

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14956

研究課題名(和文)凝集・脱凝集の視点から探るアミロイドオリゴマー生成機構

研究課題名(英文) Investigation of amyloid beta oligomerization process via aggregation and disaggregation

研究代表者

塚越 かおり (Tsukakoshi, Kaori)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20708474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病におけるA β オリゴマー生成機構としてよく知られたA β モノマーの凝集によるオリゴマー形成と、A β 線維が凝集抑制作用をもつ薬剤や分子シャペロンにより脱凝集することに注目し、凝集・脱凝集の双方からA β オリゴマーが生じる可能性を評価した。モデル動物の解析により、脳内でアミロイドオリゴマーは膜上で形成しているか、凝集後に膜上に局在する可能性を示した。凝集阻害剤を用いた脱凝集アッセイの結果、A β オリゴマーが生じることを明らかにした。以上より、脳内におけるA β オリゴマー形成過程で、2方向の経路が存在することを示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：Amyloid β (A β) consists of senile plaques that are pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD). Many studies suggest A β oligomers possess toxic effects on the neuronal cells. However, it is still unclear what kind of A β oligomers arise in vivo and exist in the brain. In this study, I investigated generation process of A β oligomers in vivo by investigation of AD-model mice. As AD-model mice are being aged, aggregated A β is gradually increased in the brain, so that A β oligomers also accumulate in brain of AD-model mice during fibrillization.

I found that low-molecular-weight of A β oligomers was generated in membrane-enriched fraction of AD-model mouse brain. I also showed A β oligomers was generated from A β fibrils by disaggregation. Thus, A β oligomers may be processed by aggregation and disaggregation in vivo.

研究分野：生命工学

キーワード：アミロイド オリゴマー 凝集

1. 研究開始当初の背景

タンパク質がアミロイド線維と呼ばれる凝集物を形成し、組織に沈着することで生じる疾病の総称をアミロイドーシスという。アミロイドーシスの一つであるアルツハイマー病では、アミロイドβが形成するアミロイドβ線維の沈着が特徴である。アミロイドβは通常モノマーとして存在するが、ひとたびβシート形成を介した凝集を開始すると、中間体であるオリゴマーを経てアミロイド線維を形成することが知られている(図1)。

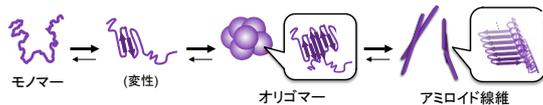


図1. アミロイドβ凝集形成過程の簡略図

アルツハイマー病研究の初期には、脳に蓄積するアミロイドβ線維が発症の原因と考えられていた。しかし、アミロイドβオリゴマーに高い細胞毒性が見出されてからは、毒性の本体はアミロイドβオリゴマーであり、アミロイドβ線維の形成は一種の防御機構であるとの考えが主流になった。アミロイドβオリゴマーの排除や形成抑制は、有用なアルツハイマー病予防・治療戦略であるが、*in vivo* でどのようにアミロイドβオリゴマーが形成されるのか、そのオリゴマー形成機構は明らかになっていない。

合成アミロイドβを用いた *in vitro* 凝集実験により、図1で示す順方向のプロセスにおいて多様なオリゴマーが生じることがわかっている。さらに、アミロイドβ線維は凝集抑制作用をもつ薬剤や、分子シャペロンにより脱凝集することが知られている。申請者は、*in vivo* におけるアミロイドβオリゴマー生成機構としても、よく知られた 1) アミロイドβモノマーの凝集によるオリゴマー形成だけでなく、2) アミロイドβ線維の脱凝集によるオリゴマー形成も存在するのではないかと仮説を立てている。そこで本研究では、脳内にアミロイドβ線維を蓄積するアルツハイマー病モデルマウスを解析材料とし、順方向・逆方向それぞれに着目した解析を通し、*in vivo* におけるアミロイドβオリゴマー生成機構を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は生化学的手法と分子生物学的手法を駆使して、1) *in vivo* におけるアミロイドβモノマーの凝集によるオリゴマー形成、及び、2) アミロイドβ線維の脱凝集によるオリゴマー形成能を明らかにすることを目的とした。1)では水溶性アミロイドβがどのよ

