

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22484

研究課題名（和文）光酸化触媒を利用した細胞内アミロイドの動態制御と機能解明

研究課題名（英文）Control of intracellular amyloid dynamics using photooxygenation catalysts

研究代表者

相馬 洋平（Sohma, Youhei）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・グループリーダー（講師相当）

研究者番号：10565518

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究目的は、光で駆動する人工触媒である光酸化触媒を利用することにより、タウ、 α -シヌクレインなどの細胞内アミロイドの動態を制御し、その結果、これらの新しい機能を同定することである。タウアミロイドに対する光酸化触媒を創製し、触媒がタウアミロイドを選択的かつ高収率で光酸化することを認めた。さらに、本触媒を用いて、細胞間伝播機構において核として働くタウアミロイドを酸化することにより、培養細胞内における新たなタウのアミロイド形成誘導が抑制されることが明らかになった。また、同様に、 α -シヌクレインが形成するアミロイドに対し、効率的に光酸化反応を促進することのできる触媒を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発した光酸化触媒は、細胞内アミロイドに対し、通常のフォールディング状態に影響することなく、疾患に關与するアミロイド凝集体と選択的に反応した。また、本手法を利用することにより、細胞内アミロイドの伝播機構が酸化修飾によって制御可能であることを示した。本結果は、細胞内アミロイドが原因となる様々な神経変性疾患の病態解明や治療法開発につながる潜在性を有する。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to control the spatiotemporal dynamics of intracellular amyloids such as tau and α -synuclein using photooxygenation catalyst. We synthesized new photooxygenation catalysts that promoted the photooxygenation of tau amyloid with high selectivity and yield. In addition, the induction of new amyloid formation in cultured cells is suppressed by oxygenating tau seed. Similarly, a catalyst capable of efficiently promoting the photooxygenation reaction with respect to the amyloid formed by α -synuclein was identified.

研究分野：創薬化学

キーワード：アミロイド 光酸化触媒 タウ α -シヌクレイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質はフォールディングすることにより特定の立体構造を形成して生理機能を果たすが、タンパク質によっては、ミスフォールディングを起こすことによって、クロスβシート構造(線維軸に対し垂直方向に配向したβストランドが並び、1枚のシートを形成した高次構造)からなるアミロイド凝集体を形成する。このようなアミロイド凝集体は、核シードを形成することで周囲の同一分子の構造を変化させること(伝播機構)により患部で広がり、疾患の進行を招く。

アルツハイマー病の主な病理学的所見として、大脳皮質を中心に広範な神経細胞の脱落に加えて、細胞外に老人斑、細胞内に神経原線維変化と呼ばれる、アミロイドタンパク質からなる異常重合体が確認される。老人斑の主要構成成分はアミロイドβ(Aβ)であり、神経原線維変化の主要構成成分は微小管結合タンパク質のタウである。その中で、タウの広がり、アルツハイマー病の進行における認知機能低下と相関があることが知られている。また、このような、脳内でのタウ蓄積病理の広がりを説明するメカニズムとして、タウアミロイドが核となって近傍の細胞内において正常タウをアミロイドに誘導する、細胞間伝播機構が考えられている。レビー小体型認知症やパーキンソン病などに関与するαシヌクレインなどの細胞内アミロイドも、同様の細胞間伝播メカニズムによってアミロイド病変を広げると考えられている。また、このような細胞内アミロイドは、疾患の原因となるだけでなく、シナプスの長期記憶維持作用など、生理的に重要な役割を果たす可能性も近年指摘されている。

2. 研究の目的

本研究目的は、光で駆動する人工触媒を利用することで、細胞内アミロイドに化学反応を起こすことにより動態を制御し、その結果、アミロイドの新たな機能を同定することである。具体的には、様々な生体分子が共存する細胞内環境において、タウ、αシヌクレインなどのアミロイドに対し選択的に酸化反応を進行することのできる光触媒を開発し、これを適用することにより、細胞内アミロイドがもたらす病態に関わる機能の同定を目指す。

