

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32643
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K06498
研究課題名（和文）アミロイド ペプチドの「老化」によるアルツハイマー病病原性変化の解析

研究課題名（英文）The physicochemical analysis of amyloid peptide containing D-Asp

研究代表者
楯 直子（UTSUNOMIYA-TATE, Naoko）

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：00201955
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：加齢に伴いアルツハイマー病原因タンパク質アミロイド（A β ）内に存在する3つのアスパラギン酸（Asp）は異性化してD-Aspとなる。アルツハイマー病の発症・進行の鍵を握るA β の線維化・凝集体形成プロセスに異性化したD-Aspが及ぼす影響について、線維・凝集体の構造安定性、微細形態、及びA β シード（線維核）の線維形成促進機能の観点から生物物理学的に解析し、加齢により生じるD-AspがA β の線維化・凝集体形成過程を多角的に促進することを明らかにした。また、AspのD-体異性化に影響を及ぼす外部環境因子の1つとしてpHが関与することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病患者の脳の老人斑を構成している疾患原因タンパク質アミロイド（A β ）内に3箇所、存在するAsp（1位、7位、23位）がD-Aspに異性化していることが見出されたが、これまでその物性・機能の詳細については不明であった。本研究により、生物物理学的な観点から、異性化D-Asp含有A β が有する物性や機能に関する様々な特性（線維・凝集体構造の安定性と微細形態、及び線維形成プロセス）を明らかにすることができた。この研究成果はアルツハイマー病の予防、及び治療薬の開発に繋がる重要な分子基盤情報となる。

研究成果の概要（英文）：Amyloid β protein, known as a pathogenic protein for Alzheimer's disease, reportedly contains stereo chemically isomerized Asp (D-Asp) at three positions (residues 1, 7, and 23) in aged patients: the elevated fibrilization of Amyloid β containing D-Asp is supposed to be relevant to promote the progression of Alzheimer's disease. We characterized Amyloid β that contains D-Asp residues with biophysical approaches, in terms of the structural stabilities of its fibrils and aggregates, the morphologies, and its cross-seeding abilities to induce amyloid fibrils. We found Amyloid β proteins with D-Asp residues elevated fibrilization and aggregation by raising rates in each constituting step for the processes.

研究分野：生物物理学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 異性化アミノ酸 D-Asp 線維形成 凝集体

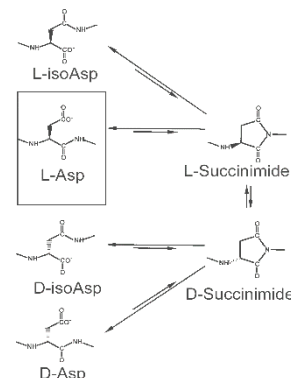
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い生体内タンパク質の代謝は低下し、タンパク質の血中滞留時間が長くなり、非酵素的にアミノ酸のD-体への異性化が起こる (Orpiszewski, et al., FASEB J. 2017)。アルツハイマー病原因タンパク質の1つで42残基のアミノ酸から構成される神経毒性の高いアミロイドβ (Aβ) は3残基の Asp (1位、7位、23位) を含む。アルツハイマー病患者の脳の老人斑において、Aβ中の Asp1、Asp7、Asp23 が D-Asp に異性化していることが

報告されており (Roher et al., PNAS 1994、Shimizu, et al., Biol. Pharm. Bull. 2005)、異性化した D-Asp 含有 Aβ がアルツハイマー病患者の脳内で生成し、老人斑中に存在していることが示されている。

しかしながら、野生型 Aβ (全構成アミノ酸が L-体) と比較して、D-体異性化 Asp 含有 Aβ がどのような物性機能特性 (線維の構造定性、線維・凝集体の形態、線維形成プロセス) を有するかについて詳細は解明されていない。



2. 研究の目的

(1) これまでに D-Asp 含有 Aβ が線維化し凝集体形成することを明らかにしている。本研究ではこの研究成果をさらに進展させて、1位、7位、23位の Asp が D-体に異性化した D-Asp 含有 Aβ について、物性機能特性の解析を進める。具体的には線維・凝集体の構造安定性の解析、電子顕微鏡による Aβ 線維・凝集体の微細形態観察、及び Aβ の線維形成過程におけるシード (線維核) の線維形成促進機能の解析を行う。得られた結果を野生型 Aβ (全構成アミノ酸が L-体) について得られたデータと比較・解析し、D-Asp 含有 Aβ の物性機能特性を明らかにする。

