

令和4年6月8日
愛媛大学

アルツハイマー病原因物質の毒性原因が明らかに

～相互作用の差異により毒性が異なるアミロイド形成することを最先端顕微鏡を使って発見～

このたび、愛媛大学大学院理工学研究科（理学系）の座古保教授らの研究グループは、医学系研究科分子病態医学講座、高知大学、筑波大学、日本電子株式会社との共同研究において、アルツハイマー病などの原因とされるアミロイドの毒性機構の一端を、インスリンアミロイドをモデルにした研究で明らかにしました。

インスリンは、高温・酸性条件下において、アミロイドとよばれるアルツハイマー病などの様々な疾患の原因とされる凝集体を形成することが知られています。アミロイドは細胞毒性を示すことで病気の原因になりますが、構造と毒性の相関は明らかになっていませんでした。これまでに座古教授らは、インスリンが毒性の異なる2つのアミロイドを形成することを見出してきました。今回、研究グループは、毒性の高いアミロイド形成過程で、タンパク質間の静電的相互作用が関与する液液相分離現象がおこっていることを、最先端顕微鏡技術を用いて見出しました。この結果は、アミロイド形成に必要な相互作用と毒性に関連があることを示しており、今後の予防・治療戦略に重要な指針を与えるものです。

本研究成果に関する論文は、2022年5月20日に英国科学誌「Scientific Reports」に掲載され、オンライン版で公開されました。

つきましては、ぜひ取材くださいますようお願いいたします。

記

掲載誌 : Scientific Reports

D O I : 10.1038/s41598-022-12212-6

題 名 : Differences in interaction lead to the formation of different types of insulin amyloid
(和訳) 相互作用の差異が異なるタイプのインスリンアミロイド形成を誘導する

著 者 : Wakako Mori, Ryosuke Kawakami, Yosuke Niko, Tomohiro Haruta, Takeshi Imamura,
Kentaro Shiraki and Tamotsu Zako

U R L : <http://chem.sci.ehime-u.ac.jp/~anachem1/>

本件に関する問い合わせ先

愛媛大学大学院理工学研究科（理学部化学コース）

教授 座古 保

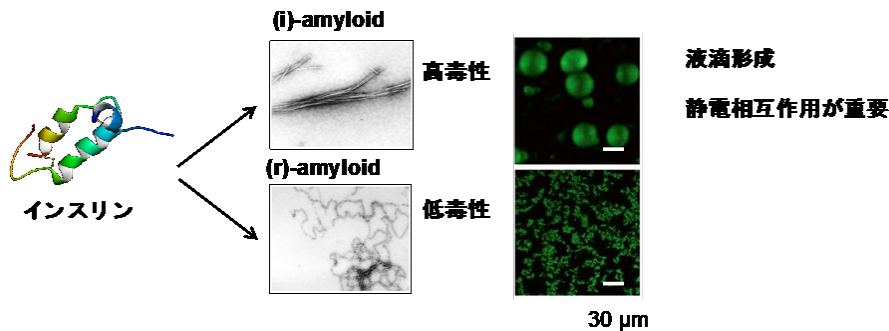
TEL : 089-927-9577

Mail : zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp

※送付資料5枚（本紙を含む）

【ポイント】

- アルツハイマー病などの原因とされる、タンパク質アミロイドの毒性と液液相分離現象に関係があることを発見。
- インスリンアミロイドをモデルにした研究において、最先端顕微鏡を用いて、毒性のあるアミロイドでのみ液液相分離現象を観察。
- 液液相分離現象では、静電相互作用がより重要であったため、タンパク質間相互作用の差異により、毒性が異なるアミロイドが形成されたことが示唆された。



【詳細】

1. 研究の背景

アミロイドは、構造がこわれたタンパク質が自己集合する事によって形成されるタンパク質凝集体であり、毒性を有し、アルツハイマー病(AD)など様々な疾病の原因になっています。アミロイドを形成しやすいタンパク質の一つにインスリンがあり、アミロイドモデルとしてよく用いられています。これまでに、座古教授らの研究グループは、インスリンが毒性や構造の異なる2種のアミロイドを形成することを明らかにしてきました (Zako *et al.*, *Biophys. J.*, 96, 3331 (2009), Yuzu *et al.* *RSC Adv.* 10, 37721 (2020)) (図1 A)。今回、同じタンパク質から形成される、これら二つのアミロイド形成について詳細に検討することで、アミロイド毒性の謎に迫れるのではと考えました。

2. アミロイド毒性と液液相分離現象の関連

まず本研究では、アミロイドの毒性と液液相分離現象の関連を調べました。液液相分離(LLPS)は、タンパク質が集合し、液滴を形成する現象を示します。液滴内ではタンパク質が高濃度で存在しており、近年、生体内での重要な生命現象(遺伝子転写、タンパク質への翻訳など)において重要な役割を果たすことが明らかになっています。また、液滴内ではアミロイドの形成が行われている事も示されています。

本研究では、毒性の異なる2種のインスリンアミロイド((i)-amyloid(高毒性)、(r)-amyloid(低毒性))形成過程に液液相分離が関連しうるかを調べた結果、毒性が高い(i)-amyloidにおいてのみ、30 μm 程度の大きさの円形の構造体が観察されました(図1 A)。最先端顕微鏡技術を用いたFRAP(光褪色後蛍光回復法)実験を行ったところ、内部は流動的であり、液液相分離現象による液滴が形成していることが分かりました(図1 B)。低毒性の(r)-amyloidでは液滴が形成しなかったことから、アミロイドの毒性と相分離現象に関連があることが分かりました。

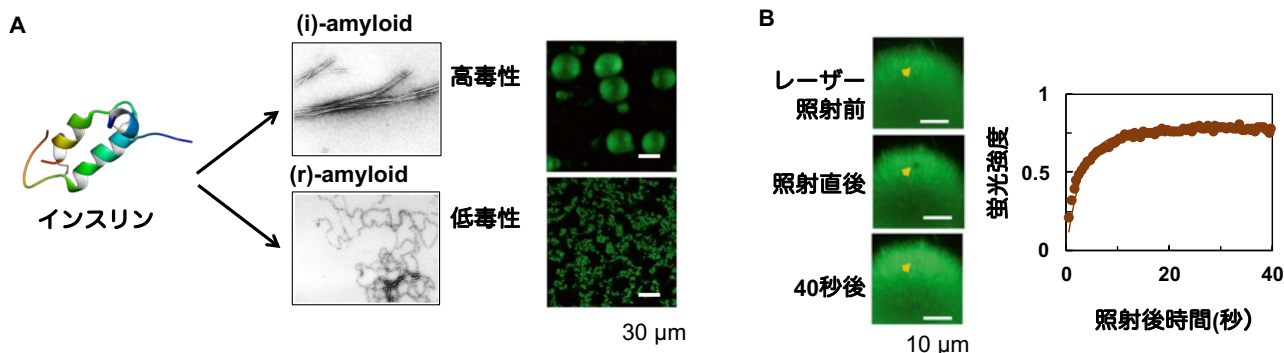


図1 A 異なる毒性の2種のインスリンアミロイド。高毒性の(i)-amyloid へのみ、液滴が観察された。右は PK 色素を用いた蛍光イメージング画像（色素は仁子先生（高知大学）提供）、B FRAP（光褪色後蛍光回復法）実験による、液滴内の流動性評価。局所的にレーザーを照射し、蛍光を退色させる。もし流動的であれば、蛍光が回復する（右側グラフ）。

3. アミロイド毒性と分子間相互作用の関連

さらにアミロイド形成における静電相互作用の影響を評価するために、塩の効果調べました。塩は、分子間の静電相互作用の弱める作用があり、塩によりアミロイド形成が阻害されれば、静電相互作用が重要であることを示すことになります。その結果、高毒性の(i)-amyloid に関して、より塩の効果が顕著でした。それに対して、(r)-amyloid では、塩濃度を変化させても、その効果はほとんどありませんでした(図2)。これらの結果は、液液相分離現象を示した高毒性の(i)-amyloid 形成において、静電相互作用が重要であることを示しています。本研究では、疎水相互作用の影響の評価も行いましたが、2種のアミロイドにおいて差異はみられませんでした。本手法では、相互作用を明らかにするために添加剤を用いると同時に、相互作用を制御するというアプローチをとっており、様々な研究に応用可能だと思われます。

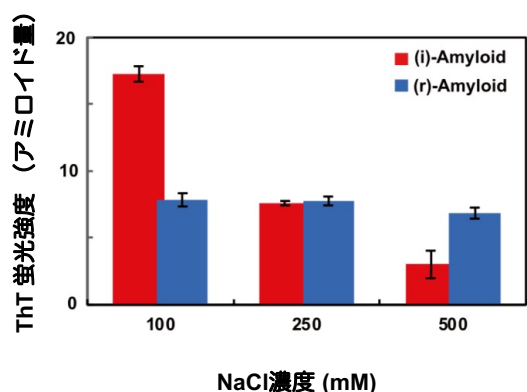


図2 アミロイド形成における、塩(NaCl)の効果。様々な濃度の塩存在下で形成したアミロイド量を、アミロイド特異的な蛍光プローブ(ThT)を用いて評価したところ、高毒性の(i)-amyloid は塩濃度が増すと凝集量が減ったのに対し、低毒性の(r)-amyloid は塩濃度による影響はなかった。

4. 成果の意義

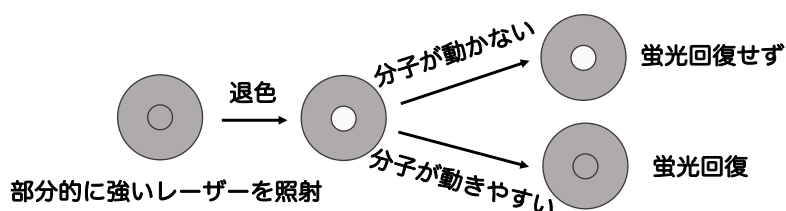
アルツハイマー病やプリオン病などの様々な疾病において、アミロイド凝集が原因とされていますが、アミロイド凝集の毒性機構は未解明な点が多いです。本研究では、同じタンパク質から毒性が異なる2種のアミロイドができるというオリジナルの発見をさらに発展させ、高毒性のアミロイド形成時にのみ観察できる現象から、その現象と毒性を新たに関連づけたことに新規性があります。液液相分離という、近年新たに注目されている現象と毒性に関連があることが分かり、静電相互作用および液液相分離を制御できれば、毒性発現を阻止できる可能性が示唆され、今後の疾病予防・治療戦略に大きなヒントになることが期待できます。

インスリンは糖尿病の治療にも用いられており、注射部位でアミロイド凝集が生成し、インスリンボールとよばれる腫瘍が形成される症例が多く報告されています。インスリンボールはインスリン吸収阻害や周辺組織炎症を引き起こすため問題となっていました。今回の発見は、炎症を引き起こすメカニズムの解明にもつながると期待できます。

【用語解説】

アミロイド凝集：構造がこわれたタンパク質が自己集合する事によって形成されるタンパク質凝集体。 β シート構造が積層した規則的内部構造を有する。様々なタンパク質がアミロイド凝集を形成し、形成中間体を含め、アルツハイマー病などの様々な疾病の原因になると考えられている。

FRAP（光褪色後蛍光回復法）：蛍光色素を含んだ細胞などの組織体の一部分にレーザーを照射し、その部分を褪色させた後、蛍光の回復を観察する。褪色した周辺に流動性があり分子が動きやすければ、周りの分子が入って来るために蛍光が回復する（下記図参照）。



【論文情報】

掲載誌：Scientific Reports

題名：Differences in interaction lead to the formation of different types of insulin amyloid
(和訳) 相互作用の差異が異なるタイプのインスリンアミロイド形成を誘導する

著者：Wakako Mori, Ryosuke Kawakami, Yosuke Niko, Tomohiro Haruta, Takeshi Imamura, Kentaro Shiraki and Tamotsu Zako

DOI：10.1038/s41598-022-12212-6

URL：http://chem.sci.ehime-u.ac.jp/~anachem1/

【研究グループ】

愛媛大学大学院理工学研究科（理学系）

大学院生 森若子

教授 座古保

愛媛大学大学院医学系研究科

准教授 川上良介

教授 今村健志

高知大学教育研究部総合科学系

助教 仁子陽輔

日本電子株式会社 アプリケーション統括室

春田知洋

筑波大学大学院 理工情報生命学術院

教授 白木賢太郎

【研究サポート】

この研究は、日本学術振興会科学研究費（19H02527, 18H01205, 21K05128, 21H03056, 21H02650, and 16H06280 “Advanced Bioimaging Support”）、AMED JP21gm1210001、愛媛大学リサーチユニット「先端ナノ・バイオ分析研究ユニット」の助成を受けて行われました。

【本件に関する問い合わせ先】

愛媛大学 大学院理工学研究科（理学部化学コース） 教授 座古保

電話：089-927-9577

E-mail：zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp