

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16362

研究課題名（和文）金属イオン依存的に凝集するモデルペプチドを用いたA $\beta$ の毒性発現機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of amyloid-beta toxicity using model peptides which displays metal ion-dependent aggregate formation.

研究代表者

谷口 将済（Taniguchi, Masanari）

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：50710696

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）：アミロイド（A $\beta$ ）の蓄積と凝集は、アルツハイマー病の病態形成における重要な要因である。我々は、アミロイドペプチドであるA $\beta$  1-29がCu $^{2+}$ 存在下で立体構造を変化させ、神経細胞毒性を示すことを以前に明らかにした。今回、我々はA $\beta$  1-29がCu $^{2+}$ と結合するのに重要なHis残基をAla残基に改変したペプチドを用いてCDスペクトル分析を行ったところ、神経細胞に対して毒性を示すアミロイドペプチドに共通な二次構造が存在することがわかった。さらに、糖尿病の発症に関連するヒト膵島アミロイドポリペプチド（Amylin）も同様の二次構造を取ることで神経細胞毒性を発揮している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A $\beta$ と金属イオンに関する研究は全世界で精力的に行われているが、in vitro研究におけるA $\beta$ の実験的な取扱いが困難なために、保存状態や実験条件・方法がわずかに異なることによる影響が大きく、Cu $^{2+}$ がA $\beta$ の繊維形成を促進するという報告と、A $\beta$ の繊維形成を抑制するという報告が多数混在しており、A $\beta$ の凝集過程における金属イオンの具体的な役割については未だ理解されていない。本研究結果は、アミロイドペプチドが神経細胞毒性を示すために一定の構造を取ることが必要であることを示すものであり、アルツハイマー病の発症原因の解明に資することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) accumulation and aggregation are important factors in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), and several studies have shown that metal ions such as Cu $^{2+}$  and Zn $^{2+}$  play important roles in the formation and stabilization of neurotoxic A $\beta$  aggregates, but the molecular mechanisms of A $\beta$  cytotoxicity has not yet been fully elucidated. We have previously shown that the amyloid peptide A $\beta$  1-29 undergoes a conformational change in the presence of Cu $^{2+}$  and exhibits neurotoxicity. In the present study, we performed CD spectroscopic analysis using peptides in which the His residue, which is important for A $\beta$  1-29 to bind Cu $^{2+}$ , was modified to an Ala residue, and found that there is a secondary structure common to amyloid peptides that show toxicity against neurons. Furthermore, human islet amyloid polypeptide (hIAPP, Amylin), which is associated with the development of diabetes mellitus, may exhibit neurotoxicity by adopting a similar secondary structure.

研究分野：分析化学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 金属イオン

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は、記憶などの認知機能の異常を主症状とする疾患であり特徴的な病理学的所見として老人斑が見られる。老人斑は 40~42 個のアミノ酸から構成されるアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) を主要成分とする。 $A\beta$  はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から酵素により切断され、脳内で繊維化した  $A\beta$  の蓄積による神経細胞死が AD の発症に関与すると考えられてきた<sup>1)</sup>(アミロイド仮説)。また、近年の研究により可溶性の  $A\beta$  オリゴマーがアミロイド繊維よりも高い細胞毒性を示すことやシナプスの可塑性を低下させることが報告され、AD の神経細胞障害が  $A\beta$  オリゴマーによって惹起されることが示唆されている(オリゴマー仮説)。老人斑には銅や亜鉛などの金属が高濃度に含まれていることが報告されており、これらの金属が  $A\beta$  の凝集プロセスにおいて重要な役割を果たすと考えられている<sup>2)</sup>。しかしながら、 $Cu^{2+}$  が  $A\beta$  の繊維形成を促進するという報告と、 $A\beta$  の繊維形成を抑制するという報告が多数混在しており  $A\beta$  の凝集過程における金属イオンの具体的な役割については未だ理解されていない。このような相反する結果は、*in vitro* 研究における  $A\beta$  の実験的な取り扱いが困難なために、保存状態や実験条件・方法がわずかに異なることによる影響が大きいことを示している。そこで我々は、 $A\beta_{42}$  の特性を推測するために取り扱いの容易な  $A\beta$  由来のフラグメントペプチド (=FrP) を創成した。これまでに我々は  $A\beta_{1-29}$  が  $Cu^{2+}$  と結合すると構造変化と凝集を起こし、神経細胞毒性を示すことや、 $A\beta_{1-29}$  が  $Zn^{2+}$  と結合すると  $Cu^{2+}$  と結合したときよりも大きな構造変化と凝集を引き起こすが、神経細胞毒性は示さないことを明らかにしている。これらのことから  $A\beta_{1-29}$  が神経細胞毒性を発現するために、金属イオンが配位できる 3 つの His 残基が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、 $A\beta_{1-29}$  が結合する金属イオンにより性質の異なる凝集体を形成するかを明らかにすることを目的として、種々の検討を行った。 $A\beta_{1-29}$  に含まれる 3 つのヒスチジン残基 (6His, 13His, および 14His) をそれぞれアラニン残基に置換した改変体ペプチドを合成し、金属イオンとの結合能の比較 (HPLC 分析)、金属結合によるペプチドの二次構造変化の検討 (CD スペクトル分析)、およびヒト神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞に対するアポトーシス誘導能の検討 (ウエスタンブロッティング) を行った。また、糖尿病とアルツハイマー病の関連性を研究する目的で、糖尿病において膵臓細胞から分泌される凝集性ペプチドであるヒト膵島アミロイドポリペプチド (hIAPP, Amylin) に着目し、Amylin 由来短鎖ペプチド (Am1-30) を新たに合成し、凝集性と SH-SY5Y 細胞に対するアポトーシス誘導能の検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 合成アミロイドペプチドのモノマー化

