

令和元年6月10日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03288

研究課題名(和文)量子ドットナノプローブを活用したアミロイド凝集阻害物質の探索とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Screening of amyloid aggregation inhibitors using quantum dot nanoprobe and elucidation of the inhibition mechanism

研究代表者

徳楽 清孝 (Tokuraku, Kiyotaka)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00332106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病をはじめとするアミロイド病は、アミロイドタンパク質の凝集が引き金となり発症するため、その凝集阻害物質は病気の予防や治療に有用である。本研究では、量子ドットを用いたアミロイド(A)凝集体のリアルタイムイメージング法を応用したA凝集阻害物質の自動化微量ハイスループトスクリーニング法(MSHTS法)を開発し、本自動化システムを用いた阻害物質の探索と、活性物質の構造活性相関の解析を行った。また、MSHTSシステムを他のアミロイド(タウ、 $\alpha$ -シヌクレイン、アミロイドA)に拡張するとともに、神経細胞毒性の高いアミロイドオリゴマーの形成阻害物質の新規スクリーニング法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症の過半数を占めるアルツハイマー病の発症には、アミロイド やタウと呼ばれるタンパク質の脳内での凝集と蓄積が関与しているため、凝集を抑制する物質は病気の予防や治療に有用である。本研究では、不純物を含む天然物エキスのアミロイド凝集抑制活性であっても微量かつ効率的に評価できる自動分析システムの開発に成功し、本手法を用いて様々な凝集抑制物質を発見してきた。今後、本手法や新たに見つかった化合物を用いることで、認知症予防に関する研究が飛躍的に進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Amyloid disease such as Alzheimer's disease is triggered by aggregation of amyloid protein to develop it, and therefore the aggregation inhibitor is useful for prevention and treatment of disease. In this study, we developed an automated microliter-scale high-throughput screening system (MSHTS system) for amyloid (A) aggregation inhibitors applying real-time imaging method of A aggregation using quantum dots. Furthermore, we screened for inhibitory substances using this automated system and analyzed the structure-activity relationship of active substances. In addition to expanding the MSHTS method to other amyloids (tau,  $\alpha$ -synuclein, and amyloid A), we developed a new screening method for inhibitors of amyloid oligomer formation with high neurotoxicity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アミロイド 凝集阻害 量子ドット ハイスループト スクリーニング A タウ オリゴマー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

### ① 研究の学術的背景

認知症の5割~7割を占めるアルツハイマー病（AD）は、2050年にはその患者数が世界で1億人を突破すると見積もられている。認知症患者の増加は医療費や介護費などの社会保障費の増大に直結するためその対策は喫緊の課題であるとされ、世界中でその対策が検討されている。

AD患者の脳にはアミロイドβ（Aβ）と呼ばれるタンパク質が凝集沈着した老人斑と呼ばれる構造が見られる。Aβ凝集体が神経毒性を持つことから、この凝集が引き金となりADが発症するというアミロイドカスケード仮説（Hardy & Higgins, 1992）（図1）が提唱され、これまでこの仮説を裏付ける研究成果が多く報告されてきた。その一方で、数年前に立て続けに行われたアミロイドカスケード仮説に基づく薬剤の臨床試験（Aβ生成に関わる酵素の阻害物質やAβ凝集阻害活性を有する抗体をAD患者に投与）が失敗に終わり、アミロイドカスケード仮説が誤りであるのではないかと一時危惧された時期もあった。しかしながら、Aβの凝集は認知症発症の数十年前から始まることや、凝集体の形態（例えば、少数の分子が会合したオリゴマーなのか線維なのか）によって毒性が異なること等が明らかとなり、最近ではこの臨床試験の失敗は試験条件の不適によるものであると考えられている。そのため、現在、家族性AD患者の家族集団を対象とした発症前の臨床試験の実施や、様々なオリゴマー形成阻害物質の検討がなされている。このように、アミロイドカスケード仮説が再評価されつつある現在、これまで見つかっていないような、強力かつオリゴマー形成をも阻害するアミロイド凝集阻害物質が見つければ、それがADの根本治療薬開発のための大きな武器となるだろう。

これまでの研究により、クルクミンやカテキンなど、様々な天然由来物質がAβ凝集を阻害することが報告されている（Masuda et al., 2006）。しかしながらこれら天然由来物質を効率的にスクリーニングする手法はこれまで無かった。現在、Aβ凝集阻害活性を評価するために最も多用されている手法にチオフラビンT（ThT）法が挙げられるが、これはAβ凝集体にThTが結合することで変化する蛍光強度を計測するものである。即ち、ThTの励起光を吸収するような夾雑物が含まれる植物粗抽出液等のサンプルについてはその活性評価は困難であり、様々な天然抽出液からの網羅的スクリーニングにThT法は適さない。また、ThT法による解析には複数ステップの操作が必要であるため、同時に多数のサンプルを扱うハイスループット解析にも向かない。

その様な中、我々は量子ドットを用いAβ凝集をオリゴマー形成から線維形成までリアルタイムイメージングすることに初めて成功し、さらにこのイメージング法を応用したAβ凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング法（MSHTS法、図2）を開発した。

MSHTS法の特徴は、①微量、②ハイスループット、③夾雑物の影響が小さいことである。すなわち、蛍光顕微鏡画像をもとに解析するため、顕微鏡観察に必要な数μLの微量サンプルで活性を評価できる。また、ウェルプレートにサンプルを注入後は、固定や染色等の煩雑な操作なく凝集過程やその阻害を直接観察できるため、経時的かつハイスループット解析が可能である。さらに、凝集体量をThTのように蛍光強度ではなく、画像解析によって定量化するため、不純物等による内部フィルター効果の影響を受けにくい。また、量子ドットはThTより長波長側で励起できるため、上述した内部フィルター効果の影響を受けにくいことと合わせて、多種多様な夾雑物を含む植物粗抽出液や加工食品のようなサンプルであっても評価が可能である。加えて、ThTは凝集体のβシート構造に結合することで蛍光を発するためThTと結合が競合するような阻害物質の評価はできないが、本手法では原理的にそのような心配を考慮しなくてよい。実際に我々は、MSHTS法により香辛料52種類の抽出物のAβ凝集阻害活性を評価し、シソ科に属すハーブ系香辛料が高い凝集阻害活性を示すこと、また、その活性本体がロスマリン酸であることを見いだした。さらに、海藻に対しても同様のスクリーニングを行い、多糖類がAβ凝集阻害活性を有する可能性を明らかにするなど、MSHTS法が天然物からのAβ凝集阻害物質の網羅的探索に実際に適用できることを証明した。

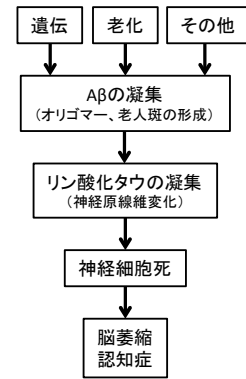


図1 アミロイドカスケード仮説

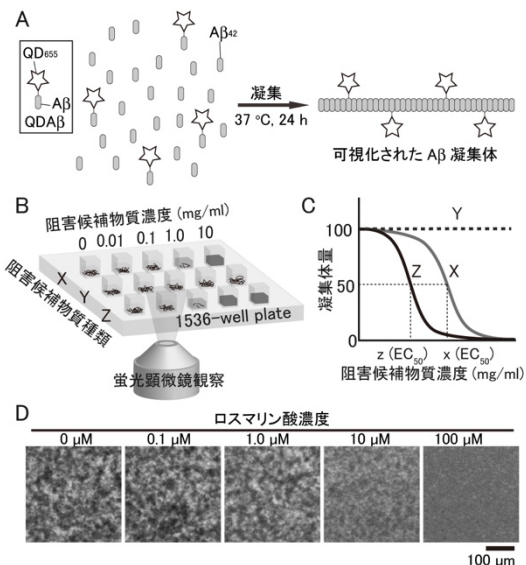


図2 MSHTS法の概要。(A)量子ドットナノプローブによるAβ凝集体の可視化。(B)1536ウェルプレートを用いたAβ凝集阻害物質のスクリーニング。(C)凝集阻害曲線より阻害活性の指標となる50%効果濃度（EC<sub>50</sub>）の求め方。(D)ロスマリン酸によるAβ凝集阻害の蛍光顕微鏡観察。

