキンソン病薬などが、 $A\beta$ アミロイド線維形成を阻害するのみならず、既に存在する線維を脱凝集・不安定化することを明らかにした (図23) (Ono et al. *J. Neurochem.* 87(1):172-181, 2003, *J. Neurosci. Res.* 75(6):742-750, 2004, *Exp Neurol.* 189(2):380-392, 2004, *Biochim. Biophys. Acta*

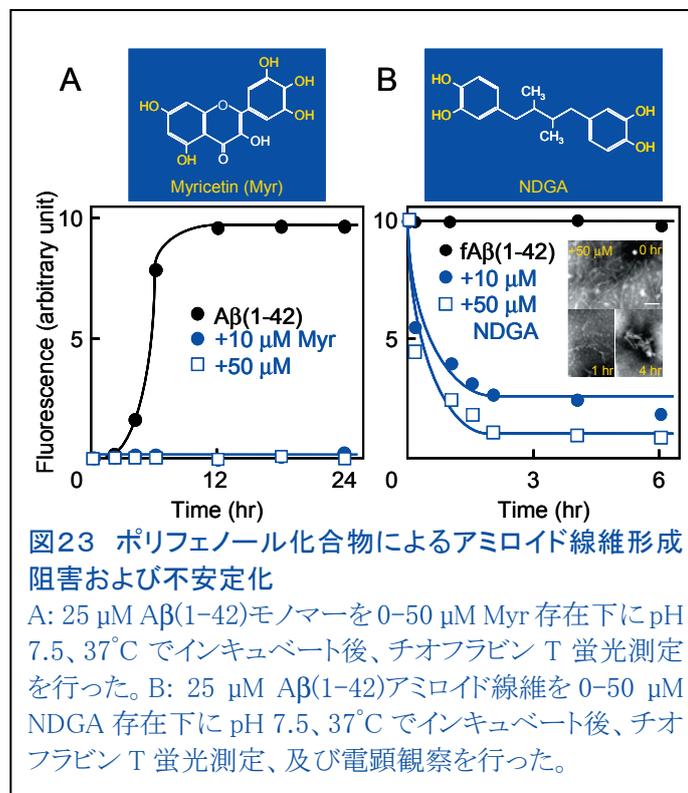


図23 ポリフェノール化合物によるアミロイド線維形成阻害および不安定化

A: 25 μM $A\beta(1-42)$ モノマーを0-50 μM Myr 存在下に pH 7.5、37°C でインキュベート後、チオフラビン T 蛍光測定を行った。B: 25 μM $A\beta(1-42)$ アミロイド線維を0-50 μM NDGA 存在下に pH 7.5、37°C でインキュベート後、チオフラビン T 蛍光測定、及び電顕観察を行った。

1690(3):193-202, 2004, Biochem. Biophys. Res. Commun. 330(1):111-116, 2005, Neurochem. Int. 48(4):275-285, 2006, Hirohata et al. Neuropharmacology 49(7):1088-1099, 2005, Matsuzaki et al. Biochim. Biophys. Acta 1768(1):122-130, 2007)。

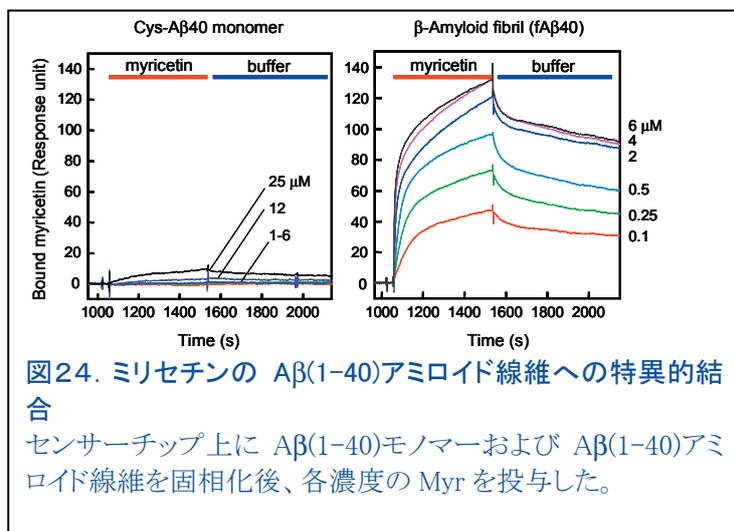


図24. ミリセチンの Aβ(1-40)アミロイド線維への特異的結合

センサーチップ上に Aβ(1-40)モノマーおよび Aβ(1-40)アミロイド線維を固相化後、各濃度の Myr を投与した。

代表的ポリフェノール化合物のミリセチンが、ランダムな立体構造を取った Aβ蛋白質モノマーの一次構造ではなく、Aβアミロイド線維の高次構造(βシート構造)を特異的に認識し、オリゴマーやポリマーに組み込まれた Aβ蛋白質に結合することにより、抗アミロイド効果を示すことを明らかにした(図24) (Hirohata et al. Biochemistry 46(7):1888-1899, 2007)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

アミロイドーシスの病態解明および新たな治療戦略の構築に向け、アミロイド線維形成を引き起こす生体内分子環境の解明は最重要課題と言える。今回本グループが得たβ2-m および Aβアミロイド線維の形成・沈着に関する知見は、上記目的に向けた画期的一步と言える。また、β2-m および Aβアミロイド線維形成のいずれにも脂質分子が深く関与していることは極めて興味深く、ヒトアミロイドーシスに共通する分子病態として脂質分子の機能・代謝異常が想定され、それぞれの疾病像を踏まえ、今後詳細に解析して行きたいと考えている。

一方、アミロイド線維形成阻害・不安定化をもたらす一連の有機化合物の同定は、アミロイドーシスに対する予防・治療薬の開発に直結し、リード化合物からの合成展開、動物モデルによる効果検証など、今後の飛躍的展開が期待できる。また、線維形成阻害機構に関する本グループの知見は、様々な有機化合物が示すアミロイド線維形成抑制・不安定化機構の解明に向けた確かな一步であると共に、生体内に沈着したアミロイドを描出するトレーサー分子の開発に向け、アミロイド線維にトレーサー分子が結合する基礎理論となることが期待される。また構造生物学的にも、『有機化合物による蛋白質フォールディングの制御』、あるいは『有機化合物をプローブとした蛋白質フォールディング機構の新たな解析手法の開発』など、新たな学問領域の創出が期待できる。

一方、これらの有機化合物が抗アミロイド効果を発揮するメカニズムはほとんど知られておらず、研究は萌芽期にある。カリフォルニアの Fink グループは、フラボノイド化合物のバイカレインがαシヌクレインに共有結合し、αシヌクレインをオリゴマーの状態にトラップすることにより、アミロイド線維形成を阻害すると報告した。Norris らは、ドーパミンがαシヌクレインモノマーの特異的結合部位に可逆的に結合し、その立体構造を変化させることによりアミロイド線維形成を阻害すると報告している。今回本グループは、

3.2 アミロイドーシス伝播の機構(信州大学 樋口グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

本グループの主要な研究目的は、(1) 試験管でのアミロイド線維形成反応と、マウスを用いたアミロイドーシス発症、伝播の機構の関係を解明する、(2) ヒト β 2ミクログロブリンを過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、アミロイドーシス発症の機構を解析する、であった。研究グループの主な研究実施内容と成果を概説する。

(1)-1 ApoA-II アミロイドの多型とアミロイド沈着の関連 (Kitagawa et al., 2003, Guo et al., 2003)

マウス apoA-II アミロイドーシス (アミロイド線維は AApoAII) はプリオン病と類似した「アミロイド線維による伝播」を示し、試験管でのアミロイド線維形成反応と生体でのアミロイドーシス発症・伝播機構の解明との関連を解析し、治療戦略を開発するための貴重なモデルシステムである。apoA-II タンパク質にはこれまで3種の多型が知られ、重度なアミロイドーシスが発症するC型 apoA-II (*Apoa2^c*)を持つマウス系統を用いて解析を行ってきた。しかし41種の近交系マウスの apoA-II の多型を調べた結果、1~7ヶ所でのアミノ酸の置換が存在する6種の多型が明らかになった。アミロイドーシスの発症程度は *Apoa2^c* > *Apoa2^a* > *Apoa2^b* \approx *Apoa2^f* \approx 0 であった。アミロイドタンパク質の線維形成特性と生体でのアミロイドーシス発症特性との関連の解析や、伝播や線維構造の特性に及ぼす1次構造の影響の解析のための基礎的データが得られた。また *Apoa2^c* を持ちながらアミロイドーシスの発症が非常に異なる SAMPl(重度発症)と A/J(軽度発症)の2系統マウスを交配し、アミロイドーシスの発症を調節する遺伝的要因の解析を行った結果、アミロイドーシスの抑制には、複数の遺伝子が関与し、主要な2つの遺伝子のうちの1つ(第4染色体)は炎症に伴い、apoA-II の代謝を促進する遺伝子 *Pla2g2a* である可能性が示された。

(1)-2 AApoAII アミロイドーシスの伝播の機構の解析 (Zhang et al., 2006, Korenaga et al., 2006)

AApoAII アミロイド線維の生体での伝播の特性を解析した。マウス肝臓より分取した AApoAII アミロイド線維を R1.P1-*Apoa2^c* マウスに投与後2ヶ月で屠殺し、アミロイド沈着を調べた。10⁻¹³g/匹の線維の血中投与でアミロイド沈着が誘発された。胃内への単独投与では、誘発に必要な線維量は増大した(10⁻⁷g/匹)。AApoAII 線維の伝播力は、ホルマリン、DNAase, RNAase, 脱脂等の処理では変化せず、6M尿素、オートクレーブ、0.1N NaOH 処理等で減少、6M塩酸グアニジン、蟻酸、1N NaOH/オートクレーブ処理で消失した。さらに AApoAII 線維はプロテアーゼに耐性を示し、これらの性質はプリオンに類似する。処理された AApoAII 線維の伝播力はアミロイド線維構造(チオフラビン T 蛍光と電子顕微鏡による超微形態)と相関し、線維構造が伝播に重要であることが示唆された。試験管内でのアミロイド線維の分解を促進する分子(tetracycline, rifampicin, streptomycin, polymyxin B, cephalixin, NDGA)の投与がマウスでの伝播を抑制できることを示した(Zhang et al., 2006)。

AApoAII アミロイドーシスを誘発した母マウスから生まれた仔マウスでは、アミロイドーシスの発症が促進されることが明らかになった(図25)。このような発症促進はアミロイドーシス(+)母マウスが哺乳した場合にのみ認められた。アミロイドーシス(+)母マウスのミルクからはアミロイド線維が抽出され、この線維を投与したマウスではアミロイドーシスが誘発されたが、塩酸グアニジンで処理すると伝播力は消失した(Korenaga et al., 2006)。さらにアミロイドーシスを発症したマウスの唾液や筋肉中にアミロイド線維が存在し、これらの線維がアミロイドーシスを誘発することを明らかにした。

これらの知見は伝播の主体となるアミロイド線維の生理的、物理的特性を明らかにした。さらにアミロイドーシス新たな伝播経路の可能性を示したと考えている。

(1)-3 アミロイド線維間の Cross-seeding の解析と意義について (Fu et al., 2004, Korenaga et

al., 2006)

アミロイド線維は、クロスβ構造という特徴的な構造を持つことから、よく似た形状を示すことが多い。多種のアミロイド線維に反応する抗体が報告されていることから、互いに共通した構造の存在が示唆されている。アミロイド線維が、異なったアミロイドタンパク質の線維形成を誘発する Cross-seeding は プリオン病の牛からヒトへの伝播や、「種間の障壁」(Species barrier)の基盤となる反応であり、アミロイドーシスの伝播や発症機構を理解する為の重要な反応であると考えている。ヒトや動物の組織に沈着したアミロイド線維や精製したタンパク質および合成ペプチドから試験管内で作成したアミロイド線維を R1.P1-*Apoa2^c* マウスに投与してアミロイド線維沈着の誘発を試みた(図26)。沈着程度は投与した線維によって大きく異なるが、6ヶ月後にはどの線維を投与したマウスでもアミロイド線維の沈着が観察された。アミロイドタンパク質が近縁であるほど沈着程度が大きい傾向が見られた(Fu et al., 2004)。