うなオリゴマー分子種から構成されるかを生化学的・免疫化学的解析により示し、初期のオリゴマー形成機構を明らかにすることを目指した。2)ではアミロイドβ線維が脱凝集した際、アミロイドβオリゴマーが生じるかどうかを評価した。

3. 研究の方法

1) 解析試料として、主にアミロイドβ₁₋₄₂が脳内に蓄積するアルツハイマー病モデルマウスの脳を用いた。マウス半脳分の皮質・海馬に1 mlのTBS buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7.6)を加え、ホモジナイザーペッセルを用いて破碎した。破碎液を遠心し、回収した上清をTBS soluble画分とした。ペレットにRIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium Deoxy Cholate, pH7.6)を加え、懸濁した後1時間攪拌した。遠心し、回収した上清をRIPA soluble画分とした。得られたペレットに0.9% SDSを含むRIPA bufferを加え、懸濁した後1時間攪拌した。遠心し、回収した上清をSDS soluble画分とした。全てのバッファーにはプロテアーゼ阻害剤カクテルを加えた。遠心は全て15,000 rpm, 4°C, 30分間で行った。RIPA soluble画分、SDS soluble画分に含まれるアミロイドβを、抗アミロイドβ抗体82E1を用いたウエスタンブロッティング(WB)で解析した。

2) 解析試料として、合成アミロイドβペプチドをHam's F12 mediumで希釈し、22°Cで4日間インキュベートすることで調製したアミロイドβ線維を用いた。アミロイドβ線維と、脱凝集能が報告されている薬剤3種をリン酸バッファー中で混合し、8~16時間インキュベートした。インキュベート後に溶液を回収し、電気泳動で分離後、銀染色にて脱凝集によるオリゴマー形成を解析した。

4. 研究成果

1) 18ヶ月齢を超えるモデルマウスの皮質・海馬全体には、不溶性のアミロイドβ₁₋₄₂線維が蓄積していることがわかっている一方で、アミロイドβオリゴマーの蓄積については不明である。これまでに細胞外液・細胞質由来のタンパク質を含むと考えられる。TBS soluble画分のWB解析を行なった結果、アミロイドβモノマーがメインバンドであり、低分子量のアミロイドβオリゴマーは観察できなかった。そこでTBS soluble画分を得た後のペレットから、界面活性剤を含み膜画分を可溶化できるRIPA bufferを用いてタンパク質を抽出し、WB解析を行った。

結果を図2に示した。RIPA soluble画分に、モノマー、トリマー、テトラマー、高分子量オリゴマーが観察された。膜画分にトリマー、テトラマーが存在する可能性が示唆された。トリマーと思われるバンドはCTFβである可能性もある。膜タンパク質であるGABAA receptorをマーカーとしたWB解析の結果、RIPA soluble画分には細胞膜に含まれるタンパク質が回収されていることを確かめている。よって脳内において、膜画分に分子量の異なる複数のアミロイドβオリゴマーが存在することが示唆された。一方、TBS soluble画分ではアミロイドβモノマーがメインバンドであったことから、脳内でアミロイドβオリゴマーは膜上で形成しているか、凝集後に膜上に局在する可能性が考えられた。

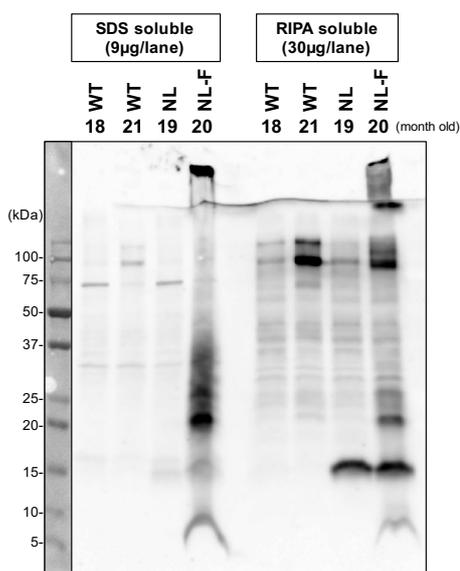


図2. RIPA soluble画分に含まれるアミロイドβオリゴマー。NL-F: アルツハイマー病モデルマウス。NL: CTFβ観察のためのコントロールマウス。WT: 野生型マウス。

