

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640023

研究課題名(和文) アミロイド タンパク質のモノマーとオリゴマー動態がシナプス機能を調節する

研究課題名(英文) Development of new amyloid beta-GFP fusion protein which is a useful tool for the analysis of the synaptic function of amyloid beta monomers and oligomers

研究代表者

落石 知世(OCHIISHI, TOMOYO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：30356729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)はその発症原因として最近、従来のアミロイド仮説ではなく、アミロイドタンパク質(A β)のオリゴマーが神経細胞内でより強い毒性を示し、シナプス障害を引き起こすとするオリゴマー仮説が有力となりつつある。本研究ではA β の細胞内動態を生きた個体で可視化できるA β -GFPトランスジェニックマウスを開発した。A β -GFPの分子特性を解析した結果、生体内・外でオリゴマーを形成することが判明した。このマウスの行動学的解析では、比較的若い月齢で既に認知機能障害を呈することから、このマウスはA β オリゴマーの毒性機構とADの記憶障害の発症機構の解明に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The intracellular accumulation of Amyloid- β (A β) oligomers critically contributes to disease progression in Alzheimer's disease (AD) and can be contribute to the potential target of AD therapy. We developed A β -GFP fusion proteins that are oligomerized and visualize their dynamics inside cells. We also developed the A β -GFP transgenic mice that express A β -GFP fusion protein in neurons. The behavior analysis of this transgenic mice presented impaired retention memory compared with the non-transgenic mice in young age. These results suggest that the A β -GFP transgenic mouse is useful tool to investigate the toxicity of A β oligomer and pathogenic mechanisms of memory deficit of AD.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド タンパク質 シナプス オリゴマー トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

ADの発症原因はこれまで、神経細胞から細胞外に分泌されたAβが異常凝集し老人斑を形成することに起因するとするアミロイド仮説が広く受け入れられている。しかし最近、遺伝子改変動物で細胞外Aβの沈着以前に神経症状を呈する事例が報告され、実際にヒトでも、老人斑の形成が認められず、細胞内にAβオリゴマーが蓄積するアルツハイマー病患者の変異(大阪変異)が発見されたことから、神経細胞外へのAβの沈着よりむしろ細胞内でのAβオリゴマーがより強い毒性を示すことが示唆され始めている。大阪変異のモデルマウスでは、オリゴマーが細胞内に蓄積するにつれてシナプス機能や空間認知機能が低下するため、従来考えられていたオリゴマーの細胞外からのシナプス攻撃だけではなく、細胞内からの作用も重要である可能性が出て来た。一方、内因性Aβの生産を抑制すると細胞死が起こり、このメカニズムにはカリウムチャンネルが関与することが推測されている。これはAβの機能が細胞の生存と興奮性に関与することを示唆している。しかし、Aβは容易に重合してオリゴマーになることから、Aβモノマーの生理学的機能は殆ど解明されていない。このような現状を踏まえ、申請者は細胞内でのAβモノマーからオリゴマーの動態や機能の解析に特化した新規モデル動物を開発し、シナプス部でのAβの機能について解析している。

2. 研究の目的

アルツハイマー病(AD)の病因因子でアミロイドβタンパク質(Aβ)は容易に重合することから、これまでモノマーの解析が困難であった。申請者は、神経細胞内にのみAβを発現し、かつそのAβはオリゴマーもしくはモノマーしか形成せず、更にはその分子の動態を生きた細胞内で観察可能な新規ADモデル動物を開発中である。ADは老人斑の形成に先行して記憶障害が生じることから、AD発症の極初期に起こるシナプスの微細な変化をとらえることは、病気の真の発症機序を解明することに繋がる。そこで、本研究は開発したモデルマウスを用いてシナプス内部でのモノマーの生理学的機能を調べ、モノマーやオリゴマーの動態を生きたシナプスで観察し、更に行動解析を行うことにより、シナプス内部でのAβの機能や重合と毒性との関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) Aβ-GFP プラスミドの作成

Aβ₁₋₄₂-GFP発現ベクターはヒトAPPのコーディング配列を持つプラスミドから作成した。これをchicken β-actinプロモーターを持つpEGFP-N1ベクターに導入しpAct-Aβ₁₋₄₂-GFPプラスミドを得た。これを用いてAβ₁₋₄₂のPhe19をSerに、Leu34をProに置き換えてAβの重合を抑制するAβmut-GFP

プラスミドおよび、Aβ₁₋₄₂のGlu22を欠損した(大阪変異)Aβ(E22Δ)-GFPプラスミドを作成した。

(2) Aβ-GFP 融合タンパク質の精製

Aβ-GFP, Aβmut-GFPおよびGFPを大腸菌に発現させ、Chitin beads(pH 8.5)を用いて精製した。

(3) NMRによる解析

上記(2)で精製したそれぞれの融合タンパク質溶液に1N NaOHを加えてpH10-11にし、融合タンパク質を完全にモノマーにした。それをAβがより重合しやすい中性付近のpHにするため、重水素化Tris-HCl(pH7.2)で置換した。NMR(Bruker Avance III-500 spectrometer)による測定は、モノマーをおよび、重合が促進される条件である37°Cで、15時間から60時間静置したものについて、20°Cで行った。

(4) 電子顕微鏡による解析

各融合タンパク質のモノマーおよび、上記(2)と同様の重合しやすい条件下においたサンプルを、カーボンコートしたEMグリッドに5μl滴下し、1%酢酸ウランでネガティブ染色した。サンプルは電子顕微鏡(Tecnaï F20 EM)で観察し、ORIOUS SC600 Slow-scan CCD cameraを用いてX80000で画像を撮影した。

(5) 蛍光相関分光分析(Fluorescence correlation spectroscopy; FCS)

Aβ-GFP融合タンパク質をCOS7細胞に発現させ、生きた細胞の細胞質内におけるAβ-GFP分子の動態をConfoCor3を備えたLSM510 META(Carl Zeiss)を用いて解析した。

(6) 行動解析

生後比較的若い月齢のAβ-GFPマウスを用いて物体再認テストとモリス水迷路を行った。

4. 研究成果

1) Aβ-GFP 融合タンパク質の分子状態と毒性の解析。

開発している新規ADモデルマウスはAβ-GFP融合タンパク質を発現している(Aβ-GFPマウス)。従来、AβとGFP等の蛍光タンパク質はAβの重合が進むとGFPのコンフォーメーションに影響し、蛍光が消失することから、凝集したものを可視化することが困難であった。Aβ-GFPマウスはAβとGFPのリンカー部分を工夫し、Aβの重合が進んでもGFPが蛍光を発することを可能にした。そこでこのAβ-GFPの分子状態をNMR、電子顕微鏡および蛍光相関分光分析法によりより詳細に解析し、重合と細胞毒性の関係を調べた。

NMRにより液体中のAβ-GFP分子の重合状態を観察した結果、本研究の実験条件下ではAβペプチドは約7時間程度でモノマーから完

全に重合し、モノマーやオリゴマーは存在しなくなるのに対し、A β -GFP は同じ条件下で一定以上重合が進まず、オリゴマーのままの状態が存在することが明らかとなった (図 1)。

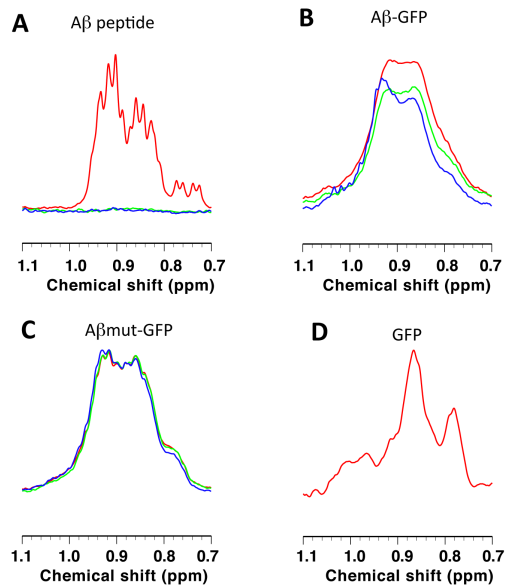


図 1 A β -GFP 融合タンパク質の NMR による解析。赤・緑・青のスペクトルはそれぞれモノマー、37°C で 15 時間、および 37°C で 60 時間静置し、重合させたものを示す。A β -GFP はスペクトルがほとんど変化せず、一定以上重合が進まないことがわかる。