## 2. 研究の目的

本研究では MSHTS 法により Aβ 凝集阻害物質を網羅的に探索し、新規阻害物質についてはその作用機序を解明する。また、あらゆるアミロイドの凝集を可視化できるユニバーサルプローブを活用することで MSHTS 法を Aβ 以外のアミロイドに拡張するとともに、神経細胞毒性の高いアミロイドオリゴマーの形成阻害物質の新規スクリーニング法を開発する。

## 3. 研究の方法

本研究では、量子ドットナノプローブを活用し、オリゴマー形成を含むアミロイドの凝集阻害物質を幅広く探索する。阻害活性の高い物質が見つければその作用機序の解明に取り組む。そのために平行して以下の3項目に取り組むとともに、有望な物質については生体内でも効果が発揮されるかどうか細胞レベルで検証する。

- (1) MSHTS 法による Aβ 凝集阻害物質の網羅的探索および阻害機構の解明
- (2) ユニバーサルプローブを用いた、Aβ 以外のアミロイドに対する凝集阻害物質の探索
- (3) アミロイドオリゴマー形成阻害物質の新規スクリーニング法の開発

## 4. 研究成果

### (1) MSHTS 法による Aβ 凝集阻害物質の網羅的探索および阻害機構の解明

本研究では、Aβ 凝集阻害物質の探索と同時に、MSHTS 法の自動化にも取り組んだ。タンパク質の凝集は、タンパク質分子同士の衝突によりはじまる。分子の衝突は攪拌により促進されるため、サンプル調製の際の攪拌条件のばらつきは評価結果のばらつきとなってしまふ。ThT アッセイのような従来法だけでなく、MSHTS 法においてもこれまで手動でのピペッティングによるサンプルの攪拌を行っていた。網羅的探索のためには、数百~数千のサンプルを均一の条件で攪拌する必要があるため、本研究では自動分注機を用いて攪拌条件の最適化を検討した。また、天然抽出物のような色素を含むサンプルについても MSHTS 法は評価できるという特長を持っているが、サンプル濃度が高い部分においては色素の影響を若干受けることがわかってきた。そこで、量子ドットの種類やサンプル濃度の最適化に加え、撮影条件についても自動露光、オートフォーカス条件の最適化、自動化を行なった。これらの成果については論文(論文①)や学会発表(学会③)すると共に、特許出願(特願 2018-242280)した。

実際に自動化した MSHTS システムにより、北海道産真葉植物エキスライブラリ 504 種の Aβ 凝集阻害活性を評価した。その結果、単子葉類の活性が低いこと、フトモモ目、フウロソウ目の活性が高いなど、植物の分類と活性に相関があることが明らかになった(図3、論文①)。また、2016 年度内閣府地方創生交付金事業(北海道白糠郡白糠町が採択)の助成により、我々が独自に作成した白糠町に自生する植物のエキスライブラリー約 200 種についても評価も行なった。その結果、活性の高かいいくつかの植物種を見いだした。その中で、ゲンノショウコについては、活性本体を探索に成功し学会発表を行なった(学会①②⑬)。また、本手法を用いて、ドレッシングや海藻類の評価も行なった(学会⑧⑩⑬)。

本研究では、以前我々がサマーサボリーの活性本体として明らかにしたロスマリン酸の構造活性相関についても検討した。ロスマリン酸の構造的特徴を考慮して、様々な誘導体を作成、これらの Aβ 凝集阻害活性の評価や ClogP の算出(図4)、さらにドッキングシミュレーションにより、ロスマリン酸がどのようなメカニズムで Aβ と相互作用し、凝集を阻害するのかが明らかになった(論文③④)。

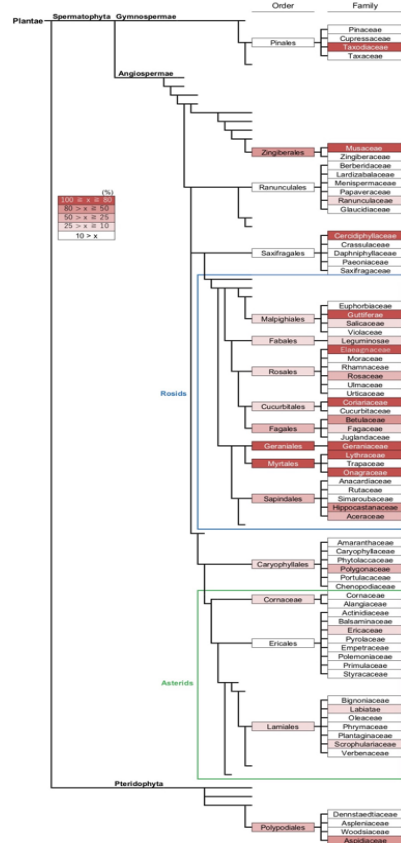


図3 植物の分類と Aβ 凝集阻害活性の関連。色が濃い程、凝集阻害活性が高い植物種を示す。

Compounds	EC <sub>50</sub> [μM]	ClogP	Compounds	EC <sub>50</sub> [μM]	ClogP
	20.3	1.10		23.2	1.98
	21.9	0.27		24.7	2.26
	216	0.97		12.0	2.79
	67.7	1.20		2.58	3.32
	1040	4.56		5.13	3.85
	7.95	3.30		10.4	4.38
	39.5	2.96		9.52	5.43
	20.6	2.03		80.1	1.33
	8.41	3.30		54.8	1.86
	4536	4.38		2.82	3.53
	5.93	3.11		69.0	1.37
	14.9	1.85		11.4	2.66
	274	4.03			

図4 ロスマリン酸誘導体の Aβ 凝集阻害活性と ClogP



本研究では、化合物ライブラリーの評価も行なった。98種の低分子芳香族化合物ライブラリーを1stスクリーニングしたところ、13種の化合物の活性を検出することができた(図5a)。興味深いことに、この13種のうち、半数以上の7種がトロポロン骨格を含む化合物であった(図5b)。そこで、トロポロン骨格を含有する誘導体を36種作成し、これらに対して2ndスクリーニングを行なったところ、19種に活性があることを見出した(図5c)。これらの化合物については、従来法であるThT法でも活性を確認することができたが、その大きさはMSHTS法により計測したものと完全には一致しなかった(図5d-g)。これは、検出原理の違いによるものと推測された。構造と活性について比較評価したところ、官能基の種類や位置によって活性に影響することが明らかになった。今回、トロポロン誘導体で最も活性が高かったものは、TR-003(図5f)であり、その活性はロスマリン酸より高かった。これらの研究成果については、論文発表(論文①)すると共に学会発表も行なった(学会⑨)。

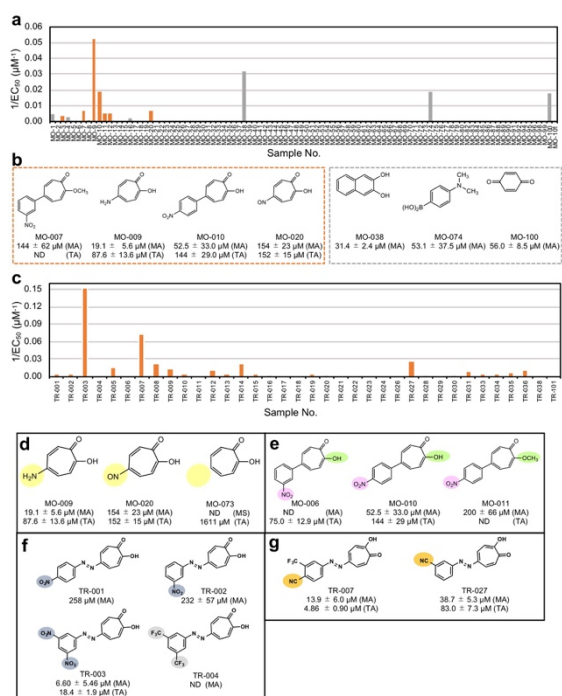


図5 低分子芳香族化合物の評価。a) 1stスクリーニングの結果。b) 高い活性を示した化合物の構造と活性。c) 2ndスクリーニングの結果。d)-g) 構造活性相関。

## (2) ユニバーサルプローブを用いた、Aβ以外のアミロイドに対する凝集阻害物質の探索

Aβ以外のタンパク質の凝集体の可視化にも取り組んだ。そのために、様々なタンパク質と共凝集する量子ドットナノプローブの開発を行うとともに(学会⑬)、量子ドットナノプローブとタンパク質凝集体の非特異的結合を利用した。これらの検討により、tau(学会④⑥⑫)およびα-シヌクレイン(学会⑤)の可視化に成功した(図6)。tauについては、共焦点レーザー顕微鏡より詳細に解析を行い、電子顕微鏡では検出できないようなAβと凝集体の構造の違いについて明らかにするとともに、シヤペロンがtauの凝集を強く阻害すること明らかにした(論文①②)。様々なアミロイドタンパク質の凝集阻害活性の評価については、自動化の特許出願と同時に特許出願した(特願2018-242280)。

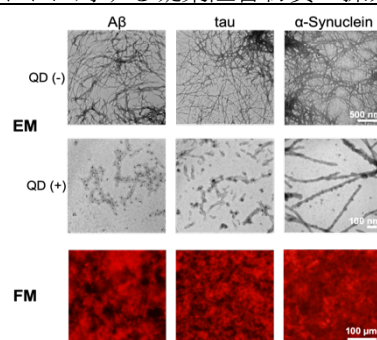


図6 他のアミロイド形成性タンパク質の凝集体の可視化。EM: 電子顕微鏡観察、FM: 蛍光顕微鏡観察。

## (3) アミロイドオリゴマー形成阻害物質の新規スクリーニング法の開発

近年、Aβオリゴマーの強い神経毒性が注目されており、オリゴマーの形成阻害活性を簡易に評価できる手法の開発が望まれている。従来、オリゴマーの評価は、オリゴマー特異的な抗体を用いて評価する方法が一般的であったが、この手法は継時的なオリゴマー形成の評価や、多サンプルの同時解析には向かない。そこで、本研究では量子ドットとAβをクロスリンクした量子ドットナノプローブを用いて、オリゴマー形成阻害活性を評価する手法の開発にも取り組んだ。2009年に我々が報告した手法によってAβのオリゴマー形成能を画像解析し(図7)、輝点の相対的な明るさの比からオリゴマー量を定量化した。オリゴマー形成を誘導するためのインキュベート前に、Aβの凝集阻害活性が報告されているロスマリン酸、ケルセチン、クルクミン、シソ抽出物を様々な濃度で添加し、阻害物質濃度とオリゴマー含有量からオリゴマー形成の阻害曲線を作成した。この阻害曲線からオリゴマー形成を50%阻害する濃度をEC50として算出した(表1)。その結果、シソ抽出物がロスマリン酸より高いオリゴマー形成阻害活性を示すことが明らかになった。一方、クルクミンやケルセチンのオリゴマー形成阻害活性は、ロスマリン酸やシソ抽出物と比較して低いことが明らかになった。これらの研究成果については、2019年度の生物物理学会で発表するとともに、論文投稿の準備をすすめる予定である。

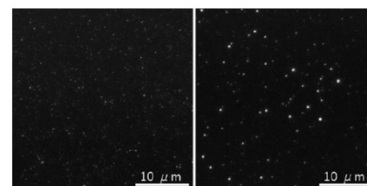


図7 Aβオリゴマーの蛍光顕微鏡観察。左: インキュベート前、右: インキュベート後。

表1 Aβオリゴマー形成阻害活性の評価

	RA	ケルセチン	クルクミン	シソ抽出物
EC50	10.62 µM (0.00382 mg/ml)	268 µM (0.0809 mg/ml)	64.1 µM (0.0236 mg/ml)	0.00235 mg/ml

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕 (計 19 件)

- ① Sasaki Rina, Tainaka Reina, Ando Yuichi, Hashi Yurika, Deepak Hadya V., Suga Yoshiko, Murai Yuta, Anetai Masaki, Monde Kenji, Ohta Kiminori, Ito Ikuko, Kikuchi Haruhisa, Oshima Yoshiteru, Endo Yasuyuki, Nakao Hitomi, Sakono Masafumi, Uwai Koji, Tokuraku Kiyotaka, An automated microliter-scale high-throughput screening system (MSHTS) for real-time monitoring of protein aggregation using quantum-dot nanoprobe, Scientific Reports, 査読有, Vol. 9, 2019, Article Number 2587.  
DOI: 10.1038/s41598-019-38958-0
  - ② Shigematsu Hideki, Imasaki Tsuyoshi, Doki Chihiro, Sumi Takuya, Aoki Mari, Uchikubo-Kamo Tomomi, Sakamoto Ayako, Tokuraku Kiyotaka, Shirouzu Mikako, Nitta Ryo, Structural insight into microtubule stabilization and kinesin inhibition by Tau family MAPs, J. Cell Biol., 査読有, Vol. 217, 2019, 4155-4163.  
DOI: 10.1083/jcb.201711182
  - ③ Tsukamoto Yuta, Ikeda Sotaro, Uwai Koji, Taguchi Riho, Chayama Kazuaki, Sakaguchi Takemasa, Narita Ryo, Yao Wan-Ling, Takeuchi Fumihiko, Otakaki Yukie, Watashi Koichi, Wakita Takaji, Kato Hiroki, Fujita Takashi, Rosmarinic acid is a novel inhibitor for Hepatitis B virus replication targeting viral epsilon RNA-polymerase interaction, PLOS ONE, 査読有, Vol. 13, 2018, e0197664.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0197664
  - ④ Riho Taguchi, Koki Hatayama, Tomohito Takahashi, Takafumi Hayashi, Yuki Sato, Daisuke Sato, Kiminori Ohta, Hiroto Nakano, Chigusa Seki, Yasuyuki Endo, Kiyotaka Tokuraku, Koji Uwai, Structure-activity relations of rosmarinic acid derivatives for the amyloid  $\beta$  aggregation inhibition and antioxidant properties, Eur. J. Med. Chem., 査読有, Vol. 138, 2017, 1066-1075.  
DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.026
  - ⑤ 徳楽清孝, 上井幸司, 量子ドットを用いた  $A\beta$  凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング法, BIO Clinica, 査読無, Vol. 31, 2016, 76-81.
- 他 14 件

### 〔学会発表〕 (計 38 件)

- ① 上井幸司, 久保研二, 渡邊輝, 関千草, 中野博人, 徳楽清孝, ゲンノショウコ (*Geranium thunbergii*) のアミロイド  $\beta$  凝集阻害物質, 日本薬学会第 139 年会, 2019
- ② 久保研二, 渡邊輝, 関千草, 中野博人, 徳楽清孝, 上井幸司, アミロイド  $\beta$  凝集阻害活性スクリーニングと活性物質の探索, 第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2018
- ③ 佐々木里奈, 安藤雄一, 上井幸司, 徳楽清孝, 量子ドットナノプローブを用いたアミロイド凝集阻害物質の自動化スクリーニングシステムの開発, 第 91 回日本生化学会大会, 2018
- ④ 田井中玲奈, 橋友理香, 中尾仁美, 迫野昌文, 徳楽清孝, 量子ドットナノプローブを用いた tau 凝集過程のリアルタイムイメージングと凝集阻害物質の活性評価, 第 91 回日本生化学会大会, 2018
- ⑤ NUOMIN, 野口太郎, 徳楽清孝, 量子ドットナノプローブを用いた  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体のイメージング, 第 91 回日本生化学会大会, 2018
- ⑥ 橋友理香, 田井中玲奈, 上井幸司, 徳楽清孝, 量子ドットを用いた Tau リピートペプチド凝集阻害物質探索システムの開発と改良, 第 91 回日本生化学会大会, 2018
- ⑦ 近井優作, 山下涼太, 倉賀野正弘, 高橋正行, 徳楽清孝, アミロイド  $\beta$  の凝集はアクチンに富む細胞辺縁部で凝集が促進される, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
- ⑧ 吉成航, 上井幸司, 徳楽清孝, 醤油に含まれるアミロイド  $\beta$  凝集阻害物質の探索, 日本食品化学学会第 24 回総会・学術大会, 2018
- ⑨ Yuichi Ando, Kiminori Ota, Ikuko Ito, Haruhisa Kikuchi, Yoshiteru Oshima, Yasuyuki Endo, Koji Uwai, Kiyotaka Tokuraku, Screening of amyloid- $\beta$  aggregation inhibitors from aromatic low molecular compounds by a microliter-scale high-throughput screening system with quantum-dot nanoprobe, Neuroscience 2017, 2017
- ⑩ 楊卓朗, 板田鉄平, 大柄俊貴, 上井幸司, 徳楽清孝, アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) 凝集体の形態に与える  $A\beta$  凝集阻害物質の効果の 3D 観察, 第 69 回日本生物工学会大会, 2017
- ⑪ 渡邊輝, 久保研二, 杉村康司, 徳楽清孝, 上井幸司, 北海道白糠町産植物からのアミロイド  $\beta$  凝集阻害物質の網羅的探索, 第 69 回日本生物工学会大会, 2017
- ⑫ 田井中玲奈, 松井一史, 橋友理香, 上井幸司, 徳楽清孝, 量子ドットナノプローブを用いた tau 凝集過程の可視化と凝集阻害物質の活性評価, 日本食品化学学会第 23 回総会・学術大会, 2017
- ⑬ 吉成航, 上井幸司, 徳楽清孝,  $A\beta$  凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング法

を用いた市販ドレッシングの活性評価、日本食品化学学会第23回総会・学術大会、2017

⑭ 久保研二、渡邊輝、杉村康司、関千草、中野博人、菱田敦之、徳楽清孝、上井幸司、アミロイドβ凝集阻害活性と総ポリフェノール含有量に基づく北海道白糠町産植物からの活性物質の探索、日本薬学会第137年会、2017

⑮ 中林昌基、片山茂、三谷墨一、徳楽清孝、橋友理香、中村宗一郎、多様なアミロイド形成のモニターを可能にする新規量子ドットプローブの創製、日本農芸化学会中部支部第177回例会、2016

⑯ 楊卓朗、板田鉄平、高橋倫人、大柄俊貴、上井幸司、徳楽清孝、微量ハイスループットスクリーニング法を用いたフクロフノリ (*Gloiopeltis furcata*) 熱水抽出物のAβ凝集阻害機構の解明、日本食品化学学会第22回総会・学術大会、2016

他22件

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1件)

名称：アミロイド形成を評価する方法、装置及びプログラム

発明者：徳楽清孝、上井幸司

権利者：室蘭工業大学

種類：特許

番号：2018-242280

出願年：2018

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

[http://www3.muroran-it.ac.jp/tokuraku/tokuraku/Top\\_Page.html](http://www3.muroran-it.ac.jp/tokuraku/tokuraku/Top_Page.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：上井 幸司

ローマ字氏名：Koji Uwai

所属研究機関名：室蘭工業大学

部局名：大学院工学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：80347905

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名：中村 宗一郎

ローマ字氏名：Soichiro Nakamura

所属研究機関名：信州大学

部局名：役員等

職名：理事

研究者番号 (8桁)：00105305

### (3) 研究分担者

研究分担者氏名：橋 友理香

ローマ字氏名：Yurika Hashi

所属研究機関名：山野美容芸術短期大学

部局名：その他部局等

職名：講師

研究者番号 (8桁)：40756962

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。