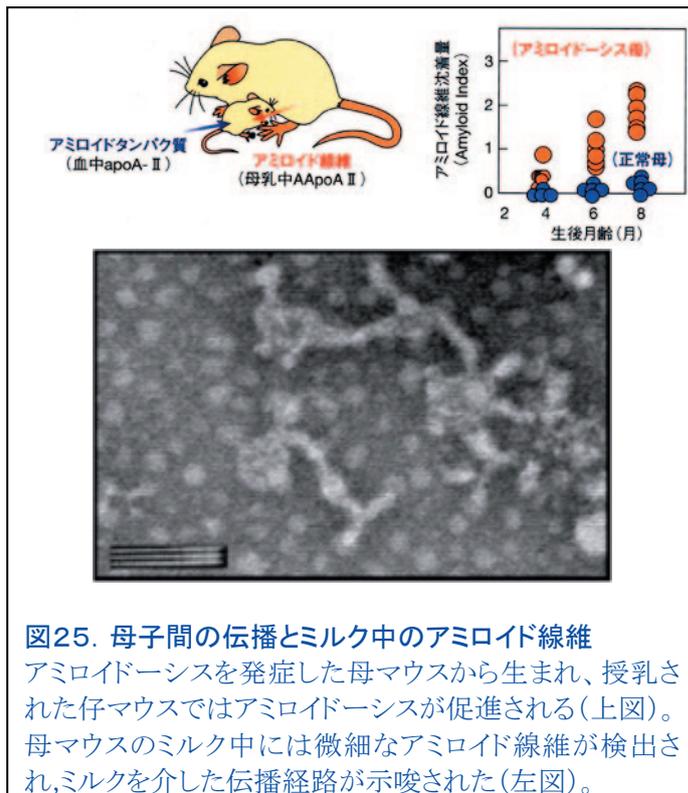


図25. 母子間の伝播とミルク中のアミロイド線維

アミロイドーシスを発症した母マウスから生まれ、授乳された仔マウスではアミロイドーシスが促進される(上図)。母マウスのミルク中には微細なアミロイド線維が検出され、ミルクを介した伝播経路が示唆された(左図)。

Cross-seeding の現象は様々なアミロイド線維間で報告されている。アミロイドーシスの発症を考える場合には、同種の動物(例えばヒト、マウス)間の伝播に加えて、食品や環境からの他種のアミロイド線維による伝播も考える必要を示唆している。勿論、伝播の効率が非常に低いなど否定的な見方もあるが、繰り返し摂取によるアミロイド線維の体内への蓄積や多くのタンパク質がアミロイド線維様構造を採ることが報告されているので、より詳細に検討する必要があると考えている。

(1) -4 アミロイドーシス発症における伝播の意義 (Wei et al., 2004, Tojo et al., 2005, Yan et al., 2007)

伝播が他のアミロイドーシスでも発症に関与しているのかを検討する為、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)のモデルマウス(*hTTR^{30M}Tg, mTtr^{-/-}*)に、患者心臓から抽出したATTRアミロイド線維を投与した。しかしながら、ヒト TTR のアミロイド線維としての沈着は観察せず、マウスの AApoAII 線維の沈着が観察された。すなわち ATTR 線維の self-seeding (vs hTTR) 効果は認められず、cross-seeding (vs mApoA-II)効果が観察された。元来、*hTTR^{30M}Tg, mTtr^{-/-}*マウスは老齢に達してもアミロイド沈着を呈しないので、TTR アミロイドーシス伝播のためには未知の条件が必要と考えられる(Wei et al., 2004)。

樋口らはこれまでに AApoAII(C) 線維の投与がアミロイドーシスをほとんど発症しない SAMR1 マウス (*Apoa2^b*) にアミロイドーシスを誘発し、しかも SAMR1 に沈着したアミロイド線維を再度 SAMR1 に投与するとアミロイド沈着が加速する、いわゆる「Adaptation」が生じることを示した(Xing et al., 2002)。CREST 研究では、一般的にアミロイドーシス発症が軽度で、沈着部位も異なる *Apoa2^a* を持つ C57BL/6 マウスの組織より抽出したアミロイド線維 (AApoAII(A)) は形態学的、タンパク質化学的に AApoAII(C) とは異なり、互いのアミロイドタンパク質/線維間に Cross-seeding (AApoAII(C) vs *Apoa2^a*, AApoAII(A) vs *Apoa2^c*) は、成立するが、同種間の Self-seeding に比較すると伝播力が軽度であることを示した(Korenaga et al., 2006)。

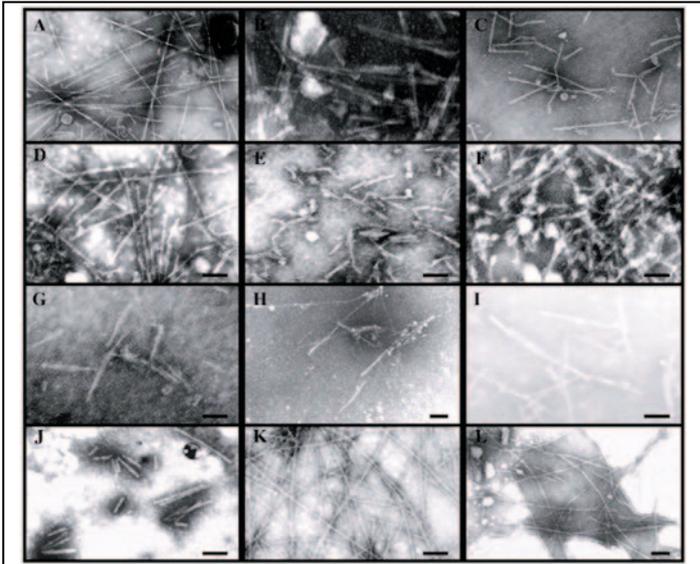


図26. (上図)R1.P1-*Apoa2^c* マウスに投与したアミロイド線維の電子顕微鏡写真。(A: AApoAII(C); B: AApoAII(A); C: mAA; D: hAA; E: hATTR; F: hAL-1; G: hAL-2; H: hA β 2M; I: A α -synuclein; J: AGroES; K: ALysozyme; L: A β 1-40 fibrils. 横棒は 100. (下図) AApoAII(C) (左)と AApoAII(A) (右)アミロイド線維の原子間力顕微鏡写真

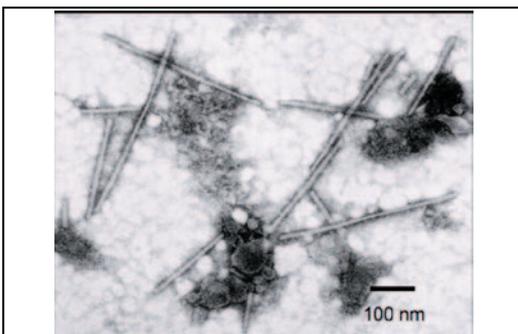


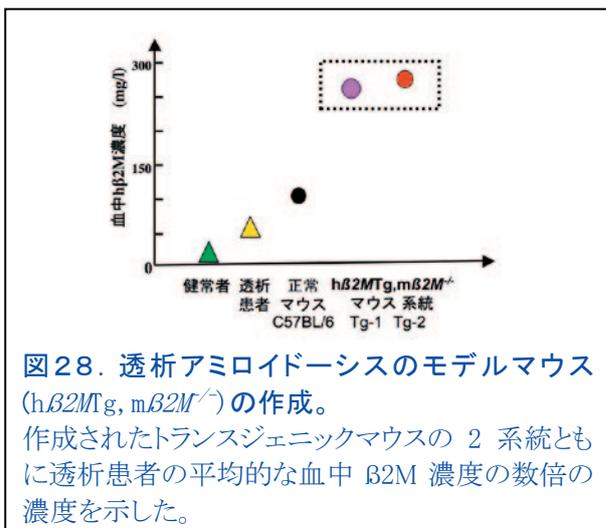
図27. 牛腎臓より抽出下 AA アミロイド線維の電顕写真

アミロイド沈着が病理学的に確認された牛の腎臓からは AA アミロイド線維が抽出され、急性炎症を惹起したマウスに投与するとアミロイドーシスが誘発された。

反応性あるいは続発性アミロイドーシスとして知られている炎症に伴う AA アミロイドーシスでもプリオン様伝播が報告されている。これまでに高齢牛で AA アミロイドーシスが発症することが報告されていたので、長野県で屠殺された 4 才以上の牛を調べたところ、5% という高率で AA アミロイド沈着を認めた(図27)。アミロイド線維を分取して急性期炎症を惹起したマウス(AA アミロイドーシスの実験モデル)に投与した結果、AA アミロイド沈着が誘発された。この結果より、慢性関節リウマチ等の慢性炎症を持つ患者での AA アミロイド線維によるアミロイドーシス促進/誘発が危惧された(Tojo et al., 2005)。

アミロイド線維による伝播が重要な発症機構の一つであると考えられる ApoAII アミロイドーシスと AA アミロイドーシスをモデルとして、異種のアミロイド線維とアミロイドタンパク質間の相互作用を解析した。R1.P1-*Apoa2^c* マウスに AApoAII と AA アミロイド線維を与し、AgNO₃ 投与によって急性炎症を惹起した。解析の結果は以下

のような機構を提示している。1) AApoAII, AA アミロイドーシスともアミロイド線維の投与無しに発症しない。2) 単純なアミロイド線維の投与では cross-seeding が起こり他種のアミロイド線維の沈着が誘発される。3) あらかじめ組織に沈着したアミロイド線維でも cross-seeding で他種のアミロイド線維沈着を誘発する。4) 1種の線維に対して、2 種のアミロイドタンパク質が存在する条件では、タンパク質間で競合が起こり、異種のアミロイドタンパク質が結合した線維末端はブロックされる。5) 伸張がブロックされた線維は分解が進行し組織や血中から除去される (cross-competition)。6) cross-competition は見掛け上、組織特異的で両アミロイド線維の沈着が重複しない肺や舌では観察されない。勿論、生体でのアミロイドーシスの発症は非常に複雑な現象なので、cross-seeding と cross-competition の機構についてはより詳細な解析が必要である (Yan et al., 2007)。



(1)–5 アミロイドーシスモデル動物の作成と伝播の解析 (Ge et al., 2007, Yan et al., 2007)

透析アミロイドーシスには適切なモデル動物が存在せず、*in vivo* でのアミロイドーシス発症機構の解明や予防・治療法の開発の障害となっていた。この問題の解決を目指してヒト β2ミクログロブリン (β2M) を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、内在性 β2ミクログロブリンのノックアウトマウスと交配して、透析アミロイドーシスのモデルマウス (hβ2MTg, mβ2M^{-/-}) を作成した。hβ2MTg, mβ2M^{-/-} マウスは透析患者の数倍の β2M 血中濃度を示した (図 28)。試験管で検証されている伝播現象が生体

でも観察出来るのかを解析する為に、患者椎間板から精製した Aβ2M 線維、試験管内で酸性あるいは中性条件下に作成した Aβ2M 線維を投与した。現在まで、Aβ2M 線維の沈着は観察できていない。試験管内での Aβ2M 線維は強酸性条件下が最も効率的であり、中性条件下での線維伸張には様々な工夫が必要である。ATTR と同様に生体での Aβ2M 線維形成には、「微小環境条件」と言う言葉で表される他の因子の寄与が必要と考えられ、その上で伝播が成立すると推測している。

AApoAII アミロイドーシス伝播の生体での解析はこれまで R1.P1-Apoa2^c マウスを用いてきたが感度の増大と、解析期間の短縮の為に Apoa2^c のトランスジェニックマウス (mApoa2^cTg, Apoa2^{c/c}) を作成した。このマウスは全身臓器で Apoa2^c の発現が認められ、血中 apoA-II 濃度は約 1.5 倍に増大し、アミロイド線維による伝播に関して約 1,000 倍の感度を示し、有効性が示された。今後様々な解析に使用する予定である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

ヒトやウシの伝播性海綿状変性脳症が大きな注目を集めて以来、「伝播」という言葉にはプリオン病に特異的で危険な印象がもたれていた。しかし試験管内での解析で、seeding 反応を中心とした構造伝播が、アミロイド線維形成の本質的な特徴であることが明らかにされてきた。マウスを用いた研究でも少なくとも AApoAII や AA アミロイドーシスでは伝播が重要な役割を果たすことが明らかになった。実際のアミロイドーシスは沈着タンパク質や病態も多様で、様々な生理的、遺伝子、環境的因子が関与する複雑な疾患群である。試験管内での解析から得られたタンパク質化学的知見を医学的、社会的領域へと橋渡しする為には、マウス等のモデル動物を用いた解析が必須であり、CREST 研究での樋口グループの課題であった。AApoAII, AA, ATTR, Aβ2M 等のモデルマウスを用いて、個体でのアミロイド線維による伝播の特性を明らかにし、cross-seeding/cross-competition の概念や新たな伝播経路を明らかにした。一方、ATTR や Aβ2M では伝播以外の因子の解明等の将来解決すべき課題を示した。

