

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：14202
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K05207
研究課題名(和文) アミロイド オリゴマー顕微解析によるアルツハイマー病薬効候補物質の役割の解明

研究課題名(英文) Microscopic analysis of amyloid beta oligomers to elucidate the function of candidate medicinal agents for Alzheimer's disease

研究代表者
成瀬 延康 (Naruse, Nobuyasu)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30350408
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、電気泳動実験と、代表的なナノスケール実空間観察法である原子間力顕微鏡法(AFM)を用いてアミロイドペプチド(A β)の5量体を均一に作製する方法を確立した。続いて、この5量体と相互作用し、凝集を抑制する化合物候補として、クルクミンとその誘導体に着目し、AFM像で観察されたA β の5量体との相互作用を統計解析した結果、クルクミンはこの5量体をモノマーにまで分解したが、クルクミン誘導体の一部は分解しない結果を得た。この違いが生じた理由は、クルクミンがもつケト・エノール互変異性によるものと考察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クルクミンは、A β の5量体を直接モノマーにまで分解するという証拠を実空間観察手法と電気泳動実験で示した点と、クルクミン誘導体の一部で5量体の分解が起こらないことを見出した。これらの結果は、5量体の分解にクルクミンの互変異性が関連していることを意味しており、大きな成果である。この成果は、今後のアルツハイマー病の初期に患者の脳に形成されると想定されているA β のオリゴマーを分解するには、ケト・エノール互変異性を有する化合物が有用であることを示しており、予防薬開発に繋がらう成果と言える。

研究成果の概要(英文)：Using electrophoresis experiments and atomic force microscopy (AFM), a typical nanoscale real-space observation method, we established a homogeneous incubation method for amyloid β -peptide (A β) pentamer. Statistical analysis of the interaction of curcumin and its derivatives with the pentamer, focusing on the height of the pentamer observed in AFM images, showed that curcumin disassembled the pentamer to monomers, while some curcumin derivatives did not. This difference can be attributed to the keto-enol tautomerism of curcumin.

研究分野：表面科学

キーワード：アミロイド オリゴマー 走査プローブ顕微鏡 統計解析 クルクミン クルクミン誘導体

1. 研究開始当初の背景

繊維状のアミロイドβ (Aβ) の前段階に形成されるオリゴマー (AβO) が、アルツハイマー病 (AD) の引き金となる異常代謝を引き起こす原因物質との説が注目されている。さらに、Aβモノマーのn量体 (n>2) からなるAβOが、強い神経細胞毒性やシナプス機能障害を有するとの報告がある。そのため、AβOの詳細な構造と、線維形成の初期過程の理解が、AD治療法確立・薬剤開発に向けた重要な知見になるはずだが、それは難航している。その理由は、AβOは、1) 準安定構造であり容易に凝集すること、2) 神経毒性をもつ線維へと成長するAβOと、成長しないものの両方が多種多様に混在すること、さらに、3) 溶液中の微量金属・pH・温度・緩衝液などで容易に構造が変化するためである。ゆえに均一な結晶が作りやすく、構造解析手法で主流のX線回折法や核磁気共鳴 (NMR) など、平均的構造評価手法では構造評価が難しい。そのため、AβOの構造モデルは、数々の手法により提唱されているが広く受け入れられてはいない。線維形成の初期過程の理解やADの薬剤開発も停滞している。

最近、プロリン置換法、電子スピン共鳴法、固体NMR法を駆使して神経細胞毒性を有するAβ40やAβ42の2量体の構造モデルが提唱された。主鎖の毒性構造までもマウスに投与して明らかにしており大きな知見と言える。しかし、その議論は2、3量体の構造のみに限られている上、過去の報告とはC末端の構造やコンフォメーションが異なっており、これがオリゴマー作成条件の違いなのか、複数の準安定構造の一つなのか不明である。さらにAβ42の二量体型線維の構造モデルとは異なっており、AβOの線維への成長機構を知るためにも追加の別の角度からの構造知見が必要である。

研究代表者らは、最近、走査トンネル顕微鏡法 (STM) により、水溶性の5、6、8、9、12量体のオリゴマーの高分解能観察に成功し、8、9、12量体については、3量体、4量体の積層構造に近いという新たな構造モデルを提唱した。過去に報告されたAβ線維の構造モデルによく似ており、Aβ線維成長機構の理解に迫る知見といえる。この構造モデルを多角的に検証するために、実空間観察法を駆使して、水溶性のAβOの構造を1nm以下の空間分解能で観察する方法論の確立が課題である。AβOの構造に関する知見が進展すれば、AβOの構造に直接影響を与える薬効物質候補のメカニズムの解明に向けた取り組みが可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、ナノスケール実空間観察法を駆使することで、水溶性AβOを1nm以下の分解能で直接観察するための顕微解析法を確立する。そのために、AβOのn量体の均一試料の作製方法の確立が最初の到達目標となる。さらに、これらの方法論をベースに、AβOの構造に影響を与える薬効物質候補として注目されているクルクミンおよびその誘導体を用いて、AβOの構造に影響を与えるメカニズムについて議論する。溶液中で互変異性を有すると示唆されていることから、ケト型とエノール型を取るクルクミン誘導体を自ら合成し、1) AβOのどの位置に結合あるいは影響し、2) その分解・吸着メカニズムは何かを、クルクミン誘導体添加前後のAβOの詳細な構造変化に注目し、分光法などを用いて多面的に分析する。これにより、AβOの構造に影響しうる有機化合物の条件を明確にし、AD薬剤開発への知見とすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