3. 研究の方法

申請者らはこれまで、光エネルギーを利用し、空気中の分子状酸素を酸素原子源(ドナー)として、アミロイド凝集体を選択的に酸化する触媒の開発を進めてきた(Nat. Chem., 2016, 8, 974-982; Chem, 2018, 4, 807-820など)。本触媒は、可視光照射による励起状態において、アミロイド凝集体に特徴的な高次構造であるクロスβシート構造に結合したときのみ反応性に富む一重項酸素を産生するスイッチ機能を有しており、通常のタンパク質(オフターゲット)とは反応せずにアミロイド凝集体に対して選択的に酸化を起こす。その結果、酸化を受けたアミロイドタンパク質は凝集性を失い、アミロイド機能がノックダウンされる。特に、光触媒1は、組織透過性の高い近赤外光によって活性化可能であり、マウスの脳内においてAβアミロイドを酸化して病原性を軽減することに成功した(図1)。

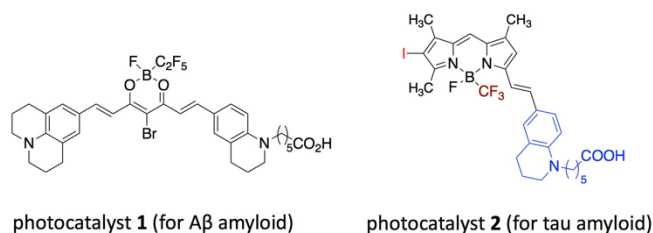


図1 光酸化触媒1及び2の化学構造

タウアミロイドもまた、Aβアミロイドと同様にクロスβシート構造をとっていることから、光酸化触媒によって酸化できる可能性が考えられた。実際、光触媒1は、タウアミロイドを酸化することができた。しかしながら、タウアミロイドに対する光触媒1の酸化活性は、中程度にとどまった。そこで、今回、新たな酸化触媒を開発し、それをを用いて細胞アミロイドに関する機能評価を実施することとした。

4. 研究成果

新たな酸化触媒として、アミロイド凝集体に対する蛍光プローブを参考に、ボロン-ジピロメテン錯体(以下BODIPY)を母骨格とした光触媒2を設計した(図1)。光触媒2のヨウ素原子による重原子効果が酸化活性に重要な役割を果たしていたことに加え、ホウ素上のトリフル

オロメチル基によって触媒の光安定性が顕著に増大されることが分かった。また、テトラヒドロキノリンは強い電子ドナー性を有しており、触媒の吸収波長を長波長化することに功を奏した。テトラヒドロキノリンに連結したカルボン酸は、触媒の水溶性向上に寄与した。光触媒 **2** を用いて、リコンビナントタウ（repeat domain からなるタウモデルを使用）に対する酸素化を評価したところ、既存の光触媒 **1** と比べ効率的に酸素化が可能であることが明らかになった（図 2a）。酸素化は主にタウのヒスチジン残基に生じていた。一方、凝集していない単量体タウに対しては、光触媒 **2** は酸素化活性を発現しなかった（図 2b）。すなわち、本触媒は、クロスβシート構造を有するタウアミロイドに対して選択的に酸素化するスイッチ機能を持ち合わせていた。

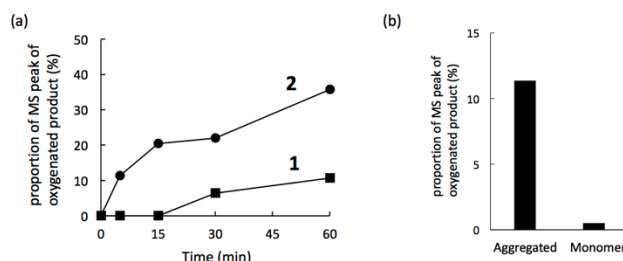


図 2 (a) 凝集タウに対する触媒 **1** 及び **2** の光酸素化; (b) 触媒 **2** を用いた凝集タウ及び単量体タウに対する酸素化反応

アミロイドの凝集を認識して蛍光を発する色素を用いた実験により、光触媒 **2** による酸素化修飾によって、タウアミロイドの形成が完全に抑制されることが明らかとなった。さらに、前述の細胞間伝播機構において核シードとして働くタウアミロイドを酸素化し、それをタウを高発現している培養細胞にインジェクトしたところ、酸素化していないインタクトなタウアミロイドをインジェクトした時（コントロール）と比較して、培養細胞内における新たなタウのアミロイド形成誘導が抑制されることも明らかになった。本結果は、タウアミロイドを酸素化することにより、細胞内における凝集形成につながる動態を制御できることを示している。