アミロイド線維構造を取りうるタンパク質が続々と発見される現状では、アミロイドーシスに代表される「タンパク質の構造に起因する疾患」は高齢化を突き進む我が国にとっては、次世代の主要疾患として、医学的・社会的に解決すべき重要課題である。個体においても「伝播」は普遍的な発症機構であることが示されたが、「伝播」の詳細が解明されたとはいえない。最近では、アミロイドーシスでの伝播や細胞毒性・発症には典型的なアミロイド線維とは異なる中間体等の特別な構造の重要性が示唆されているが、その実体はまだ不明である。伝播を担うタンパク質構造の物理化学的解明と個体を用いた生物学的、病理学的解析が、社会的、医学的に重要性が増大している『タンパク質構造疾患』の予防や治療に有力な情報をもたらすものと期待される。

3.3 アミロイド原因蛋白質のフォールディング反応の解析(自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター 桑島グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

(1)-1 大腸菌シャペロニン GroEL/ES の機能発現の分子機構

細胞内での蛋白質の構造形成はさまざまな分子シャペロンにより介助されている。分子シャペロンは、細胞内での蛋白質の構造形成とアセンブリーに関係するのみならず、蛋白質のアミロイド形成、細胞内輸送、DNA の複製、ストレス応答など、細胞内でのさまざまな現象に関与しており、分子シャペロンの概念は、生物物理学、生化学、分子生物学、細胞生物学、医学、バイオテクノロジーなどの広い分野を包括する新しい研究分野を提供しつつある。われわれは、このような *in vivo* の現象を理解することを目的として、分子シャペロンの一つ、大腸菌のシャペロニン(GroEL/ES)に関する研究を行った。特に、蛋白質の巻き戻りの速度過程に及ぼすシャペロニンの影響やシャペロニンの機能発現にとって必要な ATP によるアロステリックな構造転移を *in vitro* のモデル系を用いて調べた。特に、ATP によって引き起こされる GroEL のアロステリック転移の速度過程を調べ、速度論的な Monod-Wyman-Changeux モデルで表されることを示した。X 線溶液散乱法を用いて GroEL-GroES 複合体の立体形状を解析し、細胞内環境下では GroEL と GroES のモル比が 1:1 の非対称な弾丸型複合体が安定であることを明らかにした。

(1)-2 $\beta 2$ ミクログロブリンのフォールディング反応の解析

これまでの研究から、 $\beta 2$ ミクログロブリンは酸性条件下で中間体を形成し、その中間体がアミロイド繊維の前駆体であると考えられている。しかしながら、 $\beta 2$ ミクログロブリンのフォールディング機構に関する研究は十分に行われておらず、 $\beta 2$ ミクログロブリンのフォールディング過程やアミロイド線維形成過程においてこの中間体がどのような役割を果たしているのかはまだ明らかにされていない。そこで我々は $\beta 2$ ミクログロブリンの酸変性を短波長 CD およびトリプトファン蛍光を追跡することで調べ、また酸変性状態からの巻き戻り反応をトリプトファン蛍光を指標として、ストップフロー装置を用いて調べた。

短波長 CD の測定から、 $\beta 2$ ミクログロブリンの酸変性は天然状態から pH 4.0 付近で蓄積する中間体への転移と、中間体から完全に酸変性した状態への転移の 2 つの転移を経て進行することがわかった。さらに詳細な解析を行った結果、天然状態から中間状態への転移は天然状態において $pK_a < 4.3$ 、中間状態において $pK_a = 6.0$ を示す His 残基のプロトン化を伴って起こり、中間体から酸変性状態への転移は中間状態において $pK_a < 2.7$ 、変性状態において $pK_a = 4.5$ を示す Glu または Asp のプロトン化を伴って起こることを見出した。またこの pH 4.0 付近で蓄積する中間体がモルテングロビュール状態のような特徴を示すことを今回の結果は示唆している。

次に酸変性状態から天然状態への巻き戻り反応をトリプトファンの蛍光を指標として調べたところ、ストップフロー装置の不感時間以内に蛍光強度の急激な増加が見られ、その後、更なる蛍光強度の増加が見られた。不感時間以降の蛍光強度の変化は 4 つの指数関数の和でうまく近似することができ、このことは $\beta 2$ ミクログロブリンが複雑なフォールディング過程を有していることを示している。

(2) 研究成果の今後期待される効果

今回の研究によって明らかとなった、 $\beta 2$ ミクログロブリンの複雑なフォールディング反応がアミロイド線維形成と関係があると推測される。今後さらに、シャペロニン GroEL/ES 存在下における $\beta 2$ ミクログロブリンのフォールディングを明らかにしてゆく予定である。さらなる $\beta 2$ ミクログロブリンのフォールディング過程に関する理解が、アミロイド線維形成の抑制・治療に向けた方法論の確立につながると期待される。

4 研究参加者

①後藤グループ(アミロイド線維の構造物性と線維形成の分子機構)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
後藤 祐児	大阪大学 蛋白質研究所	教授	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構、3 アミロイド線維を溶解する薬物の開発、4.アミロイド原性蛋白質予測、5.アミロイド線維を利用したナノ材料の創製	平成14年11月～ 平成20年3月
星野 大	大阪大学 蛋白質研究所 ～ 京都大学大学院薬学研究科	助手 ～ 助教授	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構、3 アミロイド線維を溶解する薬物の開発、4.アミロイド原性蛋白質予測、5.アミロイド線維を利用したナノ材料の創製	平成14年11月～ 平成17年3月
笹原 健二	大阪大学 蛋白質研究所	CREST 研究員	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構	平成15年4月～ 平成20年3月
Jozsef Kardos	大阪大学 蛋白質研究所	CREST 研究員	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構	平成15年10月～ 平成16年4月
李 映昊	大阪大学 蛋白質研究所	研究補助 員	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構	平成16年10月～ 平成19年3月
石井 真美子	大阪大学 蛋白質研究所	研究補助 員	事務一般	平成16年10月～ 平成19年3月
茶谷 絵理	大阪大学 蛋白質研究所	CREST 研究員	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構	平成18年4月～ 平成20年3月

②桑島グループ(アミロイド原因蛋白質のフォールディング反応の解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
桑島 邦博	東京大学大学院理学研究科 ～岡崎統合バイオサイエンスセンター	教授	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構	平成14年11月～ 平成20年3月
伊野部智由	東京大学大学院理学研究科	CREST 研究員	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構	平成15年4月～ 平成16年9月

③内木グループ(ヒトアミロイドーシスに共通する分子病態の解明、及び治療戦略の構築)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
内木 宏延	福井大学 医学部	教授	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構、3 アミロイド線維を溶解する薬物の開発	平成14年11月～ 平成20年3月

長谷川 一浩	福井大学 医学部	助手	1.アミロイド線維の構造物性と形成機構、3 アミロイド線維を溶解する薬物の開発	平成14年11月～ 平成20年3月
--------	-------------	----	---	----------------------

④樋口グループ(アミロイドーシスの伝播の機構の解明の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
樋口 京一	信州大学 医学系研究科 加齢適応医科学系加齢生物学分野	教授	2.アミロイドーシスの伝播の機構	平成14年11月～ 平成20年3月
郭 占軍	信州大学 医学部附属加齢適応研究センター	CREST 研究員	2.アミロイドーシスの伝播の機構	平成15年4月～ 平成16年3月
付 笑影	信州大学 医学部附属加齢適応研究センター	CREST 研究員	2.アミロイドーシスの伝播の機構	平成16年4月～ 平成17年3月
姚 俊潔	信州大学 医学部附属加齢適応研究センター	CREST 研究員	2.アミロイドーシスの伝播の機構	平成17年4月～ 平成18年3月

5 招聘した研究者等

なし

6 成果発表等

後藤祐児

(1) 原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 52 件、内 36 報は内木との共著)

1. Fernandez, A., Kardos, J., Scott, L. R., Goto, Y. & Berry, R. S. Structural defects and the diagnosis of amyloidogenic propensity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6446-6451 (2003).
2. Gozu, M., Lee, Y. H., Ohhashi, Y., Hoshino, M., Naiki, H. & Goto, Y. Conformational dynamics of β_2 -microglobulin analyzed by reduction and reoxidation of the disulfide bond. *J. Biochem.* **133** (6), 731-736 (2003).
3. Fernández, A., Kardos, J. & Goto, Y. Protein folding: could hydrophobic collapse be coupled with hydrogen-bond formation? *FEBS Letters* **536**, 187-192 (2003).
4. Ban, T., Hamada, D., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *J. Biol. Chem.* **278** (19), 16462-16465 (2003).
5. Hirota-Nakaoka, N., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Dissolution of β_2 -microglobulin amyloid fibrils by dimethylsulfoxide. *J. Biochem.* **134**, 159-164 (2003).
6. Chiba, T., Hagihara, Y., Higurashi, T., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Amyloid fibril formation in the context of full-length protein: Effects of proline mutations on the amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin. *J. Biol. Chem.* **278** (47), 47016-47024 (2003).
7. Yagi, M., Sakurai, K., Kalidas, C., Batt, C. A. & Goto, Y. Reversible unfolding of bovine β -lactoglobulin mutants without a free thiol group. *J. Biol. Chem.* **278** (47), 47009-47015 (2003).
8. Villanueva, J., Hoshino, M., Katou, H., Kardos, J., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Increase in the conformational flexibility of β_2 -microglobulin upon copper binding: A possible role for copper in dialysis-related amyloidosis. *Protein Sci.* **13** (3), 797-809 (2004).
9. Ohhashi, Y., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Optimum amyloid fibril formation of peptide 20-41 at neutral pH suggests intrinsic amyloidogenic preference of β_2 -microglobulin under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* **279** (11), 10814-10821 (2004).
10. Hiramatsu, H., Goto, Y., Naiki, H. & Kitagawa, T. Core structure of amyloid fibril proposed from IR-microscope linear dichroism. *J. Amer. Chem. Soc.* **126** (10), 3008-3009 (2004).
11. Yamaguchi, K., Katou, H., Hoshino, M., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Core and heterogeneity of β_2 -microglobulin amyloid fibrils as revealed by H/D exchange. (2004) *J. Mol. Biol.* **338** (3), 559-571.
12. Narimoto, T., Sakurai, K., Okamoto, A., Chatani, E., Hoshino, M., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Conformational stability of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin probed by guanidine hydrochloride-induced unfolding. *FEBS Letters*, **576** (3), 313-319 (2004).
13. Ban, T., Hoshino, M., Takahashi, S., Hamada, D., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Direct observation of A β amyloid fibril growth and inhibition. *J. Mol. Biol.*, **344** (3), 757-767 (2004).
14. Kardos, K., Yamamoto, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Direct measurement of the thermodynamic parameters of amyloid formation by isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Chem.*, **279** (53), 55308-55314 (2004).
15. Wadai, H., Yamaguchi, K., Takahashi, S., Kanno, T., Kawai, T., Naiki, H. & Goto, Y. Stereospecific amyloid fibril formation of a peptide fragment of β_2 -microglobulin. *Biochemistry*, **44** (1), 157-164 (2005).
16. Raman, B., Chatani, E., Kihara, M., Ban, T., Sakai, M., Hasegawa, K., Naiki, H., Rao, C. H. & Goto, Y. Critical balance of electrostatic and hydrophobic interactions is required for β_2 -microglobulin amyloid fibril growth and stability. *Biochemistry*, **44** (4), 1288-1299 (2005).

17. Kanno, T., Yamaguchi, K., Naiki, H., Goto, Y. & Kawai, T. Association of thin filaments into thick filaments revealing the structural hierarchy of amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **149**, 213-218 (2005).
18. Kihara, M., Chatani, E., Sakai, M., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Seeding-dependent maturation of β 2-microglobulin amyloid fibrils at neutral pH. *J. Biol. Chem.* **280** (1), 12012-12018 (2005).
19. Raman, B., Ban, T., Yamaguchi, K., Sakai, M., Kawai, T., Naiki, H. & Goto, Y. Metal ion-dependent effects of clioquinol on the fibril growth of an amyloid β peptide. *J. Biol. Chem.* **280** (16), 16157-16162 (2005).
20. Kameda, A., Hoshino, M., Higurashi, T., Takahashi, S., Naiki, H. & Goto, Y. NMR characterization of refolding of β 2-microglobulin trapped by prolyl cis-trans isomerization. *J. Mol. Biol.* **348** (2), 383-397 (2005).
21. Chatani, E., Kato, M., Kawai, T., Naiki, H. & Goto, Y. Main-chain dominated amyloid structures demonstrated by the effect of high pressure. *J. Mol. Biol.* **352** (4), 941-951 (2005).
22. Sasahara, K., Naiki, H. & Goto, Y. Kinetically controlled thermal response of β 2-microglobulin amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **352** (3), 700-711 (2005).
23. Raman, B., Ban, T., Sakai, M., Pasta, S. Y., Ramakrishna, T., Naiki, H., Goto, Y. & Rao, Ch. M. α B-Crystallin, a small heat shock protein, prevents the amyloid fibril growth of an amyloid β -peptide and β 2-microglobulin. *Biochem. J.* **392** (3), 573-81 (2005).
24. Yamaguchi, K., Takahashi, S., Kawai, T., Naiki, H. & Goto, Y. Seeding-dependent propagation versus maturation of amyloid fibril conformation. *J. Mol. Biol.* **352** (4), 952-960 (2005).
25. Ohashi, Y., Kihara, M., Naiki, H. & Goto, Y. Ultrasonication-induced amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. *J. Biol. Chem.* **280** (38), 32843-32848 (2005).
26. Hiramatsu, H., Goto, Y., Naiki, H. & Kitagawa, T. Structural model of the amyloid fibril formed by β 2-microglobulin #21-31 fragment based on vibrational spectroscopy. *J. Amer. Chem. Soc.* **127** (22), 7988-7989 (2005).
27. Kardos, J., Okuno, D., Kawai, T., Hagihara, Y., Yumoto, N., Kitagawa, T., Závodszy, P., Naiki, N. & Goto, Y. Structural studies reveal that the diverse morphology of β 2-microglobulin aggregates is a reflection of different molecular architectures. *Biochim. Biochem. Acta* (Special Issue) **1753**, 108-120 (2005).
28. Sakurai, K. & Goto, Y. Dynamics and mechanism of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **356** (2), 483-496 (2006).
29. Kihara, M., Chatani, E., Iwata, K., Yamamoto, K., Matsuura, T., Nakagawa, A., Naiki, H. & Goto, Y. Conformation of amyloid fibrils of β 2-microglobulin probed by tryptophan mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **281** (41) 31061-31069 (2006).
30. Chatani, E., Naiki, H. & Goto, Y. Seeding-dependent propagation and adaptation of amyloid fibril conformation. *J. Mol. Biol.* **359** (4), 1086-1096 (2006).
31. Ban, T., Morigaki, K., Yagi, H., Kawasaki, T., Kobayashi, A., Yuba, S., Naiki, H. & Goto, Y. Real-time and single fibril observation of the formation of amyloid β spherulitic structures. *J. Biol. Chem.* **281** (44), 33677-33683 (2006).
32. Sasahara, K., Naiki, H. & Goto, Y. Exothermic effects observed upon heating of β 2-microglobulin monomers in the presence of amyloid seeds. *Biochemistry*, **45** (29), 8760-8769 (2006).
33. Lu, M., Hiramatsu, H., Goto, Y. & Kitagawa, T. Structure of interacting segments in the growing amyloid fibril of β 2-microglobulin probed with IR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **362** (2), 355-364

- (2006).
34. Yamaguchi, K., Naiki, H. & Goto, Y. Mechanism by which the amyloid-like fibrils of a β 2-microglobulin fragment are induced by fluorine-substituted alcohols. *J. Mol. Biol.* **363** (1), 279-288 (2006).
 35. Iwata, K., Fujiwara, T., Matsuki, Y., Akutsu, H., Takahashi, S., Naiki, H. & Goto, Y. 3D Structure of amyloid protofilaments of β 2-microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (48), 18119-18124 (2006).
 36. Standley, D. M., Yonezawa, Y., Goto, Y. & Nakamura, H. Flexible docking of an amyloid-forming peptide from β 2-microglobulin. *FEBS Lett.* **580** (26), 6199-6205 (2006).
 37. Lee, Y.-H., Tamura, K., Maeda, M., Hoshino, M., Sakurai, K., Takahashi, S., Ikegami, T., Hase, T. & Goto, Y. Cores and pH-dependent dynamics of ferredoxin-NADP⁺ reductase revealed by H/D exchange. *J. Biol. Chem.*, **282** (8), 5959-5967 (2007).
 38. Fujii, N., Shimmyo, Y., Sakai, M., Sadakane, Y., Nakamura, T., Morimoto, Y., Kinouhi, T., Goto, Y. and Lampi, K. Age-related changes of alpha-crystallin aggregate in human lens. *Amino Acids* **32**, 87-94 (2007).
 39. Sasahara, K., Yagi, H., Naiki, H., & Goto, Y. Heat-triggered conversion of protofibrils into mature amyloid fibrils of β 2-microglobulin. *Biochemistry* **46** (11), 3286-3293 (2007).
 40. Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H. A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H., Toda, T. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (4) 332-340 (2007).
 41. Konuma, T., Sakurai, K. & Goto, Y. Dynamics and mechanism of the ligand binding of bovine β -lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **368** (1), 209-218 (2007).
 42. Adachi, R., Yamaguchi, K., Yagi, H., Sakurai, K., Naiki, H. & Goto, Y. Flow-induced alignment of amyloid protofilaments revealed by linear dichroism. *J. Biol. Chem.*, **282** (12), 8978-8983 (2007).
 43. Kanekiyo, T., Ban, T., Aritake, K., Huang, Z.-L., Qu, W.-M., Okazaki, I., Mohri, I., Murayama, S., Ozono, K., Taniike, M., Goto, Y. & Urade, Y. Lipocalin-type prostaglandin D synthase/ β -trace is a major amyloid β -chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (15), 6412-6417 (2007).
 44. Matsumoto, S., Yane, A., Nakashima, S., Hashida, M., Fujita, M., Goto, Y., & Takahashi, S. A rapid flow mixer with 11- μ s mixing time microfabricated by a pulsed-laser ablation technique: Observation of a barrier-limited collapse in cytochrome c folding. *J. Am. Chem. Soc.* **129** (13), 3840-3841 (2007).
 45. Dzwolak, W., Lokszejn, A., Galinska-Rakoczy, A., Adachi, R., Goto, Y. & Rupnicki, L. Conformational indeterminism in protein misfolding: chiral amplification on amyloidogenic pathway of insulin. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 7517-7522 (2007).
 46. Kinoshita, M., Kamagata, K., Maeda, A., Goto, Y., Komatsuzaki, T. and Takahashi, S. Development of a technique for the investigation of folding dynamics of single proteins for extended time periods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (25), 10453-10458 (2007).
 47. Sakurai, K. & Goto, Y. P rincipal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine β -lactoglobulin monitored by heteronuclear NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (39), 15346-15351 (2007).
 48. Sasahara, K., Yagi, H., Naiki, H. & Goto, Y. Heat-induced efficient conversion of β 2-microglobulin and hen egg-white lysozyme into amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **372** (4), 981-991 (2007).
 49. Iwata, K., Matsuura, T., Sakurai, K., Nakagawa, A. & Goto, Y. High-resolution crystal structure

of β_2 -microglobulin formed at pH 7. *J. Biochem.* 142 (3), 413-419 (2007).

50. Nishiguchi, S., Goto, Y., & Takahashi, S. Solvation and desolvation dynamics in apomyoglobin folding monitored by time-resolved infrared spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 373 (2):491-502 (2007).
51. Yagi, H., Ban, T., Morigaki, K., Naiki, N. & Goto, Y. Visualization and classification of amyloid β supramolecular assemblies. *Biochemistry*, 46 (51), 15009 -15017 (2007).
52. Yamamoto, K., Yagi, H., Ozawa, D., Sasahara, K., Naiki, N., & Goto Y. Thiol compounds inhibit the amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin at neutral pH. *J. Mol. Biol.* 376 (1), 258-268 (2008).

(2) その他の著作物(国内誌 7 件、国際誌 14 件)

1. 後藤祐児、蛋白質の昼と夜、実験医学, **21**, 898-902 (2003).
2. 後藤祐児・高橋聡, (総説) 蛋白質のフォールディングの昼と夜, 現代化学, **No. 402**, 26-33 (2004).
3. 後藤祐児・大橋祐美子, (総説) アミロイド線維の構造物性と危険性, *Molecular Medicine*, **41** (4), 401-408 (2004).
4. 後藤祐児・伴匡人・星野大, (総説) アミロイド線維の構造安定性-ナノスケールの針, 蛋白質核酸酵素, **49** (7), 1091-1095 (2004).
5. 櫻井一正・後藤 祐児, (総説) *in vitro* フォールディング, 細胞工学, **23**, 1364-1369 (2004).
6. 山口圭一・後藤 祐児, (総説) 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, 生物物理 **44**, 212-217 (2004)
7. Yamamoto, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Goto, Y., Gejyo, F. & Naiki, H. Review: Kinetic analysis of the polymerization and depolymerization of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* (Special Issue) **1753**, 34-43 (2005).
8. Chatani, E. & Goto, Y. Review: Structural stability of β_2 -microglobulin amyloid fibrils in comparison with its native fold. *Biochim. Biophys. Acta* (Special Issue) **1753**, 64-75 (2005)
9. Naiki, H., Yamamoto, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Goto, Y. & Gejyo, F. Review: Molecular interactions in the formation and deposition of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils. *Amyloid* **12** (1), 15-25 (2005).
10. Hamada, D. & Goto, Y. Alcohol- and Salt-induced Partially Folded Intermediates. in *Protein Folding Handbook* Vol. 2 (Eds. J. Buchner and T. Kiefhaber) pp. 884-916, Wiley-VCH, Weinheim (2005).
11. 木下正弘・後藤祐児, アミロイド線維形成の原動力: エントロピー的排除容積効果, 現代化学, 2005年4月号, 27-31 (2005)
12. 茶谷絵理・後藤祐児, アミロイド線維形成機構-裏の世界の構築原理, 細胞内タンパク質の社会学(永田和弘、遠藤斗志也編), 実験医学増刊, 羊土社, pp 174-180 (2005).
13. Ban, T. & Goto, Y. Direct observation of amyloid growth monitored by total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods Enzymol.* **413**, 91-102 (2006).
14. Ban, T., Yamaguchi, K. & Goto, Y. Direct observation of amyloid fibril growth, propagation, and adaptation. *Acc. Chem. Res.* **39** (9), 663-670(2006).
15. Hoshino, M., Katou, H., Yamaguchi, K., & Goto, Y. Dimethylsulfoxide-quenched hydrogen/deuterium exchange method to study amyloid fibril structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1768** (8), 1886-1899 (2007).
16. 茶谷絵理、後藤祐児. アミロイド線維形成機構-裏の世界の構築原理. 実験医学 **23** (15),

174-180 (2005).

17. 櫻井一正、後藤祐児. フォールディング入門、「タンパク質の一生集中マスター」遠藤斗志也、森和俊、田口英樹編、羊土社, pp. 38-48 (2007).
18. 後藤祐児:監修. 特集:アミロイドの謎は解けるか? プリオン病・アルツハイマー病、透析アミロイドーシスなどの病態を紐解く. *細胞工学* **26** (2), (2007)
19. 後藤祐児. 序:タンパク質科学と医学の融合によるアミロイドーシス研究の発展. *細胞工学* **26** (2), 134-138 (2007).
20. 伴匡人・後藤祐児. アミロイド線維の直接観察から形成機構を探る. *細胞工学* **26** (2), 139-144 (2007).
21. 後藤祐児、桑田一夫、関島良樹、田中元雅、内木宏延、永井義隆、松崎勝巳、樋口京一. アミロイドーシス発症の分子機構解明を目指して:現状と展望、夢. *細胞工学* **26** (2), 181-185 (2007).

