

アルツハイマー病の原因とされるタンパク質を細胞内で可視化する技術を開発

— 発症メカニズムの解明や治療薬の候補物質のスクリーニングに貢献 —

平成 28 年 3 月 17 日

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

国立大学法人 北海道大学

■ ポイント ■

- ・ アルツハイマー病の原因因子の一つであるアミロイドβタンパク質(Aβ)の動態を生体内で可視化
- ・ Aβと蛍光タンパク質 GFP の融合を工夫し、Aβが凝集しても蛍光が観察されるタンパク質を開発
- ・ GFP の蛍光強度を利用した簡便・迅速な治療薬の探索と、詳細な発症メカニズムの理解へ貢献

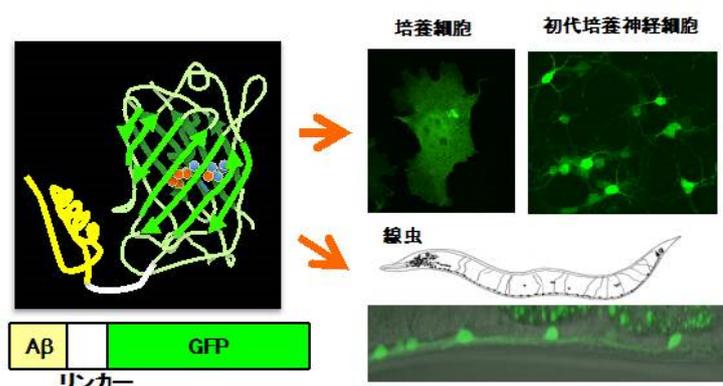
■ 概要 ■

国立研究開発法人 産業技術総合研究所【理事長 中鉢 良治】(以下「産総研」という)バイオメディカル研究部門【研究部門長 近江谷 克裕】脳遺伝子研究グループ 落石 知世 主任研究員らは、国立大学法人北海道大学【総長 山口 佳三】大学院 先端生命科学研究院 北村 朗 助教、学校法人 順天堂【理事長 小川 秀興】順天堂大学 医学部 脳神経内科 志村 秀樹 准教授らと共同で、アルツハイマー病の原因因子の一つであるアミロイドβ(Aβ)タンパク質の動態を、生きた神経細胞内や生体内で可視化する技術を開発した。

Aβは容易に重合し、それが更に集まって大きな凝集体を形成する。Aβと蛍光タンパク質の GFP を融合させたタンパク質(Aβ-GFP)は、Aβの重合により GFP の蛍光が阻害されると推測されている。そのため、生体内で発現させても Aβが重合すると蛍光が観察されず、これまで Aβの局在や動態を可視化することは困難であった。今回、Aβと GFP を繋ぐアミノ酸配列(リンカー)を工夫することで、Aβの重合状態に関係なく GFP の蛍光が観察できる融合タンパク質を開発した。また、この融合タンパク質はアルツハイマー病の発症に関与する毒性の強い Aβオリゴマーを形成することが分かった。

この技術は、培養細胞や生きた個体を用いたアルツハイマー病治療薬の候補物質のスクリーニングへの応用や、アルツハイマー病の発症メカニズムの解明への貢献が期待される。なお、本成果の詳細は、2016 年 3 月 16 日に *Scientific Reports* 誌(電子版、オープンアクセス)に掲載される。

_____は【用語の説明】参照



開発した Aβ-GFP 融合タンパク質の模式図(左)と、培養細胞や線虫内での発現の様子(右)

■ 開発の社会的背景 ■

高齢化社会を背景とした認知症患者の増加は、医療費や介護制度の現状などが絡み合い、世界的にも大きな社会問題となっている。特にアルツハイマー病は記憶障害や判断能力の低下、見当識障害等を特徴とし、認知症の半数以上を占めるにもかかわらず、詳細な発症メカニズムが解明されておらず、有効な治療法や特効薬も開発されていない。

■ 研究の経緯 ■

産総研では、生体メカニズムや疾病に関連する分子の機能・構造の解明を目指した研究を推進しており、そこから得られた知見を基に創薬基盤・医療基盤技術の開発に取り組んできた。アルツハイマー病は、 $A\beta$ を主成分とする老人斑の神経細胞周囲への沈着と、過剰にリン酸化されたタウタンパク質が神経細胞内に蓄積する神経原繊維変化および、脳の萎縮を主な病理学的特徴とする認知症である。これらは発症原因として有力であるものの、いまだアルツハイマー病発症のメカニズムは解明できていない。このような背景の中で、最近少数の $A\beta$ 分子が重合した $A\beta$ オリゴマーが細胞に対する強い毒性を有し、これが細胞内に蓄積されることが病気の発症に強く関与するという説が有力になりつつある。しかし従来の方法では、細胞や脳組織の標本を用いた解析しかできなかったため、生きた細胞内で $A\beta$ のオリゴマー化の状態を直接可視化して毒性との因果関係を詳細に解析する方法や、治療薬の候補となる物質の $A\beta$ の重合に対する効果を直接解析する新たな手法が求められていた。そこで、細胞の可視化や、神経細胞の機能の解析、トランスジェニック動物の作成と解析を行っている産総研と、生きた細胞内での分子の相互作用を解析する蛍光相関分光法に優れた実績を持っている北海道大学大学院先端生命科学研究院で共同研究を行うこととした。

■ 研究の内容 ■

これまで、 $A\beta$ と GFP を繋ぐリンカーとして 12 個以下のアミノ酸から構成されたものが報告されていたが、これらは $A\beta$ が重合すると GFP の蛍光が消失するため、毒性の強いオリゴマーを観察できていなかった。今回、 $A\beta$ と GFP を繋ぐリンカーとして、14 個のアミノ酸を用いて、 $A\beta$ 分子の重合体が形成されても蛍光を観察できる、 $A\beta$ -GFP 融合タンパク質 ($A\beta$ -GFP)を開発した。この $A\beta$ -GFP を核磁気共鳴装置や電子顕微鏡、免疫組織化学法、蛍光相関分光法で解析したところ、GFPを融合させたことで $A\beta$ の重合が一定以上進まず、生体内でも生体外でも 2 量体から 4 量体を中心としたオリゴマーの状態が存在することが分かった(図 1)。これらの特徴を活かし、生きた細胞内で $A\beta$ のダイナミックな動きや、初代培養神経細胞内での蓄積状態などの解析が可能となる。また、重合が進んで繊維状となった $A\beta$ よりも、オリゴマーのほうがより強い毒性を有することから、 $A\beta$ オリゴマーの重合の度合いと細胞への毒性との関係などの解析を行うことができる。

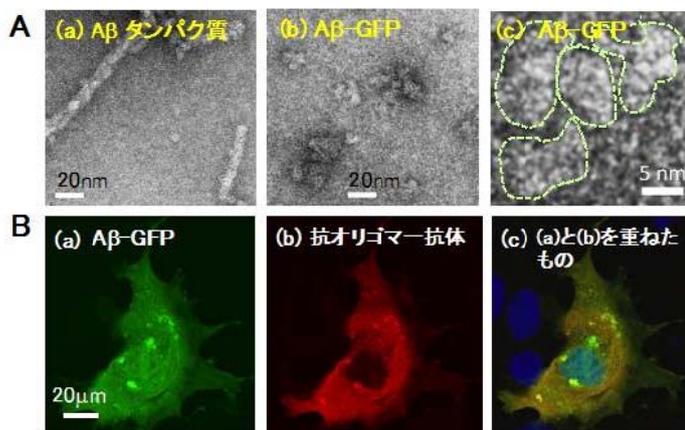


図1 生体内・生体外でのAβ-GFPの様子

(A) Aβタンパク質(a)と Aβ-GFP(b, c)の電子顕微鏡像。Aβタンパク質は重合が進み繊維状になるのに対し、Aβ-GFPは重合が途中で止まり、数量体のオリゴマーを形成する(cの破線で囲まれた部分はそれぞれ1個の重合体を示す)。

(B) Aβ-GFPを発現させたCOS7細胞(a)を、オリゴマーだけを認識する抗体で染色した像(b)。(a)と(b)がほぼ一致することから(c)、Aβ-GFPがオリゴマーであるとわかる。

また、AβとGFPを繋ぐリンカーが短いと、重合の影響を受けてGFPの蛍光は観察されなくなる。そこで今回発見した現象を利用して重合の状態が検出できるシステムを考案し、GFPの蛍光強度を利用した治療候補物質のスクリーニングが可能であることを実証した(図2)。GFP単独を特定の神経細胞に発現させたトランスジェニック線虫では神経細胞内に明瞭な蛍光が観察できる(図2a)が、2個のアミノ酸からなる短いリンカーを持つAβ-GFPを発現させた線虫では、Aβの重合の影響を受けてGFPの蛍光は観察されなかった(図2b)。この線虫を、Aβの重合を抑制するクルクミンを加えた培地で飼育した結果、GFPの蛍光が観察できた(図2c)。このように、Aβ-GFPは蛍光強度の変化を測定することで、Aβの重合を抑える創薬候補物質のスクリーニングに利用できる。

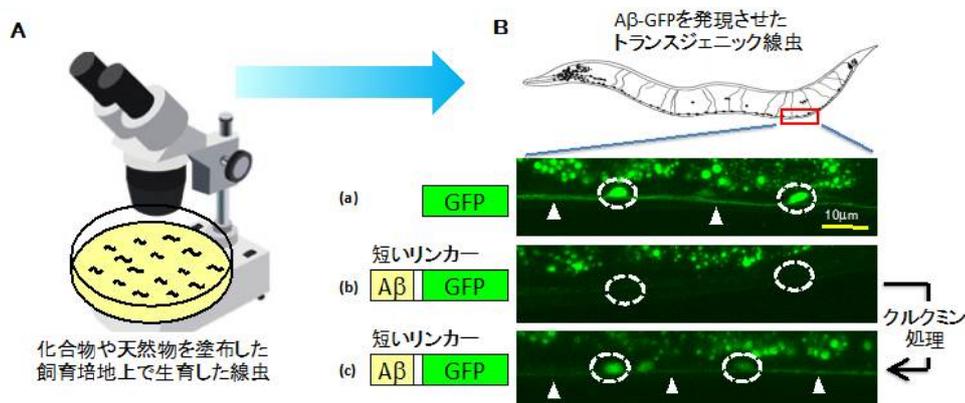


図2 生体を用いた創薬候補物質のスクリーニング例

飼育培地上の線虫(A)を顕微鏡で観察すると、クルクミンによるAβの重合抑制によって蛍光強度が増加した神経細胞を見ることができる(B)。白丸は神経細胞の細胞体、矢頭は神経細胞の軸索を示す。

■ 今後の予定 ■

今後は培養神経細胞を用いて、A β -GFP の蛍光強度を利用したアルツハイマー病の治療薬や予防薬の候補となる物質をより簡便にスクリーニングできる方法の開発に着手する。また、今回開発したA β -GFP を発現させたトランスジェニックマウスを用いて、アルツハイマー病発症のごく初期に起こる神経細胞内部での微細な変化に A β オリゴマーが与える影響についてより詳細な解析を行い、アルツハイマー病発症のメカニズムの解明や予防に関する研究をすすめる。

■ 本件問い合わせ先 ■

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

バイオメディカル研究部門 脳遺伝子研究グループ

主任研究員 落石 知世 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6
TEL:029-861-6577 FAX:029-861-6407
E-mail:tomoyo.ochiishi@aist.go.jp

バイオメディカル研究部門 脳遺伝子研究グループ

研究グループ長 戸井 基道 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6
TEL:029-861-7886 FAX:029-861-6407
E-mail:doi-m@aist.go.jp

国立大学法人 北海道大学 大学院

先端生命科学研究院 細胞機能科学研究室

教授 金城 政孝 〒001-0021 北海道札幌市北区北 21 条西 11 丁目
次世代ポストゲノムセンター
TEL:011-706-9005 FAX:011-706-9045
E-mail:kinjo@sci.hokudai.ac.jp

先端生命科学研究院 細胞機能科学研究室

助教 北村 朗 〒001-0021 北海道札幌市北区北 21 条西 11 丁目
次世代ポストゲノムセンター
TEL:011-706-9006 FAX:011-706-9045
E-mail:akita@sci.hokudai.ac.jp

【取材に関する窓口】

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 企画本部 報道室
〒305-8560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1
つくば本部・情報技術共同研究棟 8F
TEL:029-862-6216 FAX:029-862-6212 E-mail:press-ml@aist.go.jp

国立大学法人 北海道大学 総務企画部広報課
〒060-0808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目
TEL:011-706-2610 FAX:011-706-2092 E-mail:kouhou@jimuhokudai.ac.jp

【用語の説明】

◆アルツハイマー病

記憶障害を中心とした認知機能障害を主な症状とする認知症。認知症の中でも最も多い。

◆アミロイドβ(Aβ)タンパク質

40 個程度のアミノ酸からなるタンパク質。

◆GFP(Green Fluorescent Protein 緑色蛍光タンパク質)

オワンクラゲがもつ緑色蛍光タンパク質。青色の光を吸収して緑色の蛍光を発するため、生きた細胞や個体内のタンパク質の局在などを観察する際によく用いられる。

◆オリゴマー

単量体(モノマー)が少数個結合(重合)したもの。

◆見当識障害

日時・場所・話している相手など、自分が置かれている状況が認識できないことをいう。

◆リン酸化

タンパク質の特定の場所に、リン酸化酵素によりリン酸基が付加される化学反応。リン酸化されたタンパク質は生体内でその機能が活性化されたり抑制されたりする。

◆タウタンパク質

神経の軸索内に存在する微小管結合タンパク質。細胞の骨組みや物質輸送経路として機能する微小管の安定化に関与する。

◆神経原線維変化

タウタンパク質がリン酸化されると微小管から離れ、タウタンパク質同士で結合する。これが神経細胞の細胞質で繊維状の塊となったもの。

◆トランスジェニック動物

外部から特定の遺伝子を人為的に導入した動物。

◆蛍光相関分光法

レーザー光を用いた共焦点光学系を利用し、ごく微小な観察領域の中を蛍光分子が出入りすることにより生じる蛍光強度のゆらぎを解析し、蛍光分子の濃度や拡散速度を測定する技術。拡散速度から分子の大きさや分子間の相互作用を解析することができる。

◆核磁気共鳴装置

物質の分子構造や物性を原子レベルで解析するための装置。強力な磁場中の試料にラジオ波を照射すると、原子の核の状態によって、ある周波数のラジオ波を吸収する(核磁気共鳴)。この吸収スペクトルから分子構造を解析する。複雑な有機化合物の化学構造を決定するために広く用いられる。

◆COS7 細胞

アフリカミドリザル腎臓由来の細胞。細胞外から導入された遺伝子が効率よく機能するため、遺伝子導入実験に汎用される。

◆クルクミン

カレーのスパイスであるウコンの黄色色素。A β の重合を抑制する働きがある。