(2) 次に実際に生体内 Aβ において1位、7位、23位の Asp の異性化が確認されていることに基づき、1位、7位、23位の Asp の D-体異性化が起こる外部環境の条件を追究する。生体内を模した系で Aβ を長時間、試験管内インキュベーションし、その外部環境 (溶液条件) に応じて生じる D-体異性化 Asp を分離する実験法を確立し、D-体異性化 Asp 含有 Aβ の生成に係わる外部環境に関する解析を行う。

3. 研究の方法

(1) Thioflavin T (ThT)- assay 法を用いた線維形成の計測

① 線維化したタンパク質と結合すると蛍光を発する蛍光試薬 Thioflavin T (ThT) を用いてタンパク質の線維化を計測した。Aβ 溶液 (20 μM、10 μL) に ThT 溶液 (20 μM、800 μL) を添加し、蛍光光度計 (JASCO FP-8300 fluorescence spectrometer) で蛍光強度 (励起波長 450nm、蛍光波長 482nm) を計測し、Aβ の線維形成を計測・解析した。

② 同様に ThT-assay 法を用いて、シード (線維核) の線維形成促進機能の計測実験を行った。Aβ の線維形成は、(a) 単量体が重合してプロトフィブリルとなってシードを形成する過程と (b) シードから線維が伸長する過程から成り立っている。Aβ のシードは 20 μM Aβ (50mM リン酸バッファー溶液 (pH7.4)) を 37°C、72 時間、インキュベーションし、生成した線維を超音波破碎して得た。Aβ 単体にシードを添加し、ThT-assay 法により蛍光強度を経時的に計測することによって線維形成過程を追跡し、その結果に基づきシードが線維形成を促進する機能を解析した。

(2) タンパク質変性剤であるグアニジン塩酸塩 (Gdn-HCl) により惹起される線維変性に対する耐性を指標として Aβ 線維の構造安定性を解析した。

(3) 透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-7650 electron microscope) による Aβ 線維・凝集体の微細形態観察を行った。

(4) CD スペクトル分光器 (JASCO J-1500 spectrometer) により CD スペクトルを測定し、規則構造である β シート構造転移を計測した。

(5) 試験管内インキュベーションにより起こる Aβ 内の3つの Asp (1位、7位、23位) の D-体異性化を検出する下記の方法を確立した。

① Aβ をトリプシン処理すると4つのフラグメント (a) Aβ (1-5)、(b) Aβ (6-16)、(c) Aβ (17-28)、(d) Aβ (29-42) が得られる。このうち、フラグメント (a) には1位の Asp、(b) には7位の Asp、(c) には23位の Asp がそれぞれ含まれている。

② (a) A β (1-5)、(b) A β (6-16)、(c) A β (17-28)について、L-Asp、D-Asp、L-isoAsp、D-isoAspの各異性化 Asp を含む標準ペプチドの検出ピークを指標として、LC-MSにて異性化 Asp を分離・検出できる測定条件（バッファー条件、グラディエント条件、流速等）を決定した。

③ A β を生理的条件下（pH7.4、塩濃度 150mM、37°C）で4週間、試験管内インキュベーションし、3箇所（1, 7, 23）の Asp の異性化についてキラルカラムを用いた LC-MS で解析した。