(3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 18 件、国際会議 20 件)
(国際会議)

1. Yuji Goto, Folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. Gordon Research Conference: Proteins. June 25, 2003. Plymouth, New Hampshire, USA
2. Yuji Goto, Conformation and folding of bovine β -lactoglobulin. Benzon Symposium No. 50: The Lipocalin Protein Superfamily, August 27, 2003 Copenhagen, Denmark
3. Yuji Goto, Amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. The 9th Keihanna Conference on Molecular Biophysics: Physical Aspects of Protein Folding and Function, January 8, 2004, Keihanna
4. Yuji Goto, Folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, April 16, 2004, Yokohama
5. Yuji Goto, Folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. FASEB Summer Research Conference "Protein Misfolding, Amyloid and Conformational Disease". June 14, 2004, Colorado, USA
6. Yuji Goto, Folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. OUMS 2004 on Structural and Dynamics in Macromolecular Systems with Specific Interactions. July 14, 2004, Osaka
7. Yuji Goto, Folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. Molecular Aspects of Misfolding Diseases: Annual Meeting of Swedish Society for Biochemistry and Molecular Biology. October 21, 2004, Linköping, Sweden
8. Yuji Goto, Comparison of folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. 1st Italian-Japanese Workshop "Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies", December 10, 2004, Pavia, Italy, Organizers: Y. Goto, R. Esposito, and V. Berotti
9. Yuji Goto, Folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. "Biophysical Aspects of Protein Aggregation: Experiment and Theory" 229th National ACS Meeting, March 14, 2005, San Diego, USA.
10. Yuji Goto, Comparison of folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. US-Japan Symposium on Folding, Design and Dynamics, May 2-5, 2005, Univ. of Pennsylvania, Philadelphia, USA.
11. Yuji Goto, Comparison of folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. The Protein Society 19th Symposium, July 30 - August 3, 2005, Boston, USA

12. Yuji Goto, Comparison of folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. Trends in High Pressure Protein Sciences, September 1 - 3, 2005, Montpellier, France
13. Yuji Goto, Comparison of protein folding and amyloid fibril formation. The 3rd Gordon Research Conference on Protein Folding Dynamics, January 8-13, Ventura, CA, USA
14. Yuji Goto, Comparison of folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. The 3rd Joint Symposium between Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology, Seoul National University and Institute for Protein Research, Osaka University, Seoul National University, Korea, September 9, 2005.
15. Yuji Goto, Comparison of protein folding and amyloid fibril formation. The 7th AEARU Molecular Biology & Biotechnology Workshop, September 19-21, 2005, Tsinghua University, China
16. Yuji Goto, Comparison of protein folding and amyloid fibril formation. International Symposium on Life of Proteins, October 30 – November 3, 2005, Awaji, Hyogo
17. Yuji Goto, Comparison of protein folding and amyloid fibril formation. The 3rd Gordon Research Conference on Protein Folding Dynamics, January 8-13, 2006, Ventura, CA, USA
18. Yuji Goto, Protein folding and amyloid fibril formation: Day and night of proteins. Nagoya University 21st Century COE-RCMS International Conference – Chemistry for Life, January 27, 2006, Nagoya
19. Yuji Goto, Direct observation of amyloid fibril growth and propagation. Conference on Structure and Dynamics in Soft Matter and Biomolecules: From Single Molecules to Ensembles, June 4-8, 2007, International Centre for Theoretical Physics, Trieste, Italy.
20. Yuji Goto, Comparison of Folding and Amyloid Fibril Formation of Proteins. Korean Biophysical Society Symposium. June 26, 2007, Chonbuk National University, Korea

(国内会議)

1. 後藤祐児, 蛋白質のフォールディングとアミロイド線維形成. 第2回分子科学研究会シンポジウム, 2003年5月17日、岡崎
2. 後藤祐児, 蛋白質のフォールディングとアミロイド線維形成. 高分子学会講演会「材料として眺めた生体内の高分子」、2003年7月25日、東京.
3. 後藤祐児, 蛋白質のフォールディングーその正常と異常. 第40回補体シンポジウム, 2003年8月22日、熊本.
4. 後藤祐児, Folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. 日本生化学会シンポジウム「アミロイドーシス研究の新展開」、2003年10月16日、横浜
5. 後藤祐児, 蛋白質のフォールディングとアミロイド線維形成. 第16回ペプチドの構造と活性談話会, 2003年11月21日、吹田
6. 後藤祐児, Folding and amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. 特定領域研究『水と生体分子が織り成す生命現象の化学』第1回公開ワークショップ, 2004年1月9日、豊中
7. 後藤祐児, β 2ミクログロブリンのアミロイド線維形成反応. 中性子構造生物学シンポジウム, 2004年2月17日、茨城県東海村
8. 後藤祐児, β 2ミクログロブリンのアミロイド線維形成の分子機構, 日本透析医学会、ランチョンセミナー(カネカ)「透析アミロイド症の新たな展開」、2005年6月24日
9. 後藤祐児, 蛋白質のアミロイド線維形成と熱測定, 第8回マイクロカロリー技術セミナー、東京, 2005年9月16日

10. 後藤祐児、蛋白質の昼と夜ーアミロイド線維形成の分子機構、熊本大学拠点形成ミニシンポジウム「タンパク質立体構造の正常と異常」、2005年12月16日、熊本大学
11. 後藤祐児、蛋白質のフォールディングとアミロイド線維形成反応、農芸化学会シンポジウム「プロテインデザイナー：タンパク質の多様性獲得の知恵とその創出」、2005年3月28日、京都
12. 後藤祐児、「蛋白質のフォールディングとアミロイド線維形成」、日本薬学会東海支部特別講演会、2006年6月1日、名古屋市立大学
13. 後藤祐児、「蛋白質のフォールディングとミスフォールディング」、武蔵野大学薬学研究所ハイテク・リサーチ・センター第1回公開シンポジウム、2006年9月30日、武蔵野大学
14. 後藤祐児、「 β 2ミクログロブリンのアミロイド線維形成の分子機構」、第54回長野県透析研究会学術集会、2006年10月15日、丸子文化会館
15. 後藤祐児、「蛋白質のフォールディングとアミロイド線維形成の比較」、第47回高圧討論会シンポジウム「水と生体分子の高圧生命科学」、2006年11月11日、熊本市産業文化会館
16. 後藤祐児、第4回崇城大学ノーベル賞フォーラム、パネル討論会ー「進化する生命科学の未来を展望する」ーバイオニクス・ナノ科学から先端医療までーパネリスト、2006年11月27日、熊本市産業文化会館
17. 後藤祐児、「アミロイド構造生物学の新たな地平」、アミロイドーシス夏のワークショップ 2007、2007年8月31日、山口大学
18. 後藤祐児、「表面に依存したアミロイド超分子形成反応の直接観察」、第5回メンブレン・ストレスバイオテクノロジーシンポジウム、2007年9月22日、大阪大学

② その他の口頭発表 (国内会議2件、国際会議0件)

1. 蛋白研セミナー「蛋白質の昼と夜ーフォールディングとミスフォールディング」、世話人、内木宏延、津本浩平、後藤祐児、2005年5月26-27日
2. 後藤祐児、「蛋白質のフォールディングとアミロイド線維形成の比較」、ダイナミクス研究会、2006年6月23日、岐阜大学人獣感染防御研究センター

(4)特許出願

① 国内出願 (1件)

発明の名称:アミロイド蛋白質の凝集を抑制する物質とその作用

発明者:池谷雅子(代表、阪大院・医学研究科)、有竹浩介(大阪バイオサイエンス研究所)、裏出良博(大阪バイオサイエンス研究所)、兼清貴久(阪大院・医学研究科)、後藤祐児(阪大蛋白質研究所)、伴匡人(阪大蛋白質研究所)

出願番号:特願2004-218952

出願日:2004年7月27日

出願人:財団法人大阪バイオサイエンス研究所(50%)、国立大学法人大阪大学(33%)、関西ティー・エル・オー株式会社(17%)

② 海外出願 (0件)

(5)受賞等

① 受賞 なし

② 新聞報道

1. 後藤祐児、「たんぱく質ー生命をかたちづくるもの第1部7」、読売新聞 2003年5月21日

2. 後藤祐児、「透析患者のたんぱく質、阪大など、構造解明」、日経産業新聞 2006 年 11 月 14 日

③ その他 なし

(6) その他特記事項 なし

内木宏延

(1) 原著論文発表（国内誌 0 件、国際誌 58 件、この内、後藤との共著 33 件、樋口との共著 4 件は記載していない。それぞれの共著者の項を参照）

1. Hasegawa, K., Ohhashi, Y., Yamaguchi, I., Takahashi, N., Tsutsumi, S., Goto, Y., Gejyo, F. & Naiki, H. Amyloidogenic synthetic peptides of β_2 -microglobulin—a role of the disulfide bond. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304** (1), 101-106 (2003).
2. Yamaguchi, I., Suda, H., Tsuzuike, N., Seto, K., Seki, M., Yamaguchi, Y., Hasegawa, K., Takahashi, N., Yamamoto, S., Gejyo, F. & Naiki, H. Glycosaminoglycan and proteoglycan inhibit the depolymerization of β_2 -microglobulin amyloid fibrils in vitro. *Kidney Int.* **64** (3), 1080-1088 (2003).
3. Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro* : Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **87** (1), 172-181 (2003).
4. Yamamoto, S., Yamaguchi, I., Hasegawa, K., Tsutsumi, S., Goto, Y., Gejyo, F. & Naiki, H. Glycosaminoglycans enhance the trifluoroethanol-induced extension of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15** (1), 126-133 (2004).
5. Mori, I., Yokochi, T., Koide, N., Sugiyama, T., Yoshida, T., Kimura, Y., Naiki, H., Matsubara, R., Takeuchi, T. & Nishiyama, Y. PCR search for the herpes simplex virus type 1 genome in brain sections of patients with familial Alzheimer's disease. *J. Clin. Microbiol.* **42** (2), 936-937 (2004).
6. Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res.* **75** (6), 742-750 (2004).
7. Hayashi, H., Kimura, N., Yamaguchi, H., Hasegawa, K., Yokoseki, T., Shibata, M., Yamamoto, N., Michikawa, M., Yoshikawa, Y., Terao, K., Matsuzaki, K., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., Naiki, H. & Yanagisawa, K. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J. Neurosci.* **24** (20), 4894-4902 (2004).
8. Yamamoto, N., Hasegawa, K., Matsuzaki, K., Naiki, H. & Yanagisawa, K. Environment- and mutation-dependent aggregation behavior of Alzheimer amyloid β -protein. *J. Neurochem.* **90** (1), 62-69 (2004).
9. Mori, I., Kimura, Y., Naiki, H., Matsubara, R., Takeuchi, T., Yokochi, T. & Nishiyama, Y. Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease. *J. Med. Virol.* **73** (4), 605-611 (2004).
10. Yamamoto, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Tsutsumi, S., Kardos, J., Goto, Y., Gejyo, F. & Naiki, H. Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Bochemistry* **43** (34), 11075-11082 (2004).
11. Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp. Neurol.* **189** (2), 380-392 (2004).
12. Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1690** (3), 193-202 (2004).

13. Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Preformed β -amyloid fibrils are destabilized by coenzyme Q₁₀ in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330** (1), 111-116 (2005).
14. Ono, K., Noguchi, M., Matsumoto, Y., Yanase, D., Iwasa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes β -amyloid fibril formation in vitro. *Neurobiol. Dis.* **20** (2), 233-240 (2005).
15. Hirohata, M., Ono, K., Naiki, H. & Yamada, M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Neuropharmacology* **49** (7), 1088-1099 (2005).
16. Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Neurochem. Int.* **48** (4), 275-285 (2006).
17. Ono, K., Noguchi-Shinohara, M., Samuraki, M., Matsumoto, Y., Yanase, D., Iwasa, K., Naiki, H. & Yamada, M. Blood-borne factors inhibit Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro. *Exp. Neurol.* **202** (1), 125-132 (2006).
18. Matsuzaki, K., Noguch, T., Wakabayashi, M., Ikeda, K., Okada, T., Ohashi, Y., Hoshino, M. & Naiki, H. Inhibitors of amyloid β -protein aggregation mediated by GM1-containing raft-like membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1768** (1), 122-130 (2007).
19. Ono, K., Noguchi-Shinohara, M., Yoshita, M., Naiki, H. & Yamada, M. Cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies patients enhances a-synuclein fibril formation in vitro. *Exp. Neurol.* **203** (2), 579-583 (2007).
20. Hirohata, M., Hasegawa, K., Tsutsumi-Yasuhara, S., Ohhashi, Y., Ookoshi, T., Ono, K., Yamada, M. & Naiki, H. The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure. *Biochemistry* **46** (7), 1888-1899 (2007).
21. Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H. A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H. & Toda, T. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (4), 332-340 (2007).

(2) その他の著作物(国内誌 5 件、国際誌 11 件)

1. 山本 卓, 長谷川一浩, 内木宏延. 蛋白質のフォールディングとアミロイドーシス(β_2 -ミクログロブリンアミロイドーシスを中心に). *炎症と免疫* **11** (5), 546-551 (2003).
2. 山本 卓, 長谷川一浩, 内木宏延. 透析アミロイドーシスの発症機構—分子生物学的見地から—. *関節外科* **22** (11), 1398-1403 (2003).
3. 長谷川一浩, 内木宏延. A β の化学構造 Amino acid sequence and assembly of A β protein. *日本臨床* **61** (増刊 9), 37-41 (2003).
4. 高橋直生, 下条文武, 内木宏延. アミロイド原性 AL 蛋白質の線維形成機構. *血液・腫瘍科* **47** (1)別冊, 12-19 (2003).
5. 長谷川一浩, 内木宏延. A β 線維伸長機構. *Molecular Medicine* **41** (4), 420-426 (2004).
6. 長谷川一浩, 内木宏延. アミロイド線維の形成と解離. *蛋白質核酸酵素* **49** (7), 1096-1097 (2004).
7. 長谷川一浩, 内木宏延. β アミロイドの試験管内線維形成. *Cognition and Dementia* **3** (4), 8-15 (2004).
8. Naiki, H., Yamamoto, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Goto, Y. & Gejyo, F. Molecular interactions in the formation and deposition of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils. *Amyloid* **12** (1), 15-25 (2005).

9. Yamamoto, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Goto, Y., Gejyo, F., & Naiki, H. Kinetic analysis of the polymerization and depolymerization of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1753** (1), 34-43 (2005).
10. Kardos, J., Okuno, D., Kawai, T., Hagihara, Y., Yumoto, N., Kitagawa, T., Zavodszky, P., Naiki, H. & Goto, Y. Structural studies reveal that the diverse morphology of β_2 -microglobulin aggregates is a reflection of different molecular architectures. *Biochim. Biophys. Acta* **1753** (1), 108-120 (2005).
11. 長谷川一浩, 内木宏延. *In vitro* におけるアミロイド線維形成機序. *アミロイドーシスの基礎と臨床*(池田修一 編)金原出版, pp. 40-45 (2005).
12. 大橋祐美子, 内木宏延. フォールディング異常と疾患. *タンパク質科学イラストレイテッド*(竹縄忠臣 編)羊土社, pp. 295-303 (2005).
13. Ono, K., Hamaguchi, T., Naiki, H. & Yamada, M. Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762** (6), 575-586 (2006).
14. Ono, K., Naiki, H. & Yamada, M. The development of preventives and therapeutics for Alzheimer's disease that inhibit the formation of β -amyloid fibrils (fA β), as well as destabilize preformed fA β . *Curr. Pharm. Des.* **12** (33), 4357-4375 (2006).
15. 長谷川一浩, 大越忠和, 内木宏延. 透析アミロイドーシスと β_2 ミクログロブリン. *細胞工学* **26** (2), 156-161 (2007).
16. 大越忠和, 長谷川一浩, 内木宏延. アミロイド線維生成沈着機構. *腎と透析* **62** (2), 155-160 (2007).

(3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

- ① 招待講演 (国内会議 3 件、国際会議 4 件)
(国際会議)
1. Naiki, H. Molecular interactions in the formation and destabilization of Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. Joint Meeting of the 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and the 47th Annual Meeting of the Japanese Society for neurochemistry ISN Symposium, Neurochemical aspects and approaches for neurological diseases. 2004,9,21-23, Osaka.
 2. Naiki, H. Molecular interactions in the formation and stabilization of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils. International symposium on amyloidosis: genetics, biochemistry, pathology and clinical studies, 2005,2,10-11, Kumamoto.
 3. Naiki, H. Molecular interactions in the formation, stabilization and destabilization of amyloid fibrils. The 2nd Open Workshop "Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules", 2005,3,17-18, Tokyo.
 4. Naiki, H. Molecular pathogenesis of β_2 -microglobulin related Amyloidosis. 24th Annual Meeting of the International Society of Blood Purification, 2006,9,8-10, Nara.
- (国内会議)
1. Naiki, H. Molecular mechanism of amyloid fibril formation and destabilization : Implication in the therapeutics of Alzheimer disease and β_2 -microglobulin-related amyloidosis. 第 76 回日本生化学会大会シンポジウム, アミロイドーシス研究の新展開, 2003,10,15-18, 横浜.
 2. Nagai, Y., Inui, T., Hasegawa, K., Popiel, HA., Fujikake, N., Fukui, K., Yamaguchi, Y., Urade, Y. Naiki, H. & Toda, T. A molecular therapy for polyglutamine diseases targeting the toxic

conformational transition of the polyglutamine protein using the inhibitor peptide QBP1. 第 76 回日本生化学会大会シンポジウム, アミロイドーシス研究の新展開, 2003,10,15-18, 横浜.

3. 山本 卓, 長谷川一浩, 下條文武, 内木宏延, 風間順一郎, 丸山弘樹, 成田一衛, 山口 格, 後藤祐児. β 2-ミクログロブリンアミロイド線維・沈着の分子機構, 透析アミロイドーシス—基礎研究から治療戦略 Update—. 第 50 回(社)日本透析医学会学術集会・総会, 2005,6,24-26, 横浜.

② その他の口頭発表 (国内会議 2 件、国際会議 6 件)

1. 内木宏延. アミロイド線維形成・沈着の分子機構—アルツハイマー病、透析アミロイドーシスを中心に. 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 2003,6,23-25, 札幌.
2. 内木宏延. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の昼と夜—フォールディングとミスフォールディング」, 2005,5,26-27, 大阪.

(国際会議 6 件)

1. Yamamoto, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Takahashi, N., Goto, Y., Gejyo, F. & Naiki, H. Extension and stabilization of β 2-microglobulin-related amyloid fibrils at neutral pH. 1st Italian-Japanese Workshop—Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies—, 2004,12,9-13, Pavia.
2. Hiramatsu, H., Goto, Y., Naiki, H. & Kitagawa, T. Amyloid fibril structure of β 2-microglobulin and its fragments elucidated from IR-microscope linear dichroism. 1st Italian-Japanese Workshop—Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies—, 2004,12,9-13, Pavia.
3. Kardos, J., Yamamoto, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Direct measurement of the thermodynamic parameters of β 2-microglobulin amyloid formation by isothermal titration calorimetry. 1st Italian-Japanese Workshop—Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies—, 2004,12,9-13, Pavia.
4. Takahashi, N., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Kimura, H., Yoshida, H., Gejyo, F. & Naiki, H. A first-order kinetic model of light chain-associated amyloid fibril extension in vitro. 1st Italian-Japanese Workshop—Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies—, 2004,12,9-13, Pavia.
5. Hasegawa, K. & Naiki, H. Kinetic analysis of Alzheimer's β -amyloid fibril formation using surface plasmon resonance. 1st Italian-Japanese Workshop—Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies—, 2004,12,9-13, Pavia.
6. Naiki, H., Ono, K., Hasegawa, K. & Yamada, M. Anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of antioxidants in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease and other amyloid diseases. 1st Italian-Japanese Workshop—Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies—, 2004,12,9-13, Pavia.

樋口京一

(1) 原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 13 件、内 4 報は内木との共著)

1. Umezawa, M., Tatematsu, K., Korenaga, T., Fu, X., Matsushita, T., Okuyama, H., Hosokawa, M., Takeda, T., Higuchi, K. Dietary fat modulation of apoA-II metabolism and prevention of senile amyloidosis in the senescence-accelerated mouse. *J. Lipid Res.* **44** (4), 762-769 (2003).
2. Guo, Z., Mori, M., Fu, X., Yao, J., Xing, Y., Korenaga, T., Li, G., Matsushita, T., Hosokawa, M. & Higuchi, K. Amyloidosis modifier genes in the less amyloidogenic A/J mouse strain. *Lab. Invest.* **831** (11), 1605-1613 (2003).

3. Kitagawa, K., Wang, J., Mastushita, T., Kogishi, K., Hosokawa, M., Fu, X., Guo, Z., Mori, M. & Higuchi K. Polymorphisms of mouse apolipoprotein A-II: seven alleles found among 41 inbred strains of mice. *Amyloid*. **10**(4), 207-214 (2003)
4. Fu, X., Korenaga, T., Xing, Y., Fu, L., Guo, Z., Matsushita, T., Hosokawa, M., Naiki, H., Baba, S., Kawata, Y., Ikeda, S., Ishihara, T., Mori M. & Higuchi K. Induction of AApoAII amyloidosis by various heterogeneous amyloid fibrils. *FEBS Lett.* **563** (1-3), 179-184 (2004)
5. Korenaga, T., Fu, X., Xing, Y., Matsusita, T., Kuramoto, K., Syumiya, S., Hasegawa, K., Naiki, H., Ueno, M., Ishihara, T., Hosokawa, M., Mori, M. & Higuchi, K. Tissue distribution, biochemical properties, and transmission of mouse type A AApoAII amyloid fibrils. *Am. J. Pathol.* **164**(5), 1597-1606 (2004)
6. Yazaki, M., Fushimi, T., Tokuda, T., Kametani, F., Yamamoto, K., Matsuda, M., Shimojo, H., Hoshii, Y., Higuchi, K. & Ikeda S. A patient with severe renal amyloidosis associated with an immunoglobulin gamma-heavy chain fragment. *Am. J. Kidney Dis.* **43**(5), e23-28 (2004).
7. Wei, L., Kawano, H., Fu, X., Cui, D., Ito, S., Yamamura, K., Ishihara, T., Tokuda, T., Higuchi, K. & Maeda S. Deposition of transthyretin amyloid is not accelerated by the same amyloid in vivo. *Amyloid* **11**(2), 113-120 (2004)
8. Tojo, K., Tokuda, T., Hoshii, Y., Fu, X., Higuchi, K., Matsui, T., Kametani, F. & Ikeda, S. Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. *Amyloid* **12**(2), 103-108 (2005)
9. Yan, J., Fujii, K., Yao, J., Kishida, H., Hosoe, K., Sawashita, J., Takeda, T., Mori, M. & Higuchi K. Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. *Exp. Gerontol.* **41**(2), 130-140 (2006)
10. Korenaga, T., Yan, J., Sawashita, J., Matsusita, T., Naiki, H., Hosokawa, M., Mori, M. & Higuchi, K., Fu X. Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am. J. Pathol* **168**(3), 898-906 (2006)
11. Zhang, H., Sawashita, J., Fu, X., Korenaga, T., Yan, J., Mori, M. & Higuchi, K. Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J.* **20** (7), 1012-1014 (2006)
12. Ge, F., Yao, J., Fu, X., Guo, Z., Yan, J., Zhang, B., Zhang, H., Tomozawa, H., Miyazaki, J., Sawashita, J., Mori, M. & Higuchi, K. Amyloidosis in transgenic mice expressing murine amyloidogenic apolipoprotein A-II (*Apoa2^C*). *Lab. Invest.* **87**(7): 633-543 (2007)
13. Yan, J., Fu, X., Ge, F., Zhang, B., Yao, J., Zhang, H., Qian, J., Tomozawa, H., Naiki, H., Sawashita, J., Mori, M. & Higuchi K. Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils (AApoAII) and protein A amyloid fibrils (AA). *Am J Pathol.* **171**(1): 172-180 (2007)

(2) その他の著作物(国内誌 7 件、国際誌 5 件)

1. 樋口京一、アミロイドと老化 (総説)、日本アフェレシス学会雑誌, **23**, 143-150 (2004).
2. 樋口京一、付笑影. 老化アミロイドーシス (総説)、基礎老化研究, **28**(4) 7-13 (2004).
3. 樋口京一、付笑影. アミロイドーシスと伝播 『アミロイドーシスの基礎と臨床』(池田修一編) 金原出版(東京) (書籍) 82-87, (2005).
4. 樋口京一、マウス老化アミロイドーシス。『アミロイドーシスの基礎と臨床』(池田修一編), 金原出版(東京) (書籍) 197-202, (2005).
5. 樋口京一、制御不能タンパク質が引き起こす病態 (総説)、実験医学・増刊、細胞内タンパク質の社会学 **23**, 167-173. (2005).

6. 樋口京一、アミロイドーシスの伝播 (総説)細胞工学 **26**, 177-180, (2007)
7. 後藤祐児、桑田一夫、関島良樹、田中元雅、内木宏延、永井義隆、松崎勝巳、樋口京一、アミロイドーシス発症の分子的機構解明を目指して:現状と展望、夢。(総説) 細胞工学 **26**, 181-185.
8. Higuchi, K., Xing, Y., Fu, X., Korenaga, T., Guo, Z., Nakamura, A. & Mori, M., Mouse senile amyloidosis in the SAM model. The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence. Nomura Y, Takeda T, Okuma Y eds. Elsevier BV Amsterdam, The Netherlands 35-40 (2004)
9. Fu, X., Korenaga, T., Xing, Y., Fu, L., Guo, Z., Matsushita, T., Hosokawa, M., Naiki, H., Mori, M. & Higuchi, K. Induction of AApoAII and AA amyloidosis by the injections of various amyloid fibrils. The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence. Nomura Y, Takeda T, Okuma Y eds. Elsevier BV Amsterdam, The Netherlands. 383-386 (2004)
10. Umezawa, M., Okumura, H., Hosokawa, M., Takeda, T. & Higuchi, K. Effects of dietary fats on senile amyloidosis in SAMP1 mice. The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence Nomura Y, Takeda T, Okuma Y eds. Elsevier BV Amsterdam, The Netherlands 427-431 (2004).
11. Sawashita, J., Zhang, H., Fu, X., Korenaga, T., Mori, M. & Higuchi K. Transmission of Mouse AApoAII Amyloidosis by the Amyloid Fibrils; Inhibitory Effects on Transmission by the Denaturation / Degradation of Amyloid Fibrils. Amyloid and Amyloidosis. Grateau G, Kyle RA, Skinner M eds. CRC Press, Boca Raton USA. 457-459 (2005).
12. Korenaga, T., Fu, X., Mori, M., Sawashita, J., Naiki, H., Matsushita, T. & Higuchi K. Transmission of Mouse AApoAII Amyloidosis from Mother to Pups. Amyloid and Amyloidosis. Grateau G, Kyle RA, Skinner M eds. CRC Press, Boca Raton USA, 460-442.

(3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 18 件、国際会議 20 件)
(国際会議)

1. Higuchi K., Xing Y, Fu X, Korenaga T, Guo Z, Nakamura A, Mori M. Mouse senile amyloidosis in SAM model. 2nd International Conference on Senescence: The SAM Model. July 21, 2003, Sapporo.
2. Higuchi K. Transmission of mouse senile amyloidosis. 1st Italian-Japanese workshop, Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies. December 9-13, 2004, Pavia. Italy
3. Higuchi K., Fu X, Korenaga T, Sawashita J, Mori M. Genetics and transmission of mouse systemic amyloidosis. International Symposium on Amyloidosis; Genetics, Biochemistry, Pathology and Clinical Studies. February 10-11, 2005, Kumamoto.
4. Higuchi K. Transmission of mouse systemic amyloidosis. The 4th Asia-Pacific IAP Congress (IAP2005). August 26, 2005, Beijing China.

(国内会議)

1. 樋口京一. 16回老年泌尿器学会総会 特別講演、2003年5月17日、松本.
2. 樋口京一. アミロイド線維によるアミロイドーシスの伝播機構。大阪大学蛋白質研究所セミナー「タンパク質の構造・機能発現の品質管理 -凝集と再生-」、2003年6月5日、大阪.
3. Higuchi K. Transmission of AApoAII amyloidosis. シンポジウム「アミロイドーシス研究の進展

開」第76回日本生化学会大会 2003年10月16日、横浜。

4. 樋口京一. 短寿命変異マウスからのメッセージ。第8回 Wako つくばフォーラム 2004年、1月22日、つくば。
5. 樋口京一. マウスアミロイドーシス(AApoAII)を用いたアプローチ。シンポジウム「タンパク質のコンフォメーション異常とフォールディング病」日本農芸化学学会 2004年度大会、2004年3月31日、広島。
6. 樋口京一. 老化アミロイドーシスモデルマウスの開発と応用。ワークショップ「老化病態研究のための実験モデル」第93回日本病理学会総会、2004年6月11日、札幌。
7. 樋口京一. アミロイドーシスの伝播機構。熊本大学大学院特別セミナー、2004年11月17日、熊本。
8. 樋口京一. アミロイドーシス発症要因としての伝播。厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班、アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 「アミロイドーシス 夏のワークショップ2007」、2007年8月30日、山口。

桑島邦博

(1) 原著論文発表 (国内誌0件、国際誌25件)

1. Ali, S.A., Iwabuchi, N., Matsui, T., Hirota, K., Kidokoro, S., Arai, M., Kuwajima, K., Schuck, P. & Arisaka, F. Reversible and fast association equilibria of a molecular chaperone, gp57A, of bacteriophage T4. *Biophys. J.* **85**, 2606-2618 (2003).
2. Inobe, T., Arai, M., Nakao, M., Ito, K., Kamagata, K., Makio, T., Amemiya, Y., Kihara, H. & Kuwajima, K. Equilibrium and kinetics of the allosteric transition of GroEL studied by solution X-ray scattering and fluorescence spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **327**, 183-191 (2003).
3. Inobe, T., Kikushima, K., Makio, T., Arai, M. & Kuwajima, K. The allosteric transition of GroEL induced by metal fluoride-ADP complexes. *J. Mol. Biol.* **329**, 121-134 (2003).
4. Arai, M., Kataoka, M., Kuwajima, K., Matthews, C.R. & Iwakura, M. Effects of the difference in the unfolded-state ensemble on the folding of Escherichia coli dihydrofolate reductase. *J. Mol. Biol.* **329**, 779-791 (2003).
5. Kamagata, K., Sawano, Y., Tanokura, M. & Kuwajima, K. Multiple parallel-pathway folding of proline-free Staphylococcal nuclease. *J. Mol. Biol.* **332**, 1143-1153 (2003).
6. Arai, M., Inobe, T., Maki, K., Ikura, T., Kihara, H., Amemiya, Y. & Kuwajima, K. Denaturation and reassembly of chaperonin GroEL studied by solution X-ray scattering. *Protein Sci.* **12**, 672-680 (2003).
7. Nakao, M., Arai, M., Koshihara, T., Nitta, K. & Kuwajima, K. Folding mechanism of canine milk lysozyme studied by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Spectroscopy--Int. J.* **17**, 183-193 (2003).
8. Kamagata, K. & Kuwajima, K. Parallel folding pathway of proline-free staphylococcal nuclease studied by the stopped-flow double-jump method. *Spectroscopy--Int. J.* **17**, 203-212 (2003).
9. Enoki, S., Saeki, K., Maki, K. & Kuwajima, K. Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein. *Biochemistry* **43**, 14238-14248 (2004).
10. Iizuka, R., So, S., Inobe, T., Yoshida, T., Zako, T., Kuwajima, K. & Yohda, M. Role of the helical protrusion in the conformational change and molecular chaperone activity of the archaeal group II chaperonin. *J. Biol. Chem.* **279**, 18834-18839 (2004).
11. Akhtar, M.W., Srinivas, V., Raman, B., Ramakrishna, T., Inobe, T., Maki, K., Arai, M., Kuwajima, K. & Rao, C. Oligomeric Hsp33 with enhanced chaperone activity: gel filtration,

- cross-linking, and small angle x-ray scattering (SAXS) analysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 55760-55769 (2004).
12. Inobe, T. & Kuwajima, K. Phi value analysis of an allosteric transition of GroEL based on a single-pathway model. *J. Mol. Biol.* **339**, 199-205 (2004).
 13. Kamagata, K., Arai, M. & Kuwajima, K. Unification of the Folding Mechanisms of Non-two-state and Two-state Proteins. *J. Mol. Biol.* **339**, 951-965 (2004).
 14. Saeki, K., Arai, M., Yoda, T., Nakao, M. & Kuwajima, K. Localized nature of the transition-state structure in goat alpha-lactalbumin folding. *J. Mol. Biol.* **341**, 589-604 (2004).
 15. Nakao, M., Maki, K., Arai, M., Koshiha, T., Nitta, K. & Kuwajima, K. Characterization of Kinetic Folding Intermediates of Recombinant Canine Milk Lysozyme by Stopped-Flow Circular Dichroism. *Biochemistry* **44**, 6685-6692 (2005).
 16. Iizuka, R., Yoshida, T., Ishii, N., Zako, T., Takahashi, K., Maki, K., Inobe, T., Kuwajima, K. & Yohda, M. Characterization of archaeal group II chaperonin-ADP-metal fluoride complexes: implications that group II chaperonins operate as a "two-stroke engine". *J. Biol. Chem.* **280**, 40375-40383 (2005).
 17. Yamada, Y., Yajima, T., Fujiwara, K., Arai, M., Ito, K., Shimizu, A., Kihara, H., Kuwajima, K., Amemiya, Y. & Ikeguchi, M. Helical and expanded conformation of equine beta-lactoglobulin in the cold-denatured state. *J. Mol. Biol.* **350**, 338-348 (2005).
 18. Oroguchi, T., Ikeguchi, M., Saeki, K., Kamagata, K., Sawano, Y., Tanokura, M., Kidera, A. & Kuwajima, K. Atomically detailed description of the unfolding of alpha-lactalbumin by the combined use of experiments and simulations. *J. Mol. Biol.* **354**, 164-172 (2005).
 19. Kamagata, K. & Kuwajima, K. Surprisingly high correlation between early and late stages in non-two-state protein folding. *J. Mol. Biol.* **357**, 1647-1654 (2006).
 20. Enoki, S., Maki, K., Inobe, T., Takahashi, K., Kamagata, K., Oroguchi, T., Nakatani, H., Tomoyori, K. & Kuwajima, K. The Equilibrium Unfolding Intermediate Observed at pH 4 and its Relationship with the Kinetic Folding Intermediates in Green Fluorescent Protein. *J. Mol. Biol.* **361**, 969-982 (2006).
 21. Kuwajima, K., Inobe, T. & Arai, M. The allosteric transition of the chaperonin GroEL from *Escherichia coli* as studied by solution X-ray scattering. *MACROMOLECULAR RESEARCH* **14**, 166-172 (2006).
 22. Nakatani, H., Maki, K., Saeki, K., Aizawa, T., Demura, M., Kawano, K., Tomoda, S. & Kuwajima, K. Equilibrium and Kinetics of the Folding and Unfolding of Canine Milk Lysozyme. *Biochemistry* **46**, 5238-5251 (2007).
 23. Kato, A., Maki, K., Ebina, T., Kuwajima, K., Soda, K. & Kuroda, Y. Mutational analysis of protein solubility enhancement using short peptide tags. *Biopolymers* **85**, 12-18 (2007).
 24. Oroguchi, T., Ikeguchi, M., Ota, M., Kuwajima, K. & Kidera, A. Unfolding Pathways of Goat alpha-Lactalbumin as Revealed in Multiple Alignment of Molecular Dynamics Trajectories. *J. Mol. Biol.* **371**, 1354-1364 (2007).
 25. Inobe, T., Takahashi, K., Maki, K., Enoki, S., Kamagata, K., Kadooka, A., Arai, M. & Kuwajima, K. Asymmetry of the GroEL-GroES complex under physiological conditions as revealed by small-angle X-ray scattering. *Biophys. J.* in press.

(2) その他の著作物(国内誌 7 件、国際誌 0 件)

1. 桑島邦博. 水と生体分子の物理化学の新展開 ([新連載] 水と生体分子が織りなす生命現象 (1)), *現代化学*, 1月号 (No.406) 45-50 (2005).
2. 池口満徳、桑島邦博. フォールディング実験とその分子動力学による再現 ([新連載] 水と生体

分子が織りなす生命現象(2))、現代化学 2月号(No.407)49-54 (2005).

3. Maki, K., Kamagata, K. & Kuwajima, K. Equilibrium and kinetically observed molten globule state. In *Protein Folding Handbook Volume 2*, eds. Buchner, J. & Kiefhaber, T. (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim) 856-883 (2005).
4. 桑島邦博. フォールディング反応—速度論—、「タンパク質科学 構造・物性・機能」(後藤祐児・桑島邦博・谷澤克行 編)分担執筆、化学同人, 245-259 (2005).
5. 鎌形清人、桑島邦博. タンパク質フォールディング速度と構造パラメータとの相関解析、*生物物理* **46**(3), 144-149 (2006).
6. 桑島邦博. 「バイオインフォマティクス事典」(宮野悟・江口至洋・金久實・高木利久・中井謙太編)分担執筆、共立出版 (2006).
7. 桑島邦博. タンパク質のアンフォールディングとフォールディング、「生物物理学ハンドブック」(石渡信一・桂勲・桐野豊・美宅成樹 編) 分担執筆、朝倉書店 (2007).

(3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

- ① 招待講演 (国内会議 17 件、国際会議 15 件)
(国際会議)

1. Kuwajima, K.: Multiple parallel-pathway folding of proline-free staphylococcal nuclease. *Third KIAS Conference on Protein Structure and Function: Folding Mechanism, Proteomics, and Bioinformatics*, September 29-October 1, 2003, Korea Institute for Advanced Study, Seoul Korea.
2. Kuwajima, K.: What determines the folding rates for two-state and three-state folding proteins? *2003 POSTECH Symposium of Structure and Folding in Protein Science*, October 2, 2003, Pohang University of Science and Technology, Pohang, Korea.
3. Kuwajima, K.: Mechanism of protein folding and its relation to protein hydration. *The 5th ORCS International Symposium on Development of New Structural Biology Including Hydrogen and Hydration*, November 19-21, 2003, Atomic Energy Research Institute, Tokai, Ibaraki.
4. Kuwajima, K.: The rate-determining step of kinetic folding of globular proteins. *The 9th Keihanna Conference on Molecular Biophysics*, January 5-8, 2004, Kyoto.
5. Kuwajima, K.: The molecular chaperone function of the *Escherichia coli* chaperonin GroEL. *The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science* April 14-18, 2004, Yokohama.
6. Kuwajima, K.: Unification of the folding mechanism between two-state and non-two-state globular proteins. *US-Japan Symposium on Folding, Design and Dynamics*, May 2-5, 2005, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.
7. Kuwajima, K.: Studies on the chaperonin from *Escherichia coli* by solution X-Ray scattering. *3rd International Symposium of X-ray and Neutron Scattering on Integrated Molecular Systems*, June 27-29, 2005, Pohang, Korea.
8. Kuwajima, K.: Folding of α -lactalbumin and calcium-binding lysozyme studied by stopped-flow circular dichroism. *10th International Conference on Circular Dichroism*, August 21-25, 2005, Sandestin, Florida, USA.
9. Kuwajima, K.: The allosteric transition of the chaperonin GroEL studied by solution X-ray scattering and fluorescence spectroscopy. *The 3rd COE Workshop "Frontiers of Laser and Optical Sciences"*, October 1-2, 2005, University of Tokyo, Tokyo.
10. Kuwajima, K.: Folding mechanism of green fluorescent protein. *The 5th KIAS Conference on Protein Structure and Function* (Korea Institute for Advanced Study, November 7-9, 2005, Seoul, Korea).
11. Kuwajima, K.: Molecular mechanisms of globular-protein folding. *Pacificchem 2005 Symposium*

"Structures, Dynamics, and Functions of Biomolecules and Water" December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA,.

12. Kuwajima, K.: Folding mechanism of non-two-state globular proteins. *Asia-Pacific Workshop on Biological Physics*, July 3-5, 2006, National University of Singapore, Singapore.
13. Kuwajima, K.: Experimental and simulation studies on the folding/unfolding of goat α -lactalbumin. *The 6th KIAS Conference on Protein Structure and Function*, October 26-28, 2006, Korea Institute for Advanced Study, Seoul, Korea.
14. Kuwajima, K.: Equilibrium and kinetics of the folding/unfolding of authentic and recombinant goat α -lactalbumin. *21st COE 5th International Conference--Perspectives in Nonlinear Physics*, November 20-22, 2006, Dept. Phys., Univ. Tokyo, Tokyo.
15. Kuwajima, K.: Molecular mechanism of protein folding. *1st International Symposium on Nanomedicine--From Basic to Applications*, April 20-22, 2007, Okazaki Conference Center, Okazaki.

(国内会議)

1. 桑島邦博: 分子シャペロンによる凝集の抑制と再生、大阪大学蛋白研セミナー「タンパク質の構造・機能発現の品質管理—凝集と再生—」(大阪大学、平成 15 年 6 月 5-6 日)
2. 桑島邦博: Kinetic folding mechanism of goat α -lactalbumin. 特定領域研究「水と生体分子」第 1 回公開ワークショップ(大阪、千里ライフサイエンスセンター、平成 16 年 1 月 9 日)
3. 桑島邦博: 蛋白質フォールディングの分子機構、理工学研究所プロジェクト研究シンポジウム「蛋白質を主とする生体系の化学—生物科学と溶液化学の融合—」(立命館大学・エポック立命 21、平成 16 年 1 月 15 日)
4. 桑島邦博: A unified view of the protein folding rate: What is the relationship between the folding rates of non-two-state and two-state proteins? 理研シンポジウム「タンパク質のデザイン、実験室進化、フォールディング」(理研中央研究所(和光)、平成 16 年 3 月 5 日)
5. 桑島邦博: 緑色蛍光蛋白質(GFP)のフォールディング機構、特定領域研究「水と生体分子」特定領域研究「タンパク質の一生」共同主催公開シンポジウム(東京、日本科学未来館、2004 年 9 月 11 日)
6. 桑島邦博: 球状蛋白質フォールディングの分子機構、第 27 回溶液化学シンポジウム(東京電機大学鳩山キャンパス、2004 年 11 月 19-21 日)
7. 桑島邦博: 蛋白質フォールディングの分子機械シャペロニンの作用機構、学振 169 委員会研究会(回折構造生物)(東京都、主婦会館プラザエフ、2004 年 12 月 2 日)
8. 桑島邦博: 蛋白質のフォールディング機構、日本生物物理学会第 42 回年会シンポジウム「蛋白質と水の生物物理学」(国立京都国際会館、2004 年 12 月 13 日)
9. 桑島邦博: 蛋白質フォールディングの分子機械シャペロニンの作用機構、分子研研究会(物理化学から生命科学を展望する～分子組織体から細胞へ～)(岡崎コンファレンスセンター、2004 年 12 月 20 日)
10. 桑島邦博: α ラクトアルブミン: 私たちのフォールディング研究におけるお気に入り蛋白質、札幌タンパク質科学シンポジウム(札幌、北大学術交流会館、2005 年 3 月 22 日)
11. 桑島邦博: 緑色蛍光蛋白質(GFP)のフォールディング、スペクトル化学研究センターシンポジウム「生命とスペクトル」(主催: 東京大学大学院理学系研究科附属スペクトル化学研究センター、東京、2005 年 12 月 3 日)
12. Ikeguchi, M., Oroguchi, T., Ota, M., Kidera, A. & Kuwajima, K.: Molecular dynamics

simulations of protein folding/unfolding. 特定領域研究「水と生体分子」第3回公開ワークショップ(自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター、2006年1月6-7日)

13. 桑島邦博:蛋白質のフォールディング問題 ―その統一的理解を目指して、岡崎統合バイオサイエンスセンター5周年シンポジウム(自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター、2006年2月6-8日)
14. 桑島邦博:蛋白質フォールディングの階層性と協同性、自然科学研究機構連携プロジェクト「自然科学における階層性と全体」第3回シンポジウム(箱根パークス吉野、2006年7月19-20日)
15. 桑島邦博:蛋白質のフォールディング問題:物質科学と生命科学の接点、蛋白質科学に関するシンポジウム「ライフサイエンスと蛋白質科学」(東京大学山上会館、2006年10月5日)
16. 桑島邦博:蛋白質科学:蛋白質の構造と機能、日本化学会第87春季年会イブニングセッション「生体分子科学の進展」(関西大学千里山キャンパス、2007年3月25日)
17. 桑島邦博:真性体および組換え体 α ラクトアルブミンの構造の安定性とダイナミクス、酪農科学シンポジウム(岐阜市、ホテルグランヴェール岐山、2007年8月24日)

7 研究期間中の主な活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成15年6月5日～ 平成15年6月6日	蛋白質研究所セミナー「タンパク質の構造・機能発現の品質管理―凝集と再生―」	大阪大学蛋白質研究所	140名	細胞内でのタンパク質の品質管理、アミロイド線維などの規則的凝集形成、crowding効果などに関する発表と討論した。
平成16年12月9日～ 平成16年12月13日	学術振興会二国間交流事業 - セミナー “Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies”	パピア大学 パピア、イタリア	70名	透析アミロイドーシスを中心に、アミロイドーシスの分子機構、治療基盤を議論した。
平成17年5月26日～ 平成17年5月27日	蛋白質研究所セミナー「蛋白質の昼と夜」	大阪大学蛋白質研究所	200名	蛋白質の正常なフォールディングとアミロイド形成を引き起こすミスフォールディングを比較して討論した。
平成18年12月1日	細胞工学特集「タンパク質のミスフォールディングと疾患―アミロイド線維の役割」ミーティング	大阪大学蛋白質研究所	20名	蛋白質のアミロイド線維研究の動向に関する調査と研究提案:アミロイド線維研究の方向性と展望を討論した。
平成19年6月21日～ 平成17年6月22日	蛋白質研究所セミナー「蛋白質の会合と凝集―機能、病気、利用」	大阪大学蛋白質研究所	160名	会合と凝集という視点から、蛋白質の発現・精製、構造物性や機能、疾病、利用に関する最近の研究成果や現状について発表と討論を行った。

8 結び

研究領域の進展:

医学領域の重要な対象ではあるが謎の多かったアミロイドーシスの研究は、現在、蛋白質科学との連携によって、急速な発展を続けている。アミロイド線維の構造や物性、形成機構が、蛋白質の物性、物理化学に基づいて研究され、アルツハイマー病やプリオン病、透析アミロイドーシスをはじめとするさまざまなアミロイドーシスにおけるアミロイド線維の役割が、統一的に理解されようとしている。特に注目されるのは、アミロイド線維の構造生物学的研究である。現在、多くの研究者の努力によって、固体NMRを用いた構造解析、電子顕微鏡をはじめとする各種の顕微鏡解析を駆使した構造研究、水素重水素交換と溶液NMRとの組み合わせられた方法などによって、さまざまなアミロイド線維の原子レベルでの構造が明らかになりつつある。これらの状況によって、「アミロイド構造生物学」という新たな研究領域が台頭しつつある。アミロイド構造生物学は、これまでの、機能的な蛋白質を中心とした構造生物学研究の地平を大きく広げるものとして、蛋白質研究の進展に大きな貢献をすることが期待できる。

本研究の成果とまとめ:

後藤は、蛍光顕微鏡、溶液・固体NMRを用いた構造物性研究を中心に本CREST研究を展開した。それらの成果は、世界的なアミロイド構造生物学の台頭に、重要な役割を果たしてきたと考えている。特に、全反射蛍光顕微鏡を用いたアミロイド線維の一線維、リアルタイム観察は、世界で追従する研究グループの現れない独自で強力な手法であり、アミロイド線維の実体と特徴を鮮明にした。また、重水素交換とNMRを組み合わせたアミロイド線維の構造安定性のアミノ酸残基レベルの解析法は、今日、様々なアミロイド線維で適用される標準的な方法となっており、世界的にも極めて高い評価を得ている。今、正に、アミロイド線維の構造と形成機構が、原子レベルで解明されつつある。

内木は、アミロイドーシスの病態解明、新たな治療戦略の構築を目指し、アミロイド線維形成を引き起こす生体内分子環境の研究を行った。 β 2ミクログロブリン、 $A\beta$ アミロイド線維形成のいずれにも脂質分子が関与していることを明らかにした。また、一連の有機化合物がアミロイド線維形成阻害・不安定化をもたらすことを明らかにした。これらは、アミロイドーシスの予防・治療薬の開発に直結する成果であり、今後の飛躍的な発展が期待できる。

樋口は、学術的にも社会的にも重要な問題である「アミロイドーシスの伝播」に正面から取り組んだ。そして、マウスを用いた研究により、少なくともAApoAIIやAAアミロイドーシスでは、アミロイドセ線維を介したアミロイドーシスの伝播が重要な役割を果たすことを明らかにした。しかしながら、その詳細が解明されたとは言いがたく、「アミロイドーシスの伝播」の医学・社会的な重要性を考えると今後のいっそうの研究が必要である。

桑島は、 β 2ミクログロブリンの天然構造へのフォールディング反応と、基本的な中間体の特徴、シャペロンGroEL/ESとの相互作用を研究した。詳細な反応機構やの実態を明らかにするには至っていないが、今後、研究を進めることにより、アミロイド線維形成を引き起こす蛋白質の構造状態に関する理解が進むと期待する。

他方、所期の目的の中では、「アミロイド原性蛋白質の予測」、「アミロイド線維を利用したナノ材料の創製」については、今、研究の端緒についた状態であり、大きな成果を得たとは言いがたい。しかしながら、今後の発展が期待される研究課題であることは間違いなく、上述の成果と共に、本CREST研究を継承・発展させることが必要である。

今後の展望:

はじめにも述べたが、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り、緊急の対策と、いっそうの基礎研究が必要である。これを解決し、さらにはアミロイド線維との共生への道を開拓することが必要である。今後は、蛋白質科学と医学の連携をいっそう強化して、蛋白質科学としてのアミロイド研究から、アミロイドーシスの発症機構および病態の医学的解明に還元することを目指した学際的研究を推進することが特に重要である。



写真1. 2004年12月9日日本イタリアセミナー「Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies」。前列、Rino Esposito(左端、イタリア世話人); 後藤祐児(2人目、日本世話人); 下条文武(3人目); Vittorio Bellotti (5人目、イタリア世話人)。2列目、内木宏延(左から2人目); 樋口京一(3人目)。



写真2. 2004年12月9日、日本イタリアセミナー「Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies」。左より、後藤祐児、下条文武(新潟大)、長谷川一浩(福井大)、内木宏延、樋口京一、田口英樹(東大)、高橋直生(福井大)。



写真3. 2006年12月1日、蛋白工学特集「蛋白質のミスフォールディングと疾患—アミロイド線維の役割」ミーティング。同特集の執筆者は、中央列左から、関島良樹(信州大)、内木宏延、樋口京一、後藤祐児、松崎勝巳(京都大)、桑田一夫(岐阜大)、田中元雅(理研)、後列右から長谷川一浩(福井大)、永井義隆(阪大)。