

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21396

研究課題名（和文）病態診断を指向したアミロイド構造多形の簡便かつ迅速な評価法の構築

研究課題名（英文）Establishment of a simple and rapid method for assessing amyloid polymorphism for pathophysiological diagnosis

研究代表者

茶谷 絵理（Chatani, Eri）

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00432493

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヨウ素分子をプローブとして、アミロイド多形を簡便かつ迅速に評価する方法の構築を目指した。インスリンアミロイド線維が呈する色調を解析し、ヨウ素染色が多形の識別法として有用であることを明らかにするとともに、メカニズムの解明を行った。さらに、本手法の活用例としてアミロイド線維が伝播する際の構造の保存や変化の追跡を行った。また複数種類のアミロイド線維のヨウ素染色も試み本手法の拡張性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイド多形は、異なる病態や感染性をもたらす構造的な要因であることが指摘されているものの、迅速かつ鋭敏に識別する方法は見出されていなかった。ヨウ素染色はアミロイド線維の構造多形を幅広く識別することが示されたことから、現状を打開し、アミロイド研究での活用だけでなく新たな病態診断法への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study has been conducted aiming to construct a simple and rapid method for identifying amyloid polymorphism. Through the analysis of insulin amyloid fibrils, we have demonstrated that iodine staining is useful for distinguishing amyloid polymorphs. Furthermore, as an application example of this method, we tracked the preservation and changes of the structure of amyloid fibrils during seeding reactions. We also tried iodine staining of multiple types of amyloid fibrils and confirmed the applicability of iodine staining to a wide range of proteins.

研究分野：タンパク質科学、生物物理学

キーワード：蛋白質 ミスフォールディング アミロイド 多形

1. 研究開始当初の背景

アミロイド線維は、タンパク質の異常凝集体の一種である。アミロイド線維は不定形な凝集とは異なり、線維状の形状と β シート構造に富んだ内部構造(クロス β 構造)を特徴的に示す。これまでの研究で、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病、筋委縮性側索硬化症などに代表されるアミロイドーシスや神経変性疾患にアミロイド線維の形成が関与することが判明している。

アミロイド線維は、単純なクロス β 構造が基本構造であるにも関わらず、細部のポリペプチド鎖構造には多様性が見られる。さらには、同じタンパク質であっても構造多形と呼ばれる分子レベルでの微細な構造の違いが存在している。アミロイド線維の構造多形(本研究では『アミロイド多形』と呼称する)は、疾患の潜伏期間や症状に関与している可能性が提唱されているため、アミロイド病の分子メカニズムの解明には、線維構造の詳細な解明が重要である。

ところが、アミロイド多形を簡便かつ迅速に識別できる手法は確立されていない。最近、クライオ電子顕微鏡と固体 NMR 解析が大きく進展したことにより、アミロイド多形が原子レベルで明らかにされるようになったが、これらの解析技術には高度な設備が必要なおうえ一つの構造解析当たりには要する時間が長い。このため、同手法の適用だけではアミロイド多形を逐一識別することが困難なのが実情である。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究ではアミロイド線維がヨウ素で染まる性質に注目し、ヨウ素染色の色調を利用してアミロイド多形を簡便かつ迅速に評価する方法を構築することを目的とした。チオフラビン T はアミロイド線維に結合すると高い蛍光強度を示すため、アミロイド線維の有用な検出手段として頻りに用いられている。しかし、チオフラビン T の蛍光スペクトル形状には顕著な多様性が見られないため、アミロイド線維の構造的な違いには鋭敏でないというのが一般見解であり、他の呈色法を探る必要がある。本研究では、その候補としてヨウ素染色に注目し、インスリンをモデルとしてアミロイド線維が呈する色調を評価することで、多形の識別法としての有用性を評価した。続いて、本手法の活用例として、アミロイド線維が伝播する際の構造の保存性や変化が可能なことを示した。さらに、インスリン以外のタンパク質から成るアミロイド線維のヨウ素染色も試み、本手法の拡張性を確認した。

また、アミロイド線維もデンプンと同様にヨウ素で染色されることは一世紀以上も前に確認されていたものの、その分子メカニズムは解明されることなく現在に至る。そこで、呈色機構の解明を行うことも目的とし、ヨウ素染色による呈色を担うポリヨウ素イオンの同定や電子状態の解析を行った。