また不溶性画分をSDSで可溶化し、ウエスタンブロット解析に供すると、複数のアミロイドβオリゴマーのバンドが観察され(図2)、且つペレットにアミロイドβ線維が含まれることが確認できた。膜画分の解析で観察された一部のアミロイドβオリゴマーは分子量が大きく、電気泳動で分離されなかったため、660 kDaの分子量まで解析可能なゲルろ過クロマトグラフィーでの解析系を立ち上げた。また高感度かつ特異的にアミロイドβ₁₋₄₂を検出する手法の開発にも着手し、10 Ofmol程度の合成アミロイドβ₁₋₄₂を検出できることを確認した(図3)。そこで、高感度アミロイドβ₁₋₄₂検出法により、再度TBS soluble画分の低分子量アミロイドβ₁₋₄₂オリゴマーを解析した結果、TBS soluble画分にはアミロイドβ₁₋₄₂モノマー

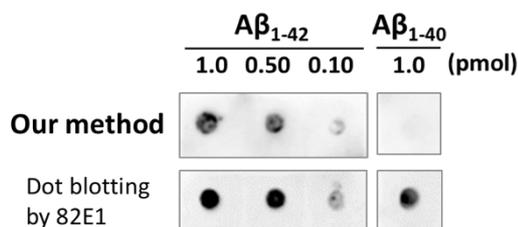


図3. アミロイドβ₁₋₄₂特異的な高感度検出法の結果。開発した手法により(現在投稿論文準備中)、感度を維持したままアミロイドβ₁₋₄₀(凝集能が低いと考えられるアミロイドβ)とアミロイドβ₁₋₄₂を区別できた(図3上)。抗アミロイドβ抗体82E1はアミロイドβのN末端を認識するのでC末端側が異なるバリエーションを区別して検出できないので、アミロイドβ₁₋₄₀も測り込む(図3下)。

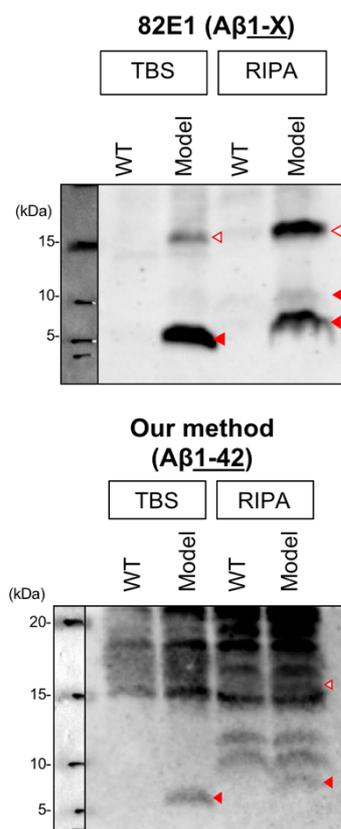


図4. TBS soluble画分に対してアミロイドβ₁₋₄₂特異的なWB解析を行なった。結果、アミロイドβ₁₋₄₂の低分子量オリゴマーは観察されなかった。

のみが検出され、一方RIPA soluble画分にはアミロイドβ₁₋₄₂ダイマーを検出した(図4)。以上より、細胞膜がアミロイドβオリゴマー凝集において重要な役割を担うこと

が示唆された。

2) アミロイドβオリゴマー生成機構としてよく知られたアミロイドβモノマーの凝集によるオリゴマー形成だけでなく、アミロイドβ線維が凝集抑制作用をもつ薬剤や分子シャペロンにより脱凝集することに注目し、脱凝集によりアミロイドβオリゴマーが生じる可能性を評価した。脱凝集を促すとされる薬剤はアミロイド線維の分解が確かめられている一方、分解産物としてオリゴマーが生じるかどうかは検討されていない。そこで脱凝集能が報告されている薬剤を一定時間アミロイドβ線維に暴露し、アミロイドβオリゴマー形成の有無を検討した。結果、いくつかの分子量のアミロイドβオリゴマー由来のバンドがゲル中に観察され、脱凝集によってアミロイドβオリゴマーが生じることが明らかとなった。以上の結果から、脱凝集がアミロイドβオリゴマー形成の原因となる可能性が示唆された。

本研究より、順方向のアミロイドβオリゴマー形成プロセスとして、脳内でアミロイドβが細胞膜周辺で凝集すること、逆方向のプロセスとしてアミロイドβ線維からの脱凝集が存在することが示唆された。今後、アルツハイマー病モデルマウスから抽出したアミロイドβ線維を用い、*in vivo*における脱凝集を原因とするアミロイドβオリゴマー形成の解析や、脱凝集産物オリゴマー特異的なリガンドの作製および染色実験を実施することで、脳内でアミロイドβオリゴマーがアミロイドβ線維からの解離で産生される可能性を検討していくことで、脳内におけるアミロイドβオリゴマー生成機構を明らかにすることができると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① S. Goto, K. Tsukakoshi, K. Ikebukuro, Development of aptamers against unpurified proteins, *Biotechnol. Bioeng.*, 114(12), 2017, 2706-2716, 査読有, 10.1002/bit.26389

② K. Tsukakoshi, K. Ikebukuro, Sensitive and Homogeneous Detection System with Aptamer-Based Biosensor, *Sensor Mater.*, 28(10), 2016, 1083-1089, 査読有, http://myukk.org/SM2017/sm_pdf/SM1270.pdf

③ K. Tsukakoshi, Y. Ikuta, K. Abe, W. Yoshida, K. Iida, Y. Ma, K. Nagasawa, K. Sode, K. Ikebukuro, Structural regulation by a G-quadruplex ligand increases binding abilities of G-quadruplex-forming

aptamers, *Chem. Commun.*, 52(85), 2016, 12646-12649, 査読有, 10.1039/C6CC07552E

[学会発表] (計7件)

① 塚越かおり、細井千尋、池袋一典、Aβオリゴマーの高感度検出に向けた Proximity Ligation Assay の開発、第36回日本認知症学会学術集会、2017年11月24日～26日、石川県立音楽堂・もてなしドーム地下イベント広場(石川・金沢)

② 塚越かおり、細井千尋、池袋一典、Proximity Ligation Assay によるアミロイドβ特異的検出、第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年9月7日～2017年9月9日、東京大学(東京・文京)

③ K. Tsukakoshi, C. Hosoi, K. Sode, K. Ikebukuro, BINDING PROPERTIES OF AMYLOID OLIGOMER-BINDING DNA APTAMERS AGAINST AMYLOID BETA OLIGOMERS, 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, 2017年3月29日～2017年4月2日, Vienna, Austria

④ 塚越かおり、細井千尋、池袋一典、アミロイドオリゴマー結合アプタマーを用いた、核酸増幅に基づく水溶性アミロイドβオリゴマーの検出、日本化学会第97春季年会、2017年3月16日～2017年3月19日、慶應大学日吉キャンパス(神奈川・横浜)

⑤ 塚越かおり、生田結里、飯田圭介、馬悦、長澤和夫、早出広司、池袋一典、グアニン四重鎖特異的リガンドを用いた DNA アプタマーの構造制御、第10回バイオ関連化学シンポジウム、2016年9月7日～2016年9月9日、石川県立音楽堂・もてなしドーム地下イベント広場(石川・金沢)

⑥ K. Tsukakoshi, C. Takahashi, Y. Ikuta, K. Iida, K. Nagasawa, K. Sode, K. Ikebukuro, Development of multivalent aptamers for high-sensitive detection of target proteins, *Biosensors2016*, 2016年5月25日～2016年5月27日, Gothenburg, Sweden

⑦ 塚越かおり、藤岡亮、細木恵美、高野二郎、齊藤貴志、高島明彦、西道隆臣、APP ノックインマウスにおけるリン酸化タウ病態の解析、第34回日本認知症学会学術集会、2015年10月2日～2015年10月4日、リンクステーションホール青森・ホテル青森(青森・青森)

[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://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/57/0005661/profile.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚越 かおり (TSUKAKOSHI, Kaori)
東京農工大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：20708474

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし