

放射光赤外顕微鏡を用いたアルツハイマー病モデルマウスの脳組織切片の 構造解析

Structural analysis of brain sections from Alzheimer's disease model mouse using infrared microscope spectroscopy

川崎平康^a, 家路豊成^b, 中村和裕^c
Takayasu Kawasaki^a, Toyonari Yaji^b, Kazuhiro Nakamura^c

^a 東京理科大学赤外自由電子レーザー研究センター, ^b 立命館大学 SR センター,
^c 群馬大学大学院保健学研究科

^a IR Free Electron Laser Research Center, Research Institute for Science and Technology, Organization for Research Advancement, Tokyo University of Science, ^bThe SR Center, Ritsumeikan University, ^cDepartment of Laboratory Sciences, Gunma University Graduate School of Health Sciences

e-mail: knakamur@gunma-u.ac.jp

アルツハイマー病モデルマウスの脳には凝集を示すベータシート構造を有する病的なアミロイドベータ、タウたんぱくが蓄積している。アルツハイマー病モデルマウスの脳組織切片に赤外自由電子レーザー(FEL)を照射した後、脳組織切片に含まれるたんぱくの構造変化を、赤外顕微鏡を用いて解析した。中赤外領域の波長を持つ赤外自由電子レーザーはアルファヘリックス構造を持つたんぱくの割合を増やし、逆にベータシート構造を持つたんぱくの割合を減らすことがわかった。

Pathogenic amyloid beta and tau proteins with beta sheet structure tend to aggregate and accumulate in the brain of model mice for Alzheimer's disease. We quantified ration of protein conformation in the brain after irradiation with free electron laser (FEL) using infrared microscope spectroscopy. We found that percentage of alpha helix increases, whereas that of beta sheet decreases after irradiation.

Keywords: Alzheimer's disease, free electron laser, protein conformation

背景と研究目的

神経変性疾患の中で最も多い病気はアルツハイマー病であり、認知症の原因疾患の中でも最多である。現在既に世界で数千万人の患者さんが存在すると言われている。病因はアミロイドベータとタウたんぱくの凝集体であり、それらが神経細胞死を引き起こす。その結果として認知機能障害がみられる。治療法としてシナプス伝達を修飾する作用を有する治療薬が使われることはあるが、病因そのものを標的とした根治的な治療法ではないため、有効な治療法は確立されていないと言える。したがって、今後さらに患者数が増加することが予想され、非常に多くの患者さんが認知機能障害、精神症状に苦しむことになる。根本的な治療戦略を考えたとき、アミロイドベータとタウ蛋白の凝集を解離することが有効と思われる。過去の研究ではアミロイドの凝集過程を干渉する働きのあるペプチド等の有用性が報告されているが、生体で使用することを考えると血液脳関門を通過する必要があるという高いハードルが存在する。

一方で脳に直接レーザーを照射するという方法は血液脳関門の通過を考慮する必要がない方法である。東京理科大学に設置されている赤外自由電子レーザー(IR-FEL)は、分子が有する伸縮振動や変角振動に相当する中赤外領域の様々な波長を発振することができる高出力パルスレーザー光である。我々はIR-FELの6ミクロンの波長をアミロイドベータ42ペプチド凝集体に照射し電顕解析を行い、凝集体解離成功を確認した。本研究では次の段階としてアルツハイマー病モデルマウス脳切片に対して照射を行い、凝集体を形成するベータシート構造のたんぱくが減少するかどうかを調べることを目的とした。