本研究の実施に必要な合成アミロイドペプチドは全て GenScript 社のペプチド合成受託サービスを利用し合成した。本研究では、*in vitro* 実験においてヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) 1 mL に 1  $\mu$ mol の合成アミロイドペプチドを溶かし、37 °C で一晩インキュベートした後、5 本に分注して凍結乾燥し、200 nmol のペプチドストックとした。これを実験に用いる緩衝液もしくは細胞培養用の培地 1 mL で溶解することで 200 mM のペプチドモノマー溶液として使用した。

## (2) 金属結合能の評価

金属キレート樹脂 (50 % スラリー) 100  $\mu$ L に 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 緩衝液で溶解した 2 mM 金属塩化物溶液 200  $\mu$ L を加え 37  $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした後、上澄みを除去して Tris-HCl 緩衝液で 2 回洗浄した。次いで、Tris-HCl 緩衝液で溶解した 0.1 mM A $\beta$  ペプチド溶液 100  $\mu$ L を加えて 37  $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした後、上澄みを除去し Tris-HCl 緩衝液で 2 回洗浄した。その後、0.5 M HCl を 75  $\mu$ L 加え 10 分間振り混ぜて溶出し、上澄みを回収したものを「結合量分析用試料」とした。また、金属イオンを金属キレート樹脂に結合させず同様の操作を行ったものを「全量分析用試料」とした。作製した試料をフォトダイオードアレイ検出器付 HPLC にて分析し、結合量分析全量分析に対する結合量分析のピーク面積の比率を比較することで金属結合能を評価した。

## (3) 構造変化の評価

200  $\mu$ mol のアミロイドペプチドを 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 緩衝液 10 mL で溶解して 20  $\mu$ M のペプチド溶液とした。また、最終濃度 20  $\mu$ M となるように 100 mM CuCl<sub>2</sub> 溶液または ZnCl<sub>2</sub> 溶液を 0.4  $\mu$ L 加えた試料を調製した。円二色性分散計 (J-805) を用いてそれぞれの試料の CD スペクトルを経時的に測定し、金属結合による CD スペクトル変化を評価した。

## (4) 凝集性の評価

200  $\mu$ mol のアミロイドペプチドを 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 緩衝液 1 mL で溶解して 200  $\mu$ M のペプチド溶液とした。Thioflavin T (ThT) は最終濃度 1 mM、金属塩化物溶液は最終濃度 200  $\mu$ M となるように、それぞれ添加した。試料を 37  $^{\circ}$ C でインキュベートしながら、プレートリーダー (FP-8500) で蛍光強度を 7 日間経時的に測定した。

