

PRESS RELEASE

2024 年 8 月 30 日

理化学研究所
東京工業大学

家族性アルツハイマー病に生じる特異な老人斑の謎に迫る

ー合成生物学的な視点で β -アミロイドと老人斑の構造的な理解へー

概要

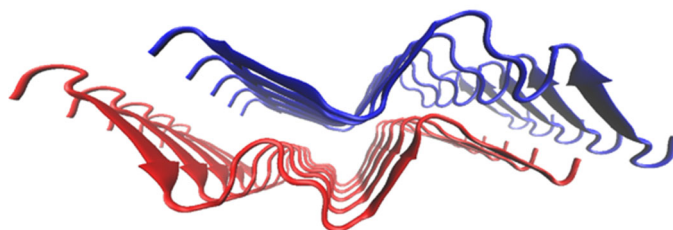
理化学研究所（理研）生命機能科学研究センター（BDR）先端 NMR 開発・応用研究チームの石井佳誉チームリーダー（東京工業大学生命理工学院教授）、東京工業大学（東工大）生命理工学院のモハンマド・ジャファー・テヘラーニ東京工業大学特別研究員、松田勇研究員、理研生命機能科学研究センタータンパク質機能・構造研究チームの山形敦史上級研究員、白水美香子チームリーダー、理研環境資源科学研究センター質量分析・顕微鏡解析ユニットの豊岡公德上級技師、佐藤繭子技師らの国際共同研究グループは、家族性アルツハイマー病^[1]で観察される綿花状の老人斑^[2]を再現するアミロイド線維^[2]を作成し、その凝集体に含まれる新規構造モチーフ^[3]をクライオ電子顕微鏡^[4]と固体 NMR^[5]の統合解析により解明しました。

本研究は、線維構造の違いがアルツハイマー病（AD）の病態や進行を大きく変える可能性を示した先駆的な研究です。若年性 AD に対する創薬や、AD のサブタイプによって異なる病態が生じる仕組みの解明に貢献すると期待されます。

家族性 AD は遺伝子変異を伴う AD の一つで、一般に若年で発症します。中でも β -アミロイド（A β ）^[2]の 22 番目のアミノ酸であるグルタミン酸がグリシンに変異した家族性 AD は、綿花状の巨大な老人斑など特異な病態を示すため注目されています。

今回、国際共同研究グループは、この綿花状の老人斑の特徴を再現する A β の線維を脳由来試料を全く使わずに化学的に作成することに成功し、クライオ電子顕微鏡と固体 NMR により解析しました。その結果、 β シート^[6]が W 字型に折り畳まれた新規構造モチーフを発見し、脳由来の物質ではなくアミロイド線維の構造により綿花状の凝集体の特異性が説明できることを示しました。

本研究は、科学雑誌『Nature Communications』オンライン版（8 月 15 日付）に掲載されました。



β シートが W 字型に配置された新規構造モチーフを持つアミロイド線維の分子構造

背景

アルツハイマー病 (AD) の脳内では、 β -アミロイド ($A\beta$) の線維状の凝集体 (アミロイド線維) が老人斑に蓄積し、これが AD を引き起こすと考えられています。一般的に酵素などのタンパク質の機能はその分子構造によって決まりますが、AD で観測される病態や病気の進展と、 $A\beta$ 線維の構造がどのように関連するかは長らく不明でした。

$A\beta$ は、主として 40 アミノ酸から成る $A\beta_{40}$ と 42 アミノ酸の $A\beta_{42}$ の 2 種類が脳内に存在しますが、老年期に発症する通常の AD では、直径 10 マイクロメートル (μm 、 $1\mu\text{m}$ は 100 万分の 1 メートル) 程度の直径の老人斑の核に、42 残基の $A\beta_{42}$ が線維を形成する形で蓄積することが知られています。近年の固体 NMR やクライオ電子顕微鏡を使った研究により、 $A\beta_{42}$ 線維の構造は、 β シートと呼ばれる平たい構造が S 字型に折り畳まれ、多数の $A\beta_{42}$ が平行に連なって長い繊維を作ることが明らかになってきています。

他方で、AD 患者の中には通常の老人斑とは大きく異なる病態を示すサブタイプに分類できるケースがあります。 $A\beta$ の 22 番目のアミノ酸であるグルタミン酸 (E) がグリシン (G) に換わることで起きる E22G 変異は、早期の発症を伴う家族性 AD を引き起こすことが知られています。この家族性 AD では、cotton wool (綿花状) 老人斑と呼ばれる直径 $100\mu\text{m}$ を超える巨大な綿花状の老人斑が形成されることが症例として見られます。綿花状老人斑は通常型 AD とは異なり、中心には $A\beta_{40}$ の線維が蓄積し、その周囲に $A\beta_{42}$ と $A\beta_{40}$ の線維がリング状に形成される特徴的なコア-シェル構造を示します。また、綿花状老人斑は、PET 検査^[7]で AD の老人斑を検出するために広く利用されるピッツバーグ試薬^[7]に対して反応が低いという特徴も持ちます。この綿花状老人斑は遺伝子変異を伴わない通常型の AD でも見られますが、このような特異な AD のサブタイプと考えられる病態が生じるメカニズムや、この病態と $A\beta$ 線維の構造やその他の要素がどのように関係するかについては、長年大きな謎とされてきました。

近年になって、E22G 変異を持つ家族性 AD 患者の脳から取り出した $A\beta$ 線維の構造解析が行われましたが^{注 1)}、綿花状老人斑などのこの家族性 AD の特異性を反映した特徴のある $A\beta$ 線維の構造は得られておらず、複数の構造を持つ $A\beta$ 線維が試料に混在しているため、E22G $A\beta$ 線維の構造と家族性 AD 特有の病態の関連に関して分子レベルの理解を深めることは難しい状況でした。

注 1) Yang, Y. et al. Cryo-EM structures of amyloid- β filaments with the Arctic mutation (E22G) from human and mouse brains. *Acta Neuropathol.* 145, 325–333 (2023).

研究手法と成果

今回、国際共同研究グループは、患者の脳からアミロイド線維を抽出するのではなく、化学合成した E22G $A\beta_{40}$ を用いて、合成生物学的なアプローチで綿花状老人斑の特徴を再現するアミロイド線維を作成しました。綿花状老人斑の特異性が E22G $A\beta$ のアミロイド線維に由来するという仮説はこれまでありませんでした。また、化学合成した E22G $A\beta_{40}$ を用いて線維を作成する試みはこれまで

でも行われていましたが、従来法では出来上がった線維が短く不均一であるなど（図 1a）、構造解析には不向きでした。今回は作成条件を最適化し、均一な構造を持つ形で単離することに成功しました。均一な構造の存在は、固体 NMR で確認されました。

通常の A β の線維は複数の線維が束を作りコンパクトな構造になりますが、今回単離された E22G A β 40 線維は分散性が高く、一本ごとに分離していることが電子顕微鏡写真で分かりました（図 1b）。このため、同じ重量でも野生型の A β 40 線維と比べて約 12 倍の大きさを持つ密度の低い凝集体を作ることが分かりました（図 2）。また、ピッツバーグ試薬と同じ分子骨格を持つ蛍光試薬（チオフラビン T）では検出しにくいことも示されました。これらの E22G A β 40 線維の特徴は、綿花状の老人斑で観測されているアミロイド線維の多くの特徴とよく一致します。さらに、通常の AD では脳内に多く存在する A β 40 よりも少数派の 42 残基の A β （A β 42）が老人斑の形成を促すと考えられていますが、国際共同研究グループは E22G 変異があると A β 42 よりも A β 40 が早く凝集をすることを、老人斑が蓄積する細胞外環境の溶液状態に似せた試験管内の実験で示しました。

