

ATTR アミロイドーシス原因タンパク質であるトランスサイレチンの生理的および病的な高次構造形成に与えるシステイン残基 (Cys10) の機能解析

熊本大学大学院薬学教育部 創薬・生命薬科学専攻
メディシナルケミストリーコース 生命分析化学分野 稲田 祐貴

ATTR アミロイドーシスは血清タンパク質である transthyretin (TTR) がアミロイド線維を形成し、全身諸臓器に沈着することで発症する。TTR は通常、四量体として機能するが、遺伝子変異や加齢により四量体構造が不安定化すると、単量体への構造変化を容易に起こす。その後、解離した単量体が変性・重合の過程を経てアミロイド線維を形成する。既存の治療薬はいずれもアミロイド形成過程の上流を標的としているため、病初期における限定的な進行抑制効果のみであり、進行した患者に対する効果的な治療法はない。そのため、TTR アミロイド形成の分子機構に基づいた新たな治療薬開発が望まれている。TTR アミロイド形成機構については、過去に多くの研究が行われているが、変異型 TTR が壮年期以降にアミロイド線維を形成する分子機構は、現在のアミロイド線維形成モデルでは説明できない。そこで、私は TTR に唯一存在する10番目のシステイン残基 (Cys10) に着目した。Cys10は生体内において50%以上が酸化修飾を受けており、酸化修飾の種類によってアミロイド形成能が変化することが報告されていることから、TTR のネイティブ構造およびアンフォールド構造の形成を制御する重要な残基であると考えられる。そこで、本研究では、ATTR アミロイドーシスの発症機構の解明及び新規治療薬及び予防法の開発を究極の目的として、TTR の Cys10に着目して、生体内での TTR アミロイド形成機構の解明に向けて、以下の3点に関する検討を行った。

第一に、C10S 変異が TTR アミロイドの沈着を抑制する分子機構の解明を目的として、C10S 変異が TTR の熱力学的安定性及び動力学的安定性に与える影響を評価した。尿素変性実験の結果より、C10S 変異は TTR 四量体の動力学的安定性には影響を与えず、TTR 単量体の熱力学的安定性を向上させることを明らかにした。C10S 変異が TTR 単量体の熱力学的安定性を向上させる分子機構を解明するために、NMR 法及び MD 計算を用いて構造解析を行った結果、Ser10のヒドロキシル基が DE loop 上の Gly57及び Thr59 と新たな水素結合を形成することを見出した。さらに、Ser10と Gly57/Thr59間の水素結合は、それぞれ、 β -strand A, D間の相互作用及び DE loop の α -helix 様構造の安定化に寄与することを明らかにした。したがって、C10S 変異は Ser10を介した新たな水素結合ネットワークの形成により、TTR 単量体の揺らぎを抑制することで、熱力学的安定性を向上させることが示唆された。

第二に、加齢依存的な ATTR アミロイドーシス発症機構の解明を目的とし、加齢により変動する細胞外環境のレドックスバランスが TTR アミロイド形成を制御するか検討した。その結果、TTR アミロイド形成は酸化的環境で促進され、還元的環境で抑制されることを明らかにした。詳細な分子機構の解析により、TTR 単量体が Cys10を介して分子間で異所性にジスルフィド結合した TTR 二量体 (S-S dimer) をアンフォールディング依存的に形成して、凝集体へと構造変化する新規経路を同定した。本経路において、レドックスバランスは S-S dimer 形成を可逆的に制御する。S-S dimer の添加によって単量体 TTR の凝集体形成は促進されることから、S-S dimer は TTR 凝集体の構成要素となるだけでなく、チオール-ジスルフィド交換反応を介してネイティブ状態の TTR 単量体の変性を誘導するプリオン様活性を有することを示した。本研究で同定した S-S dimer 重合経路は、従来モデルである TTR 単量体重合経路とは独立しており、両経路から生じるアミロイドの線維構造、細胞毒性活性は異なる。S-S dimer 重合経路により形成された TTR 凝集体のみが細胞毒性を示したことから、生体内での臓器障害には S-S dimer 重合経路により生じる TTR 凝集体が関与すると推察される。本知見より、S-S dimer 形成過程が ATTR アミロイドーシスの新たな治療標的となることが示唆された。

第三に、細胞外環境での TTR 凝集体形成を評価するための ATTR アミロイドーシス病態モデル生物の確立を目指して、蛍光タンパク質を融合した変異型 TTR を分泌発現する線虫株を作製した。モデル線虫の作製においては変異型 TTR の細胞外分泌の促進を企図して野生型 TTR と変異型 TTR を共発現するヘテロ接合体を採用した。ホモ接合体（変異型 TTR のみ発現）と比較して、ヘテロ接合体では、変異型 TTR の偽体腔中への分泌が増加し、加齢に伴い TTR 凝集体が蓄積した。加齢に伴う TTR 凝集体の蓄積は変異型 TTR への C10S 変異導入により抑制されたことから、S-S dimer 形成を介した TTR 凝集化が *in vivo* においても生じることが明らかになった。また、TTR 凝集体が蓄積した線虫株では平均寿命が短縮したことから、S-S dimer 重合経路により形成された TTR 凝集体が毒性を示すことが *in vivo* においても確認された。本研究で作製した線虫株は、加齢による TTR 凝集体形成を再現した初めてのモデルとなる。本モデル線虫を用いた遺伝学的解析を通じて、加齢に伴う TTR 凝集体形成の制御分子を同定できると考えている。

以上、本研究は従来から広く支持されてきた TTR アミロイド形成機構に関する理解を根本的に変える新しい知見を提供している。本研究成果を基盤として、我々は Cys10 を不可逆的に修飾するコバレントドラッグが画期的な予防薬または治療薬になり得ると考えている。C10S 変異が形成する水素結合ネットワークの構造基盤を活用して、TTR 単量体安定化と S-S dimer 形成阻害作用を同時に示す Cys10修飾薬の開発が期待される。