## (5) 神経細胞毒性の評価

実験には、ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞株を用いた。細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium:F12 (DMEM/F12) 培地を用い、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で維持した。SH-SY5Y 細胞を 6 well plate に 5.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells で播種し、最終濃度が 200  $\mu$ M となるようにアミロイドペプチドを DMEM/F12 培地で溶解し、元の培地と交換し、200  $\mu$ M の金属イオン存在下/非存在下で 48 時間培養した。その後、細胞を Phosphate buffered saline (PBS(-)) 500  $\mu$ L で洗浄し、6 M Urea を含む 1 $\times$ SDS sample buffer 100  $\mu$ L に溶解した後、95  $^{\circ}$ C で 10 分間加熱処理を行ったものを試料とした。同様の手順で細胞に 50  $\mu$ M Etoposide を添加し、24 時間培養した試料を調製し、ポジティブコントロールとした。調製した試料を SDS-PAGE により分離してウエスタンブロッティングを行った。1 次抗体として、anti-PARP(F-2) antibody (Santa Cruz)、anti-cleaved Caspase-3 antibody (CST) を用いて検出した。

## 4 . 研究成果

### (1) 金属結合能の評価

A $\beta$ 1-29 (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG)、A $\beta$ 1-29/13, 14HA (DAEFRHDSGYEVAAQKLVFFAEDVGSNKG)、および A $\beta$ 1-29/6HA (DAEFRADSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG) を用いて Cu<sup>2+</sup> および Zn<sup>2+</sup> との結合能を測定した。(図 1-a, b, c)。各アミロイドペプチドと Cu<sup>2+</sup> および Zn<sup>2+</sup> は全ての組み合わせにおいて、全量分析と同じ保持時間に結合量分析のピークが確認できたため、各アミロイドペプチドは Cu<sup>2+</sup> および Zn<sup>2+</sup> に対する結合能を有することがわかった。また、A $\beta$ 1-29/13, 14HA と Zn<sup>2+</sup>、A $\beta$ 1-29/6HA と Cu<sup>2+</sup> の組み合わせではある程度の金属結合量の減少が見られたことから、金属イオンによって結合する His 残基

の優位性が異なる可能性が示唆された。

(2) アミロイドペプチドの構造変化の評価

図 2 に Aβ1-29、Aβ1-29/13,14HA、および Aβ1-29/6HA の CD スペクトルを示した。Aβ1-29 は Cu<sup>2+</sup>との結合により二次構造の変化を示し、Zn<sup>2+</sup>との結合時には、より大きな構造変化を示した (図 2-a)。Aβ1-29/13,14HA は Cu<sup>2+</sup>との結合では構造変化が見られず、Zn<sup>2+</sup>との結合時に構造変化を示した (図 2-b)。Aβ1-29/6HA は Cu<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>との両方の金属イオンとの結合時に大きな構造変化が見られた (図 2-c)。

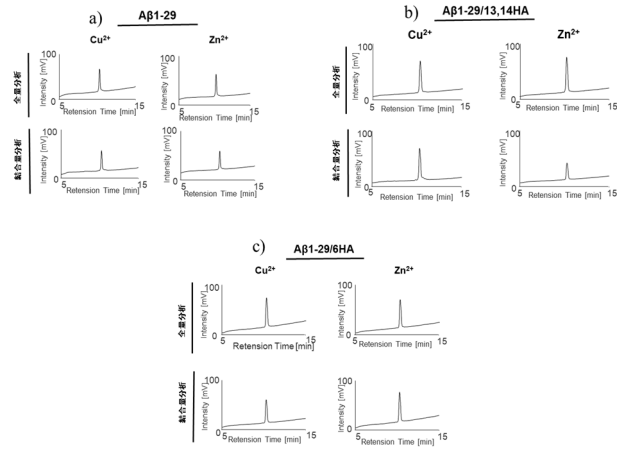


図 1 各アミロイドペプチドの金属結合性の HPLC 分析

(3) 凝集性の評価

図 3 に ThT assay により得られた各アミロイドペプチドの経時的な蛍光強度変化を示した。Aβ1-29 は Cu<sup>2+</sup>との結合によりわずかに凝集性が増大し、Zn<sup>2+</sup>との結合時には、より顕著な凝集性の増大が観察された (図 3-a)。Aβ1-29/13,14HA は Cu<sup>2+</sup> 結合時は凝集を示さなかったが、Zn<sup>2+</sup> 結合時にはわずかな凝集の促進を示した (図 3-b)。Aβ1-29/6HA は Aβ-FrP 単体でわずかに凝集性を示し、Cu<sup>2+</sup>および Zn<sup>2+</sup>が結合すると著しい凝集性の増大を示した (図 3-c)。

