

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05078

研究課題名(和文)糖化・酸化修飾をトリガーとするアミロイドの凝集とプロテアーゼ抵抗性の分子機構

研究課題名(英文) Glycation and oxidation on amyloid beta: Molecular mechanisms of the effects on aggregation and protease-resistance

研究代表者

大江 知行 (Oe, Tomoyuki)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：10203712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：A₄₀の凝集は、H2O2で促進、4-hydroxy-2(E)-nonenal、4-hydroxy-2(E)-nonenalおよびmethylglyoxalで抑制され、主修飾部位も同定した(Met32, N末端, His6,13,14, Arg5, Lys16など)。Neprilysin (NEP)あるいはinsulysin (IDE)は、A₄₀未凝集体を1日で消化したが、7日まで延長しても凝集体を消化できなかった。更に未凝集体との反応液から、30前後のペプチドを同定し、ターン構造(E22DVGS26)を含む10残基程度の主要ペプチドの存在から、一次構造より二次構造を認識した消化が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は、アミロイド(A₄₀)の構造変化・凝集に起因すると考えられ、現在まで種々の凝集トリガーが指摘されている。通常A₄₀は、インシュリン分解酵素IDE、脳内酵素NEPにより分解・除去される。一方、疫学調査で指摘されるアルツハイマー病の危険因子(糖尿病・老化)は、関連する糖化・酸化ストレスを通してA₄₀を修飾する可能性がある。本研究では、A₄₀の糖化・酸化修飾に着目し、化学ストレス下での凝集変化と修飾体の構造、IDE・NEPの切断部位と凝集による抵抗性の獲得を明らかにした。本知見は、『アルツハイマー病』と『糖尿病』・『老化』との関連解明と治療ターゲット探索の一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：Aggregation of A₄₀ was affected by chemical stresses: promoted by H2O2, but inhibited by MG, 4-hydroxy-2(E)-nonenal, 4-hydroxy-2(E)-nonenal, and methylglyoxal. Major modification sites were also identified as follows: Met32, N-term, His6,13,14, Arg5, Lys16, etc. Non-aggregated A₄₀ was digested by neprilysin (NEP) or insulysin (IDE) for one day incubation. However, aggregated A₄₀ was not digested even by prolonged incubation (7 days). From the reaction mixture between non-aggregated A₄₀ and NEP/IDE, several long peptides (ca. 30) were identified. The major peptides (ca. 10 amino acids) were found to include the turn region (E22DVGS26), suggesting that NEP/IDE can recognize the secondary structure, not primary structure.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：アミロイド 化学修飾 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) **アルツハイマー病の発症メカニズム**: 原因タンパク質のアミロイド (A β) の構造変化・凝集に起因する^[1]。現在まで、早期診断・治療ターゲット探索すべく、種々の凝集トリガーが指摘されている。しかしながら、化学修飾との観点での議論は少なかった。
- (2) **A β クリアランスメカニズム**: A β は、インシュリン分解酵素であるインシリシン、脳内酵素のネプリライシンの基質となり、分解・除去されることが報告されている^[2]。
- (3) **糖尿病・老化との関連**: 糖尿病は、多くの疫学調査で、アルツハイマー病の危険因子と指摘されている^[3]。また、両疾病は老化と共に増加する。また糖尿病・老化は、各々糖化ストレス・酸化ストレスを増加させる事も知られている。
- (4) **タンパク質の化学修飾**: タンパク質は、糖化ストレス・酸化ストレスで容易に修飾を受ける。とりわけ A β では、高次構造維持に重要な His 上に酸化・付加修飾が起こるため^[4]、凝集能・分解酵素への抵抗性の変化が予想される。
- (5) **アルツハイマー病研究の分析基盤の問題**: 研究の殆どが『免疫化学的手法による A β の定量』、『分子イメージングプローブによる凝集体の検出』を分析基盤としている。それ故、抗体の交差反応性・プローブの特異性を考え時、糖化・酸化修飾の様なアミノ酸上の想定外の微小変化を分別できず、これらを無視した議論となっていた。

以上の背景に加え、申請者は、タンパク質上の化学修飾に着目したバイオマーカー探索法として『化学修飾オミクス』^[5,6]の有用性を示唆し、以下の断片的な知見を得ていた。

