

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590080

研究課題名（和文） D-アミノ酸により誘導されるアミロイド凝集機構の解明と抗アルツハイマー病薬の開発

研究課題名（英文） The mechanism of amyloid fibril formation induced by D-amino acids

研究代表者

楯 直子（TATE NAOKO）

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：00201955

研究成果の概要（和文）：近年、アルツハイマー病患者の脳の老人斑を構成するアミロイドβペプチド（Aβ）の中に通常の L-体から異性化した D-アスパラギン酸（D-Asp）が確認されている。Aβはアミノ酸42残基より成り、1、7、23位に Asp が存在する。Asp が D-体に異性化した各種 D-Asp 含有 Aβについて、構造と線維化、凝集体形成について解析し、[D-Asp23]Aβは線維化・凝集体形成速度が顕著に大きくなることを明らかにした。また、老人斑中では正常型 Aβと各種 D-Asp 含有 Aβが混在しているが、互いに線維化や凝集体形成の速度や進行度に影響を及ぼすことはないことも解明した。さらに D-Asp 含有 N 末端フラグメント Aβ1-23は全長 Aβの線維化・凝集体形成を促進することを見出した。以上の結果より、アルツハイマー病発症に関わる Aβ凝集現象の制御において、Aβ1-23部位が重要な鍵を握っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Amyloid β proteins (Aβ) extracted from the amyloid cores of neuritic plaques are considerably isomerized at their Asp residues. To assess the impact of D-Asp on Aβ conformation and on initiation of amyloid fibril formation, I used wild type Aβ and D-Asp-containing Aβ which D-Asp was substituted for L-Asp at residues 1, 7, 23. Amyloid fibril formation was enhanced by D-Asp23. Moreover, I demonstrated that D-Asp containing Aβ showed no effect on fibril formation of wild-type Aβ. Lastly, I showed that Aβ fragment 1-23 promoted formation of fibrils and aggregates of wild-type Aβ.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アルツハイマー病、アミロイドβペプチド、線維化、凝集、D-アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病の主要病原因子としてアミロイドβペプチド（Aβ）が見出された。Aβが凝集体を形成して、神経細胞膜に沈着す

る現象が神経細胞死を引き起こし、アルツハイマー病の発症に至る。

(2) 近年、加齢に伴い生体内のタンパク質

を構成するアミノ酸がD-体からL-体に異性化する現象が確認された。A β 中には1、7、23位の3箇所にはアスパラギン酸 (Asp) が存在し、それぞれがD-体に異性化した各種D-Asp 含有 A β が見出されている。アルツハイマー病患者の脳の老人斑を形成する A β 中にも D-Asp 含有 A β が確認されている。

(3) そこで、上記(1)、(2)の背景から、A β の構造、線維形成および凝集体形成にD-アミノ酸 (D-Asp) が与える影響を解明し、アルツハイマー病治療薬開発に役立つ A β の構造・物性に関する物理化学的な分子基盤情報を集積する研究を進めたいと考えた。

2. 研究の目的

上記の研究の背景(1)より、アルツハイマー病の主要病原因子である A β が会合し凝集体を形成する現象を抑制することが、アルツハイマー病の予防・治療の1つの方策と考えられる。また、上記の研究背景(2)の記述のように、加齢とともに生体内にD-アミノ酸が生成することが見出され、アルツハイマー病患者の脳の老人斑を構成する A β 中にも加齢と共に生成するD-体の Asp が確認されている。そこで、D-Asp と A β の線維化・凝集体形成現象との関連性を軸として、A β の構造・物性に関する構造生物学的研究を行い、アルツハイマー病の予防および治療薬開発に結びつく分子基盤情報を集積することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

各種 D-Asp 含有 A β を合成し、A β の構造・物性について、分光法および物理化学的手法により計測した。

(1) 各種 A β の構造については、円偏光二色性分光法(CD)により計測した。

各種 A β は0.1%NH₄OH に一度、溶解後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に最終濃度 20 μ M となるように溶解し、フィルターろ過後、円偏光二色性分光器(Jasco 820)による測定を行った。その際、走査速度は 100nm/min とした。

(2) A β の線維化については、チオフラビンTと蛍光光度法を組み合わせたアッセイ法を用いた。

各種 A β は円二色性測定時と同様に、1% NH₄OH に一度、溶解後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に最終濃度 20 μ M となるように溶解した。各種 A β 溶液 8 μ L を 5 μ M のチオフラビンT溶液 800 μ L に加えて、蛍光強度を励起波長 450nm、蛍光波長 482nm で計測した。測定には Hitachi F2500 fluorescence spectrometer を用いた。

(3) 凝集体の形態については電子顕微鏡により観測した。各種 A β は上述の実験と同様に、1%NH₄OH に一度、溶解後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に最終濃度 20 μ M となるように溶解した。24時間、37度でインキュベートした400-mesh colodion-coated copper grid 上に載せて、乾かし、2% phosphotungstic acid で negative 染色して、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-7650 electron microscope) で観測した。

4. 研究成果

(1) 各種 D-Asp 含有 A β の構造を円偏光二色性分光法により計測した。その結果、全ての A β が β シート型の構造を示した。特に23位の Asp がD-体に異性化した A β は速やかに β シート型の構造を形成した。

(2) まず、アミノ酸42残基よりなる全長の D-Asp 含有 A β について、 β シート型構造形成に続いて起こる線維化現象と凝集体形成現象について解析した。線維化についてはチオフラビンTアッセイ法を用いて計測し、凝集体形成については電子顕微鏡により観測した。

A β には1位、7位、23位に Asp が存在し、それぞれが D-体に異性化する。3箇所が存在する Asp がそれぞれ D-体に異性化した各種 D-Asp 含有 A β について、線維化の進行度を調べた。[D-Asp23] A β は正常型 A β (全てのアミノ酸が L-体) と比べて、線維形成速度が著しく上昇した。また、23位に加えて7位の Asp も D-化した[D-Asp23,7] A β においては、さらに線維化速度は増した。一方、23位に加えて1位の Asp も D-化した[D-Asp23,1] A β においては線維化速度は正常型 A β の場合と同様の速度まで減少した。次に凝集体形成について電子顕微鏡で観察したところ、[D-Asp23] A β は正常型 A β に比べて凝集度が高く、さらに7位も D-化すると凝集度もさらに上昇した。一方、23位に加えて1位も D-化した場合は、凝集度は正常型 A β と同程度まで減少した。

(3) アルツハイマー病患者の脳内の老人斑には正常型 A β と D-Asp 含有 A β が混在している。この状況に着目し、両タイプの A β が混在しているときの各タイプの A β の線維化・凝集体形成の実態について計測・観察を行い、互いに与える影響について検討した。D-Asp 含有 A β としては最も典型的な物性を示す[D-Asp23] A β を用いた。線維化現象についてはチオフラビンTアッセイ法および Congo Red binding アッセイ法を用いて解析した。また、凝集体形成については透過型電子顕微鏡を用いて形態観察を行った。その結果、凝集体中には正常型 A β と[D-Asp23] A β

が混在していることが確認された。一方、線維化については両タイプのA β が混在しても、[D-Asp23] A β が正常型 A β の線維化に全く影響を与えることはなく、正常型 A β の線維化の促進は認められなかった。また、正常型 A β によって、[D-Asp23] A β の線維化が促進あるいは抑制されることもなかった。以上の実験結果より、老人斑中に正常型 A β と[D-Asp23] A β が混在していても、互いに線維形成現象について影響を及ぼし合うことはないことが明らかとなった。

凝集体形成においても正常型 A β と[D-Asp23] A β が互いに影響を及ぼし合うことはなかった。

(4) 次に23位のAspのD-体への異性化が線維化・凝集体形成を促進する現象に1位と7位のAspがそれぞれ抑制と促進という異なる影響を与えることに着目し、A β のD-Asp含有N末端フラグメント (A β 1-7、A β 1-23) の添加が全長A β 1-42の物性に及ぼす影響を解析した。

実験に用いたA β のN末端フラグメントはアミノ酸7残基より成るA β 1-7および23残基より成るA β 1-23である。それぞれのフラグメント中の1位、7位、23位にD-Aspを含有するN末端A β フラグメントをデザインし合成して実験の試料とした。各種A β のN末端フラグメントが全長のA β 1-42の線維化に与える影響について、チオフラビンTアッセイ法により計測した。その結果、各種フラグメントA β 1-7は全長の正常型A β 1-42の線維形成に影響を及ぼさなかった。一方、各種フラグメントA β 1-23は正常型A β 1-42の線維化を促進し、高濃度においてはその促進効果が増強した。また、電子顕微鏡による凝集体の形態観察を行ったところ、フラグメントA β 1-23は正常型A β 1-42の凝集体形成を促進することを見出した。これらの実験結果より、アルツハイマー病発症に関わるA β 凝集現象の制御において、A β 1-23部位が重要な鍵を握っていることが明らかになった。

D-Asp と A β の線維化・凝集体形成現象との関連性を軸とした構造生物学的な研究は独自性が高く、研究成果も高く評価されている。今後は構造化学の観点から行ってきた本研究にさらに各種 D-Asp 含有 A β の神経細胞毒性の強弱と構造・物性特性との関連性をさらに追究していきたいと考えている。

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4件)

① Hayashi, K., Sasabe, J., Chiba, T., Aiso, S. and Utsunomiya-Tate, N.
D-Ser containing humanin shows promotion of fibril formation.
Amino Acids 42, 2293-2297 (2012)
査読有り

② Sakai-Kato, K., Hasegawa, T., Takaoka, A., Kato, M., Toyooka, T., Utsunomiya-Tate, N. and Kawanishi, T
Controlled structure and properties of silicate nanoparticle networks for incorporation of biosystem components.
Nanotechnology 22, 1-8 (2011)
査読有り

③ Kasai, A., Yamashita, N. and Utsunomiya-Tate, N.
Collagen racemization and deposition in the lungs of aged rats.
Biochemistry Insights 3, 25-33 (2010)
査読有り

④ Sakai-Kato, K., Umezawa, Y., Mikoshiba, K., Aruga, J. and Utsunomiya-Tate, N.
Stability of folding structure of zinc finger proteins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 384, 362-365 (2009)
査読有り

[学会発表] (計12件)

① 林 周宏、楯 直子
D-アスパラギン酸含有アミロイド β ペプチドの線維・凝集体形成および神経細胞毒性に関する解析
第84回日本生化学会 2011年9月22日
京都国際会館(京都)

② 林 周宏、楯 直子
正常型 Humanin および D-Ser 含有 Humanin の構造・物性に関する研究
日本薬学会第131回年会 2011年3月29日
ツインメッセ静岡(静岡)

③ Uewaki, J., and Utsunomiya-Tate, N.
Preferential domain orientation in HMGB2 protein revealed by NMR spectroscopy.
PACIFICHEM2010 2010年12月18日
Honolulu, USA

④ 楯 直子
アミロイド β ペプチドのアスパラギン酸残

基異性化置換による線維化・凝集機構における構造機能相関解析
日本生化学会第83回大会 2010年12月7日
神戸ポートアイランド(兵庫)

⑤ 森内 寛、楯 直子

Analysis of structure stability of HMGB2
日本生物物理学会第47回年会
2009年10月30日
アクティ徳島 (徳島)

⑥ Moriuchi, H. and Utsunomiya-Tate, N.

Influence of amino acid isomerization on proteins, which cause senescence-related diseases.

The 1st international conference of D-amino acid research.

2009年7月2日

Awaji Yumebutai International Conference Center (Awaji, Hyougo, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楯 直子 (TATE NAOKO)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：00201955

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：