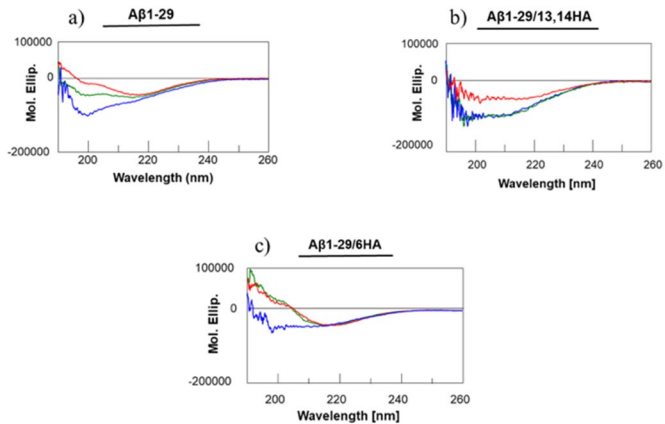


図 2 各アミロイドペプチドの CD スペクトル  
青: 未処理、緑: Cu<sup>2+</sup>存在下、赤 Zn<sup>2+</sup>存在下

(4) 神経細胞毒性の評価

SH-SY5Y 細胞にアミロイドペプチドと金属イオンを添加し培養し、Caspase-3 の活性化と PARP の断片化から神経細胞毒性を評価した。Aβ1-29 は Cu<sup>2+</sup>の共存下においてのみ Caspase-3 の活性化と PARP の断片化を示し、Zn<sup>2+</sup>共存下では示さなかった (図 4-a レーン 3)。また、Aβ1-29/13,14HA は Zn<sup>2+</sup> 結合時のみ、(図 4-a レーン 7)。Aβ1-29/6HA は金属イオン非結合時のみにおいてアポトーシス誘導を示した (図 4-b レーン 5)。

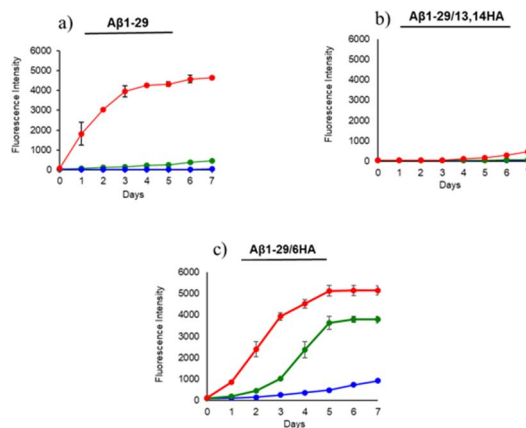


図 3 アミロイドペプチドの凝集による ThT の蛍光強度の変化  
青: 未処理、緑: Cu<sup>2+</sup>存在下、赤 Zn<sup>2+</sup>存在下

(5) 考察

図5にそれぞれのアミロイドペプチドのCDスペクトルを重ね合わせたものを示す。実践で記されたスペクトルはSH-SY5Y細胞に対して細胞毒性を示した組み合わせ(Aβ1-29 + Cu<sup>2+</sup>、Aβ1-29/13,14HA + Zn<sup>2+</sup>、および未処理のAβ1-29/6HA)である。このことから、神経細胞に対してアポトーシス誘導を發揮するためには、アミロイドペプチドが一定の二次構造を示す必要があることが考えられた。

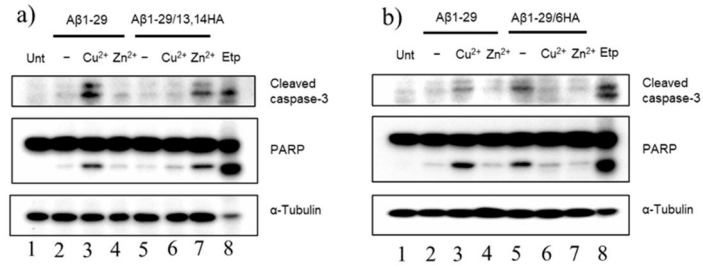


図4 アミロイドペプチドによる Caspase-3 の活性化と PARP の断片化

また、ThT の蛍光強度による凝集性の評価においても、SH-SY5Y 細胞に毒性を發現した組み合わせ(Aβ1-29 + Cu<sup>2+</sup>、Aβ1-29/13,14HA + Zn<sup>2+</sup>、および未処理のAβ1-29/6HA)は全て、わずかな凝集性の増大を示していたことがわかった(図6 実線)。