しかしながら、BODIPY を母骨格とした光触媒は、細胞膜透過性が低かったため、引き続き、細胞内タウアミロイドに対するプローブ分子骨格をもとにした光酸素化触媒を創製した。本触媒は、細胞膜を効率的に透過することで、細胞内に存在するタウアミロイドを高い選択性および収率で酸素化することを認めた。

また、 α -シヌクレインが形成するアミロイドに対する光酸素化触媒についても、同様の設計指針に基づいて同定した。具体的には、GFP 蛍光団をもとに作られたアミロイド凝集体を認識する蛍光プローブを参考にした光酸素化触媒を開発した。本触媒は、生体利用可能な 595 nm の光照射によって活性化し、 α シヌクレインのアミロイドに対して光酸素化反応を促進した。さらに、タウと同様、酸素化修飾により α シヌクレインの凝集を制御することができた。

今回、細胞内アミロイドであるタウ及び α シヌクレインに対して、選択的かつ高収率で酸素化することのできる新規触媒を同定した。さらに、本触媒を利用して、細胞間伝播機構における核シードを酸素化し、これによって、細胞内でのアミロイド形成を制御できることを示した。今後、細胞膜を通過し、細胞内環境でアミロイドを光酸素化することのできる触媒を利用することにより、時空間を精密に限定した、より厳密な光酸素化及びアミロイド凝集の制御が可能になると考えられ、これにより、アミロイドの病態機能に関するさらに詳細な知見が得られると考えられる。また、本手法を他のアミロイドタンパク質に応用することで、アミロイドがもたらす病的な機能のみならず、生理的な機能の同定も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nozomu Nagashima, Shuta Ozawa, Masahiro Furuta, Miku Oi, Yukiko Hori, Taisuke Tomita, Yohei Sohma, Motomu Kanai	4. 巻 7
2. 論文標題 Catalytic Photooxygenation Degrades Brain Aβ in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Adv.	6. 最初と最後の頁 eabc9750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abc9750	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 T. Suzuki, Y. Hori, T. Sawazaki, Y. Shimizu, Y. Nemoto, A. Taniguchi, S. Ozawa, Y. Sohma, M. Kanai, T. Tomita	4. 巻 55
2. 論文標題 Photo-oxygenation inhibits tau amyloid formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 6165-6168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9cc01728c	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 P. Bondia, J. Torra, C. M. Tone, T. Sawazaki, A. Valle, B. Sot, S. Nonell, M. Kanai, Y. Sohma, C. Flors	4. 巻 142
2. 論文標題 Nanoscale view of amyloid photodynamic damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 922-930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.9b10632	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 K. Shinoda, M. Kanai, Y. Sohma	4. 巻 85
2. 論文標題 Design, synthesis, and properties of a chemically-tethered amyloid-β segment trimer resistant to inter-trimer mis-aggregation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 1635-1643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.joc.9b02612	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 堀由起子、相馬洋平	4. 巻 55
2. 論文標題 神経変性疾患治療を目指したアミロイドの光酸素化反応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 532-536
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 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Atsushi Iwai, Nozomu Nagashima, Reito Nakamura, Yukiko Hori, Taisuke Tomita, Youhei Sohma, Motomu Kanai
2. 発表標題 Development of Photo-Oxygenation Catalyst for α -Synuclein
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀由起子、永島臨、小澤柊太、相馬洋平、金井求、富田泰輔
2. 発表標題 新規光酸素化触媒による非侵襲的光酸素化反応の確立
3. 学会等名 日本認知症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相馬洋平
2. 発表標題 アミロイドを光酸素化する人工触媒
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Youhei Sohma
2. 発表標題 Development of Blood-Brain Barrier Permeable Oxygenation Catalyst of Amyloid Peptide
3. 学会等名 The 18th AKABORI Conference 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相馬洋平
2. 発表標題 アミロイドペプチドを標的とした化学合成から 疾患治療戦略の開発まで
3. 学会等名 TAKEDA Academic salon2021spring (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相馬洋平