④ 次に様々な外部環境（溶液条件：pH、塩濃度など）でインキュベーションして得られた各 Asp の異性化の状況を LC-MS による測定結果に基づき解析した。

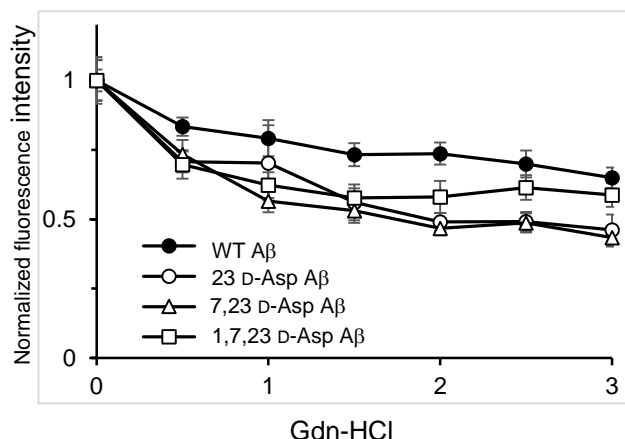
4. 研究成果

(1) A β 線維の構造安定性に異性化 D-Asp が及ぼす影響の解析

本研究課題の開始前に既に1位、7位、23位の各異性化 D-Asp 含有 A β においても野生型 A β （全構成アミノ酸が L-体）と同様に線維化・凝集体形成が起こり、特に23 D-Asp A β 、7, 23 D-Asp A β は線維化・凝集度が高く、両者と比較して1, 7, 23 D-Asp A β は線維化・凝集度は低いことなどを明らかにしている。

本研究ではさらに詳細な線維の物性機能特性の解析を進展させた。まず、異性化 D-Asp 含有 A β が形成する線維の構造安定性の解析を行った。タンパク質変性剤グアニジン塩酸塩(Gdn-HCl)を添加し、ThT-assay 法により時間経過に伴う線維形成状況を計測した。図1に示す通り、Gdn-HClの濃度が高くなるにつれて線維構造を反映する ThT の蛍光強度が低下し、線維構造が崩れていくことが明らかになった。野生型 A β は 3M Gdn-HCl 存在下でも線維構造は約 70%保持されているが、23D-Asp A β 、7, 23D-Asp A β の場合は 50%のみ、また 1, 7, 23 D-Asp A β では 65%保持されていた。

【図1】 ThT-assay による A β 線維構造安定性の解析



上記の結果から、異性化 D-Asp 含有 A β は野生型 A β と比較して、線維の構造安定性が低下していることが明らかとなった。L-Asp が D-Asp に異性化することにより、野生型 A β で形成されていた規則構造の β シート構造が崩れるため、構造安定性が低下したと考えられた。

(2) A β の線維・凝集体形態に異性化 D-Asp が及ぼす影響の観察

次に電子顕微鏡による線維・凝集体の微細形態観察を行った。各種 D-Asp 含有 A β のうち、23位の Asp のみ D 体に異性した 23 D-Asp A β 、及び7位と23位の Asp が共に D-体に異性化した 7, 23 D-Asp A β は、野生型 A β と比較し、線維の凝集度が極めて高いことが確認された。一方、1, 7, 23 D-Asp A β の場合には野生型 A β と同程度の線維凝集度であった。また高解像度で観察したところ、23 D-Asp A β 及び7, 23 D-Asp A β においては、凝集体を形成している線維が野生型 A β の線維よりも太いことも確認された。

A β には Asp が3箇所存在するが、D-体異性化する Asp の位置により、線維の太さや凝集度が異なることが明らかとなった。

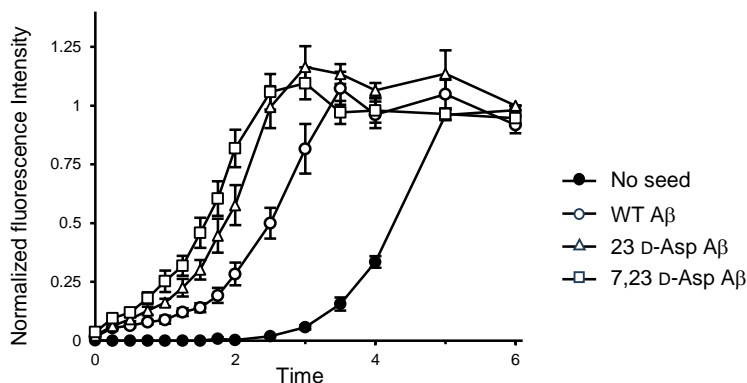
(3) A β 線維形成プロセスにおけるシード効果に D-Asp 異性化が及ぼす影響の解析

A β の線維形成プロセスは、(a)単量体が重合してプロトフィブリルとなってシード（線維核）を形成する過程と(b)シードにさらに単量体が重合して線維が伸長する過程から成り立っている。シードには線維化を速め、線維形成を促進するシード効果があり、A β 線維・凝集体の脳内伝播も促進する。

そこで Asp の D-体異性化が A β のシード効果に及ぼす影響を各種 D-Asp 含有 A β の中で凝集能がとりわけ高い 23 D-Asp A β 、及び 7, 23 D-Asp A β を対象として解析した結果を図 2 に示した。本実験において蛍光強度の増加は線維形成の進行を反映している。シードを全く添加しない場合は線維形成を開始するまでに 2 時間以上要するが、まず野生型のシード (WT A β) を加えた場合、線維形成はラグタイム無しに進行し始め、シード無しの場合よりも速く線維化が進行した。次に 23 D-Asp A β シードあるいは 7, 23 D-Asp A β シードを添加した場合、添加直後から線維形成を開始し、線維形成速度は野生型 A β シードよりも有意に速くなることが確認できた。

さらに各シード存在下において形成された線維・凝集体の形態を電子顕微鏡で観察したところ、野生型 A β シード、23 D-Asp A β シード、7, 23 D-Asp A β シードをそれぞれ添加するとシード非存在下と比較して、A β 線維の凝集度は一層、高くなっていった。また、野生型 A β シードと比較して、23 D-Asp A β シードあるいは 7, 23 D-Asp A β シードを添加した場合の方が線維の凝集度は一層、亢進した。A β 中の Asp の D-体異性化はシードの線維形成機能を促進することが明らかとなった。

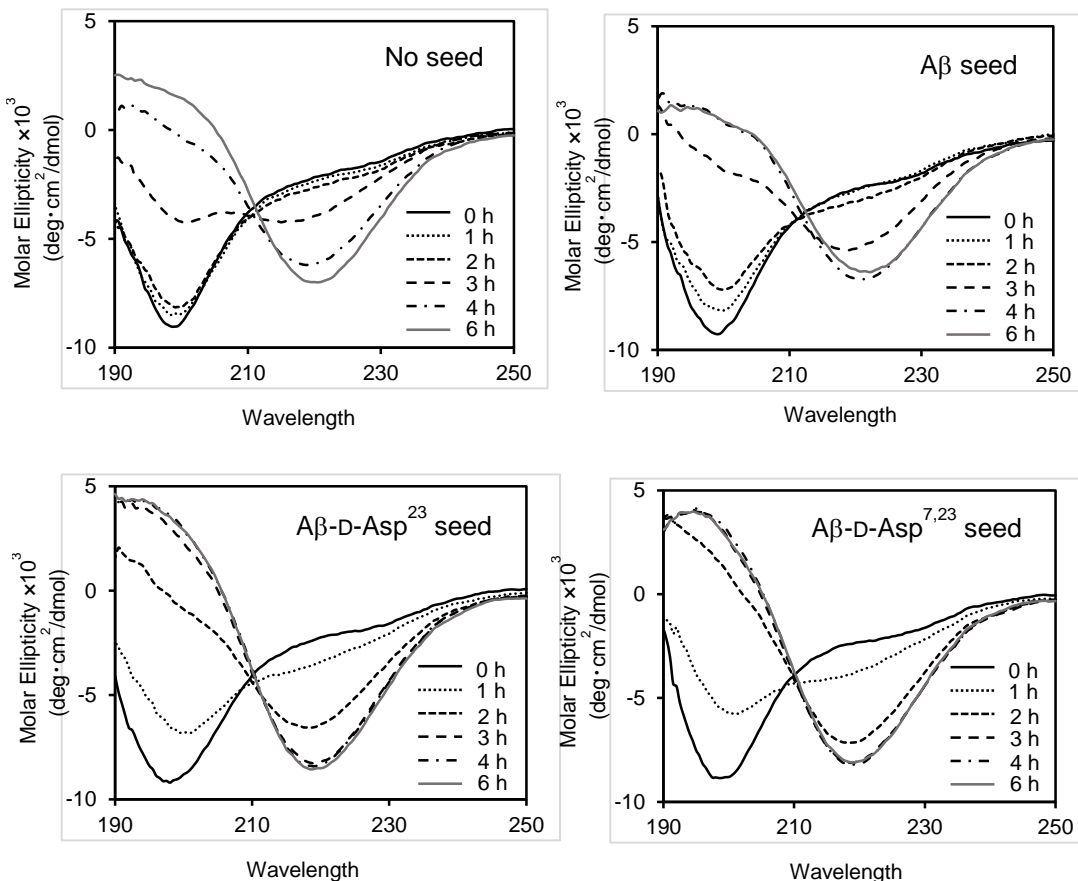
【図 2】 A β 線維形成に対するシード効果



(4) シード存在下、 β シート構造転移に D-Asp 異性化が及ぼす影響の解析

上記 (3) の結果を受け、A β はまずランダム構造から β シート構造に転移した後に、線維形成を開始することから、各シードが A β の β シート構造転移に及ぼす効果を計測した。

【図 3】 A β の β シート構造転移に対するシード効果

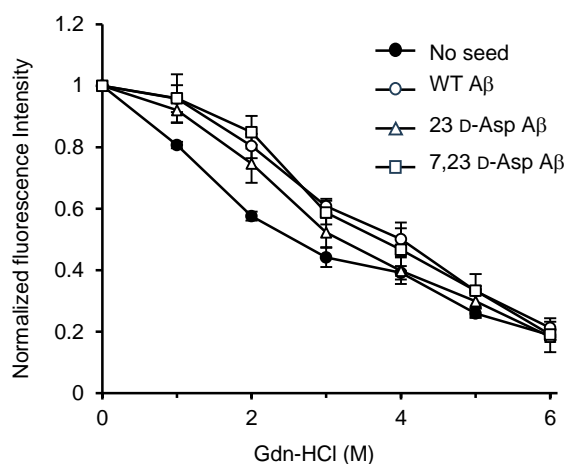


CD スペクトル計測を行った結果を図3に示した。βシート構造をとる場合、CD スペクトルにおいて波長 218 nm で極小値を示す。シードが無い場合には Aβ のβシート構造への転移が終了するまでに 6 時間を要するが、野生型 Aβ シードを添加すると 4 時間でβシート構造転移が終了する。さらに 23 D-Asp Aβ シードあるいは 7, 23 D-Asp Aβ シードを添加した場合には 3 時間でβシート構造転移が終了する。

以上の結果から、上述の (3) において明らかにした Aβ 中の Asp の D-体異性化によるシードの線維形成機能の促進は、Asp の D-体異性化により線維形成に先立って起こる Aβ のβシート構造転移を促進することに起因することを明らかにできた。

(5) シード存在下、形成した Aβ 線維の構造安定性にシードの D-Asp 異性化が及ぼす影響の解析
各種 Aβ シード存在下、形成した Aβ 線維にタンパク質変性剤グアニジン塩酸塩 (Gdn-HCl) を添加し、ThT-assay 法により線維量の減少状況を計測し、Aβ 線維の構造安定性を解析した。その結果、図4に示す通り、実験に用いた各シード存在下、形成された Aβ 線維の構造安定性は、シード無しの場合よりは上昇したが、野生型 Aβ と D-Asp 含有 Aβ シードに関して差異は認められず、シード内の D-Asp の存在の影響は見られなかった。

【図4】 シード存在下、形成した Aβ 線維の構造安定性



(6) 試験管内インキュベーションにより産生する Aβ 内の Asp (1 位、7 位、23 位) の異性化の解析

① まず、試験管内インキュベーションにより産生する Aβ 内の Asp (1 位、7 位、23 位) の D-体異性化を検出する方法を確立した。確立した方法については 3. 研究の方法 (5) に記載した通りである。Aβ を生理的条件下 (pH7.4、塩濃度 150mM、37°C) で 4 週間、インキュベーションし、LC-MS により各箇所の Asp の異性化を解析したところ、Asp1 については D-Asp 及び L-iso-Asp への異性化が確認され、Asp7 においては L-iso-Asp への異性化が確認された。Asp23 について、異性化は確認されなかった。インキュベーションにより惹起され異性化は Asp の Aβ 内の位置に依存することが明らかになった。

② 次に外部環境 (溶液条件) を変化させて、異性化の状況を解析した。まず溶液の pH の影響について検討するために pH5、6、8、或いは 9 に設定し、他の条件は①と同様として 4 週間、インキュベーションし、LC-MS により計測した。Asp1 の D-Asp 異性化は pH5 及び pH9 で促進し、Asp7 の異性化は pH6 及び pH8 で抑制された。次に溶液の塩濃度の影響を調べるために NaCl 0mM 或いは 500mM に設定し、他の状況は①と同様として 4 週間、インキュベーションし、LC-MS により計測したところ、Asp1、Asp7 の異性化に塩濃度は影響を及ぼさなかった。以上より、外部環境の pH は Aβ 内の Asp 異性化に影響を与えることを明らかにした。

本研究により、加齢に伴いアルツハイマー病原因タンパク質 Aβ 内の Asp の異性化により生じる D-Asp が、アルツハイマー病の発症や進行の鍵を握る Aβ の線維化・凝集体形成に及ぼす影響について線維・凝集体の構造安定性、微細形態、及び線維形成過程におけるシード (線維核) の線維形成促進機能の観点から初めて明らかにすることができた。また、Asp の異性化に影響を及ぼす外部環境因子の一つとして系の pH が関与することも明らかにした。本研究成果はアルツハイマー病の予防や治療薬の開発に繋がる重要な分子基盤情報となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murata T., Ito, G. and Utsunomiya-Tate, N.	4. 巻 654
2. 論文標題 Site-specific amino acid D-isomerization of Tau R2 and R3 peptides changes the fibril morphology, resulting in attenuation of Tau aggregation inhibitor potency.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 18-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.02.073.	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 Ito, G., Tomita, T. and Utsunomiya-Tate, N.	4. 巻 667
2. 論文標題 LRRK2-mediated phosphorylation and thermal stability of Rab12 regulated by bound nucleotides.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 43-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.05.048.	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 Sato, W. Watanabe-Takahashi M., Murata, T., Utsunomiya-Tate, N., Motoyama, J., Anzai, M., Ishihara, S., Nishioka, N., Uchiyama, H., Togashi, J., Nishihara, S., Kawasaki, K., Saito, T., Saïdo, TC., Funamoto, S. and Nishikawa, K.	4. 巻 6
2. 論文標題 A tailored tetravalent peptide displays dual functions to inhibit amyloid b production and aggregation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-04771-9.	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 Ito, G. and Utsunomiya-Tate, N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Overview of the Impact of Pathogenic LKLR2 Mutation Parkinson' s Disease.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom13050845.	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 Murata, T., Tochio, N. and Utsunomiya-Tate, N.	4. 巻 760
2. 論文標題 Physicochemical characterization of the G51D mutation of α -synuclein that is responsible for its severe cytotoxicity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2021.136077	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村田拓哉、矢萩真菜、国生莉奈、楯 直子
2. 発表標題 タウのD-アミノ酸が線維形成に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤和佳、高橋美帆、村田拓哉、楯 直子、内山陽菜、斉藤貴志、西道隆臣、舟本聡、西川喜代孝
2. 発表標題 A の産生ならびに凝集を抑制する多価型ペプチドの同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田拓哉、大塚遥菜、矢萩真菜、国生莉奈、伊藤弦太、楯 直子
2. 発表標題 タウ微小管結合領域におけるアミノ酸D-体異性化と線維化・凝集体形成の相関関係の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田拓哉、小嶋淳也、吉根直加、小澤雅史、楯 直子
2. 発表標題 家族性パーキンソン病を惹起する変異型 α -synucleinの構造と線維形成の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田拓哉、小嶋淳也、吉根直加、小澤雅史、楯 直子
2. 発表標題 変異型 α -synuclein ; 30PおよびA53Eの線維形成プロセスの解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田拓哉、伊藤弦太、楯 直子
2. 発表標題 タウ線維化にアミノ酸D-体異性化が及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村田拓哉、楯 直子
2. 発表標題 アミノ酸のD-体異性化がアミロイド β のシード効果に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 楯 直子・平嶋 尚英	4. 発行年 2021年
2. 出版社 培風館	5. 総ページ数 270
3. 書名 薬学生の物理化学	

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------