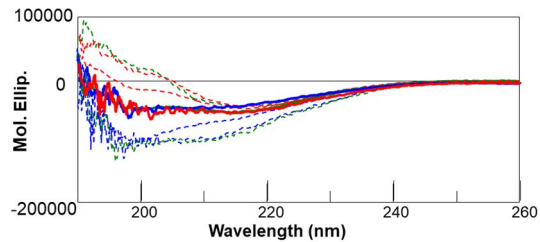


図5 アミロイドペプチドのCDスペクトル(重ね合わせ)  
青: 未処理、緑: Cu<sup>2+</sup>存在下、赤: Zn<sup>2+</sup>存在下

#### (6) ヒト膵島アミロイドポリペプチド(hIAPP, Amylin)の検討

糖尿病とアルツハイマー病の相互病態修飾およびアミロイドペプチドの関連性を研究する目的で、糖尿病において膵臓細胞から分泌される凝集性ペプチドであるヒト膵島アミロイドポリペプチド(hIAPP, Amylin)に着目し、Amylin由来短鎖ペプチド(Am1-30)の構造変化、凝集性とSH-SY5Y細胞に対するアポトーシス誘導能の検討を行った。

Aβ1-29と同様に、Cu<sup>2+</sup>の共存下においてSH-SY5Y細胞に対してアポトーシス誘導を示した(図7-a)。一方で、Amy1-30は金属イオン非存在下で著しく凝集し、Cu<sup>2+</sup>の存在によって、凝集性が抑制され、わずかな凝集を起こすようになることがわかった(図7-b)。さらに、Amy1-30自身が3時間程度で二次構造の変化を起こすのに対し、Cu<sup>2+</sup>存在下においては48時間後に非存在下とは異なる構造への変化を起こした(図7-c)。

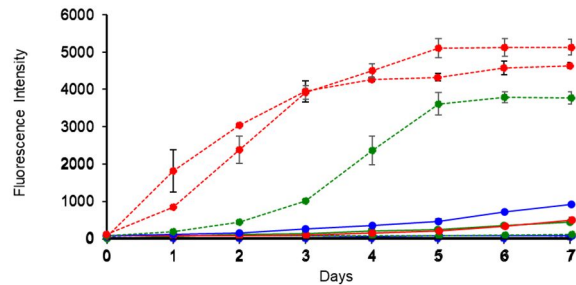


図6 アミロイドペプチドの凝集によるThTの蛍光強度の変化(重ね合わせ)  
青: 未処理、緑: Cu<sup>2+</sup>存在下、赤: Zn<sup>2+</sup>存在下

Cu<sup>2+</sup>存在下におけるAmy1-30の二次構造は、Aβ1-29が細胞毒性を示した際の二次構造にスペクトルパターンが類似していることから、Amy1-30も一体の二次構造を取ることで細胞毒性を發揮している可能性が示唆された。

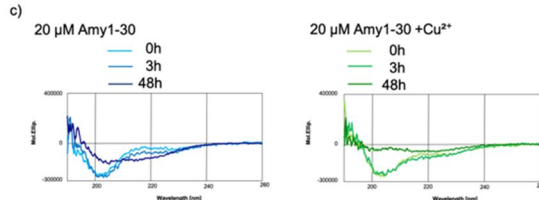
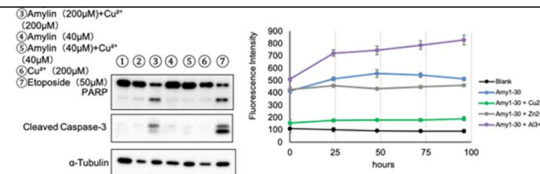


図7 Amylin由来短鎖ペプチド Amy1-30 の検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Taniguchi Masanari, Saito Mayu, Kuga Takahisa, Yamagishi Nobuyuki	4. 巻 534
2. 論文標題 Binding of Cu <sup>2+</sup> to A <sub>1-29</sub> causes aggregation and toxicity in SH-SY5Y cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 617 ~ 623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.031	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 谷口 将済, 惣馬 一貴, 川戸 満里菜, 田中 浩貴, 久家 貴寿, 山岸 伸行
2. 発表標題 A <sub>1-29</sub> の神経細胞毒性に対する金属イオンの影響.
3. 学会等名 第30回 日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanari Taniguchi, Kazuki Souma, Marina Kawato, Hiroki Tanaka, Takahisa Kuga, Nobuyuki Yamagishi
2. 発表標題 Effect of Copper and Zinc on the aggregation and cytotoxicity of the A <sub>1-29</sub> -derived fragment peptide
3. 学会等名 The 6th Meeting of International Society for Zinc Biology (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------