

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390020

研究課題名(和文) A オリゴマーは単一カルシウムチャンネルを形成するか？

研究課題名(英文) Single calcium channel(s) formed by Abeta oligomer(s)

研究代表者

西道 隆臣 (Saïdo, Takaomi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・シニア・チームリーダー

研究者番号：80205690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の病態形成に重要であるA₄₃がチャンネル活性を有する可能性が示唆された。また、ペルオキシ二硫酸アンモニウムとルテニウム触媒を使用した光化学反応であるPICUP(photo-induced cross-linking of unmodified proteins)法により、A₄₃オリゴマーを作製し、高速液体クロマトグラフィーによる精製法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We showed the possibility that A₄₃, an essential molecule for pathological process of Alzheimer's disease, could induce channel activity. Also, we successfully prepared A₄₃ oligomers by PICUP (photo-induced cross-linking of unmodified proteins) method and established the purification procedure with HPLC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド ペプチド オリゴマー カルシウムチャンネル

1. 研究開始当初の背景

アミロイド ペプチド(A β)の蓄積はアルツハイマー病(AD)発症までの過程で最初に認められる病理的特徴であるが、A β がどのようにADを引き起こすのかについては十分に明らかにされていない。近年、A β が複数集合したオリゴマーがA β 単量体や繊維化A β よりも神経毒性が高いとする「オリゴマー仮説」が提唱され、徐々に認知されている。A β オリゴマーの作用機序は未解明な部分が多いが、A β オリゴマー自体がカルシウムチャンネルを形成するという「アミロイドチャンネル仮説」が提唱されている。本仮説は、「A β の蓄積」とADモデルマウスやAD脳で生じる「神経細胞内カルシウム濃度の破綻」を結びつける魅力的な説であり、その立証はADに対する新たな創薬標的の創出につながることを期待される。しかし、先行研究では限られたA β 分子種しか扱われていない。加えて、チャンネル活性の確認も人工脂質膜や培養細胞レベルでの検証にとどまっている。

2. 研究の目的

本研究の目的はA β オリゴマー自体がカルシウムチャンネルを形成するという「アミロイドチャンネル仮説」を検証することである。A β オリゴマーは神経病理学的にAD発症機構の早い段階から存在するとされている。そのため、A β オリゴマーがどのようにしてAD発症に関与しているのか、その作用機序を明らかにすれば、予防的治療の観点から優れた創薬ターゲットとなる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) AD患者の脳内に多量に存在するアミロイドペプチドにはA β 1-40、A β 1-42、A β 1-43、A β 3(pE)-40(pE:ピログルタミン酸)、A β 3(pE)-42、A β 3(pE)-43の6種類が存在する。本研究ではA β 3(pE)-43を除く5種類を使用した。A β オリゴマーはペルオキシ二硫酸アンモニウムとルテニウム触媒を使用した光化学反応であるPICUP法により作製した。作製したA β オリゴマーは分画範囲の異なる2種類のゲルろ過カラム、あるいはゲルろ過カラムと逆相カラムを使用した高速液体クロマトグラフィーにより精製した。

(2) イオンチャンネル活性は人工脂質膜を用いて測定した。人工脂質膜の形成にはfolding法を用いた。同一サイズの2つの小型チャンバー間に60 μ m程度の小孔を有するテフロンフィルムを設置し、穴の両側面にDOPE、DOPSの2種類の脂質で構成される人工脂質膜を形成した。チャンバー内は適切なバッファーで満たした。電圧を印加後にベースラインのシフトが生じないこと、グラミシジンの添加によりチャンネル活性が認められること、の2点の指標から適切に膜が形成されているかを評価した。膜の形成を確認後、A β を添加し、波形の変化を検出した。

4. 研究成果

(1) チャンネル形成能を調べるために、安定性・精製度の高いA β オリゴマーの作製に取り組んだ。PICUP法により作製したA β オリゴマー混合物の電気泳動後の銀染色像を図1に示した。約5kDaであるA β モノマーに加えて、ダイマー、トリマー、テトラマーを含む複数種類のA β オリゴマーの存在が確認できた。

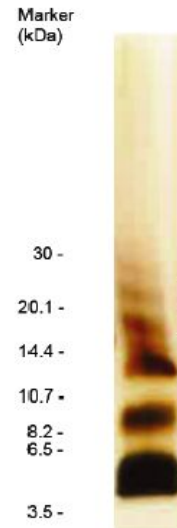


図1 作製したA β オリゴマーの銀染色像 (A β 1-42を使用)

単一A β オリゴマーは、作製したA β オリゴマー混合物をゲルろ過カラムと逆相カラムを使用することで精製した。ゲルろ過カラムを使用したA β オリゴマー混合物のHPLCチャートを図2に示した。A β オリゴマーは難溶性かつカラムへの吸着性が高いため、調製が困難であったが、作製・精製操作を複数回行うことで問題を解決した。本研究により確立したA β オリゴマー調整法は、オリゴマーの機能的意義の検討に有用であると考えられる。また、ADモデルマウス脳内のA β オリゴマーの分離同定にも応用できる可能性がある。

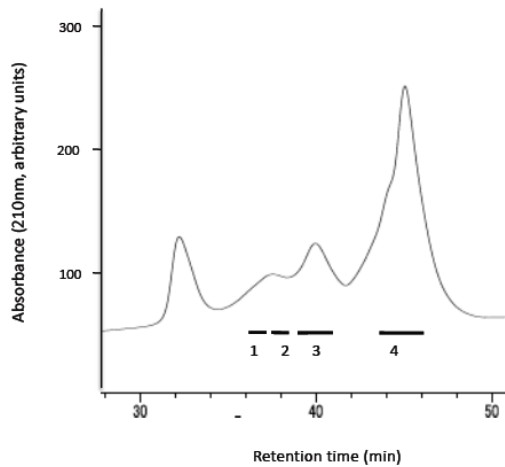


図2 作製したAβオリゴマー混合物のゲルろ過

Aβ1-42を使用. カラム温度:50°C
1:テトラマー 2:トリマー 3:ダイマー 4:モノマー

(2) 人工脂質膜の系が上手く構築されているか、を確認するためポジティブコントロールであるグラミシジンを用いて実験を行った。グラミシジンは土壌細菌が産生するペプチド性の猛毒である。グラミシジン自体が細胞膜にチャンネルを形成することで一価の陽イオンを通過させ、毒性を発揮する。人工脂質膜が形成されていれば、グラミシジンがイオンを通す小孔をあけることで、チャンパー間をイオンが移動し電気的な変化が検出されることになる。1ng/mlのグラミシジンを5ul添加し、添加後の一定時間の電気的な活動を測定した。添加後数分の後に、持続時間数百ミリ秒～数秒、2pAの矩形波が複数観察された(図3)。特徴的な矩形波は同様の脂質膜を使ったグラミシジンの先行研究と類似したものであり、構築した人工脂質膜の系が正しく機能していることが確認された。

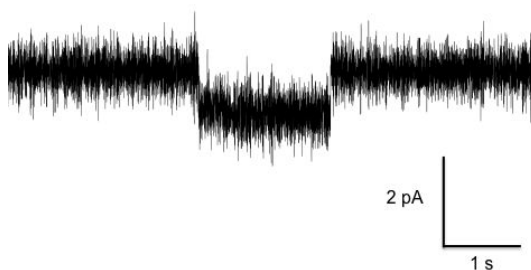


図3 グラミシジン添加後にみられた特徴的な矩形波

先行研究により A 40、A 42 がチャンネル活性を有することが報告されている。一方、A 43 は神経毒性や凝集性が他の A 分子種よりも高く、アルツハイマー病の病態形成に重要であることが知られているが、チャンネル活性をもつかどうかは明らかでなかった。A 43 をチャンパー内に添加したところ、数分後からスパイク状の波形が多数検出された(図4)。この結果より、A 43 がイオンチャンネル形成能を有する可能性が示唆された。

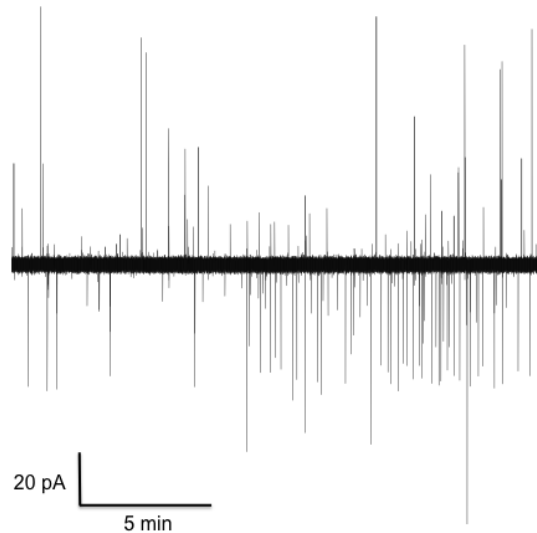


図4 Aβ添加後にみられた電気的变化

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. Nilsson P, Sekiguchi M, Akagi T, Izumi S, Komori T, Hui K, Sörgjerd K, Tanaka M, Saito T, Iwata N, Saido TC (2015) Autophagy-related protein 7 deficiency in amyloid (A) precursor protein transgenic mice decreases A in the multivesicular bodies and induces A accumulation in the Golgi. Am J Pathol. 185(2): 305-313. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.10.011 査読有
2. Saido TC (2013) Metabolism of amyloid peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 89(7): 321-339. https://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/89/7/89_PJA8907B-04/_article 査読有

[学会発表](計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/38>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西道 隆臣 (SAIDO, Takaomi)

独立法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：80205690

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし