

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15444

研究課題名(和文)世界最速の高速原子間力顕微鏡によるA $\beta$ 凝集体の形成過程の解明

研究課題名(英文)Dynamic analysis of amyloid beta aggregation using high-speed atomic force microscopy.

研究代表者

中野 博人(NAKANO, Hiroto)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：10804263

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): 脳のアミロイド $\beta$  (A $\beta$ )沈着部位や臨床病理像の多様性には、A $\beta$ の凝集過程や構造の違いが深く関係しているという仮説を検証する目的で、*in vitro*凝集系実験を用いてA $\beta$ の凝集過程や構造上の特徴を解析した。A $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-42 monomer溶液にA $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-42 seedsを加えると、A $\beta$ の凝集は加速度的に促進された。EMでは、枝分かれのない線維構造を認め、HS-AFMでは異なる構造を有するA $\beta$ 線維が混在していることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイド $\beta$  蛋白(amyloid protein: A $\beta$ )は、主に脳実質と血管壁に沈着する。孤発性Alzheimer病(孤発性AD)には、脳実質の老人斑が主体で、典型的なADの臨床病理像を呈するものや血管壁に高度のcerebral amyloid angiopathy(CAA)を認め、脳出血を頻回に起こすものなど、臨床病理像に多様性があることが知られている。また、遺伝性ADの原因遺伝子の1つであるAPP遺伝子変異の種類によっても脳実質のA $\beta$ 沈着が主体のもの、血管壁のA $\beta$ 沈着が主体のものなど、異なった臨床病理像をとることが知られているが、詳細についてはわかっていない。

研究成果の概要(英文): To examine a hypothesis that a diversity of amyloid beta protein (A $\beta$ ) deposition and clinical and pathological features of Alzheimer's disease (AD) were associated with different features of A $\beta$  aggregation and structural forms, we analyzed A $\beta$  aggregation using thioflavin T (ThT) assay, electron microscopy (EM), and high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). A $\beta$  aggregation was accelerated when A $\beta$  monomer were incubated with A $\beta$  seeds. EM images demonstrated non-branched fibrillar structures of A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 aggregates. Three structural types of A $\beta$ 1-42 fibrils were identified during observation in HS-AFM.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：高速原子間力顕微鏡 アミロイド 蛋白 凝集 脳実質 脳血管 凝集過程

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アミロイド 蛋白(amyloid protein: A)は、Alzheimer 病 (Alzheimer 's disease: AD)の病理学的特徴の1つである老人斑の主要構成蛋白である。遺伝性 AD 患者の遺伝子変異は全て A 生成にかかわる遺伝子にあり、A の産生及び凝集・沈着が AD の発症に深く関係している。一方、脳への A の沈着には、脳実質に沈着する老人斑以外に血管壁に沈着する cerebral amyloid angiopathy (CAA)がある。孤発性 AD には、脳実質の老人斑が主体で、典型的な AD の臨床病理像を呈するものや血管壁に高度の CAA を認め、脳出血を頻回に起こすもの、極めて急速に認知機能障害が進行するものなど、臨床病理像に多様性があることが知られている。また、遺伝性 AD の原因遺伝子の1つである APP 遺伝子変異の種類によっても脳実質の A 沈着が主体のもの、血管壁の CAA 主体のものなど、異なった臨床病理像をとることが知られている。APP 遺伝子に変異を有する遺伝性 AD のうち、Dutch APP mutation (E22Q) では、臨床的には再発性の脳出血を呈し、主に脳血管への A 沈着を認める。これまでも野生型 A や APP 遺伝子に変異を有する変異 A の凝集速度や形態を比較する先行研究は実施されているが、A 沈着部位や多様な臨床病理像を呈する詳細な病態についてはわかっていない。

本研究の研究協力者による研究チームは、野生型の A 1-42 が重合して凝集体が形成される過程を世界最速の高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いて世界で初めて観察することに成功し、A 凝集体は straight pattern や spiral pattern といった異なる形態が混在して形成されることを報告した。研究協力者による研究チームが HS-AFM で見出した A 凝集体の凝集過程や構造上の違いは、A の沈着による AD や CAA の臨床病理像の違いと深く関与している可能性がある。

### 2. 研究の目的

申請者を含む金沢大学脳神経内科の研究グループは、「異なる A 沈着部位や臨床病理像の多様性には、A の凝集過程や構造上の違いが深く関係している」と仮説を立て、その仮説を検証するため、世界最速の HS-AFM を用いて、野生型及び Dutch APP mutation を有する変異 A の凝集過程や構造を単一線維レベルで観察し、A の凝集過程や構造上の特徴を解析した。

### 3. 研究の方法

(1) **野生型及び変異 A 凝集体の作成:** *In vitro* 凝集系を用いて、合成 A 1-40、A 1-42、E22Q A 1-40 及び E22Q A 1-42 ペプチドより各種 A 凝集体を作成した。

(2) **チオフラビン T 分析:** 上記(1)で作成した A 凝集体溶液を 5  $\mu$ M のチオフラビン T (ThT) 溶液に加え、分光蛍光光度計で蛍光強度を測定した。また、A 凝集体を超音波破碎して作成した A seeds を A monomer 溶液に加え、観察される A の凝集を ThT を用いて、経時的にモニタリングした。

(3) **電子顕微鏡 (EM) による A 凝集体の観察:** 上記(1)で作成した A 凝集体溶液を 2.5% (v/v) グルタルアルデヒド溶液及び酢酸ウラニル 二水和物でメッシュに生着させ、A の線維構造を EM で観察した。

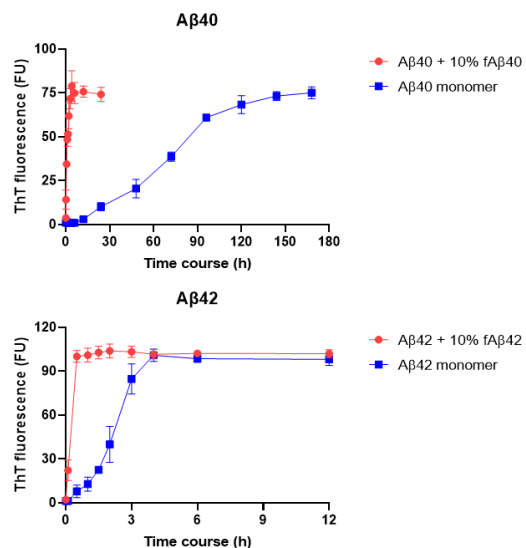
(4) **HS-AFM による A の凝集過程の観察:** 合成 A 1-42 の凝集過程を HS-AFM を用いて、単一線維レベルでビデオイメージングした。HS-AFM 画像データの解析ソフトウェア (ImageJ) を用いて、A 線維の伸長過程や構造を解析した。

### 4. 研究成果

(1) *In vitro* 凝集系を用いて、合成 A 1-40、A 1-42、E22Q A 1-40 及び E22Q A 1-42 ペプチドより各種 A 凝集体を作成した。そのうち、A 1-40、A 1-42 凝集体を超音波破碎して作成した A 1-40、A 1-42 seeds をそれぞれ A 1-40、A 1-42 monomer 溶液に加え、37 でインキュベーションした。A 1-40、A 1-42 monomer 溶液のみのサンプルも同様にインキュベーションし、観察される A の凝集過程を経時的にモニタリングした。A 1-40、A 1-42 共に、A monomer 溶液のみの場合、ThT 吸光度はシグモイドカーブを描きながら緩徐に上昇した。一方、A monomer 溶液に A seeds を加えた場合、A 1-40、A 1-42 共に ThT 吸光度は急速に上昇した (図 1)。

(2) A 1-40、A 1-42 凝集体の形態を EM で観察すると、枝分かれのない線維構造を観察することができた (図 2)。線維幅(平均 $\pm$ SD)は、A 1-40 線維が  $9.07 \pm 1.25$  nm、A 1-42 線維が  $10.2 \pm 1.85$  nm であり、2 群間に有意差は認めなかった。

図1 ThTによるA $\beta$ 凝集過程のモニタリング



(3) HS-AFMを用いて、5  $\mu\text{M}$  の A 1-42 monomer の凝集過程を観察すると、開始後~1,000 sの間は、A 線維は観察されなかったが、1,000 s以降、A 線維の形成が確認できた(図3)。単一線維レベルの解析では、線維が階段状に伸びていく過程が観察できた。また、A 1-42 線維には、既報告 (Watanabe-Nakayama T, Yamada M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2016) と同様に、spiral-type、straight-type、hybrid-type という異なる構造を有する線維が混在していることも確認できた(図4)。