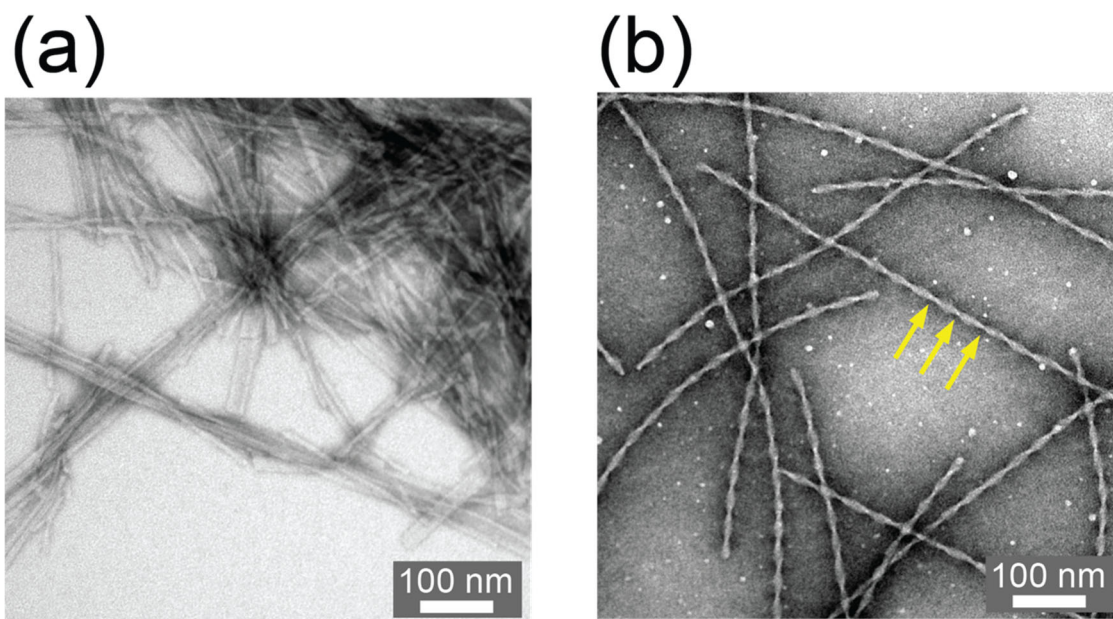


図 1 合成生物学的なアプローチで作成した E22G A β 40 線維の透過電子顕微鏡像

- (a) 従来法で作成した E22G A β 40 線維。さまざまな形状の線維が混ざっており、束を作っていることが分かる。このような不均一で分散性の低い試料はクライオ電子顕微鏡での構造解析が難しく、固体 NMR による解析でも複数の異なる構造の存在が示唆された。
- (b) 条件を最適化して得た線維。(a) の観察像では分からなかった強いねじれ（黄色矢印）を伴う線維が観測された。均一な形状が得られており、クライオ電子顕微鏡と固体 NMR による構造解析に最適である。この線維は、温度や振とう条件などを最適化して得た線維を超音波で破碎し、それを鋳型として凝集していない E22G A β 40 モノマーを加えて線維を成長させることを 5 回繰り返して得られた。

