

氏名	か けん い 何 剣 為
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第393号
学位授与年月日	平成17年 9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Studies on molecular mechanisms of amyloid formation of recombinant chicken cystatin expressed in yeast (酵母で発現させたシスタチンのアミロイド形成の分子メカニズムに関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 加藤 昭夫 (副査) 松富直利 松田英幸 森嶋伊佐夫 川 向 誠

### 学位論文の内容の要旨

Human cystatin C amyloid angiopathy (CAA) is a dominantly inherited disorder characterized by tissue deposition of amyloid in blood vessels that leads to recurrent hemorrhagic stroke. In hereditary cystatin C amyloid angiopathy (HCCAA), a natural variant of HCC (Leu68Gln) forms massive amyloid deposits in brain arteries of young adults leading to lethal cerebral hemorrhage. It has now been established that wild type hcC also forms part of the amyloid deposits in brain arteries of elderly patients suffering from cerebral amyloid angiopathy. Since in both cases aggregation involves abnormal, pathological change of protein conformation, these disorders can be classified as conformational diseases. Knowledge of the molecular mechanism causing the transition of physiologically normal and soluble proteins to toxic oligomers and insoluble fibrils is crucial in efforts to develop treatment modalities for this group of common diseases.

In chapter I, amyloidogenic chicken cystatin mutant I66Q (cC I66Q) was successfully secreted by yeasts *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. Large amounts of insoluble aggregate and polymeric form cC I66Q besides the monomer and dimer forms were secreted into the culture medium. The monomer form the amyloidogenic cC I66Q exhibited a similar level of inhibitory activity toward papain, but the dimer form did not. Our experiment demonstrated that amyloidogenic mutant I66Q cC, but not the wild type cC can form mature

amyloid fibers in vitro, however, it maintains a relatively stable conformation in vivo, indicating that in vivo protein amyloidogenesis through 3D domain-swapping is a distinct mechanism that is fairly different from other amyloidogenesis mechanisms.

In chapter II, to investigate whether Eps1p is a component of the ER quality control system for disulfide-containing model proteins, both amyloid-prone cystatin and unstable mutant C94A lysozyme were secreted in wild-type and  $\Delta$ eps1 *Saccharomyces cerevisiae* cells. Amyloid-prone cystatin secreted at much higher level in  $\Delta$ eps1 cells than that in wild-type yeast. In parallel, the secretion amount of disulfide bond disrupted mutant C94A lysozyme greatly increased in  $\Delta$ eps1 cells although that was apparently low in wild-type yeast cells compared with the secretion amount of wild-type lysozyme. It is interesting that neither the unstable mutant C94A lysozyme nor amyloid-prone cystatin secreted in  $\Delta$ eps1 cells maintained their specific activities. These observations lead to the supposition that yeast cells deficient for the PDI-family-member EPS1 locus secrete more of labile disulfide-containing model proteins.

In chapter III, to address the role of glycosylation on fibrillogenicity of amyloidogenic chicken cystatin, N-linked consensus sequence (Asn106-Ile108? Asn106-Thr108) was introduced by site-directed mutagenesis into the wild type and amyloidogenic chicken cystatins to construct the glycosylated form of chicken cystatins. The glycosylated and unglycosylated forms of both wild type and amyloidogenic mutant I66Q cystatin were expressed and secreted in the culture medium of *Pichia pastoris* transformants. Comparison of insoluble aggregate amount, the secondary structure, inhibitory activity and fibrillogenicity has shown that the N-linked glycosylation inhibited the formation of three-dimensional domain-swapped dimer, oligomer so as to suppress the amyloidogenicity of the mutant cystatins.

Our results in chapter II and III combined with the fact that glycosylated proteins have different folding pathways in ER and require more chaperones to fold correctly than nonglycosylated proteins, lead to the supposition that pathophysiological mechanism of cerebral amyloid angiopathy suffered by elderly patients could possibly be explained as that the wild type hcC forms part of the amyloid deposits in brain arteries in elderly patients due to decreased levels of aging related ER chaperones.

## 論文審査の結果の要旨

シスタチンはシステインプロテアーゼ阻害作用をもつ分子量約 13,000 のタンパク質で哺乳動物、植物にも含まれており、ウィルスの増殖を抑制する機能を有する。ヒトシスタチンは遺伝性の変異あるいは弧発性によりアミロイドを形成して脳出血を引き起こす原因となる。この変異シ

スタチンのアミロイド形成機構は明らかではない。ヒトシスタチンのホモログであるニワトリシスタチンは酵母発現系で多量に分泌するため、アミロイド形成を調べるのに都合のよい試料である。こうした背景のもとに本研究ではニワトリシスタチンのアミロイド型変異体 I66Q を作成し、酵母で発現させその性質を調べた。

アミロイド型ニワトリシスタチン I66Q は酵母 *P. pastoris* で多量発現分泌した。野生型のシスタチンは大部分がモノマーで存在するが、変異体 I66Q はモノマーとダイマーが培養液に観察されたが、多量のポリマー、凝集体が不溶性画分で観察された。これは 66 位のイソロシンが分子内疎水性パッキングに重要な残基であり、親水性のグルタミンに置換すると疎水性コアが不安定になり、 $\beta$  ストランドが分子表面に露出し、この  $\beta$  構造を介してダイマーが形成され、さらにドメインスワッピングにより多量体が形成され、アミロイド形成をしやすくなると考えられる。I66Q の CD スペクトラムは野生型と同じであり、モノマーはパパイン阻害作用を示したが、ダイマーは示さなかった。I66Q は生理的な条件下あるいは酸性条件下でアミロイドに典型的なコンゴレッドやチオフラビン T と結合し、アミロイド線維を形成した。アミロイド線維形成は走査型電顕で確認した。

さらに、このシスタチンのアミロイド線維形成を阻害するための研究を行った。アミロイド型シスタチンのアミロイド形成はシスタチンの疎水コアから分子表面に遊離した  $\beta$  シートを介した水素結合によるドメインスワッピング機構が提唱されている。このドメインスワッピングを阻害するためにシスタチンの 5 番目の  $\beta$  ストランドに N 型糖鎖を付加する変異体 (I108T) を作成し、アミロイド形成に及ぼす影響を調べた。その結果、アミロイド型糖鎖付加変異体 (I66Q/I108T) は酵母で発現分泌し、不溶性凝集体の量は著しく減少した。CD スペクトラムからアミロイド型変異体 (I66Q) に比べ、ヘリックス含量が保存されていることが示された。また、パパイン阻害活性は保たれており、ダイマー形成が生じないことが示された。これらの結果から、5 番目の  $\beta$  ストランドへの N 型糖鎖付加により、アミロイド形成は阻害されることが示され、シスタチンのアミロイド形成がドメインスワッピングモデルに適合することが予測された。また、アミロイド型タンパク質に糖鎖を導入することによる線維形成を防止できることが示された。

最後に、シスタチンをモデルタンパク質として、酵母 *S. cerevisiae* 小胞体におけるタンパク質の品質管理に関する研究を行った。糖タンパク質の品質管理は小胞体膜結合型カルネキシンによって行われることは明らかにされているが、シスタチンのように糖タンパク質でないタンパク質の品質管理については明らかでない。本研究では、シスタチンやリゾチームなどの S-S 結合を多く含む糖タンパク質でないタンパク質の品質管理は小胞体膜結合型 PDI ホモログである Eps1 により行われるという仮説をたて、これを証明しようとした。

野生型シスタチンおよびリゾチームの変異体 (C94A) を Eps1 欠損酵母と野生型酵母で発現分泌させ、その分泌量および性質を調べた。野生型のリゾチームは Eps1 欠損酵母と野生型酵母で同様の分泌を示したが、シスタチン、リゾチーム変異体 (C94A) は野生型酵母では分泌が著しく抑制されるが、Eps1 欠損酵母では分泌量が数倍増加し、シスタチンおよびリゾチームの活性が著しく低下したものが分泌していることが示された。この結果は Eps1 が不安定な S-H 含有タンパク

質の品質管理に関与しており、Eps1 欠損により、不安定変異体の分解ができなくなり、小胞体内に変性タンパク質が蓄積し、Unfold Protein Response (UPR)により、変性タンパク質が分泌されることを示す。

これらの結果は異常タンパク質の分泌による遺伝性の分子病（アミロイドシス）に加えて、弧発性分子病は小胞体膜結合型シャペロンの機能低下により生じることが示唆される。