合成Aβ1-42ペプチドを用いたin vitroのオリゴマー化では、様々な集合体 (オリゴマーと線維) からなる調製物が得られる。この不均一性は、おそらく一過性のメタ安定性と異なる速度論的経路によるものであり、このままでは、Aβ1-42のオリゴマーに対する有機化合物の構造に与える影響を特徴づけ、評価する試みは困難であると思われる。そこで、Aβ1-42均一なオリゴマー化をするためのプロトコルを最初に探索することとした。

過去に、Ahmedらは、温度、pH、塩、初期モノマー濃度などのパラメータを慎重に制御すると、5量体のAβOが優勢な集合体を形成することを示した。我々はこれを基に、インキュベーション温度やMica基板温度を精密に制御することにより、主に5量体からなる試料をMica基板上に適切な濃度で滴下する方法論を確立した。また、Aβ1-42オリゴマー化プロトコルの信頼性を、ネイティブ (BN) および変性条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を用いても評価した。また、クルクミンやクルクミン誘導体のAβOの構造への影響については、Photo-Induced Cross-Linking of Unmodified Proteins (PICUP) も併用した。

様々な条件でインキュベートしたAβOの試料の実空間観察には、原子間力顕微鏡法を用いた。この理由は、透過電子顕微鏡法 (TEM) よりも多数のAβOを後述する方法で種類別に区別して容易に統計解析できるためである。AFM像では探針の曲率半径に依存して基板平行方向の空間解像度は、基板垂直方向の精度に及ばない。そこで、AFM像に写るAβOと思われる円形コント

ラストのラインプロファイルに対するガウシアンフィッティングにより、垂直方向の高さ(分解能は0.1nm以下)を得てヒストグラム化した。この方法論を用いて、クルクミンなどの添加に伴う構造への影響を評価した。

4. 研究成果

上記のインキュベーション温度管理に注意して作製したA β Oは、変性条件下でのTricine-SDS-PAGEとウェスタンブロット分析によって評価した。ネイティブゲルでは、20kDaをわずかに超える分子サイズの強いシャープなバンドが観察され、これはA β Oに期待されるサイズと一致した。146kDa以上のバンドと20kDaと146kDaの間のスミアも観察された。変性ゲルでは、A β OはSDSによって分解され、22.5kDa、14kDa、10kDa以下の分子サイズを持つ3つのバンドが観察された。これらのバンドは、A β 1-42の5量体、3量体、単量体に期待されるサイズと一致した。BNおよびTricine-SDSゲルでの移動パターンは、以前に報告された文献と一致した。このことから、A β ペンタマーはBN-PAGEで見られるオリゴマー化の主要な生成物であることが確認できた。

A β Oと相互作用する可能性のある化合物の多くは水に溶けない。そのため、アルコールなどの界面活性剤が溶媒として必要である。いくつかのアルコールは、A β Oの3次構造および4次構造に作用して効果的に分解することが示されているが、正確な分子メカニズムはまだ不明である。ジメチルスルホキシド(DMSO)がA β 1-40およびA β 1-42のコンフォメーションに影響を与えることが報告されているが、すでに形成されたA β Oに対するアルコールの効果は厳密にはわかっていない。そこで、A β ペンタマーの構造安定性に影響を与えることなく、溶媒として使用可能なアルコール、特にDMSOよりも効果が少ないと考えられるエタノール、の最高濃度を決定した。

AFMと電気泳動実験を組み合わせ、様々な濃度のエタノール(0から7.2M)のA β ペンタマーの構造安定性の影響を調べた。AFM画像から得られた高さヒストグラムのガウス解析は、BN-PAGE上のバンド強度と相関があり、A β Oの定量的な推定が可能であった。その結果、1.4M(8.3%)までのエタノールを添加した溶媒であれば、A β Oの安定性に定量的な影響を与えることなく使用できることがわかった。さらに高濃度のエタノールはA β Oを著しく不安定化させ、最終的にはA β Oが完全分解した。

上記の結果を基に、クルクミンを上記のエタノール以下の濃度のリン酸緩衝液に溶かし、これを溶媒として、A β ペンタマーの構造に与える影響の評価を行った。クルクミンをA β と同程度のモル比でA β ペンタマーの溶液に入れると、AFM像には、A β をインキュベートする前のモノマーの高さに相当するコントラストが観察されるようになった。この結果は、PICUPの実験からも支持された。一方、入れない場合には、A β ペンタマーの2層分の高さをもつA β Oが成長した。つまり、クルクミンは、A β ペンタマーを分解するという結果である。

これらの観察から、クルクミンがどのようにしてA β ペンタマーの分解を促進するのかという疑問が生じる。過去の文献から、これらが、クルクミンのケト・エノール互変異性に因るとの議論があるため、この説に注目した。Shiga-Y51は、互変異性化できないクルクミンの構造類似体であり、常にケト型の下にある。A β ペンタマーを含む溶液にShiga-Y51を添加した場合のAFM像は、クルクミンの場合のそれよりも大きなサイズの円形状コントラストを示した。コントラストの高さをガウスフィット解析しヒストグラム化したところ、2つのピークが確認された。クルクミンと結果と比較すると、このピークは単量体およびA β ペンタマーであるとわかった。この実験から、Shiga-Y51はA β ペンタマーを分解できないことが示された。この結果は、A β ペンタマーの構造をクルクミンが直接分解するという証拠を得た点で大きな成果である。

クルクミンのような疎水性化合物は水溶液中でエンタルピー的に不利なため、これらの化合物は疎水性部位に捕捉される可能性がある。このとき、ケト型の構造は、よりエンタルピー的に有利なエノール型構造へと変化しうる。エノール型の構造がケト形より平坦な構造であることから、ペンタマーを構成するモノマーを分離する方向へと力がはたらくと推測される。こうした分解メカニズムの推測は、今後分子動力学法などでの理論計算などによって確認していく必要があるが、オリゴマーの分解にクルクミンの互変異性が関係しうる実験的証拠を得た点において、本研究は、今後のアルツハイマー病の治療薬開発に繋がりうる大きな成果といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naruse Nobuyasu, Satooka Hiroki, Todo Kagefumi, Nakanishi Akio, Taguchi Hiroyasu, Mera Yutaka	4. 巻 58
2. 論文標題 Oligomers imaging of amyloid- <i>1-42</i> by scanning tunneling microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 S11B30 ~ S11B30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7567/1347-4065/ab203b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsui Atsuya, Bellier Jean-Pierre, Kanai Takeshi, Satooka Hiroki, Nakanishi Akio, Terada Tsukasa, Ishibe Takafumi, Nakamura Yoshiaki, Taguchi Hiroyasu, Naruse Nobuyasu, Mera Yutaka	4. 巻 23
2. 論文標題 The Effect of Ethanol on Disassembly of Amyloid- 1-42 Pentamer Revealed by Atomic Force Microscopy and Gel Electrophoresis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 889 ~ 889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23020889	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 A. Matsui , H. Satooka , H. Taguchi , N. Naruse , Y. Mera
2. 発表標題 Threshold Concentration of Alcohol Affecting Amyloid- 1-42 Oligomeric Structures
3. 学会等名 International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM28) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Kanai, H. Taguchi, N. Naruse and Y. Mera
2. 発表標題 Effect of Curcuminoid on Structure of Amyloid- 1-42 Oligomers
3. 学会等名 27th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM27) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Matsui, J. P. Bellier, H. Taguchi, N. Naruse and Y. Mera
2. 発表標題 Curcuminoids-induced Amyloid- disassembly assessed by electrophoresis and AFM
3. 学会等名 29th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM29) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotaro Fujii, Yohei Shinohara, Atsuya Matsui, Nobuyasu Naruse, Yutaka Mera
2. 発表標題 High-resolution imaging of small peptides on HOPG using scanning tunneling microscopy
3. 学会等名 The 9th International Symposium on Surface Science (ISSS-9) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotaro Fujii, Atsuya Matsui, Nobuyasu Naruse, Yutaka Mera
2. 発表標題 Structural Characterization of Amyloid (1-42) Oligomers on HOPG by Scanning Probe Microscopy
3. 学会等名 The 22nd International Vacuum Congress (IVC-22) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuya Matsui, Jean-Pierre Bellier, Hiroyasu Taguchi, Nobuyasu Naruse, and Yutaka Mera
2. 発表標題 Amyloid- Oligomer Transition Evaluated through Electrophoresis and Atomic Force Microscopy with Histogram Analysis
3. 学会等名 The 22nd International Vacuum Congress (IVC-22) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田口 弘康 (Taguchi Hiroyasu) (90102912)	滋賀医科大学・神経難病研究センター・特任教授 (14202)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	目良 裕 (Mera Yutaka)	滋賀医科大学・医学部医学科・教授 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------