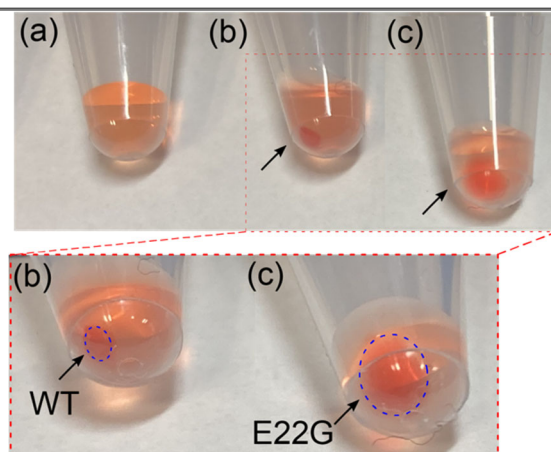


図 2 E22G A β 40 線維が作る密度の低い凝集体

化学合成した A β を染色して試験管内で遠心沈殿させた観察像。

上段：(a) 線維なしの試料。

(b) 対照試料としての、アミノ酸変異を持たない野生型 (WT) A β 40 線維。

(c) 最適化して作成した E22G A β 40 線維。

下段：(b)、(c) を同じ倍率で拡大した画像。E22G A β 40 線維の沈殿の大きさが、同じ重量でも面積ベースで WT A β 40 線維と比較して 12 倍程度大きいことを示し、綿花状の老人斑で大きく広がった老人斑を再現したものと考えられる。この理由として、図 1b で確認されたように通常の線維のように束を作らず、分散しているために同じ量でも線維の分布範囲が大きく広がるためと説明できる。

国際共同研究グループは、今回単離された E22G A β 40 に対して、クライオ電子顕微鏡と固体 NMR による統合構造解析を行いました。解析の結果、E22G A β 40 はこれまで観測されたことのない、 β シートが W 字型に折り畳まれた新規構造モチーフを持つことが分かりました (図 3)。C 末端の 40 番目のアミノ酸が他の残基と強く相互作用していないことから、A β 42 が E22G A β 40 線維の末端に吸着しても、C 末端にある 41 と 42 残基が邪魔にならず相互作用可能で、A β 42 の共凝集を引き起こしやすいことがこの構造より示唆されました。

実際にこの E22G A β 40 線維を、凝集していない野生型の A β 42 (WT A β 42) のモノマー (単分子) に混ぜて実験を行ったところ、WT A β 42 の線維化が促進され、E22G A β 40 と WT A β 42 の共凝集が起こることが確認できました。さらに、得られた構造を基に分子動力学計算^[8]を行ったところ、E22G A β 40 と WT A β 42 が混ざった線維 (キメラ線維) も W 字型構造で安定であることが示唆されました。WT A β 42 で見られる S 字型の構造では A β 40 の共凝集が起こりにくいことが以前から知られていましたが、今回観察された W 字型構造は A β 40 と A β 42 の共凝集を促進すると考えられます。

以上の結果より、E22G 変異を伴う家族性 AD では、凝集の早い E22G A β 40 が分散性の高い W 字型構造を持つ E22G A β 40 線維を生成することで、A β 40 の大きなコアができると説明できます。さらにこの A β 40 の大きなコアの周りに、A β 42 モノマーが共凝集によりリクルートされて A β 42 の線維が蓄積することが、綿花状の老人斑に特有のコア-シェル構造の生成メカニズムであると示唆されました。

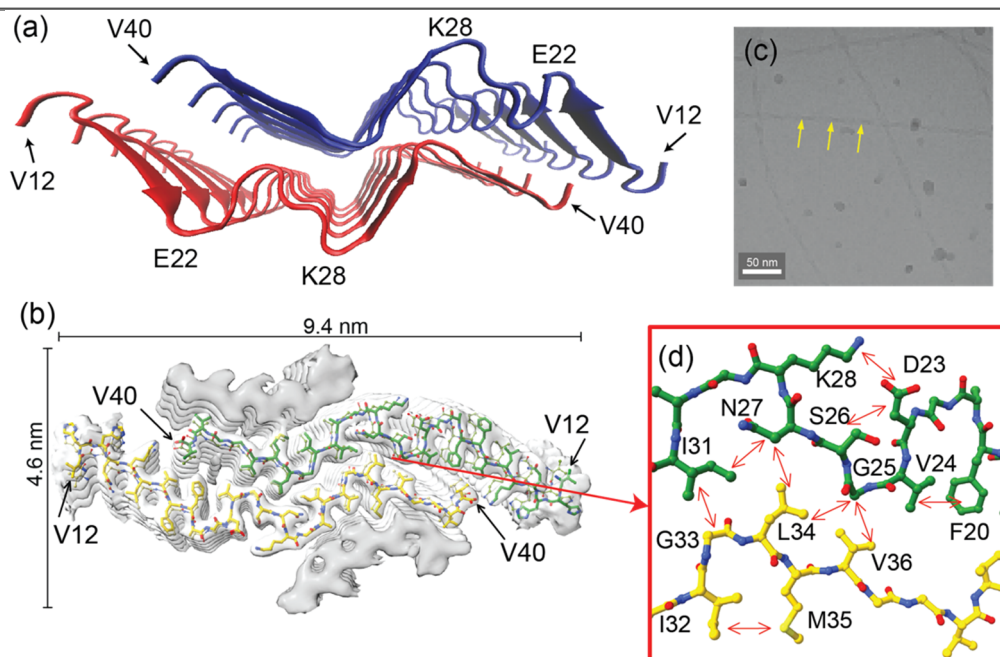


図 3 W 字型に β シートが折り畳まれた新規構造モチーフ

- (a) W 字型の新規構造モチーフを示す E22G A β 40 線維の構造。幅広のリボンの矢印は β シート構造を示し、赤と青の構造は 180 度回転するとほぼ対称形の W 字になっている。
- (b) クライオ電子顕微鏡で得られた密度マップ（分子内部密度の高低を白と灰色のアウトラインで表示）と得られた構造（緑と黄色の構造）の重ね合わせ。初期構造では内層の 2 層の他に外層の 2 層の β シート構造（灰色）も密度マップで示されたが、固体 NMR で得られた構造情報と一致する内層の構造のみを示した。なお A β 40 の N 末端側 11 アミノ酸はおそらく定常的な構造を取っていないため、密度マップとして得られなかった。
- (c) クライオ電子顕微鏡で得られた線維の画像。黄色矢印は、透過電子顕微鏡像で見られたねじれ（図 1b）に対応する構造。
- (d) クライオ電子顕微鏡で得られた構造に、固体 NMR で観測された原子間の相互作用情報（矢印）を重ね合わせたもの。両者の位置関係がよく一致している。

今後の期待

今回の合成生物学的なアプローチにより、AD のサブタイプに分類され得る家族性 AD の特異な老人斑の性質が、脳由来の物質を必要とせず化学合成された物質だけで説明できることが示されました。異なる病態を示す AD のサブタイプは複数報告されていますが、A β 線維の構造的な差異と、異なる病態の明確な関連は従来の研究では示されていませんでした。今回の研究は老人斑が異なる病態を示す AD に対する発症メカニズムの理解と、それに対する適切な創薬のターゲットを選ぶ上で、関連する A β 線維の単離と構造の同定がキーになり得ることを示しています。

今回の研究はまた、E22G 変異を伴う家族性 AD では、通常の AD とは違い、A β 42 ではなく A β 40 がまず線維化して A β 40 の大きなコアができ、その周囲での A β 42 の共凝集が促進されて、家族性 AD に特徴的な老人斑形成につながることを示されました。遺伝子変異により発症の第一幕である A β 凝集の主役が A β 40 に変更されることで、脇役となった A β 42 を含む異なる種類の A β の間の

相互作用でより複雑な病態が生まれることが示唆されました。A β 凝集のメカニズムと A β 線維の構造を理解することで、複雑で手掛かりが少なかった家族性 AD の発症プロセスと創薬のターゲットも理解できるようになり、有効な治療へとつながることが期待できます。

本研究は現在科学技術振興機構（JST）の未来社会創造事業^{注2} の大型プロジェクトで開発中である 1.3 ギガヘルツ（GHz）超高磁場 NMR の利用を広げる研究の一例として行いました。今回の研究では、900 メガヘルツ（MHz）の高磁場固体 NMR を用いて、化学合成した A β 試料を解析しました。NMR は磁場が高くなるほど高感度になるため、1.3GHz NMR などの超高磁場が実現すれば、ヒトやマウス由来など極微量の試料でも固体 NMR とクライオ電顕の統合構造解析が可能となることが期待できます。これにより応用可能な試料の幅が大きく広がり、他の病気の理解にも適用できることが期待されます。

注2) 科学技術振興機構（JST）未来社会創造事業大規模プロジェクト型「エネルギー損失の革新的な低減化につながる高温超電導線材接合技術」研究領域の研究課題「高温超電導線材接合技術の超高磁場 NMR と鉄道き電線への社会実装」

<https://www.jst.go.jp/mirai/jp/program/large-scale-type/theme02.html>

論文情報

<タイトル>

E22G A β 40 fibril structure and kinetics illuminate how A β 40 rather than A β 42 triggers familial Alzheimer's

<著者名>

Mohammad Jafar Tehrani, Isamu Matsuda, Atsushi Yamagata, Yu Kodama, Tatsuya Matsunaga, Mayuko Sato, Kiminori Toyooka, Dan McElheny, Naohiro Kobayashi, Mikako Shirouzu, Yoshitaka Ishii

<雑誌>

Nature Communications

<DOI>

[10.1038/s41467-024-51294-w](https://doi.org/10.1038/s41467-024-51294-w)

補足説明

[1] 家族性アルツハイマー病

アルツハイマー病（アルツハイマー型認知症、AD）には、遺伝が関係しない孤発性と遺伝が関係する家族性の二つのタイプがある。本研究の対象とした β -アミロイドの 22 番目のアミノ酸であるグルタミン酸（E）がグリシン（G）に換わる遺伝子変異は、スウェーデン北部の家族性アルツハイマー病患者で見つかったことから「北極変異（arctic mutation）」と呼ばれている。

[2] 老人斑、アミロイド線維、 β -アミロイド（A β ）

β -アミロイド（A β ）は、アミロイド β 前駆体タンパク質からプロテアーゼにより切断されて産生される生理的ペプチド。A β が凝集したアミロイド線維が、アルツハイマー病患者の脳で見られるタンパク質の沈着（老人斑）の構成成分として発見されたこ

とから、A β の過剰な蓄積が発症の引き金と考えられている。A β はアミノ酸の数で種類が分類され、40 アミノ酸残基から成る A β 40、42 アミノ酸残基から成る A β 42 が脳内の主要な種として同定されている。

[3] 構造モチーフ

多くのタンパク質に共通する構造パターンを構造モチーフと呼ぶ。新規の構造モチーフの発見は新しいタンパク質の動作機序や機能の発見につながるために価値を持つ。本研究では新しい構造モチーフの発見が、新しい機能を持つ A β アミロイド線維の発見につながっている。

[4] クライオ電子顕微鏡

液体エタン(-183~-160℃)中で急速に凍結させることにより非晶質(アモルファス)の氷に閉じ込めた試料を、液体窒素温度(-196℃)で観察する電子顕微鏡。生体分子が生体内に存在している状態と同様の水溶液中に居る状態を電子顕微鏡で観察できる。

[5] 固体 NMR

核磁気共鳴(NMR)法は、磁場中に置かれた原子核の核スピンの共鳴現象(核磁気共鳴現象)により、物質の分子構造や物性を解析する方法。分子の相互作用などの情報も得られるため、生命科学、医薬、化学、食品、材料物性といった幅広い分野で利用されている。磁気共鳴画像(MRI)法でもこの共鳴現象が用いられている。測定対象となる物質を溶媒に溶かす溶液 NMR 法に対し、固体状態の物質を測定する NMR 法を固体 NMR 法と呼ぶ。NMR は nuclear magnetic resonance の略。

[6] β シート

タンパク質の代表的な二次構造の一つ。タンパク質の直鎖状の部分が2本以上隣り合って並び、水素結合で形成された平面構造。

[7] PET 検査、ピッツバーグ試薬

PET は、陽電子を放出する放射性同位体を薬などの分子に組み込んで個体に投与し、体内で崩壊して放出される γ 線を測定して分子の体内分布を見る方法。臨床では、PET 検査として主にがんの診断に用いられている。ピッツバーグ試薬は、A β に結合する低分子を放射性同位体で標識したもので、アルツハイマー病の PET 検査に用いられる。PET は positron emission tomography の略。

[8] 分子動力学計算

コンピュータを用いた分子シミュレーション法の一つ。分子を構成する各原子の間に働く力を、経験的に定められたポテンシャルエネルギー関数を用いて計算し、その運動をニュートン方程式 $F=ma$ に基づいて数値的に解くことで、分子の動きを予測し解析する方法。

国際共同研究グループ

理化学研究所

生命機能科学研究センター

先端 NMR 開発・応用研究チーム

チームリーダー 石井佳誉 (イシイ・ヨシタカ)
 (東京工業大学 生命理工学院 教授)
 上級研究員 小林直宏 (コバヤシ・ナオヒロ)

タンパク質機能・構造研究チーム

上級研究員 山形敦史 (ヤマガタ・アツシ)
 チームリーダー 白水美香子 (シロウズ・ミカコ)

環境資源科学研究センター

質量分析・顕微鏡解析ユニット

上級技師 豊岡公德 (トヨオカ・キミノリ)
 技師 佐藤繭子 (サトウ・マユコ)

東京工業大学 生命理工学院

東京工業大学特別研究員 モハンマド・ジャファール・テヘラーニ
 (Mohammad Jafar Tehrani)

(理研 生命機能科学研究センター 先端 NMR 開発・応用研究チーム
 リサーチアソシエイト)

研究員 松田 勇 (マツダ・イサム)
 (理研 生命機能科学研究センター 先端 NMR 開発・応用研究チーム
 客員研究員)

大学院生 児玉 有 (コダマ・ユウ)
 (理研 生命機能科学研究センター 先端 NMR 開発・応用研究チーム
 研修生)

助教 松永達弥 (マツナガ・タツヤ)
 (理研 生命機能科学研究センター 先端 NMR 開発・応用研究チーム
 客員研究員)

イリノイ大学 (アメリカ) シカゴ校 化学科
 NMR 施設長 Dan McElheny

研究支援

本研究は、米国 National Institutes of Health、NIGMS の U01 グラント「Structures and Propagation of Pathologically Relevant Amyloids in Alzheimer's (研究代表者：石井佳誉)」、科学技術振興機構 (JST) 未来社会創造事業 (大規模プロジェクト型)「エネルギー損失の革新的な低減化につながる高温超電導線材接合技術」研究領域の研究課題「高温超電導線材接合技術の超高磁場 NMR と鉄道き電線への社会実装 (研究開発代表者：小野通隆)」、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業挑戦的研究 (開拓)「超高分解能固体 NMR と自動解析による非結晶性生体高分子と先端材料構造解析の新機軸 (研究代表者：石井佳誉)」、同学術変革領域研究 (A)「神経変性疾患に関わる凝集体の形成・抑制の *in situ* 構造生物学 (研究代表者：山形敦史)」による助成を受け、理化学研究所運営費交付金 (生命機能科学研究、戦略的研究展開事業) で一部の研究を実施して行われました。

発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所

生命機能科学研究センター

先端 NMR 開発・応用研究チーム

チームリーダー	石井佳誉	(イシイ・ヨシタカ)
(東京工業大学 生命理工学院 教授)		

タンパク質機能・構造研究チーム

上級研究員	山形敦史	(ヤマガタ・アツシ)
チームリーダー	白水美香子	(シロウズ・ミカコ)

環境資源科学研究センター

質量分析・顕微鏡解析ユニット

上級技師	豊岡公德	(トヨオカ・キミノリ)
技師	佐藤繭子	(サトウ・マユコ)

東京工業大学 生命理工学院

東京工業大学特別研究員	モハンマド・ジャファー・テヘラーニ	(Mohammad Jafar Tehrani)
-------------	-------------------	--------------------------

研究員	松田 勇	(マツダ・イサム)
-----	------	-----------

<機関窓口>

理化学研究所 広報室 報道担当

Tel: 050-3495-0247

Email: ex-press [at] ml.riken.jp

東京工業大学 総務部 広報課

Tel: 03-5734-2975

Fax: 03-5734-3661

Email: media [at] jim.titech.ac.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。