- (6) 糖化・酸化ストレスが容易にタンパク質を修飾する^[7]
- (7) 生理的条件下で修飾を受けた A β が、質量分析法でのみ分別可能^[8]
- (8) 酸化修飾が、 β -シヌクレインの凝集反応を惹起する^[9]
- (9) 酸化修飾が、アンジオテンシン II の関連酵素との反応やレセプター親和性へ著しく影響する^[10]

これらの背景から、A β の糖化・酸化修飾による『凝集』、『プロテアーゼ抵抗性』の分子メカニズムを明らかにできれば、『アルツハイマー病』と『糖尿病』・『老化』との関連が解明できる、との着想に至った。

関連論文

- [1] *Int. J. Alzheimers Dis.*, **2012**, 369808 (2012); [2] *J. Neurosci. Methods.*, **190**, 57 (2010); [3] *World J. Diabetes.*, **6**, 744 (2015); [4] *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 911 (2006); [5] *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **57**, 167 (2009); [6] *Jpn. J. Clin. Chem.*, **38**, 177 (2009); [7] *J. Mass Spectrom.*, **373**, 72 (2014); [8] *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3723 (2006); [9] *Biochem. J.*, **393**, 343 (2006); [10] *Anal. Biochem.*, **437**, 10 (2013).

2. 研究の目的

本研究では、A β の糖化・酸化修飾を足掛かりに、『アルツハイマー病』と『糖尿病』・『老化』の関連解明を究極の目的とした。即ち、修飾 A β の『構造解析』、『凝集能の評価』、『分解酵素への抵抗性・基質特異性』を、質量分析法・各種分光法を駆使した解析基盤の構築、糖化・酸化ストレスを介した凝集・プロテアーゼ抵抗性の分子メカニズムを以下明らかにする事を研究目的とした。

- (1) **A β の糖化・酸化修飾体を調製し、その構造を明らかにする**: 解析には、構造の明確な標品が必要である。A β とグルコース、活性酸素種による生成物をイオントラップ型質量分析計 (必要なら NMR 等) で、修飾を受けたアミノ酸の位置、修飾形態まで明らかにする。
- (2) **A β クリアランスに関連する切断部位を明らかにする**: 未だ直接的なエビデンスにかける、インシリシン、ネプリライシンによる A β の切断部位を、特異性・優先順位まで明らかにする。
- (3) **糖化・酸化修飾 A β の構造変化・凝集能を明らかにする**: A β の構造変化・凝集能は、円二色性スペクトル・蛍光プローブ等で分析出来る。また、SDS-PAGE により、モノマー型、オリゴマー型、凝集体の分別も可能である。in vitro で調製した修飾体を、修飾形態と構造変化・凝集能の関係まで明らかにする。
- (4) **糖化・酸化修飾 A β のプロテアーゼ抵抗性を明らかにする**: インタクトおよび糖化・酸化修飾 A β のモノマー、オリゴマー、凝集体を酵素反応に付し、修飾位置・凝集による、酵素消化効率、生成ペプチドの同定、切断部位の変化まで明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) in vitro 糖化・酸化ストレス由来の A β の反応と修飾体の構造解析

~ 分析法確立・凝集実験には、酸化修飾体の標品が必須である ~

- A β には、C 末端側で鎖長が異なり、凝集能の異なる A β 1-38, A β 1-40, A β 1-42 (A β 38, A β 40, A β 42) を用い検討し (DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAI IGLMVG³⁸/VV⁴⁰/IA⁴²)、最終的に操作性と生体内存在比を考慮して A β 40 を用いる事にした。
- 生体を模倣した、糖化ストレス (グルコース)、酸化ストレス (Cu^{II}/アスコルビン酸およ

び H₂O₂) 更には酸化ストレス化生じる糖由来のアルデヒド (メチルグリオキサール) 過酸化脂質由来のアルデヒド (4-hydroxy-2(E)-nonenal, HNE; 4-oxo-2(E)-nonenal, ONE) 条件下、PBS 中、37 °C でインキュベーションを行った。

- 経時的反応、*in vitro* ストレス濃度を変化させ、A の反応性と主要な反応生成物を同定した。
- 上記反応は UV HPLC あるいは LC/イオントラップ型 MS によりモニターした。
- 修飾部位を明らかにする目的で、トリプシン (切断点 R と K の C 末端) V8E (切断点 E 末端) などのプロテアーゼで断片化した。
- MS/MS により、修飾位置 (修飾アミノ酸) を同定した。

