

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

毒性型アミロイドオリゴマーの高感度検出

### 2. 氏名

迫野 昌文

### 3. 研究のねらい

アミロイド $\beta$ やプリオンなどに代表されるタンパク質の自己組織化により引き起こされるタンパク質コンフォメーション病は、現在大きな社会問題として取り上げられている。アルツハイマー病の原因物質とされるアミロイド $\beta$ は、自己組織化に伴い、線維状の形態をとることで細胞毒性を示すものと考えられてきた。しかし、近年、線維体よりもその構造中間体である可溶性オリゴマーがもっとも高い細胞毒性を示すことが明らかとなり、また、生体内でも可溶性オリゴマーが組織壊死を引き起こしていることも示されている。一方、アルツハイマー病の診断は、早期治療の面において非常に重要であるが、困難を極めているのが実情である。

これまでに考案されたアミロイド $\beta$ 検出法は、比較的毒性の低い線維形態を検出する方法が大勢を占めており、アミロイド $\beta$ 凝集体の形状による識別、特に可溶性オリゴマーのみを特異的に検出する方法の開発はいまだ十分ではない。近年、より診断性を高めるために、可溶性オリゴマーに特異的認識能を有する抗体の作製が盛んに行われている。抗体の高い標的認識能を利用することにより、可溶性オリゴマーに対する効率的な検出を可能にしている例がいくつか報告されている。しかし、抗体によるアミロイド $\beta$ 検出は、抗体の認識標的である特定重合量のオリゴマーにしかその効力を示さない。特に、アルツハイマー病患者に含まれる可溶性オリゴマーは、2量体から数十量体と言われており、全てを同時に認識する抗体の作製は極めて難しいといえる。細胞毒性と真に相関性の高いアミロイド $\beta$ 検出のためには、不溶性の線維状凝集体を認識せず、また、幅広い重合度の可溶性オリゴマーのみを認識する必要がある。よって、診断性を高めるには、サンプル中に含まれる全ての可溶性オリゴマーを柔軟に認識するシステムの開発、及びその検出感度の向上が重要であるといえる。

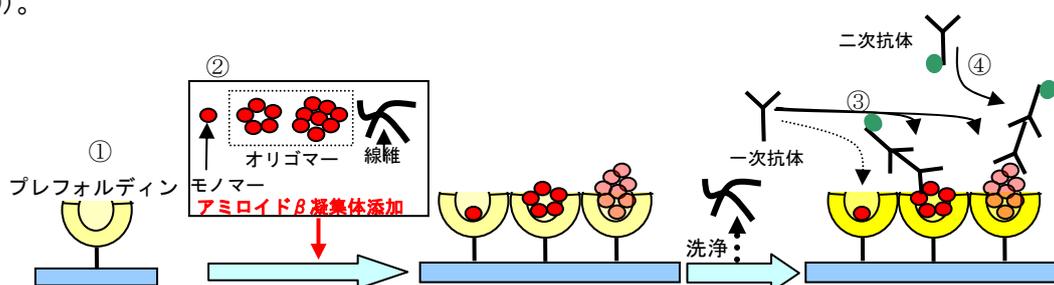
### 4. 研究成果

#### 1. 分子シャペロンプレフォルディンの可溶性オリゴマー認識能を利用した手法

##### 測定原理

超高熱性古細菌由来のプレフォルディンは2つの $\alpha$ サブユニットと4つの $\beta$ サブユニットからなる6量体であり、お椀状の構造をしている。お椀の内部は疎水性アミノ酸が占めており、直径約10nmの疎水空孔を形成している。アミロイド $\beta$ は疎水性が高いことから、プレフォルジンとよく相互作用する性質を有しており、また、プレフォルジンの疎水空孔は非常に大きいため、サイズの

大きな可溶性オリゴマーに対しても十分に認識しうるだけの空間を保持している。これまでも、他の分子シャペロンを用いたアミロイド $\beta$ 線維化抑制の報告はされているが、それらはアミロイド $\beta$ モノマーのみを捕捉するものであり、可溶性オリゴマーを認識していない。プレフォルディンのように、可溶性オリゴマーまで捕捉する分子シャペロンは報告されておらず、極めて稀な性質の分子シャペロンである。測定の流れを以下に示す。プレフォルディンを ELISA プレートに固定化し、その後プレート表面をブロッキングする(①)。アミロイド $\beta$ 凝集体とプレフォルディンを相互作用させる(②)。Anti-A $\beta$ とプレフォルジンに捕捉されたアミロイド $\beta$ を相互作用させる(③)。HRP で標識した二次抗体を添加し、洗浄操作の後、基質を添加しプレートリーダを用いて発光測定を行う(④)。



## 結果

プレフォルジン固定用プレートとして Nunc 社の ImmobilizerAmino を用いた。所定濃度で炭酸バッファーに溶解したプレフォルジンをウェルに添加し 24 時間のインキュベートを行い、固定化されたプレフォルジン量を、プレフォルジン抗体を用いて測定した。その結果、固定化されるプレフォルジン量は添加時の濃度依存的に上昇し、300nM 以上の濃度で固定化量が平衡に達した。次に、アミロイドサンプルをプレフォルジン固定化プレートのウェルに添加し、37 度で 1 時間反応を行った。アミロイドサンプルは、アミロイド $\beta$ モノマー、可溶性オリゴマー、線維をそれぞれ調製し用いた。次に、アミロイド $\beta$ 抗体である 6E10 抗体を添加し、その後 HRP コンジュゲート二次抗体を添加し、化学発光によりアミロイド $\beta$ 量を計測した。5 $\mu$ M のアミロイドサンプルを添加した際において、モノマー及びオリゴマー状態において顕著なシグナルが見られたが、線維状態は、シグナルが見られなかった。このことから、プレフォルジン固定化プレートには線維状アミロイドがほとんどつかず、オリゴマー及びモノマー状態のみが選択的に補足されたことが示唆された。しかし、モノマーとプレフォルジンの相互作用は本来あまり大きくないことが以前の実験から示されていたことより、モノマーはプレフォルジンを介さずにプレート上に非特異的に吸着していることが推察された。そこで、日油より市販の MPC ポリマーを用いてプレートのブロッキングを行うこととした。プレフォルジンを固定化したプレートに MPC ポリマー (BL-206) を添加して、各アミロイドサンプルを添加し同様の実験を行った。そ

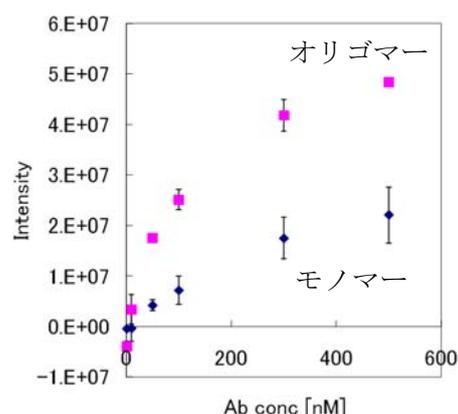


図 1.プレフォルジン固定化プレートによるアミロイドの検出

の結果、プレフォルディン非固定化プレートにおいてアミロイドサンプルの非特異的吸着の効果的な抑制が見られた。そこで、10nM プレフォルディンをプレートに固定化しBL-206でブロッキングを行い、このプレフォルディン固定化プレートを用いてアミロイドサンプルの検出を行った。その結果、モノマーとオリゴマーで明らかな吸着特性の違いが見られた(図1)。これより、プレフォルディン固定化プレートはアミロイドオリゴマー特異検出に有効であることが示された。

## 2. アミロイドβ抗体担持金コロイドによるアミロイド凝集体の検出

### 測定原理

アミロイドモノマーで免疫して得られたモノマー特異抗体は、可溶性オリゴマーや線維などの状態に関わらず結合することが多い。モノマー抗体である 6E10 や 4G8 などのクローンは、オリゴマーや線維の染色にも多く用いられている。そこで、この状態に左右されない幅広い特異性を利用して以下のような検出システムを考案した。金コロイド上にモノマー抗体を担持したものを調製する。オリゴマーや線維などの凝集状態にあるアミロイドと混合すると、コロイドはアミロイド上に集約され、また架橋点となり大きな複合体を形成すると考えられる。この際、複合体は沈殿もしくはコロイドのプラズモンシフトが観測されると考えられることから、簡便に凝集状態を見極めることができる。一方、モノマーはコロイドと結合しても、架橋点とならないことからコロイドは分散状態を保ち続けるため、上記のような変化を示さない。よって、凝集状態のものだけをスクリーニングすることが可能となる。

### 結果

20nm 直径の金コロイドに 6E10 を溶解した 10 倍希釈濃度の PBS 緩衝液を添加し、一定時間インキュベートした。その結果、抗体は金コロイドに非特異的に吸着し、抗体担持金コロイドを作製できた。しかし、このコロイドは、PBS 緩衝液中において極めて不安定で凝集しやすいことがわかった。また、抗体濃度を上げていくにつれてコロイド凝集は抑制されるものの、複合コロイドのチューブへの吸着のため回収率が著しく低下した。そこで、抗体担持ステップにおいて BSA を添加し、ブロッキング効果が得られるか実験をした。その結果、BSA を添加することで抗体担持金コロイドは緩衝液中においても非常に安定な状態を保つことができるようになった。この複合金コロイドの洗浄ステップの後、アミロイドサンプルを添加し、1 時間室温でインキュベートした後のコロイドの状態を調べた。その結果、5 $\mu$ M のアミロイドサンプルにおいて、線維状態にあるものは沈殿体を形成することがわかった。(図 2)よって、線維状態にあるものはこの金コロイドで簡便に検出できることが示された。しかし、可溶性オリゴマーにおいてはスペクトルの変化、凝集形成などは見受けられなかった。そこで、動的光散乱を用いて 10nM の可溶性オリゴマー添加サンプルの大きさを計測したところ、金コロイドよりもオリゴマーの大きさだけ大きい複合体が形成されていることがわ



PBS monomer oligomer Fibril  
図2.複合金コロイドと各種アミロイドの相互作用

かった。これは、金コロイドがオリゴマーと認識するものの、コロイドの立体障害により複数のコロイドの集約が抑制されているものと示唆された。よって、コロイドの大きさについて今後検討していく必要がある。

## 5. 自己評価

可溶性オリゴマーは、その構造に分布があり様ではないことから、ターゲットとすべき測定対象が不明瞭であることが研究当初からの課題であった。特に、ある特定サイズのオリゴマーに毒性があるのか、オリゴマーの毒性メカニズムは分子量によらず同じであるのか等、重要な点が現在も回答が出ておらず、その状況下でのオリゴマー測定法の開発は極めて挑戦的であった。当初の提案であった、分子シャペロンとオリゴマーの相互作用を利用した測定法は、検出感度は低いもののアミロイドの取る他の構造とオリゴマーを明確に分けて、オリゴマーを検出できるものであることは示せた。しかし、様々な方法を試そうとした結果、散漫な結論しか得られなかったことは大いに反省すべきと考えており、今後の研究の進め方において教訓にしていきたいと考えている。

## 6. 研究総括の見解

アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド $\beta$  ( $A\beta$ )オリゴマーは分子量分布が広く、オリゴマー全部を一度に定量するのは困難であるが、分子シャペロンプレフォルディン(PFD)が $A\beta$ オリゴマー認識に有効であろうという独創性の高い発想に基づき、これを選択的に分析する手法の開発を目指した。主たる成果は次の2点である。

1.  $A\beta$ モノマー、繊維、可溶性オリゴマーの中から、可溶性オリゴマーと特異的に吸着するPDF固定化プレートの開発に成功したが、生体中の可溶性 $A\beta$ オリゴマーを定量するには結合が弱く、感度が不足している。

2. PFDが金コロイドの凝集抑制効果を持つことを発見したが、PDFと金コロイドとの相互作用が強く、可溶性オリゴマーの検出には適していなかった。

前者のプレフォルディンを用いる方法は実用的な感度が得られていないが、分子シャペロンを分子量の大きな物質の識別法として応用可能であることを実証したことは高く評価される。後者の凝集現象を用いる方法も、アイデア段階ではあるが、実用性の高いスクリーニング法に繋がることが期待される。

これらの研究成果は2篇の原著論文にまとめられて発表された。

今後、プレフォルディンとオリゴマーの相互作用についてデータをさらに積み上げつつ、高感度化などの実用課題を解決していくことが必要と考えられる。 $A\beta$ オリゴマーとPDFとの特異的相互作用をアフィニティー電気泳動の形でマイクロチップに応用することも可能と考えられる。原理的に抗体を凌ぐ汎用性が期待できるため、計測分析の基盤技術として波及効果は大きい。引き続き更なる研究と工夫とを続けて欲しい。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

## (1)論文(原著論文)発表

**論文(国際)**

- M. Sakono, T. Zako, H. Ueda, M. Yohda, M. Maeda, "Formation of highly toxic soluble amyloid beta oligomers by the molecular chaperone prefoldin", *FEBS journal* **2008**, 275, 5982–5993.

## (2)特許出願

研究期間累積件数:1件

発明者:迫野昌文、座古保、前田瑞夫

発明の名称:アミロイド凝集体の検出試薬及び検出方法

出願人:独立行政法人 科学技術振興機構

出願日:平成21年12月10日

出願番号:特願2009-28652

## (3)著書

- Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, "Amyloid oligomers: Formation and toxicity of A $\beta$  oligomers" *FEBS Journal*, in press

## (4)学会発表

**口頭発表(国内)**

- 迫野昌文、微粒子を捕まえるタンパク質とその工業利用に関する展望、化学工学に関する沖縄ワークショップ(2008)
- 迫野昌文・座古保・上田宏・養王田正文・前田瑞夫、高毒性アミロイドオリゴマーの検出に向けた分子シャペロンの利用、第56回高分子討論会(2007)

**ポスター発表(国際)**

- Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, Hiroshi Ueda, Masafumi Yohda, Mizuo maeda, Inhibition of amyloid beta fibrillation and formation of soluble amyloid oligomers by molecular chaperone, IPA 2007 Osaka silver congress (第26回日本認知症学会)(2007)

**B. 本研究課題に関連した成果で主なもの**

## (1)論文(原著論文)発表

**論文(国際)**

- T. Zako, M. Sakono, N. Hashimoto, M. Ihara, M. Maeda, "Bovine insulin filaments induced by reducing disulfide bonds show a different morphology, secondary structure and cell toxicity from intact insulin amyloid fibrils", *Biophysical Journal* **2009**,96, 3331–3340.

## (2)学会発表

**口頭発表(国際)**

- Masafumi Sakono, Arata Utsumi, Tamotsu Zako, Chika Sugino, Masafumi Yohda, and Mizuo Maeda, Formation of non-toxic amyloid-like fibrils in the presence of small heat shock protein, APBiochEC' 09 (2009)

**ポスター発表(国際)**

- Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, Masafumi Yohda, Mizuo Maeda, Size-selective interaction between gold nanoparticles and molecular chaperone, The 238<sup>th</sup> ACS National Meeting (2009)