

## 量子ドットナノプローブを用いたアミロイド凝集過程のリアルタイムイメージング技術とその活用

その他（別言語等）のタイトル	Real-time imaging technology of amyloid aggregation process using a quantum-dot nanoprobe
著者	徳樂 清孝, 上井 幸司
雑誌名	粉体に関する討論会 : 講演予稿集
ページ	136-140
発行年	2016-09
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10258/00009009">http://hdl.handle.net/10258/00009009</a>

アミロイドタンパク質の凝集はアルツハイマー病をはじめとする様々な神経変性疾患の発症に関与している。最近、我々は量子ドットを用いたアミロイドタンパク質凝集過程のリアルタイムイメージング法を確立し、さらにそのイメージング法を応用したアミロイド凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング (MSHTS) 法を開発した。

## 1. 緒言

タンパク質は可逆的に凝集・分散することで単体では発揮できない様々な機能を新たに生み出すことができる (図 1)。

例えば、チューブリンが自己集合することで形成される直径 25 nm の微小管は、細胞分裂の際に染色体を分離させる機能を持つ紡錘体を形成したり、神経細胞のような長い細胞の形態形成に関与したりしている。また、筋肉ではアクチンと呼ば

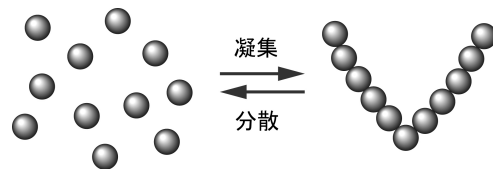


図 1 タンパク質の凝集による機能創成

ばれるタンパク質が自己集合して形成されたアクチンフィラメントと、ミオシンと呼ばれるタンパク質複合体が自己集合して形成されたミオシンフィラメントが、ATP 加水分解のエネルギーを使ってお互いに滑り合うことで力を発生する。このように、生物は、凝集し線維状構造を形成する様々なタンパク質分子を持っており、それらが凝集・分散することで、細胞分裂、細胞運動、細胞形態の形成、筋肉運動など、生命現象に必須の多様な生物機能が営まれている[1]。

一方で、変性タンパク質の凝集は病気の原因となることもある。例えば、アルツハイマー病ではアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) と呼ばれるタンパク質の凝集が、パーキンソン病では  $\alpha$ -シヌクレインというタンパク質の凝集が病気の発症に関与している。また長期透析患者に見られることが多い透析アミロイドーシスでは  $\beta$ 2-ミクログロブリンが、牛海綿状脳症 (BSE) ではプリオンと呼ばれるタンパク質が凝集する。このような変性タンパク質の凝集が関与する病気はアミロイドーシスと呼ばれ、変性タンパク質が  $\beta$  シート構造に富むアミロイドと呼ばれる線維を形成し、生体内の様々な部位に凝集、蓄積することで生命現象に異常をきたす[2]。

我々は最近、量子ドット (QD) ナノプローブを用いて  $A\beta$  凝集体を蛍光顕微鏡下で可視化できることを報告した[3]。本手法を用いることで、 $A\beta$  オリゴマーや凝集体が成長して形成されるアミロイド線維を蛍光顕微鏡で直接可視化することが可能になった。また、本手法では生体内と同様に水溶液中で  $A\beta$  凝集体を可視化できることから、従来の電子顕微鏡法や原子間力顕微鏡法では困難であった  $A\beta$  凝集過

程のリアルタイムイメージングや、マイクログリア細胞による A $\beta$  の貪食、さらには神経細胞への A $\beta$  オリゴマーの結合についても直接観察することが可能となった[4]。我々は引き続き、本イメージング法を応用した A $\beta$  凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング法 (MSHTS 法) の開発に取り組み、これまで香辛料[5]や海藻[6]から A $\beta$  凝集阻害物質のスクリーニングを行ってきた。上述したようにアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は変性タンパク質の凝集が原因で発症するため、その凝集を阻害する物質は病気の予防や治療に有用である。医学の進歩による高齢化の進行はアルツハイマー病やパーキンソン病などを原因とする認知症患者の増加という社会問題を突きつけており、MSHTS 法を活用した A $\beta$  凝集阻害物質の効率的な探索が期待される。本討論会では、A $\beta$  凝集阻害物質のスクリーニングに向けた凝集体の定量的イメージング法の開発、および本イメージング法を応用した A $\beta$  凝集阻害物質の MSHTS 法の開発、加えて本スクリーニング法を用いて得られた成果に焦点を合わせて発表する。

## 2. 実験方法

QDA $\beta$  (図 2A) はアミノ (PEG) 基を表面に付加した QD<sub>655</sub> と Cys-A $\beta$  を sulfoEMCS により架橋させ作成した。様々な濃度の香辛料や海藻抽出物を含む 30 nM QDA $\beta$ 、30  $\mu$ M A $\beta$ 、5% EtOH、PBS 溶液をそれぞれ 5  $\mu$ l ずつ 1536-ウェルプレートに注入し、プレートシールで密閉後、37  $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。蛍光顕微鏡 (Nikon、TE2000) により各ウェルを観察し、顕微鏡用カラー CCD カメラ (Olympus、DP72) を用いて画像を取得した (図 2B)。各ウェルの中央部の画像 100 $\times$ 100 ピクセル (10,000 ピクセル) の明るさを ImageJ ソフトウェア (NIH) により計測し、明るさのばらつきから標準偏差 (SD)

値を求めた。SD 値が A $\beta$  凝集体量と相関したことから、本研究では SD 値をみかけの A $\beta$  凝集体量として扱った。A $\beta$  凝集阻害物質を含まないコントロールサンプルの凝集前の SD 値と凝集後の SD 値を、それぞれ凝集体量 0% および 100% とし、SD 値が 50% となる阻害物質の濃度を 50% 効果濃度 (EC<sub>50</sub>) とした (図 2C)。この EC<sub>50</sub> 値はその値が小さい程少量で効果を示す、すなわち活性が高いことを意味する。

## 3. 結果と考察

### 3-1. QD<sub>655</sub> による A $\beta$ 凝集体のイメージングと A $\beta$ 凝集阻害物質の MSHTS 法の開発

初期の研究において我々は 525 nm の蛍光を発する QD<sub>525</sub> を用いて Cys-A $\beta$  を標識した蛍光プローブを用い A $\beta$  凝集体を蛍光顕微鏡観察していた[3]。これを様々な夾雑物が含まれる天然粗抽出物のスクリーニングに適用できるように、より長波長側で励起・観察できる QD<sub>655</sub> を用いることとした。その結果、QD<sub>655</sub> を用いて作成した QDA $\beta$  でも QD<sub>525</sub> の場合と同様に A $\beta$  凝集体を蛍光顕微鏡で可視化できることが確認できた (結果は省略)。

凝集阻害活性を数値化するためには、凝集体量を定量化する必要がある。前の報告で、我々は凝集体量を定量化するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した凝集体の 3D 情報から体積を見積もっていた[3]。しかしながら、共焦点レーザー顕微鏡による 3D 画像の取得には時間がかかる上、一つのデ

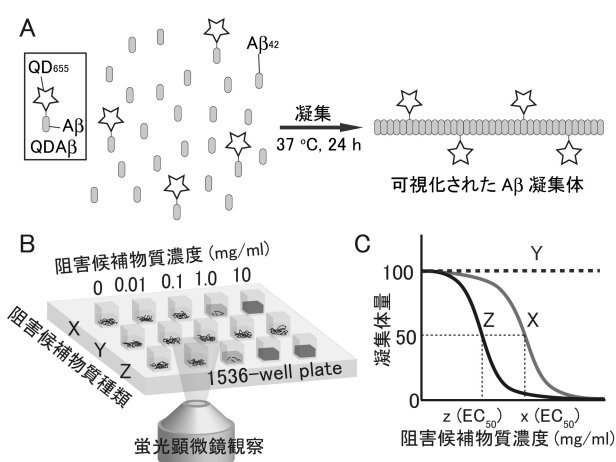


図 2 QDA $\beta$  を用いた A $\beta$  凝集体のイメージングと A $\beta$  凝集阻害物質の MSHTS 法

一タあたりの情報量も大きくなってしまいます。そこで、一般的な 2D の蛍光顕微鏡画像から凝集体量を定量化することを試みた。

QDA $\beta$  存在下で A $\beta$  が凝集する際、凝集体の中に QDA $\beta$  が取り込まれ凝集体が明るい蛍光として観察される。即ち凝集前は、QDA $\beta$  が溶液中に分散し、均一な蛍光画像となるが、凝集体が形成されることで蛍光画像に明るさのばらつきが出てくる。実際に蛍光顕微鏡画像のピクセルごとの明るさのヒストグラムをとると、凝集前はほぼ同じ明るさのピクセルばかりとなるが、凝集後は暗いピクセルから明るいピクセルまで様々な明るさのピクセルが存在し、そのばらつきを示す標準偏差の値が大きくなった。そのため、我々はこの明るさのばらつき、すなわち SD 値を凝集体量の指標とできるのではないかと考えた。

そこで、30 nM QDA $\beta$  共存下、様々な濃度の A $\beta$  を凝集させ、その SD 値を加えた A $\beta$  濃度に対してプロットした (図 3A)。その結果、A $\beta$  濃度が 30  $\mu$ M 以下では A $\beta$  濃度と SD 値が相関し、SD 値を A $\beta$  凝集体量の指標として用いることができることが示唆された。30  $\mu$ M 以上では A $\beta$  凝集体の厚さが蛍光顕微鏡の焦点深度を超え、ピンぼけの画像が映り込んでしまうため、SD 値が小さくなった。以上より、30  $\mu$ M の A $\beta$  濃度で凝集阻害実験を行えば、SD 値からおおよその凝集体量を見積もることができることが明らかになった。また、A $\beta$  凝集体形成における時間依存的な SD 値の変化を測定したところ (図 3B)、共焦点レーザー顕微鏡観察による凝集体体積の時間変化と同様[3]、遅滞期、伸長期、定常期からなる典型的な凝集阻害曲線を描くことができた。以上の結果より、蛍光顕微鏡画像の SD 値を指標として凝集体量をおおよそ見積もることができることを証明できた。

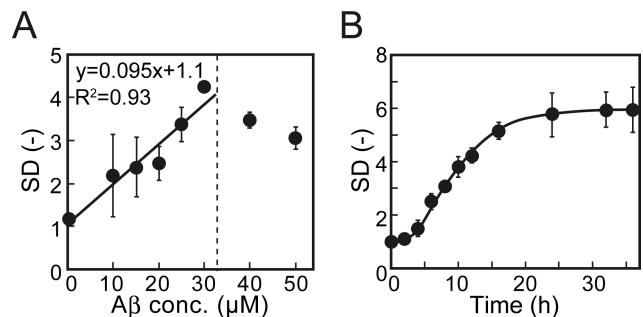


図 3 A $\beta$  凝集体の定量化。(A) A $\beta$  凝集体濃度と蛍光顕微鏡画像から算出した各ピクセルの明るさの SD 値の関係。(B) 凝集時間と SD 値の変化。

これらの予備検討を元に、次のような A $\beta$  凝集阻害物質の MSHTS 法を考案した。まず、凝集阻害物質や阻害候補物質を段階的に希釈する。これに、最終濃度が 30  $\mu$ M A $\beta$ 、30 nM QDA $\beta$  となるように A $\beta$  溶液を添加し、遠心分離でサンプル中に含まれる不溶性のゴミを除いた後、1536 ウェルプレートに 5  $\mu$ l ずつ注入する。サンプルの乾燥とゴミの混入を防ぐため、プレートをシールで密閉し、液面を水平にするためにプレート遠心機で遠心分離する。その後、37  $^{\circ}$ C、24 時間インキュベートし、蛍光顕微鏡で凝集体の画像を取得する。蛍光顕微鏡画像のピクセルごとの明るさのばらつきを SD 値として算出し、縦軸に SD 値の相対値、横軸に添加した阻害候補物質をプロットし、SD 値が阻害物質を含まないコントロールの値の 50%となる値を 50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>) として算出する。この MSHTS 法を用い、A $\beta$  凝集阻害活性がすでに報告されている様々なポリフェノール類の凝集阻害活性を評価したところ、本手法により EC<sub>50</sub> 値を評価できることが証明された (結果は省略)。

### 3-2. MSHTS 法を用いた香辛料からの A $\beta$ 凝集阻害物質の探索

MSHTS 法を用いて、香辛料エタノール抽出物の抽出物から A $\beta$  凝集阻害活性を評価した。香辛料には様々な植物種由来のものが含まれており、多くの香辛料由来の生理活性物質も知られている。また素材を安定な状態で、安く入手できることも香辛料をスクリーニング対象とした理由である。その結果、フトモモ科およびシソ科の植物が高い A $\beta$  凝集阻害活性を示すことが明らかになった (結果は省略)。

次に、シソ科の中で特に活性が高かった、タイム、サマーサボリー、スペアミントのうち、サマーサ

ポリーから活性本体の探索に取り組んだ。MSHTS 法により決定した A $\beta$  凝集阻害活性の EC<sub>50</sub> 値を指標とし、溶媒分配、一連のカラムクロマトグラフィーを経て、A $\beta$  凝集阻害活性本体を単離した。単離した凝集阻害活性本体の構造を決定したところ、ロスマリン酸であることが明らかになった。ロスマリン酸が A $\beta$  凝集阻害活性を有することはすでに報告されていたため、新規の発見ではなかったが、本成果は MSHTS 法が A $\beta$  凝集阻害物質の網羅的スクリーニングの強力なツールとして使用できることを証明したといえる。

### 3-3. MSHTS 法を用いた海藻類からの A $\beta$ 凝集阻害物質の探索

北海道沿岸に生息する海藻類 11 種類をエタノールおよび熱水で抽出し、A $\beta$  凝集阻害活性を MSHTS 法により評価した。まず、エタノール抽出物の A $\beta$  凝集阻害活性を評価したところ、全ての海藻類のエタノール抽出物が A $\beta$  凝集阻害活性を有することが明らかとなった。しかしながら、EC<sub>50</sub> 値は数 mg/ml 程度と、香辛料エタノール抽出物で最も活性が高かったスペアミントの 100 倍程度の大きさであり、スペアミントより著しく活性が低いことが分かった（結果は省略）。次に海藻熱水抽出物の凝集阻害活性を MSHTS 法によって評価した。その結果、蛍光顕微鏡画像で観察される A $\beta$  凝集体の形態がエタノール抽出物のものと比較して異なることが明らかになった。さらに、EC<sub>50</sub> 値については、エタノール抽出物のものより数値が小さく、スペアミントと同程度の高い活性を有するものが見いだされた（結果は省略）。

海藻熱水抽出物はエタノール抽出物と比較して粘性が高かったことから、熱水抽出物には多糖類が含まれることが予想された。そのため、この多糖類が凝集阻害活性や凝集体の形状に影響を与えた可能性が考えられた。そこで、この仮説を証明するため、熱水抽出物の中で活性が高かったフノリとワカメ抽出物に 70% エタノールを添加し、遠心分離することで、多糖類を沈殿として除去した。多糖類を除去した熱水抽出物を MSHTS 法で評価したところ、A $\beta$  凝集体の形状や凝集阻害活性がエタノール抽出物の結果と同程度になった。以上の結果より、海藻類に含まれる多糖類が A $\beta$  凝集阻害活性の EC<sub>50</sub> や凝集体の形状に影響を与えることが明らかになった。

## 4. 結言

本研究により、我々は量子ドットナノプローブによる A $\beta$  凝集のリアルタイムイメージング法を応用した A $\beta$  凝集阻害物質の MSHTS 法の開発に成功した。本手法の特長は、（1）数マイクロリットルの微量サンプル量、（2）ハイスループット、（3）夾雑物を含む天然粗抽出物や加工食品でも A $\beta$  凝集阻害活性を評価できることである。現在我々は、本手法を活用し、様々な天然物ライブラリーや化合物ライブラリーからの A $\beta$  凝集阻害物質のスクリーニングに取り組んでいる。また、MSHTS 法の改良や自動化、さらには、A $\beta$  以外の他の変性タンパク質への適用についても現在研究を進めている。これらの研究により、様々な病気の発症を誘引する変性タンパク質の凝集阻害物質の探索やその予防・治療薬の開発、また凝集や発症のメカニズム解明の進展が期待される。

## 引用文献

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2014) Molecular biology of the cell. New York: Garland Science. 1464 p.
2. Koo EH, Lansbury PT, Jr., Kelly JW (1999) Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9989-9990.
3. Tokuraku K, Marquardt M, Ikezu T (2009) Real-time imaging and quantification of amyloid-beta peptide aggregates

by novel quantum-dot nanoprobe. *PLoS One*, 4, e8492.

4. Tokuraku K, Ikezu T (2013) Imaging of amyloid  $\beta$  aggregation using a novel quantum dot nanoprobe and its advanced applications. In: Uversky VN, Lyubchenko Y, editors. *Bio-nanoimaging: Protein Misfolding and Aggregation*: Elsevier Inc. pp. 121-131.
5. Ishigaki Y, Tanaka H, Akama H, et al. (2013) A microliter-scale high-throughput screening system with quantum-dot nanoprobe for amyloid-beta aggregation inhibitors. *PLoS One*, 8, e72992.
6. Ogara T, Takahashi T, Yasui H, et al. (2015) Evaluation of the effects of amyloid beta aggregation from seaweed extracts by a microliter-scale high-throughput screening system with a quantum dot nanoprobe. *J Biosci Bioeng*, 120, 45-50.

## 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP16H03288、および JST マッチングプランナープログラム「企業ニーズ解決試験」MP28116808300 の助成を受けたものです。