3. 研究の方法

アミロイド多形に応じてヨウ素染色の色調が変わること、およびヨウ素染色の基本的な呈色機構に取り組む際には、ヒトインスリンをモデルタンパク質として選択し解析を行った。まず数種類の溶液条件で線維化させることでアミロイド多形を誘導した。アミロイド線維の形成確認や構造的特徴の解析は、原子間力顕微鏡あるいは透過型電子顕微鏡、チオフラビン T 蛍光、フーリエ変換遠紫外スペクトル、遠視外部の円偏光二色性スペクトルを用いて行った。アミロイド線維の形成を確認した後は、各種線維溶液をヨウ素溶液と混合し紫外可視吸収スペクトル測定を行うことで呈色と色調の確認を行い、ヨウ素染色によりアミロイド多形を識別できるか否かを検証した。さらに呈色メカニズムを明らかにするために、アミロイド線維のヨウ素滴定共鳴ラマン分光法や偏光顕微鏡を用いて線維に結合したポリヨウ素分子種の同定や線維に結合する際の

配向性の評価を試みた。続いて、ヨウ素染色の色調の違いをプローブとして、アミロイド線維の構造伝播性の追跡を行い、ウシ由来インスリンとヒト由来インスリンのシーディングに見られる線維構造の保存あるいは変化の様子を解析することにより、ヨウ素染色法の有用性を実証した。また、インスリン以外のアミロイド線維がヨウ素染色により呈色することを確認するために、実際の疾病に関わるいくつかのアミロイド原性タンパク質の線維を作製してヨウ素染色し、紫外可視吸収スペクトルを測定した。

本研究は、神戸大学大学院理学研究科の大学院生と共同で行い、紫外可視吸収スペクトルの解析は自治医科大学医学部山本直樹博士の協力を得た。また、アミロイド線維表面に形成したポリヨウ化物イオン種の同定のためのラマン散乱測定は、関西学院大学の尾崎幸洋博士、安田充博士、石垣美歌博士との共同研究として実施した。密度汎関数理論計算は、国立台湾大学林倫年博士、神戸大学理学研究科の富永圭介博士、奥田真紀博士との共同研究として実施した。また、本研究では、ヨウ素染色と並行してチオフラビン T の蛍光寿命測定も行った。本検討は、浜松ホトニクス株式会社中央研究所の里園浩博士と小田明典氏との共同研究として実施した。

4. 研究成果

(1) 新規アミロイド構造プローブとしてのヨウ素染色の有用性評価

ヨウ素染色がアミロイド構造を識別する良好なプローブとして機能可能なことを示すため、インスリンのアミロイド線維を用いた検討を行った。インスリンアミロイド線維をヨウ素で染色すると、多形に応じて異なる色調を示した。呈色は基本的に 400 - 750 nm の可視領域の 3 つの吸収バンドの総和として表され(図 1 の I-III)、線維構造の違いに応じてこれらのバンドの位置及び強度が変化することが明らかになった。さらにヨウ素滴定を行った結果、吸収バンドはヨウ素に対して異なる滴定曲線を示した。すなわち、線維にはおもに 3 つの特異的なヨウ素結合部位が存在すること、さらにその結合部位の性質は線維の種類に応じて異なることが明らかになった。