2. 発表標題 アミロイドを光酸化化する人工触媒
3. 学会等名 新潟大学コアステーション 「ユビキタスグリーンケミカルエネルギー連携教育研究センター」 第11回研究シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩井 篤志, 永島 臨, 中村 麗人, 堀 由起子, 富田 泰輔, 相馬 洋平, 金井 求
2. 発表標題 パーキンソン病治療戦略を指向した シヌクレインに対する光酸化触媒
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山根三奈、岩井篤志、永島臨、岡田匡充、植田光晴、安東由喜雄、相馬洋平、金井求
2. 発表標題 トランスサイレチンアミロイドに対する光酸化触媒の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大井 未来、城野 柳人、相馬 洋平、金井 求
2. 発表標題 メチレンブルー誘導体を基盤とした新規A 光酸化触媒の開発と機能評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤崎鷹、鈴木崇允、清水裕介、根元侑、谷口敦彦、小澤柊太、堀由紀子、富田泰輔、相馬洋平、金井求
2. 発表標題 触媒的光酸化はタウのアミロイド形成を阻害する
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14 回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Youhei Sohma
2. 発表標題 Chemo- and site-selective chemical transformations of peptides and proteins
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬洋平
2. 発表標題 疾患原因アミロイドに対する光酸化触媒の開発
3. 学会等名 有機合成化学協会関東支部 2019年度若手研究者のためのセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬洋平
2. 発表標題 化学・位置・標的選択的なペプチド化学変換
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taka Sawazaki, Takanobu Suzuki, Yusuke Shimizu, Yu Nemoto, Atsuhiko Taniguchi, Shuta Ozawa, Yukiko Hori, Taisuke Tomita, Youhei Sohma, Motomu Kanai
2. 発表標題 Catalytic photo-oxygenation enables inhibition of tau amyloid formation
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nozomu Nagashima, Shuta Ozawa, Yukiko Hori, Taisuke Tomita, Youhei Sohma, Motomu Kanai
2. 発表標題 Development of Blood-Brain Barrier Permeable Oxygenation Catalyst of Amyloid beta
3. 学会等名 The 56th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taka Sawazaki, Takanobu Suzuki, Yusuke Shimizu, Yu Nemoto, Atsuhiko Taniguchi, Shuta Ozawa, Yukiko Hori, Taisuke Tomita, Youhei Sohma, Motomu Kanai
2. 発表標題 Inhibition of tau amyloid formation using catalytic photo-oxygenation
3. 学会等名 The 56th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤崎 鷹, 鈴木崇允, 清水裕介, 根本侑, 谷口敦彦, 小澤柗太, 堀由起子, 富田泰輔, 相馬洋平, 金井 求
2. 発表標題 タウのアミロイド形成を阻害する光酸化触媒の開発
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬洋平
2. 発表標題 神経変性疾患治療を目指した生体内人工触媒反応
3. 学会等名 第36回関西地区ペプチドセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬洋平
2. 発表標題 神経変性疾患治療を目指した生体内人工触媒反応
3. 学会等名 7th WCCU（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永島臨, 小澤柊太, 堀由起子, 富田泰輔, 相馬洋平, 金井求
2. 発表標題 血液脳関門を透過可能な光酸化触媒の開発と低侵襲的な脳内アミロイド 光酸化
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大井未来, 城野柳人, 相馬洋平, 金井求
2. 発表標題 メチレンブルー骨格を基盤とした新規A 酸化触媒の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井篤志, 永島臨, 中村麗人, 堀由起子, 富田泰輔, 相馬洋平, 金井求
2. 発表標題 シヌクレインに対する新規光酸化触媒の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤崎鷹, 鈴木崇允, 清水裕介, 根本侑, 谷口敦彦, 小澤柊太, 堀由起子, 富田泰輔, 相馬洋平, 金井求
2. 発表標題 触媒的光酸化反応によるタウアミロイド形成の阻害
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 光酸素化触媒化合物及びこれを含有する医薬	発明者 金井求、相馬洋平、 永島臨、富田泰輔、 堀由起子、小澤柊太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/44846	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 メチレンブルーを母骨格とする新規光触媒	発明者 金井求、相馬洋平、 城野柳人、大井未来	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/1008	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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		
スペイン	IMDEA Nanociencia		