(2) Nepriylsin (NEP) insulysin (IDE) による A 切断部位の同定

~未だ直接的なエビデンスの無い分解酵素の特異性を、修飾体解析に先立ち最適化する~

- 同様に、鎖長の異なる A₃₈, A₄₀, A₄₂ を検討し、最終的に操作性と生体内存在比を考慮して A₄₀ を用いる事にした。
- 酵素反応のポジティブコントロールとして基質ペプチドのインシュリンを用いた。
- PBS 中、37 °C の酵素反応に付し、生成するペプチドを経時的に LC-MS/MS に付した。
- MS/MS データの b イオン、y イオンを用いた *de novo* シークエンス法により、部分アミノ酸配列を求め、全アミノ配列と比較して切断部位を明らかにした。
- 上記の経時的反応により、選択性・切断の優先順位を比較した。
- コントロール酵素として、トリプシン、V8 など A 非特異的な酵素も用いた。
- 凝集過程のプロテアーゼ選択性・切断点は以下、モニターしながら行った。
- SDS-PAGE 上のオリゴマーのバンドを *in gel* 消化後、LC/MS で解析した。
- チオフラビン T で蛍光増強を確認後、プロテアーゼとの反応に付した。

(3) 糖化・酸化修飾 A の構造変化・凝集実験

~凝集トリガー候補の選択のため、*in vitro* で調製した各種酸化修飾体の構造変化・凝集能の関係まで明らかにする~

3-1 反応系での評価

- (1)の反応系 (糖化ストレス・酸化ストレス下で、PBS 中、37 °C) 凝集反応の経時変化を見た。
- 初期のオリゴマー形成反応のモニターは、SDS PAGE で行った。
- 凝集反応のモニターにはチオフラビン T を用いる蛍光プローブ法で行った。
- 蛍光プローブ法は、蛍光マイクロプレートリーダー上 96 穴あるいは 384 穴プレート中、リアルタイムで測定した。

(4) 糖化・酸化修飾 A のプロテアーゼ耐性

~糖化・酸化修飾によるプロテアーゼ抵抗性を評価する~

- (2)の反応系 (糖化ストレス・酸化ストレス下で、PBS 中、37 °C) 凝集反応の経時変化を見た。
- 質量分析によるプロダクトイオンを解析し、消化ペプチドの同定、切断部位の特定を行った。
- 各修飾形態によるプロテアーゼ抵抗性の影響を検討した。
- 酵素 (NEP, IDE) と PBS 中、37 °C インキュベートし、経時的に LC-MS/M に付し、基質となるか否かを確認した。
- 酵素反応の経時変化を基に、修飾による酵素消化効率・切断部位の変化を解析した。
- コントロールとして、トリプシン、V8 など A 非特異的な酵素も用いた。
- 凝集過程のプロテアーゼ抵抗性は以下、モニターしながら行った。
- SDS-PAGE 上のオリゴマーのバンドを *in gel* 消化後、LC/MS で解析した。
- チオフラビン T で蛍光増強を確認後、プロテアーゼとの反応に付した。

4. 研究成果

(1) 内因性ストレスによるアミロイド の化学修飾と凝集能変化に関する研究成果

A₄₀ の凝集は、H₂O₂ により促進され、HNE、ONE および MG により抑制された (図 1)。HNE (図 2) および ONE (図 3) との反応では、0~4 個付加した修飾体を確認し、その主要修飾部位を特定した (HNE: N 末端, His^{6,13,14}; ONE: N 末端, Arg⁵, Lys¹⁶)。今回の結果では、化学修飾が凝集のどの段階に影響しているか不明であり、SDS-PAGE や CD などによる評価も検討中である。

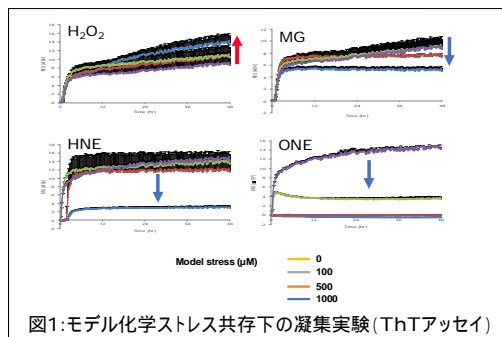
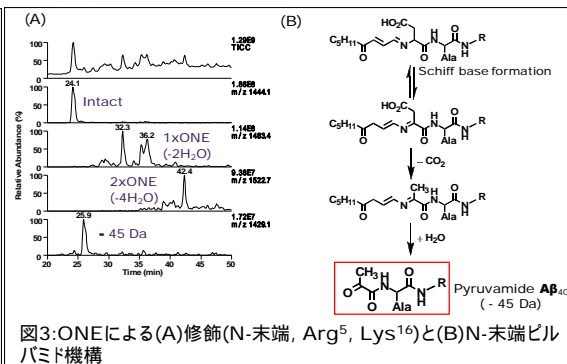
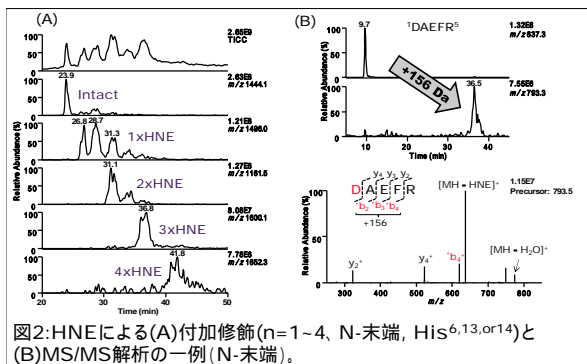


図1:モデル化学ストレス共存下の凝集実験(ThTアッセイ)



(2) アミロイド のプロテアーゼ抵抗性の評価に関する研究成果

A₄₀ 未凝集体では、NEP/IDE とともに 1 日の反応で消化が進行した (図 4)。一方凝集体では、反応を 7 日まで延長しても消化は認められず、凝集後の A₄₀ が NEP、IDE への抵抗性を獲得した事を明らかにした (図 5)。更に、A₄₀ 未凝集体は NEP/IDE いずれとも 3 日間の反応で 5~20 残基程度の 30 前後のペプチドを生成した。また各酵素の切断パターンも明らかにし、ターン構造 (E²²DVGS²⁶) を含む 10 残基程度のペプチドを複数同定し、切断パターンから、一次構造より二次構造を認識した可能性を示唆した (図 6)。今後、ダイマーやオリゴマーとの反応も精査し、プロテアーゼ抵抗性の獲得メカニズム、凝集過程特異的なペプチド断片のバイオマーカーとしての可能性を検討したい。