同様に処理したサンプルを電子顕微鏡で観察したところ、A β ペプチドは繊維状構造を呈しているのに対し、A β -GFP は主に 2~7 分子が重合したオリゴマーを形成することが明らかとなった (図 2)。

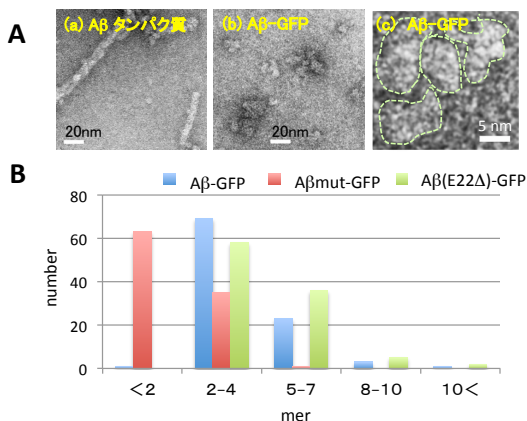


図 2 A β -GFP 融合タンパク質の電子顕微鏡による解析 A: A β ペプチド (a) および A β -GFP 融合タンパク質 (b, c) の電子顕微鏡画像。c の点線で囲んだ部分は重合した A β -GFP の 1 つの塊 (unit) を示す。B: A β -GFP の 1 unit に含まれる分子の数。A β ペプチドは線維状構造を形成するのに

対し、A β -GFP は数個の分子が重合したオリゴマーを形成する。

また A β のオリゴマーを特異的に認識する抗体を用いて COS7 細胞に発現させた A β -GFP を免疫染色したところ、GFP の蛍光とオリゴマー抗体の染色像がほぼ完全に一致した (図 3)。更に蛍光相関分光分析法による解析を行った結果、A β -GFP 分子は生きた COS7 細胞中で 2 量体から 3 量体を形成しているとも明らかとなった。これらの結果から A β -GFP 分子は生体内でも生体外でも数分子からなるオリゴマーを形成していることが明らかとなった。

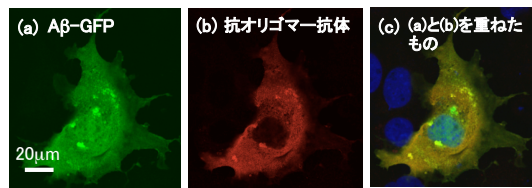


図 3 A β -GFP 融合タンパク質の局在部位は抗オリゴマー抗体の染色部位と一致する。

そこで A β -GFP オリゴマーとモノマーの細胞毒性について解析した。A β -GFP モノマー (A β mut-GFP) は A β の遺伝子配列中に 2 箇所の重合を抑える変異を挿入し、A β -GFP がモノマーの状態が存在できるようにした変異体である (図 1 NMR の結果参照)。これらの分子を COS 7 細胞に発現させ、一定時間後の細胞死の割合を解析した結果、A β -GFP は A β mut-GFP や GFP のみと比較して明らかに細胞死の割合が増加していた。この結果より、モノマーよりオリゴマーの毒性が強いことが明らかとなり、本研究に使用する A β -GFP マウスはオリゴマーの解析に特化していることが確認された (図 4)。

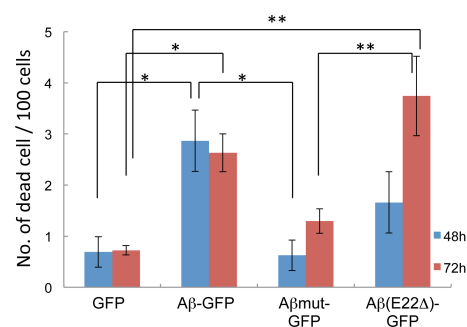


図 4 A β -GFP 融合タンパク質はモノマー (A β mut-GFP) に比べて細胞毒性が強い。

(2) A β -GFP マウスの行動解析

A β -GFP マウスについて物体再認識テストおよび、モリス水迷路を行い、空間認知機能について異常の有無を解析した。その結果、若い月齢の個体で、既に空間認知能力が同腹の野生型の個体に比べて劣っていることが確

認められた。また、シナプス部に発現するタンパク質に野生型とは発現に違いがあるものが存在した。

これらの結果は本研究に用いている Aβ-GFP マウスが AD の発症初期あるいは発症前に既に起こり始めているとされる、Aβオリゴマーによるシナプス障害を解析する有効なモデルであり、このマウスを用いてシナプス領域の様々な変化を解析することは AD の発症を予防する方法の開発に繋がると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Tomoyo Ochiishi, Motomichi Doi, Kazuhiko Yamasaki, Keiko Hirose, Akira Kitamura, Takao Urabe, Nobutaka Hattori, Masataka Kinjo, Tatsuhiko Ebihara and Hideki Shimura, Development of new fusion proteins for visualizing amyloid-β oligomers *in vivo*. Sci. Rep., 査読有, Mar 16:6:22712 (2016), DOI:10.1038/srep22712.
- ② Tomoyo Ochiishi, Akira Itakura, Lei Liu, Hiroyasu Akutsu, Hideki Kohno, Masaki Nishimura and Kazuyuki Yoshimune, Immunohistochemical detection of the delayed formation of nonfibrillar large amyloid-β aggregates. Genes Cells, 査読有, Feb 21(2):200-211 (2016), DOI:10.1111/gtc.12332.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Tomoyo Ochiishi, Motomichi Doi, Kazuhiko Yamasaki, Akira Kitamura, Takao Urabe, Nobutaka Hattori, Masataka Kinjo, Tatsuhiko Ebihara, Hideki Shimura, Development of new animal model of Alzheimer's disease visualizing the intracellular dynamics of the amyloid-β protein. Neuroscience 2015, October 20, 2015 (Chicago, USA).
- ② Tomoyo Ochiishi, Masami Kaku, Kazuhiko Yamasaki, Motomichi Doi, Tatsuhiko Ebihara, Physiological and behavioral roles of intracellular amyloid β oligomer in a novel amyloid β protein transgenic mouse. 第 38 回日本神経科学大会, 2015/7/30, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ③ Tomoyo Ochiishi, Motomichi Doi, Hideki Shimura, Takao Urabe, Nobutaka Hattori,

Tatsuhiko Ebihara, Visualization and functional analysis of intracellular Amyloid β protein in pre and postsynaptic regions, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014/11/27, パシフィコ横浜 (神奈川県)

- ④ Tomoyo Ochiishi, Motomichi Doi, Hideki Shimura, Takao Urabe, Nobutaka, Hattori and Tatsuhiko Ebihara, Development of new animal models of Alzheimer's disease visualizing intracellular dynamics of the amyloid β protein. International Symposium on Translational Neuroscience and XXXII Annual Conference of Indian Academy of Neuroscience, 2014/11/1, Bangalore (India)
- ⑤ Akira Itakura, Tomoyo Ochiishi, Takenori Shimizu, Tomoe Komoriya, Hideki Khono, Kazuaki Yoshimune, Immunoassay of recombinant amyloid beta 1-42 aggregates in rat neurons, Pacific Congress on Marine Science and Technology (PACON), 2014/8/27, Nihon University (Chiba)

[その他]

ホームページ等

- ① プレス発表

「アルツハイマー病の原因とされるタンパク質を細胞内で可視化する技術を開発」3/16/2016、国立研究開発法人産業技術総合研究所公式 HP
http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2016/pr20160316_2/pr20160316_2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落石 知世 (OCHIISHI, Tomoyo)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：30356729

(2) 研究分担者

角 正美 (KAKU, Masami)
茨城県立医療大学・保健医療学部・嘱託助手
研究者番号：30646261

(3) 連携研究者

戸井 基道 (DOI, Motomichi)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：50344213

(4) 連携研究者

海老原 達彦 (EBIHARA, Tatsuhiko)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・バ
イオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：00344119