図3 HS-AFMによるA $\beta$ 1-42の凝集過程の観察

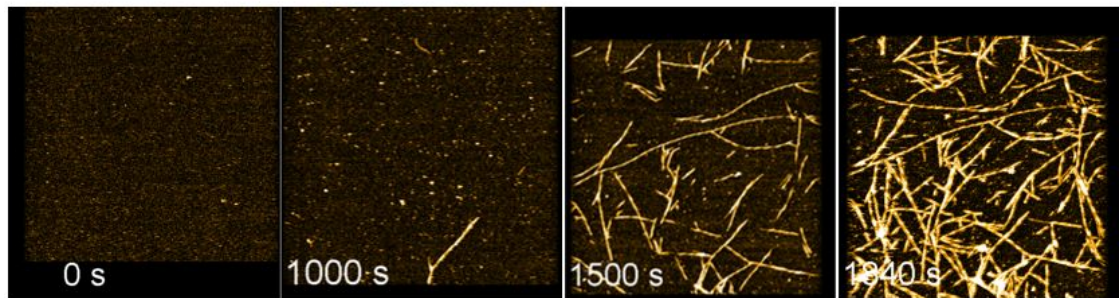
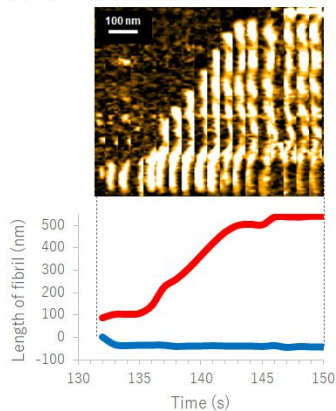
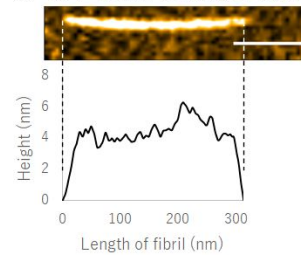


図4 A $\beta$ 1-42線維の伸長過程と構造の種類

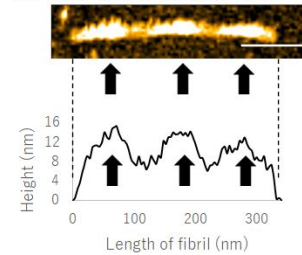
(A) A $\beta$ 1-42線維の伸長過程



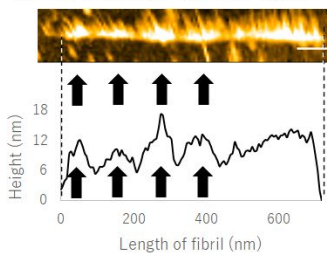
(B) A $\beta$ 1-42線維 (straight-type)



(C) A $\beta$ 1-42線維 (spiral-type)



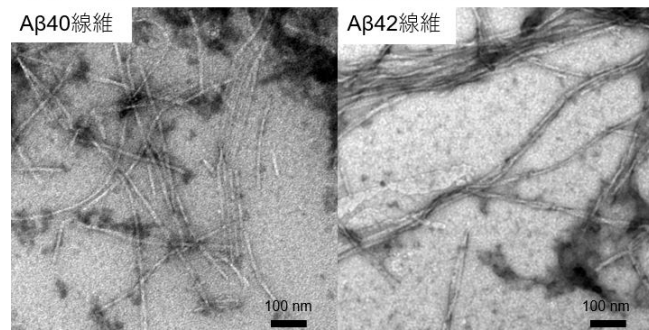
(D) A $\beta$ 1-42線維 (hybrid-type)



(4) A 1-40 のイメージングでは、A 1-40 の凝集速度が遅く、HS-AFM のカンチレバーが長時間のイメージングに耐えられない、A 1-40 凝集体がマイカに付着しにくく、イメージングができない、という2つの問題点が明らかとなった。 に関しては、HS-AFM のカンチレバーの材質や形状を変更することが難しいため、A 1-40 の凝集速度を促進するためのサンプル調整 (A 濃度、溶媒の塩濃度) を複数の条件で実施したが、安定したイメージングが可能となる観察条件は確立できなかった。また、 に関しては、A 濃度やインキュベーション時間の調整、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) を用いたマイカ表面の電荷の調整を試みたが、安定した A 1-40 凝集体のマイカへの吸着は認められなかった。

(5) E22Q A 1-40 及び E22Q A 1-42 の凝集過程を ThT assay や HS-AFM で評価・解析する実験は、研究期間内には実施できなかった。

図2 EMによるA $\beta$ 凝集体の形態学的評価



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	山田 正仁  (YAMADA Masahito)  (80191336)	金沢大学・医学系・教授    (13301)	
研究協力者	小野 賢二郎  (ONO Kenjiro)  (70377381)	昭和大学・医学系・教授    (32622)	
研究協力者	中山 隆宏  (NAKAYAMA Takahiro)  (00532821)	金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授    (13301)	
研究協力者	濱口 毅  (HAMAGUCHI Tsuyoshi)  (70452109)	金沢大学・医学系・講師    (13301)	