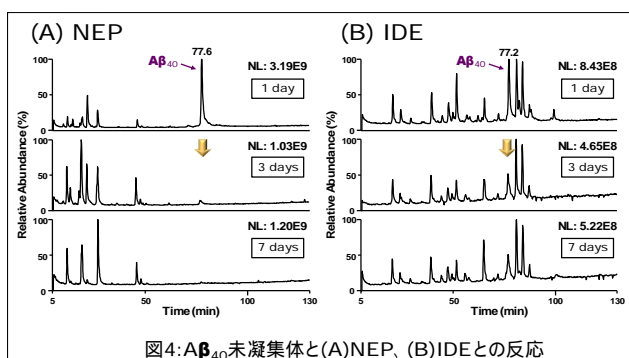


図4: Aβ₄₀未凝集体と(A)NEP、(B)IDEとの反応

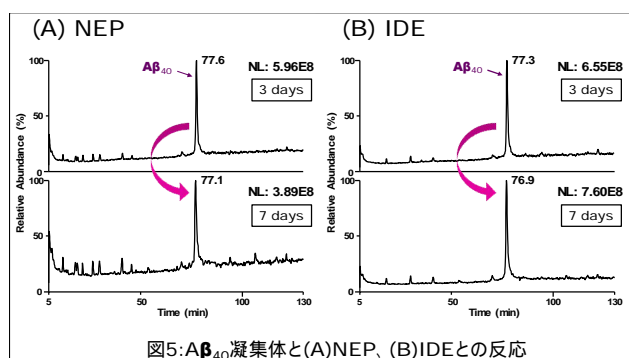


図5: Aβ₄₀凝集体と(A)NEP、(B)IDEとの反応

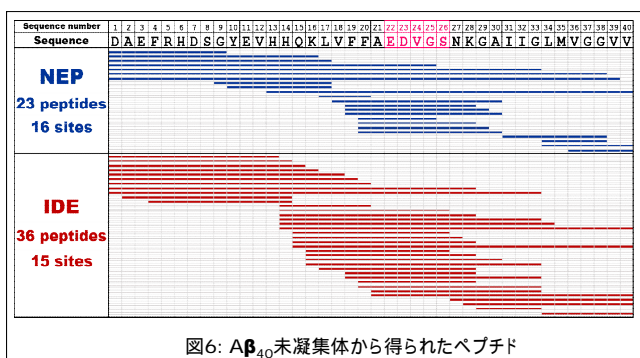


図6: Aβ₄₀未凝集体から得られたペプチド

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Fumiya Tatsuno, Fumiya Tatsuno, Seon Hwa Lee, Tomoyuki Oe: Imidazole dipeptides can quench toxic 4-oxo-2(E)-nonenal: Molecular mechanism and mass spectrometric characterization of the reaction products. *Journal of Peptide Science*, 8-9, e3097 (2018). DOI: 10.1002/psc.3097 (査読有)

Seon Hwa Lee, Atsushi Matsunaga, Tomoyuki Oe: Inhibition effect of pyridoxamine on lipid hydroperoxide-derived modifications to human serum albumin. *PLOS ONE*, 13(4), e0196050 (2018). DOI: 10.1371/journal.pone.0196050 (査読有)

[学会発表](計 12 件)

Dai Kato, Seon Hwa Lee, Tomoyuki Oe: Aggregated amyloid- and its protease-resistance. *Joint Meeting of the Tohoku Area Chemistry Societies*, Sep. 21, 2019, Yamagata, Japan (scheduled).

笹本和之、李 宣和、大江知行: 化学修飾アミロイド の凝集能評価、第 57 回 日本薬

学会東北支部大会、2018年10月20日、仙台

嘉藤 大、笹本和之、李 宣和、大江知行：アミロイド 凝集体のプロテアーゼ抵抗性の評価、第57回 日本薬学会東北支部大会、2018年10月20日、仙台

笹本和之、嘉藤 大、李 宣和、大江知行：化学修飾アミロイド の凝集とプロテアーゼ抵抗性の評価、日本分析化学会第67年会、2018年9月12日~14日、仙台

笹本和之、嘉藤 大、李 宣和、大江知行：化学修飾アミロイド の凝集能に関する基礎的検討、平成30年度東日本分析化学若手交流会、2018年7月6日~7日、松島

大江知行、李 宣和：タンパク質・ペプチドの新規N末端修飾分子メカニズムと臨床的意義、新アミノ酸分析研究会第7回学術講演会、2017年12月4日(月)、東京

大江知行：タンパク質・ペプチドのN末端修飾：分子メカニズムと臨床的意義、第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2017)、2017年11月30日(木)、仙台

大江知行：タンパク質・ペプチドのN末端修飾解析：分子メカニズムと臨床的意義、第24回クロマトグラフィーシンポジウム、2017年6月15日(木)、仙台

笹本和之、李 宣和、大江知行：過酸化脂質由来の反応性アルデヒドによる化学修飾アミロイド の研究、日本薬学会第137年会、2017年3月24日~27日、仙台

横山瑞樹、李 宣和、大江知行：凝集性タンパク質のオリゴマー化と酸化修飾の関連解明を目的とした基礎的検討、第55回日本薬学会東北支部大会、2016年9月25日、郡山

Tomoyuki Oe, Seon Hwa Lee: Alternative analytical approach for biomarker discovery through chemical modifications on a specific peptide or protein. (Invited lecture, Keynote speaker), KSMS Summer Conference, 2016 August 17~19, Gyeongju, Korea

大江知行：化学修飾オミクスを基盤としたバイオマーカー探索、第2回東北ドラッグデリバリーシステム研究会、2016年8月10日、仙台

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研究室 Web: <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~bunseki/bunseki.html>

ORCID id: <https://orcid.org/0000-0002-3893-0815>

researchmap: <https://researchmap.jp/read0138585/>

Research Gate: https://www.researchgate.net/profile/Tomoyuki_Oe

Scopus id: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7004967951>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：李 宣和

ローマ字氏名： **LEE, Seon Hwa**

所属研究機関名：東北大学

部局名：薬学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：**60519776**

(2)研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 涼 (~2016年8月)

ローマ字氏名：**SATO, Ryo**

所属研究機関名：東北大学

部局名：薬学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：**20757166**

(3)研究協力者

研究協力者氏名：笹本 和之

ローマ字氏名：SASAMOTO, Kazuyuki

研究協力者氏名：嘉藤 大

ローマ字氏名：KATO, Dai

研究協力者氏名：横山 瑞樹

ローマ字氏名：YOKOYAMA, Mizuki

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。