

表1 ALアミロイドーシス8症例のまとめ

症例	年齢・性	主症状	血清M蛋白	尿中M蛋白	骨髄形質細胞 比率	直接死因	主要沈着臓器
1	67 女	労作時呼吸困難 (右胸水)	IgG-λ	BJP (+)	明かな増加(-)	心壁在血栓→脳梗塞	心、肺 (アミロイド結節+肺門部気管支壁)
2	57 女	労作時呼吸困難 (うっ血性心不全)	N.D. <sup>1</sup>	BJP (-)	5-10 % <sup>2</sup> (λ陽性)	心壁在血栓→脳梗塞、心室細動	心、肺 (びまん性)
3	44 女	ネフローゼ症候群、 うっ血性心不全	IgG-λ	BJP-λ	15.8 %	心室頻拍	腎、心、脾
4	56 女	労作時呼吸困難 (うっ血性心不全)	IgG-λ	BJP-λ	明かな増加(-)	肺うっ血+肺炎 (うっ血性心不全)	心
5	46 女	巨舌、 皮膚アミロイド症	IgG-κ	BJP-κ	13.6 %	突然の心停止	心、舌、皮膚
6	55 男	労作時呼吸困難 (うっ血性心不全)	IgG-λ疑い	BJP-λ	5 % <sup>2</sup>	心室頻拍	心、肝、脾
7	68 女	全身浮腫 (うっ血性心不全)	わずかに疑 われる	N.D. <sup>1</sup>	5 % <sup>2</sup>	胸水貯留 (うっ血性心不全)	心、肝、脾
8	85 女	ネフローゼ症候群	IgG-λ	BJP (-)	5-10 % <sup>2</sup> (λ陽性)	腎不全、うっ血性心不全	腎、脾

<sup>1</sup>免疫電気泳動施行せず。

<sup>2</sup>剖検時採取した骨髄より推定。

## E. 結論

平成10年度に集積した全身性ALアミロイドーシス剖検症例5例に加え、今年度は3症例を追加集積した。来年度は、引き続き症例の集積を行うと共に、各症例の新鮮凍結臓器よりALアミロイド線維、及びAL蛋白を精製し、試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの一般化を目指す。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、下条文武、上田孝典、内木宏延

試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索 II—試験管内線維伸長の反応速度論的解析. 厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成11年度研究報告会 平成12年2月3-4日 東京.

## 新鮮凍結臓器からのALアミロイド線維ならびにAL蛋白の精製、及び電顕的・生化学的解析

分担研究者 下条文武<sup>1</sup> 新潟大学医学部第二内科教授

研究協力者 高橋直生<sup>1,2</sup>、長谷川一浩<sup>2</sup>、山口 格<sup>2</sup>、内木宏延<sup>2</sup>

<sup>1</sup>新潟大学医学部第二内科、<sup>2</sup>福井医大第二病理

### 研究要旨

試験管内ALアミロイド線維形成を反応速度論的に解析する実験系を確立するため、3症例の全身性ALアミロイドーシス剖検例（症例2：57歳女性、症例3：44歳女性、症例6：55歳男性、いずれもIgG- $\lambda$ 型）の新鮮凍結臓器（症例2：肺、症例3：脾、症例6：脾）を用いて、Pras法、 $10^5 \times g$ 超遠沈、及び50-60%不連続ショ糖密度勾配超遠沈によりALアミロイド線維を精製した。電子顕微鏡を用いた形態学的観察により、若干の無構造な不純物を認めるものの、幅約10 nm、らせん構造を持つALアミロイド線維を確認した。還元条件下にTricine-SDS-PAGE法を行い、各精製ALアミロイド線維溶液中に、分子量約14.5、16.5、19.0、23.5、及び57kDa（症例2）、10.2、10.3、10.6、11.1、26.0、及び57kDa（症例3）、16.5、18.5、23.0、及び57kDa（症例6）のバンドを認めた。ウェスタンブロッティングを行い、各症例とも57kDa以外のバンドは、抗ヒト $\lambda$ 抗体で陽性に染色された。次に、精製ALアミロイド線維の一部を6M尿素中、4°Cで、24~36時間可溶化した後、ゲルクロマトグラフィーで分子量別に単体AL蛋白を分画、精製した。今回、各症例の、1)チオフラビンTを用いたヒトALアミロイド線維分光蛍光定量法を確立するための標準物質を得、2)ALアミロイド線維伸長の反応速度論的解析に不可欠の重合核、及びAL蛋白を精製した。

### A. 研究目的

全身性ALアミロイドーシスは、日本における代表的アミロイドーシスであるが、有効な治療法はおろか発症機構の詳細は解明されていない。われわれは本プロジェクトで、ALアミロイド線維形成・沈着機構の解明、および沈着阻害剤の開発のため、全身性ALアミロイドーシス患者から得たAL蛋白、臓器沈着ALアミロイド線維を

用い、試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの確立を目指している。今回、3例の全身性ALアミロイドーシス剖検症例の新鮮凍結臓器よりALアミロイド線維を精製し、電顕を用いた形態的観察、及びTricine-SDS-PAGE法等による生化学的解析を行い、更にそれらよりAL蛋白を精製し生化学的解析を行った。

## B. 研究方法

### 症例提示：

#### 症例 2（天理よろづ相談所病院病理）：

臨床経過：患者は 57 才女性で、死亡 1 年程前から労作時呼吸困難が出現、心エコーにて求心性心肥大を認め、歯肉生検、心筋生検にて AL 型アミロイドーシスと診断された。死亡 5 カ月前、血圧 130/60 mmHg で舌腫大無く、腹部エコー、呼吸機能、腎機能、甲状腺機能は正常であった。血清総蛋白 6.0 g/dl ↓、 $\gamma$ -グロブリン分画 7.4 % ↓、IgG 480 mg/dl ↓、IgA 267 mg/dl、IgM 64 mg/dl、CRP < 0.2、尿中 BJP (-)。血清免疫電気泳動、骨髄穿刺は施行されなかった。死亡 1 カ月半前の平成 10 年 8 月 16 日、意識消失発作を来し、著明なうっ血性心不全が確認された。9 月 21 日、突然、構語障害および左上下肢麻痺が出現、CT にて右中大脳動脈根部閉塞による右大脳半球の広範な脳梗塞を確認した。9 日後、心室細動が出現し死亡した。

主要剖検所見：(1) 骨髄は脂肪組織比率の増加した軽度低形成性骨髄で、造血細胞は 3 系とも認められた。形質細胞比率は全体に低く、領域によりばらつきを認めるが、5~10%程度と推定された。内皮細胞の明瞭な毛細血管周囲に、形質細胞の比較的均質な集簇を認めた。これらの形質細胞は、偏心した比較的大型の核と豊富な好塩基性細胞質から成り、分化した車軸様核を持つ plasma cells も認められるが、幼若核を持つ plasmablasts が優勢であった。これらの細胞胞体は、抗ヒト $\kappa$ 鎖抗体で陽性に染色され、腫瘍性増殖と考えられた。細胞質が均質に染色される細胞も認められるが、不

規則顆粒状に染色される細胞も多数認められた。抗ヒト $\kappa$ 鎖抗体で陽性に染色される形質細胞も少数認められるが、いずれも核は小型車軸状で良く分化しており、反応性細胞と考えられた。(2) 心重量は 500 g で壁は硬く断面に光沢を認めた。左室肥大があり（左室壁厚 2.3 cm）、左心耳腔内に大豆大血栓を認めた。組織学的に、心内膜側を中心とする血管周囲、および心筋線維間質に高度のアミロイド沈着を認めた。沈着アミロイドは、過マンガン酸カリウム消化試験に抵抗性で、抗ヒト $\lambda$ 型 AL 蛋白抗体を用いた免疫染色で陽性に染色された。

(3) 肺重量は 640/580 g でやや硬く弾力性があり、断面は充実性であった。組織学的に気管支~細気管支壁、末梢血管壁、及び肺胞壁に高度のアミロイド沈着を認めた。

(4) 肝(1000 g)、脾(100 g)、腎(100/150 g)へのアミロイド沈着は軽度で、いずれも末梢血管壁に沈着を認めた。(5) その他全身諸臓器の主として血管壁に、軽度のアミロイド沈着を認めた。

考察：本症例は、剖検により心、肺に高度のアミロイド沈着を認め、これが生前認められた著明なうっ血性心不全、及び呼吸困難を引き起こしたと考えられる。また高度の心アミロイドーシスにより左房内壁血栓が惹起され、これにより右中大脳動脈根部血栓塞栓、ひいては右大脳半球の広範な脳梗塞が発症したものと考えられる。直接死因は、心アミロイドーシスによる心室細動と考えられる。

凍結保存臓器：心、肺、肝、脾、腎

#### 症例 3（京都民医連中央病院病理）：

臨床経過：患者は44才女性で、死亡1年7カ月前の1997年2月、蛋白尿を指摘された。同年6月の腎生検にて腎アミロイドーシスの診断を受けた。骨髓穿刺にて形質細胞比率の増加を認め、MP療法2クール施行。同年10月、血清総蛋白3.5 g/dl、IgG↓、IgA↓、IgM↑、骨髓形質細胞比率9.4% ( $\lambda >> \kappa$ )、尿中BJP陰性。死亡4カ月前の1998年5月、浮腫高度、蛋白尿10 g/dl前後、血清総蛋白3 g/dl、IgG↓、 $\lambda$ 型M蛋白血症(疑)、尿中 $\lambda$ 型BJP陽性、骨髓形質細胞比率15.8%を認め、MP療法3クール施行、7月15日より血液透析を開始した。死亡1カ月前にはうっ血性心不全が進行し、低血圧、胸水貯留、呼吸不全を来した。9月19日、心室頻拍が出現し死亡した。

主要剖検所見：(1) 骨髓は軽度過形成性で、造血細胞は3系とも認められ、G/Eは正常範囲であった。形質細胞(plasma cells~plasmablasts)比率は20~30%と推定された。(2) 腎重量は160:144 gで、全ての糸球体、及び皮質間質に高度のアミロイド沈着を認めた。沈着アミロイドは、過マンガン酸カリウム消化試験に抵抗性で、抗ヒト $\lambda$ 型AL蛋白抗体を用いた免疫染色で陽性に染色された。(3) 心重量は365 gで、血管周囲、及び心筋線維間質に、カルシウム沈着を伴う高度のアミロイド沈着を認めた。(4) 脾重量は180 gで、実質はほぼ全てアミロイドに置換されていた。

(5) その他、肝(1800 g)、甲状腺(21 g)、消化管、子宮壁等の全身臓器に、中等度~高度のアミロイド沈着を認めた。

考察：本症例は、剖検により腎、心に高度

のアミロイド沈着を認め、これが生前認められた高度のネフローゼ症候群、及びうっ血性心不全を引き起こしたと考えられる。直接死因は、心アミロイドーシスによる心室頻拍と考えられる。

凍結保存臓器：腎、肝、脾、子宮

症例6 (京大医学部附属病院病理部)：

臨床経過：患者は55歳男性で、死亡10カ月前の1998年8月、ドックにて心電図異常を指摘された。その後は、無症状で経過。1999年2月呼吸困難感が出現し、関西医科大学で心カテーテル検査を施行され、左室求心性肥大を指摘された。3月より胸水増加と呼吸困難感増悪し、心エコー上著明な拡張能低下と尿中BJP( $\lambda$ 型M蛋白)陽性より、同年4月心アミロイドーシスと診断された。5月12日京都大学第3内科へ転院時、血圧92/63mmHg、両側肺野に湿性ラ音を認め、心収縮期雑音、両下肢浮腫、肝腫大を認めた。心胸郭比の拡大(65%)、肺うっ血、両側胸水を認め、心電図で不完全右脚ブロックを認めた。血清総蛋白6.1g/dl、Alb 3.5 g/dl、BUN 27↑、Cre 1.3↑、 $\gamma$ -GTP 626IU/L↑、ALP 1108 IU/L↑、尿蛋白定性3+であった。転院後、心不全に対し利尿剤・カテコラミン・血管拡張薬を併用したが症状の改善は認められず、5月22日より、心室頻拍・心房細動・洞停止に対し抗不整脈薬も使用した。6月2日血圧低下・心停止を契機に腎不全・肝機能障害出現し、無尿になったため腹膜透析・血液透析を施行した。6月3日ペースメーカー挿入。6月14日腹壁脂肪織ならびに直腸生検を施行し、いずれもアミロイ

ドの沈着を確認した。6月17日再度心停止を来し、翌18日死亡した。

主要剖検所見：(1) 骨髄は正形成性で造血細胞は3系とも認められ、G/Eはほぼ正常範囲であった。形質細胞比率は約5%で、小増殖巣を散在性に認めた。免疫染色にて抗 $\lambda$ 抗体陽性細胞が抗 $\kappa$ 抗体陽性細胞に比べ有意に多く認められ、前者の胞体内には抗 $\lambda$ 抗体陽性の硝子様沈着物を認めた。

(2) 脾重量は252gで、白脾髄、及び赤脾髄脾索に高度のアミロイド沈着を認めた。

(3) 心重量は426gで、高度の求心性左室肥大(左室壁厚1.8cm)、及び両心房内に血栓を認めた。組織学的に、血管周囲、及び心筋線維間質に高度のアミロイド沈着を認めた。(4) 肝重量は1356gで、小葉中心静脈を中心とする類洞内、及びグリソン鞘域血管壁に中等度のアミロイド沈着を認めた。毛細胆管～介在部に中等度の胆汁うっ滞を認めた。(5) 舌、副腎皮質、及び甲状腺に中等度のアミロイド沈着を認めた。(6) その他全身諸臓器の主として血管壁に、軽度のアミロイド沈着を認めた。

考察：本症例は、剖検により心室壁血管周囲、及び心筋線維間質に高度のアミロイド沈着を認め、これが生前認められた著明なうっ血性心不全、洞停止、及び心室性頻拍を引き起こしたと考えられる。直接死因は、心アミロイドーシスによるうっ血性心不全・心室頻拍より循環不全を来し、腎不全、肝不全を併発したと考えられる。

凍結保存臓器：心、肝、脾

#### ALアミロイド線維の精製：

上記症例の新鮮凍結組織(症例2：肺、

症例3：脾、症例6：脾)を4℃で解凍、はさみにて小片に切断後、Pras法にて粗抽出し、さらに $10^5 \times g$ 超遠沈、及び50-60%不連続ショ糖密度勾配超遠沈によりALアミロイド線維を精製した(Naiki & Gejyo. Methods Enzymol 309:305-317, 1999)。

#### ALアミロイド蛋白の精製：

精製ALアミロイド線維の一部を可溶性バッファー(6M尿素, 20mM Tris-HCl, pH8.2, 5mM EDTA, protease inhibitor cocktail)中、4℃で、24~36時間可溶化した後、ゲルクロマトグラフィー

(Pharmacia HiPrep™ Sephacryl S-200, カラムサイズ：1.6×60 cm, 溶出バッファー：6M尿素, 20mM Tris-HCl, pH8.2, 5mM EDTA, 100mM NaCl, 4℃)で分子量別に単体AL蛋白を分画、精製した。

#### ALアミロイド線維の電顕的解析：

精製ALアミロイド線維の形態は、1%燐タングステン酸(pH 7.0)でネガティブ染色後、透過電顕(Hitachi H-7000)にて観察した。加速電圧は75 kVであった。

#### ALアミロイド線維、及びAL蛋白の電気泳動、及びウェスタンブロットティングによる解析：

精製ALアミロイド線維、及びAL蛋白の蛋白組成は、還元条件下あるいは非還元条件下にTricine-SDS-PAGE法により解析した(Schägger & Jagow. Anal Biochem 166:368-379, 1987)。ウェスタンブロットティングは定法に従い、PVDF膜(ミリポア社)に転写した蛋白バンドを、抗ヒト $\lambda$ 抗

体で染色した。

### C. 研究結果

(i) 電子顕微鏡を用いた形態学的観察により、症例3で、若干の無構造な不純物を認めるものの、幅約10 nm、らせん構造を持つALアミロイド線維を確認した(図1)。データは示さないが、症例2、6でも同様なALアミロイド線維を得た。

(ii) 還元条件下にTricine-SDS-PAGE法を行い、各精製ALアミロイド線維溶液中に、分子量約14.5、16.5、19.0、23.5、及び57kDa(症例2)、10.2、10.3、10.6、11.1、26.0、及び57kDa(症例3)、16.5、18.5、23.0、及び57kDa(症例6)のバンドを認めた。ウェスタンブロッティングを行い、各症例とも57kDa以外のバンドは、抗ヒトλ抗体で陽性に染色された。

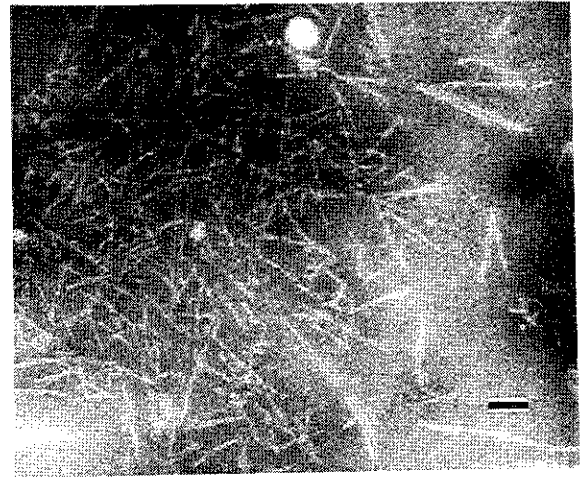


図1 精製ALアミロイド線維の電顕像(症例3)。基準線は100nmを示す。

(iii) 図2に、症例2におけるゲルクロマトグラフィーパターン、及びNo.6-9フラクションの非還元条件下Tricine-SDS-PAGEならびに抗ヒトλ抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果を示す。No.6、7のフラクションは、ほぼ完全なλ鎖、及

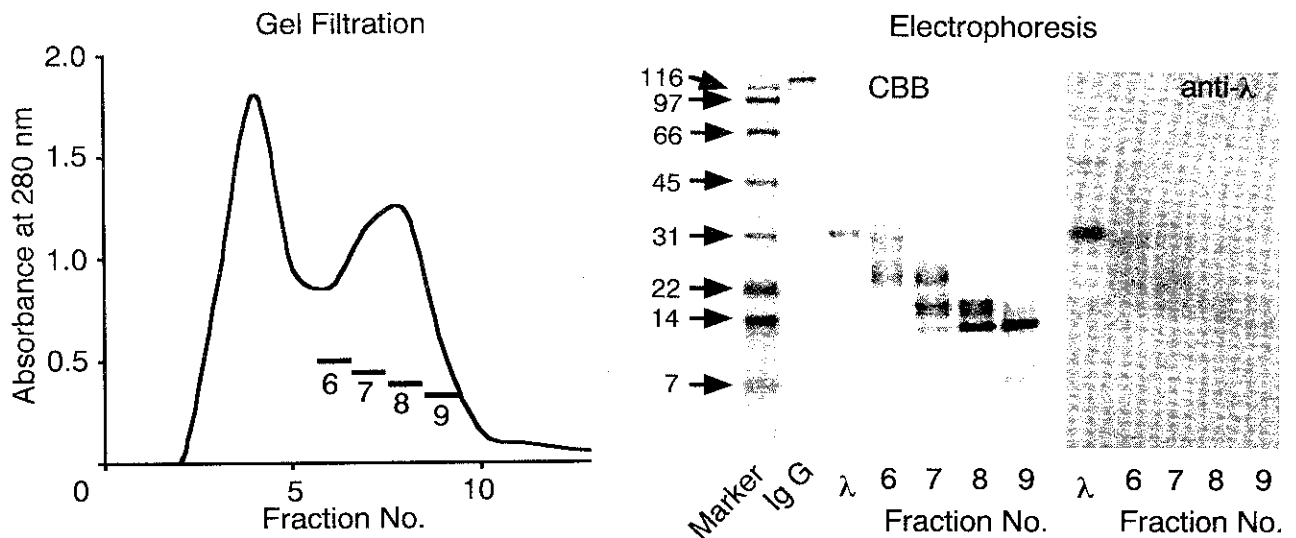


図2 症例2におけるゲルクロマトグラフィーパターン、及びNo.6-9フラクションの電気泳動ならびに抗ヒトλ抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果

び複数の高分子 $\lambda$ 鎖フラグメント、No.8、9のフラクションは、複数の低分子 $\lambda$ 鎖フラグメントで構成されていた。症例2と同様、症例3、及び6でも、各フラクションとも複数の $\lambda$ 鎖フラグメントのバンドを認めた。しかしバンドの数、及び分子量は、症例ごとに異なっていた。

#### D. 考察

各症例から精製されたALアミロイド線維の電気泳動、及びウェスタンブロッティングの結果、いずれのアミロイド線維もほぼ完全な $\lambda$ 鎖を含む複数の $\lambda$ 鎖フラグメントから構成され、しかも症例ごとに各フラグメントの分子量が異なっていた。一般にALアミロイドーシスは、腫瘍性形質細胞の分泌するモノクローナルな軽鎖が、蛋白分解酵素による限定分解を受けた後にアミロイド線維に重合し、組織に沈着するとされている。上記結果は、AL蛋白の一次構造が症例ごとに異なっているため、蛋白分解酵素による限定分解に多様性が生じたことを示唆している。さらに上記結果は、分子量の異なる複数の $\lambda$ 鎖フラグメントが、アミロイド線維形成に不可欠の共通領域（おそらく可変領域）を介して1本のアミロイド線維を構成することを示唆しており興味深い。しかし、各分子量の $\lambda$ 鎖フラグメントが、それぞれ単一な蛋白組成のアミ

ロイド線維を形成し、全体として蛋白組成の異なるアミロイド線維の集合が組織に沈着している可能性も否定できず、さらに検討を加える必要がある。

#### E. 結論

全身性ALアミロイドーシス剖検症例の新鮮凍結臓器より、ALアミロイド線維、及びAL蛋白を精製、解析した。今回、各症例の、1)チオフラビンTを用いたヒトALアミロイド線維分光蛍光定量法を確立するための標準物質を得、2)ALアミロイド線維伸長の反応速度論的解析に不可欠の重合核、及びAL蛋白を精製した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、下条文武、上田孝典、内木宏延：試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索 II—試験管内線維伸長の反応速度論的解析. 厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成11年度研究報告会 平成12年2月3-4日 東京.

## 試験管内 AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析

分担研究者 内木宏延 福井医科大学病理学第二講座教授

研究協力者 高橋直生<sup>1,2</sup>、長谷川一浩<sup>1</sup>、山口 格<sup>1</sup>、下条文武<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福井医大第二病理、<sup>2</sup>新潟大学第二内科

### 研究要旨

試験管内 AL アミロイド線維形成を反応速度論的に解析する実験系を確立するため、3 例の AL アミロイドーシス剖検例の新鮮凍結臓器より精製した AL アミロイド線維を用い、蛍光色素チオフラビン T (ThT) を用いたヒト AL アミロイド線維分光蛍光定量法を確立した。(i) AL アミロイド線維に結合した ThT の極大励起・蛍光波長は、症例 2 : 440-486 nm、症例 3 : 450-485 nm、症例 6 : 437-488 nm であった。(ii) それぞれの AL アミロイド線維に対する ThT の Kd 値は、症例 2 : 約 1  $\mu$ M、症例 3 : 約 0.9  $\mu$ M、症例 6 : 約 1.5  $\mu$ M であった。次に、各症例より精製した AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を用い、AL アミロイド線維伸長反応を速度論的に解析した。

(i) いずれの症例も、線維伸長反応は酸性領域（症例 2 : pH 2.5、症例 3 : pH 3.5、症例 6 : pH 2.0）で最も起こりやすく、ほぼ完全な入鎖に比べ、そのフラグメントである低分子量 AL 蛋白を用いた方が反応が起こりやすかった。(ii) いずれの症例も、低分子量 AL 蛋白を用いた線維伸長反応が、一次反応速度論モデル、すなわち既に存在する線維断端に、AL 蛋白が立体構造を変えながら次々に結合することにより起こるというモデルに従う事が証明された。(iii) 線維伸長反応において、AL アミロイド線維と AL 蛋白の間に厳密な適合性があることが示唆された。

### A. 研究目的

全身性 AL アミロイドーシスは、日本における代表的アミロイドーシスであるが、他のアミロイドーシス同様、有効な治療法はおろか発症機構の詳細は解明されていない。われわれは本プロジェクトで、AL アミロイド線維形成・沈着機構の解明、及び沈着阻害剤開発のため、試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの確立を目指している。今年度は、3 例の全身性 AL アミロイドーシス剖検例の新鮮凍結臓器より精製した AL アミロイド線維、

及び AL 蛋白を用い、蛍光色素チオフラビン T (ThT) を用いたヒト AL アミロイド線維の分光蛍光定量法を確立、さらにこれを用いて試験管内 AL アミロイド線維伸長機構を反応速度論的に解析したので報告する。

### B. 研究方法

#### AL アミロイド線維、及び AL 蛋白の精製：

3 症例の全身性 AL アミロイドーシス剖検例（症例 2 : 57 歳女性、症例 3 : 44 歳女性、症例 6 : 55 歳男性、いずれも IgG-



λ型) の新鮮凍結臓器 (症例 2 : 肺、症例 3 : 脾、症例 6 : 脾) より AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を精製した (下条文武ら、新鮮凍結臓器からの AL アミロイド線維ならびに AL 蛋白の精製、及び電顕的・生化学的解析、本研究報告書)。

#### AL アミロイド線維分光蛍光定量法 :

(i) 分光蛍光定量のための反応溶液は容量 1.0 ml で、0-5  $\mu$ M ThT (和光純薬)、及び 50 mM glycine-NaOH, pH 8.5 を含んでいた。(ii) 分光蛍光定量は、Hitachi F-4500 分光蛍光光度計を用い、定量モードで行った(Naiki & Gejyo. Methods Enzymol 309:305-317, 1999)。(iii) 蛋白定量は、ウシ  $\gamma$ -グロブリンをスタンダードに用い、Bladford 法で行った。

#### AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析 :

(i) 各症例より得られた AL 蛋白画分を、超音波により断片化した精製 AL アミロイ

ド線維と共に 37°C で反応させた(Naiki & Gejyo. Methods Enzymol 309:305-317, 1999)。反応溶液は容量 30~40  $\mu$ l で 60~100  $\mu$ g/ml AL アミロイド線維、30  $\mu$ M AL 蛋白、50 mM バッファー(pH 1.5~8.5)、100 mM NaCl、及び 0.3 M 尿素を含んでいた。(ii) アミロイド線維伸長を、電顕を用いた形態的観察、及び上記分光蛍光定量法によりモニターした。(iii) 伸長反応の至適 pH、及び伸長初速度に及ぼすアミロイド線維の数濃度、あるいは AL 蛋白濃度の影響の検討も行った。

#### C. 研究結果

##### AL アミロイド線維分光蛍光定量法 :

(i) AL アミロイド線維に結合した ThT の極大励起・蛍光波長は、症例 2:440-486 nm、症例 3:450-485 nm、症例 6:437-488 nm であった。(ii) 蛍光値は反応溶液の pH に依存し、全ての症例で pH 8.5 に急峻なピークを認めた (図 1A)。

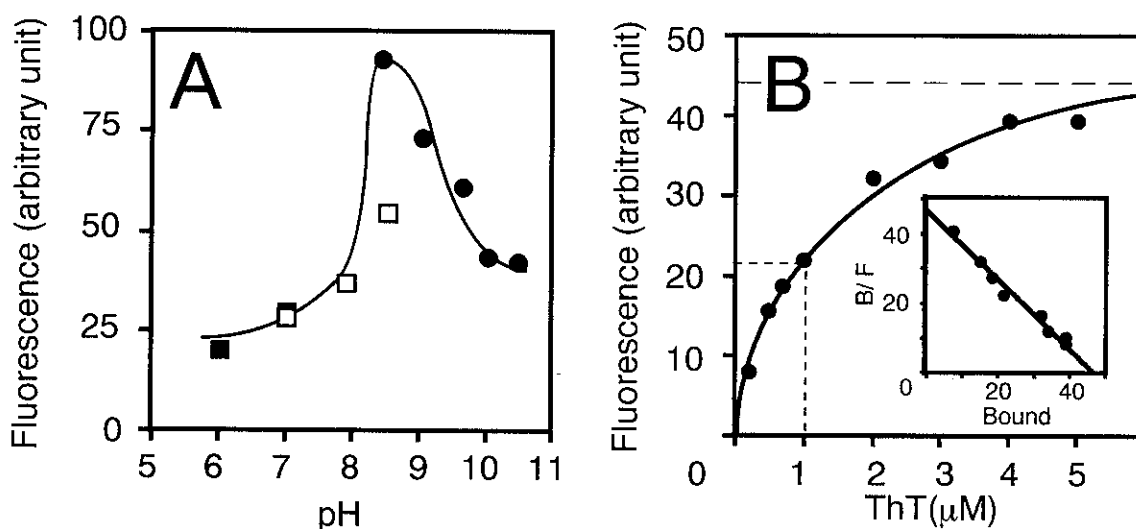


図 1 A : チオフラビン T 蛍光値の pH 依存性 (症例 3)。B : 5  $\mu$ g/ml の AL アミロイド線維 (症例 2) に対する蛍光値のチオフラビン T 濃度依存性。挿入図は Scatchard プロットを示す

(iii) 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の AL アミロイド線維に対し ThT 濃度を変化させると、いずれの症例においても蛍光値は双曲線を描いて増加し、プラトーに達した (図 1B)。

Scatchard プロットより ThT の  $K_d$  値を求めると、症例 2 : 約 1  $\mu\text{M}$ 、症例 3 : 約 0.9  $\mu\text{M}$ 、症例 6 : 約 1.5  $\mu\text{M}$  であった。単位線維量あたりの最大蛍光量  $B_{\text{max}}$  は、症例 2 : 9.5 arbitrary unit/ $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、症例 3 : 16 arbitrary unit/ $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、症例 6 : 5.8 arbitrary unit/ $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。(iv) 至適条件下で、5  $\mu\text{M}$  の ThT に対し AL アミロイド線維濃度を変化させた場合、蛍光強度は線維濃度に比例して変化し、これより AL アミロイド線維定量のための標準曲線を作成した。

#### 線維伸長の反応速度論的解析：

(i) 図 2 は、症例 2 より得られた異なる分子量の AL 蛋白質分と断片化アミロイド線

維による伸長反応の pH 依存性を示す。低分子量 AL 蛋白質分を含む反応は、ほぼ完全な  $\lambda$  鎖を含む高分子量 AL 蛋白質分に比べより多い蛍光量増加を示し、低分子量 AL 蛋白質分では pH 2.5 付近に明瞭なピークを認めた。症例 3、6 でも同様に、伸長反応は低分子量 AL 蛋白質分の方が起こりやすく、酸性域にピークを認めた (症例 3 : pH 3.5 付近、症例 6 : pH 2.0~2.5)。(ii) 反応速度論的解析は、いずれの症例も低分子量 AL 蛋白質分を用い、至適 pH で行った。図 3A は、症例 3 から得た低分子量 AL 蛋白質分、及び AL アミロイド線維による線維伸長反応の時間経過を示す。両低分子量 AL 蛋白質分による伸長反応とも、反応開始後蛍光はタイムラグなく増加し、やがて平衡に達した。症例 3 の場合、反応開始後 15 時間は、蛍光は直線的に増加した。従って以後の解析では、反応開始後 6 時間の蛍光量増加を症例 3 の伸長初速度と見なした。図 3B に示すように、図 3A に破線で示す平衡値  $F(\infty)$  より各時間の蛍光値

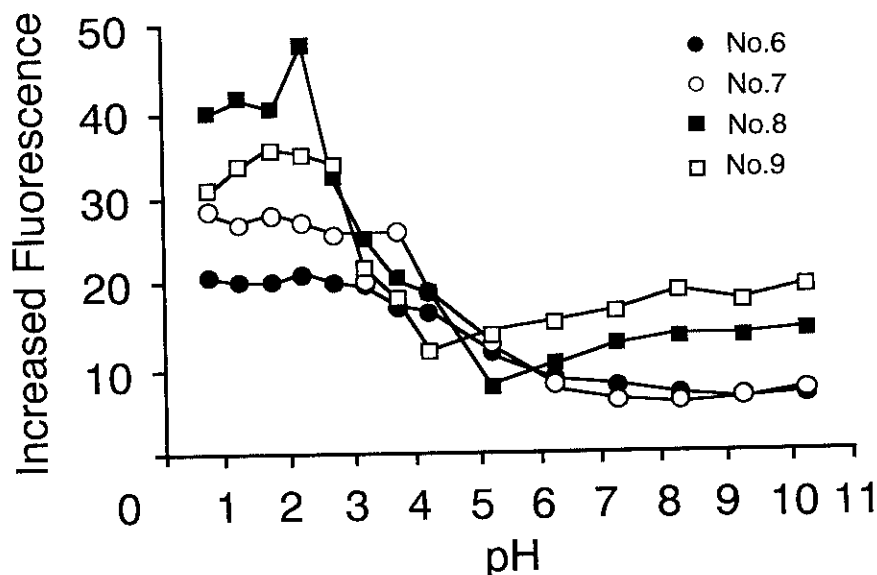


図 2 異なる分子量の AL 蛋白質分と断片化アミロイド線維による伸長反応の pH 依存性 (症例 2)。反応は 24 時間行った。フラクション番号はゲルクロマトグラフィーで得られた画分を示す (下条文武ら、新鮮凍結臓器からの AL アミロイド線維ならびに AL 蛋白質の精製、及び電顕的・生化学的解析、本研究報告書)。

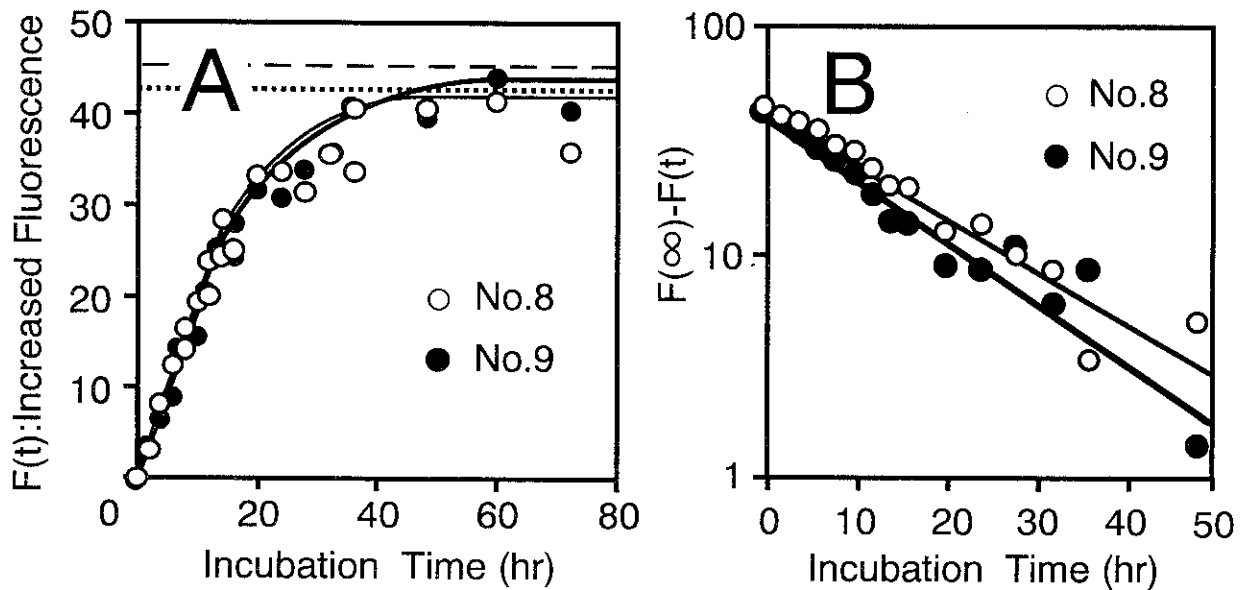


図3 症例3から得た低分子量AL蛋白画分、及びALアミロイド線維による線維伸長反応の時間経過

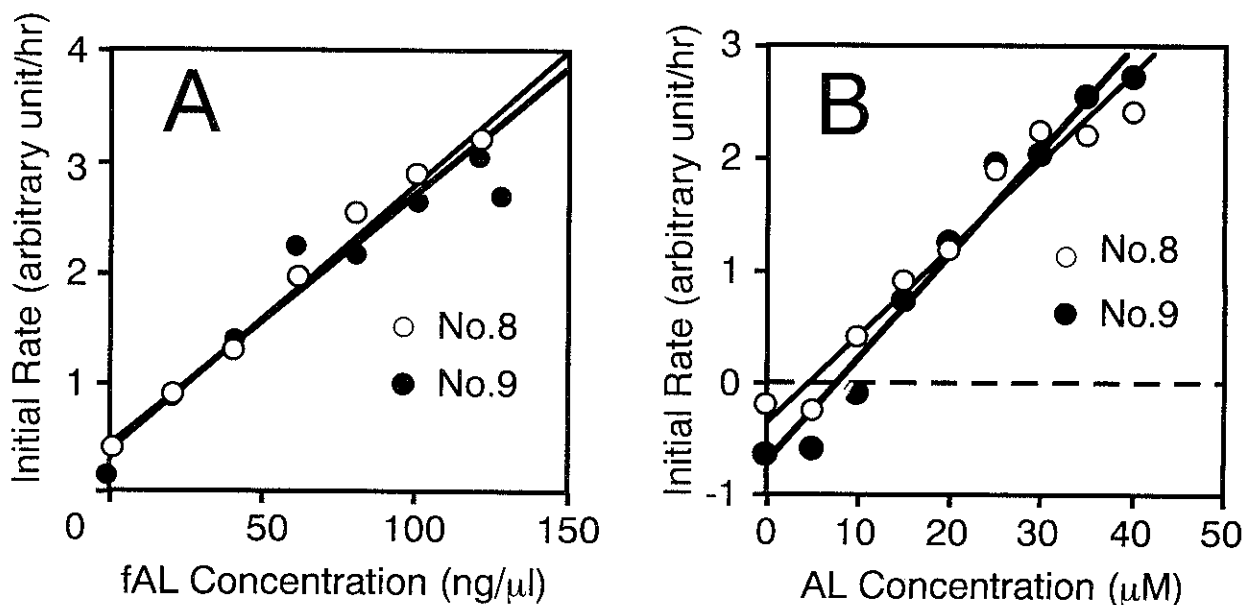


図4 伸長初速度に及ぼすALアミロイド線維数濃度(A)、及びAL蛋白濃度(B)の影響

を引いた値を反応時間と共にセミロググラフ上にプロットすると、直線が得られた。この直線を数学的に置換すると

$$F'(t) = B - CF(t) \quad (1)$$

という微分方程式が得られた。この微分方

程式の意味は後ほど考察する。(iii) 図4は、伸長初速度に及ぼすALアミロイド線維数濃度、及びAL蛋白濃度の影響を示す。伸長初速度はAL蛋白濃度が一定の場合、

ALアミロイド線維の数濃度に比例して増加した(図4A)。また伸長初速度は、ALアミロイド線維の数濃度が一定の場合、AL蛋白濃度に応じて直線的に増加した。AL蛋白濃度が0の時、初速度はマイナスの値を示したが、これはALアミロイド線維の脱重合が起こったことを示している。x軸をy切片上まで平行移動すると、1)重合初速度はAL蛋白濃度に比例し、2)各AL蛋白濃度での伸長初速度は、重合初速度と脱重合速度(一定)の和で表されることが明らかになる。症例2、6でも、同様な一連のグラフを得た。(iv)線維伸長反応におけるALアミロイド線維とAL蛋白の適合性を検討したところ、異なる症例から得られたALアミロイド線維とAL蛋白を48時間反応させても、伸長反応はほとんど起こらなかった。

#### D. 考察

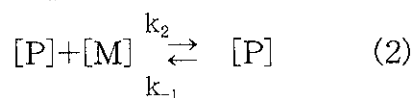
今回検討したALアミロイド線維に結合したThTの極大励起・蛍光波長は、これまでに解析した種々のヒト、及びマウスアミロイド線維の極大励起・蛍光波長(Ex: 446-455 nm, Em: 482-490 nm)とほぼ同じであり(Naiki & Gejyo. *Methods Enzymol* 309:305-317, 1999)、ThTがアミロイド線維の共通構造に結合して蛍光を発すると考えられた。また、これまでに解析した種々のヒト、及びマウスアミロイド線維のKd値は35 nM~1.1 μMであったが、ALアミロイド線維の場合も0.9~1.5 μMと症例により異なっていた。アミロイド線維上に存在するThTとの結合部位の立体構造が、異なるアミロイド線維、あるいは異なる症

例間で微妙に異なっているため、上記Kd値の違いが生じたと考えられる。

線維伸長反応は、いずれの症例でも酸性域にそのピークを認めた。興味深いことに、β2-ミクログロブリン関連アミロイド線維の伸長速度も、同様に酸性域(pH2.5)で最大になる(Naiki & Gejyo. *Methods Enzymol* 309:305-317, 1999)。AL蛋白、β2-ミクログロブリンは、いずれも免疫グロブリンスーパーファミリーに属しており、これら共通のドメイン構造を持つ前駆蛋白からのアミロイド線維形成には、共通する分子機構が存在すると推定される。

低分子量AL蛋白画分を含む線維伸長反応は、ほぼ完全な鎖を含む高分子量AL蛋白画分に比べ相対的に起こり易かったが、これは高分子量画分内に共存する他の分子による阻害の可能性もあり、今後さらに精製されたAL蛋白を用いた検討が必要である。

今回解析したALアミロイド線維の伸長が、以下の一次反応速度論モデルで表されると仮定する。



[P]はアミロイド線維の数濃度、[M]はAL蛋白濃度、 $k_2$ 、 $k_{-1}$ は重合、脱重合の速度常数である。ここでtを反応時間、f(t)を反応時間中に線維に組み込まれたAL蛋白濃度、 $[M]_0$ をAL蛋白の初期濃度とすると、式(2)は、

$$f'(t) = k_2[P][M] - k_{-1}[P] \quad (3)$$

$$[M] = [M]_0 - f(t) \quad (4)$$

と表される。すなわち、任意の時間における伸長速度 $f'(t)$ は、重合速度 $k_2[P][M]$

と脱重合速度 $-k_{-1}[P]$ の和で表され、任意の時間における AL 蛋白濃度 $[M]$ は、 $[M]_0$ と  $f(t)$ の差で表される。式(4)を式(3)に代入すると、

$$f'(t)=D-Ef(t) \quad (5)$$

という微分方程式が得られる。これは、(1)の微分方程式と同じであり、AL アミロイド線維伸長が一次反応速度論モデルに従うことが証明された。

さらに、式(3)、(4)より、伸長初速度は次の等式で表される。

$$f'(0)=k_2[P][M]_0-k_{-1}[P] \quad (6)$$

図 4 に示すように、1) 伸長初速度は AL アミロイド線維の数濃度に比例し、2) 重合初速度は AL 蛋白濃度に比例し、3) 各 AL 蛋白濃度での伸長初速度は、重合初速度と脱重合速度（一定）の和で表された。これらのデータは式(6)に一致する。

以上より、AL アミロイド線維伸長は、マウス老化アミロイド線維、アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維、及び $\beta$ 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維同様、一次反応速度論モデルに従う事が証明された。

## E. 結論

今回我々は、ThT を用いたヒト AL アミロイド線維の分光蛍光定量法を確立、さらにこれを用いて、試験管内 AL アミロイド線維伸長が一次反応速度論モデルにより説明できることを明らかにした。また AL アミロイドーシスの場合、症例ごとの多様性を認めるものの、一つの疾患単位としての共通性が存在していた。さらに線維伸長反応において、AL アミロイド線維と AL 蛋白の間に厳密な適合性があることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、下条文武、上田孝典、内木宏延：試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索 II—試験管内線維伸長の反応速度論的解析。厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成 11 年度研究報告会 平成 12 年 2 月 3-4 日 東京

## 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
J. Biol. Chem. 274(21):15110-15114, Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid $\beta$ -protein in cell culture.	1999年5月21日	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.	Mizuno, T., Nakata, M., Naiki, H., Michikawa, M., Wang, R., Haass, C., Yanagisawa, K.
Methods Enzymol. 309:305-318, Kinetic analysis of amyloid fibril formation.	1999年	Academic Press	Naiki, H., Gejyo, F.
Amyloid 6(4):256-264, Modification of $\beta$ 2-microglobulin with D-glucose or 3-deoxyglucosone inhibits A $\beta$ 2M amyloid fibril extension in vitro.	1999年12月	Parthenon Publishing	Hashimoto, N., Naiki, H., Gejyo, F.
Biochemistry 38(47):15514-15521, Interaction between A $\beta$ (1-42) and A $\beta$ (1-40) in Alzheimer's $\beta$ -amyloid fibril formation in vitro.	1999年11月23日	American Chemical Society	Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Omata, S., Gejyo, F., Naiki, H.