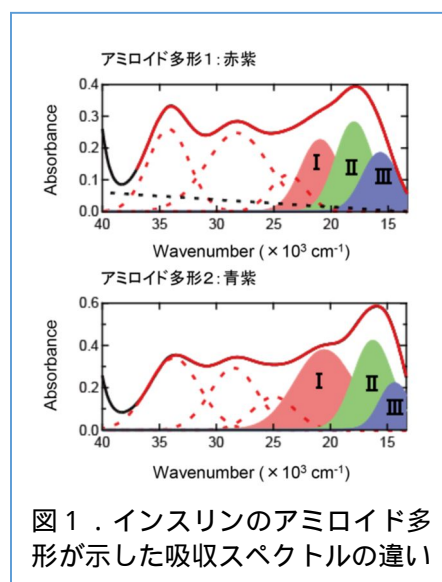


図 1 . インスリンのアミロイド多形が示した吸収スペクトルの違い

続いて、呈色に寄与する分子種の同定を行うために、共鳴ラマンスペクトル測定を行った。その結果、 107 cm^{-1} と 160 cm^{-1} 付近に 2 本の鋭いメインピークが見られ、前者は I_3 、後者は $I_2 \cdot I_3$ であると帰属された。スフェルライト構造の偏光顕微鏡観察も行い、得られた偏光像を含め考察すると、少なくとも 2 種類のポリヨウ化物イオン種がアミロイド線維に結合することで呈色するというメカニズムが明らかとなった。ヨウ素溶液には I 、 I_2 、 I_3 が含まれる。ヨウ素溶液単独ではポリヨウ化物イオンを形成することはできないが、アミロイド線維が共存すると、プリーツ状の β シート構造の溝または端を足場として $(I_3)_n$ や $(I_2 \cdot I_3)_n$ のポリヨウ化物イオンを形成し、呈色に至ることが考えられる(図 2)。このとき、形成されるポリヨウ化物の種類と立体構造はアミロイド原線維の表面構造によって決定され、結果として色調の違いが生じると推測される。以上の解析を通して、ヨウ素染色の色調を用いたアミロイド多形の識別方法の骨格を築いた。

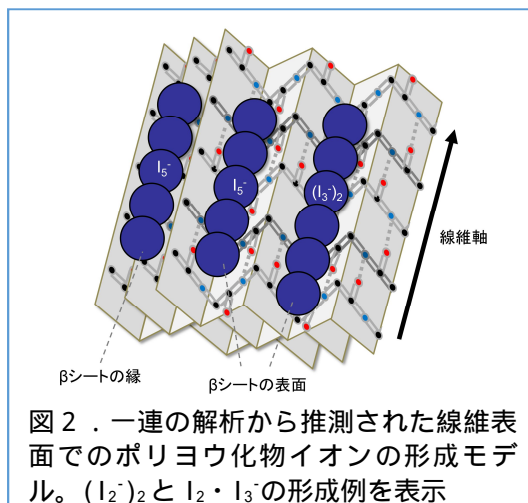


図 2 . 一連の解析から推測された線維表面でのポリヨウ化物イオンの形成モデル。 $(I_2)_2$ と $I_2 \cdot I_3$ の形成例を表示

(2) 密度汎関数計算によるヨウ素染色による呈

色メカニズムの解明

さらにヨウ素による呈色メカニズムの基本を理解するために、計算科学的手法を用いてポリヨウ素の電子遷移状態を調べた。現状では、アミロイド線維上で形成するポリヨウ化物イオンの原子レベル構造は実験的に解明されていないため、本解析では、研究の比較的進んだ α シクロデキストリン中に生成するポリヨウ化物イオンをモデルとし、メカニズム解明を試みた。X 線結晶構造解析により既に明らかにされている α シクロデキストリンのヨウ素錯体構造を初期構造として、 I_5^- と α シクロデキストリンからなる錯体の分子モデルを構築した。続いてこれを結晶軸に沿って n 個並べ、QM (ヨウ素) / MM (α -CD) 計算を用いて構造を最適化することでポリヨウ化物イオン $(I_5^-)_n$ の構造モデルを得た。その後、時間依存密度汎関数理論 (TD-DFT) によって得られたモデル構造の電子吸収スペクトルを計算し、 I_5^- 内部の電子遷移が可視領域の呈色の基本であることを示した。さらに、 I_5^- が連結して $(I_5^-)_n$ が形成される場合には、電子遷移が非局在化することも確かめ、色調の違いはポリヨウ素イオンの鎖長に由来することを示した (図 3)。

(3) シーディング反応により生成するアミロイド線維の構造追跡

続いて、ヨウ素染色を活用し、ウシとヒトという異種由来インスリンの線維構造の違いと、シーディング反応によって伸長する際に生成する線維構造の特徴を明らかにした。シーディング反応とは、アミロイド線維の断片をシードとしてタンパク質溶液に添加することにより進行する線維伸長のことである。シーディング反応において、シード構造は基本的に伸長後も保存されるとされているが、詳細は明らかにされていない。そこで解析対象として、ウシ由来およびヒト由来の 2 種のインスリンを用いて、同種のシードとタンパク質間で行うセルフシーディングと異種のシードとタンパク質間で生じるクロスシーディングを行い、生成するアミロイド線維の構造を追跡した。

まず自発的なアミロイド線維形成を誘導しヨウ素染色したところ、ウシとヒト由来では僅か 3 残基の配列の違いも関わらず、異なる紫外可視吸収スペクトル、即ち異なる線維構造が判明した。続いてこれらのアミロイド線維をシードしたシーディング反応を追跡したところ、セルフシーディングでは、アミロイ

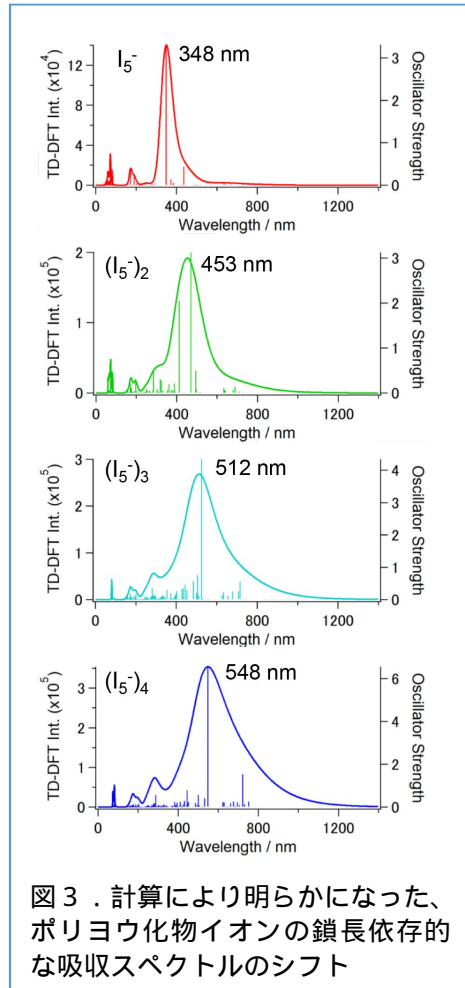


図 3 . 計算により明らかになった、ポリヨウ化物イオンの鎖長依存的な吸収スペクトルのシフト

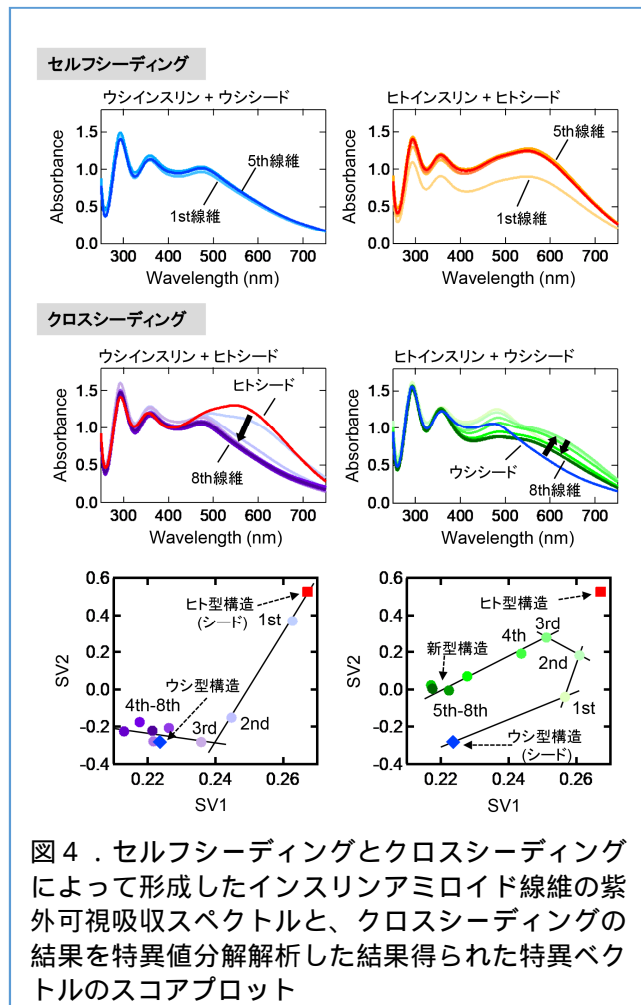


図 4 . セルフシーディングとクロスシーディングによって形成したインスリンアミロイド線維の紫外可視吸収スペクトルと、クロスシーディングの結果を特異値分解解析した結果得られた特異ベクトルのスコアプロット

ド線維構造が強固に複製されることが確認されたが、クロスシーディングでは、吸収スペクトルの形状がシーディングの繰り返しに伴い次第に変化する様子が観察され、アミロイド線維構造が変化していることが明らかになった（図4の上段と中段）。

さらに、一連の吸収スペクトルを特異値分解解析によって調べると2つの主要な特異ベクトルが得られ、シーディングの繰り返しに伴ってスコアプロットが非直線的な変化を示した（図4の下段）。この結果は、ヨウ素染色により得られる吸収スペクトルはアミロイド線維の構造変化を追跡するための良いプローブとして機能していることを示している。本解析からは、クロスシーディングにおいて異種のシードを添加すると、いくつかの構造を経ながら段階的に構造変化すること、さらには、最終的に到達する構造は必ずしも自発的に形成するアミロイド線維構造になるとは限らずより強い細胞毒性を示す新種のアミロイド線維構造が形成するという興味深い知見も得られた。

（4）様々なタンパク質のアミロイド線維のヨウ素染色の検討

さらに、インスリン以外のタンパク質への拡張性を検討するために、アミロイド β 、トランスサイレチンなどの数種類のアミロイド線維のヨウ素染色を試みた。その結果、インスリンに比べ呈色が全体的に弱いものの、酸性条件下にすることによって可視吸収領域に有意な吸収バンドを認めた。さらに予備検討の段階ではあるものの、試料中に呈色を妨げる物質が含まれる場合においても、メンブレンに試料を固定化して不要物を洗い流すことで改善できる可能性を見出した。これらのアミロイド線維については、多形の識別やシーディング反応の解析を研究期間内に達成することができなかったが、ヨウ素染色は多様なアミロイド線維構造に適用可能であることが期待される。

以上の結果より、アミロイド線維の構造を識別するプローブとしてヨウ素染色を有効活用するための基礎土台が確立した。さらに実際の適用によって、シーディング反応でのアミロイド線維の構造伝播について、細胞毒性や感染性の異なる様々なアミロイド線維構造が生体内で生成するメカニズムの一端を解き明かすことができた。今後は解析対象を様々な病原タンパク質に拡張し、アミロイド多形およびそれらの構造伝播の様子をより詳細に観察した事例を増やすことで本手法の普及を進め、最終的には、広範囲の診断サンプルにおけるアミロイド多形の検出方法へと発展させる計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Eri Chatani, Keisuke Yuzu, Yumiko Ohhashi, Yuji Goto	4. 巻 22
2. 論文標題 Current Understanding of the Structure, Stability and Dynamic Properties of Amyloid Fibrils	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22094349	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 -
1. 著者名 柚佳祐, 茶谷絵理	4. 巻 46
2. 論文標題 アミロイド線維の伝播に見られる構造の保存と変化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 C & I Commun	6. 最初と最後の頁 1921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Masaki Okuda, Takato Hiramatsu, Mitsuru Yasuda, Mika Ishigaki, Yukihiro Ozaki, Michitoshi Hayashi, Keisuke Tominaga, Eri Chatani	4. 巻 124
2. 論文標題 Theoretical modeling for electronic structure of polyiodide species included in α -cyclodextrin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 4089-4096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c01749	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 該当する
1. 著者名 Takato Hiramatsu, Naoki Yamamoto, Seongmin Ha, Yuki Masuda, Mitsuru Yasuda, Mika Ishigaki, Keisuke Yuzu, Yukihiro Ozaki, Eri Chatani	4. 巻 10
2. 論文標題 Iodine staining as a useful probe for distinguishing insulin amyloid polymorphs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 16741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73460-y	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 -

1. 著者名 Keisuke Yuzu, Naoki Yamamoto, Masahiro Noji, Masatomo So, Yuji Goto, Tetsushi Iwasaki, Motonari Tsubaki, Eri Chatani	4. 巻 120
2. 論文標題 Multistep Changes in Amyloid Structure Induced by Cross-Seeding on a Rugged Energy Landscape.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophys. J.	6. 最初と最後の頁 284-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2020.12.005	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 -

[学会発表] 計61件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Eri Chatani
2. 発表標題 Mechanism of protein assembly for the formation of amyloid fibrils
3. 学会等名 CEFMS Lecture on Protein Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茶谷 絵理
2. 発表標題 アミロイド線維の出現に至るまでのタンパク質分子集合メカニズムの理解
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柚 佳祐, 山本 直樹, 野地 真広, 宗 正智, 後藤 祐児, 岩崎 哲史, 鏑木 基成, 茶谷 絵理
2. 発表標題 インスリンアミロイド線維の種間クロスシーディングに見られる構造の変化
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田 明典, 犬伏 知生, 柚 佳祐, 茶谷 絵理, 吉川 悦次, 里園 浩
2. 発表標題 チオフラビンT 蛍光寿命アッセイによるインスリンアミロイド線維構造の識別
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Yuzu, Naoki Yamamoto, Masahiro Noji, Masatomo So, Yuji Goto, Tetsushi Iwasaki, Eri Chatani
2. 発表標題 Structural difference and its seed-dependent propagation manner of human/bovine insulin amyloid fibrils as detected by iodine staining
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akinori Oda, Tomoo Inubushi, Keisuke Yuzu, Eri Chatani, Etsuji Yoshikawa, Hiroshi Satozono
2. 発表標題 Thioflavin T Fluorescence Lifetime Assay Of Homogeneous Insulin Amyloid Fibrils
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Yuzu, Naoki Yamamoto, Masahiro Noji, Masatomo So, Yuji Goto, Tetsushi Iwasaki, Motonari Tsubaki, Eri Chatani
2. 発表標題 Cross-seeding of human and bovine insulin amyloid fibrils induces stepwise conformational transition via intermediate states
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Yuzu, Naoki Yamamoto, Masahiro Noji, Masatomo So, Yuji Goto, Tetsushi Iwasaki, Motonari Tsubaki, Eri Chatani
2. 発表標題 Multi-step conformational changes via intermediate states induced by cross-seeding of human and bovine insulin amyloid fibrils
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 茶谷 絵理
2. 発表標題 アミロイド線維形成の初期に伴うタンパク質の集合・動態
3. 学会等名 松ヶ崎サイエンスフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eri Chatani
2. 発表標題 Investigating protein assembly in the nucleation of amyloid fibrils
3. 学会等名 Molecular Basis of Proteinopathies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茶谷 絵理
2. 発表標題 アミロイド線維の形成 - 核生成と伝播 - の機構解明
3. 学会等名 広島大学 第25回RcMcD融合研究セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茶谷 給理
2. 発表標題 アミロイド線維の発生と伝播の分子機構
3. 学会等名 奈良先端科学技術大学院大学CDG共催光ナノセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eri Chatani, Keisuke Yuzu, Naoki Yamamoto, Masahiro Noji, Masatomo So, Yuji Goto, Tetsushi Iwasaki, and Motonari Tsubaki
2. 発表標題 Conformational transitions of amyloid fibrils during cross-seeding
3. 学会等名 Proteostasis & Disease Symposium 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eri Chatani
2. 発表標題 Mechanisms of oligomer and protofibril formation suggested through studies of insulin and its B chain
3. 学会等名 JSPS Core-to-Core Program and University of Wollongong Joint meeting: Protein aggregation, proteostasis and crocodiles (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eri Chatani
2. 発表標題 Study of oligomer and protofibril mediated amyloid nucleation: Mechanistic insights from insulin and its B chain
3. 学会等名 JSPS Core to Core Program and Technical University of Munich Joint Meeting: Amyloid Symposium Munich 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 茶谷絵理
2. 発表標題 アミロイド線維の核形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第14回ナノ・マイクロ計測化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柚佳祐、今村比呂志、野崎拓郎、藤井悠生、守島健、奥田綾、井上倫太郎、杉山正明、茶谷絵理
2. 発表標題 アミロイド核形成段階におけるオリゴマーおよびプロトフィブリルの形成機構
3. 学会等名 第14回 タンパク質の異常凝集と その防御・修復機構に関する研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 茶谷絵理、國尾祐貴、柚佳祐、山本直樹、守島健、奥田綾、井上倫太郎、杉山正明、Junna Hayashi、John A. Carver
2. 発表標題 アミロイド前凝集体を標的とした 分子シャペロン B-クリスタリンの線維形成阻害様式
3. 学会等名 第14回 タンパク質の異常凝集と その防御・修復機構に関する研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Po-Wei Yi, Wei-Hsiang Chiu, Shuichi Toyouchi, Roger Bresol#237;-Obach, Johan Hofkens, Eri Chatani, Yoichiroh Hosokawa, Teruki Sugiyama, and Hiroshi Masuhara
2. 発表標題 Two-stage optical trapping mechanism of protein at its air/solution interface
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究協力者	里園 浩 (Satozono Hiroshi)		
研究協力者	小田 明典 (Oda Akinori)		

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