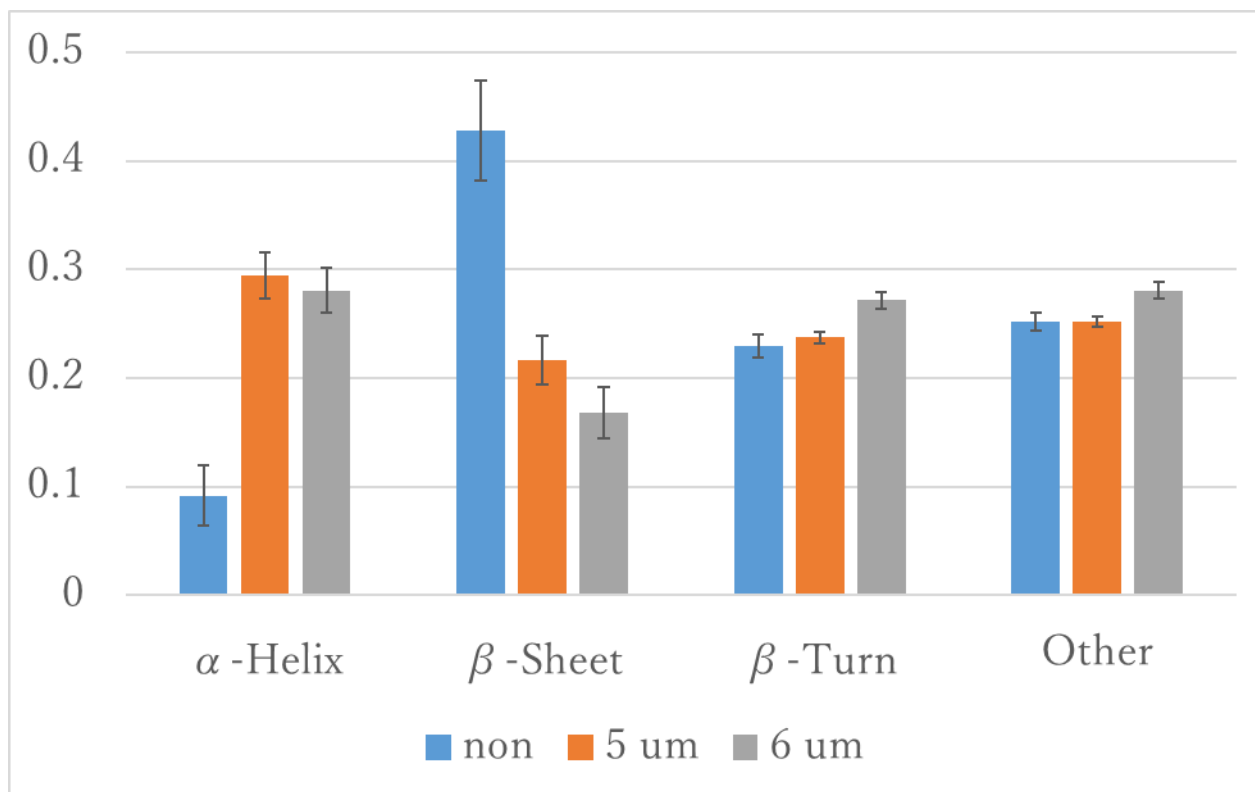
実験

脳切片試料作製、解析は下記の手順で施行した。

- (1) 使用したアルツハイマー病モデルマウスは3xTg ADマウスであり、変異のアミロイド前駆体たんぱく、タウ、プレセニリンをノックインあるいはトランスジーンとして持つマウスである。
- (2) マウス脳をOCTコンパウンドに包埋し凍結後、クリオスタットで20ミクロンの厚さの冠状断脳切片を作成した。
- (3) 未照射、5ミクロン照射、6ミクロン照射の3群の切片を用意した。
- (4) 立命館大学SRセンター BL-15赤外顕微鏡で大脳皮質の領域からデータを取り、アルファヘリックス、ベータシート、ベータターン、それ以外のコンフォメーションを持つものの割合を定量した。

結果、および、考察：

下図に示すように中赤外領域の波長（5ミクロン、6ミクロン）を持つ赤外自由電子レーザーはアルファヘリックス構造を持つたんぱくの割合を有意に増やし、逆にベータシート構造を持つたんぱくの割合を減らすことがわかった。我々は過去の論文において、複数の別のたんぱく凝集体を6ミクロンの波長が特異的に解離することを見出してきた。その効果はペプチド、たんぱくそのもの(1-6)に限定せず、細胞内のポリグルタミン凝集体(7)にも当てはまった。今回我々がアミロイドベータ42ペプチド凝集体に照射した時も同様に、5ミクロンの波長では効果が見られず、6ミクロンの波長で特異的に凝集解離効果が見られた。今回の脳切片の結果では5、6ミクロン両方で解離がみられたため、この結果はペプチドに結果と一部矛盾する。脳内にはアミロイドベータとタウたんぱく以外のたんぱくでベータシート構造をとっているものが多数存在していることが予想されるため、それらに対する5ミクロンの波長の効果が今回の結果につながったのかもしれない。今後、アミロイドベータとタウたんぱく凝集体を持たない野生型マウス脳を使った解析を追加し、上記仮説について調べる予定である。



参考文献

- 1 Kawasaki T, Fujioka J, Imai T, Tsukiyama K (2012) Effect of Mid-infrared Free-Electron Laser Irradiation on Refolding of Amyloid-Like Fibrils of Lysozyme into Native Form. *Protein J* 31: 710-716.
- 2 Kawasaki T, Fujioka J, Imai T, Torigoe K (2014) Tsukiyama, K. Mid-infrared free-electron laser tuned to the amide I band for converting insoluble amyloid-like protein fibrils into the soluble monomeric form. *Lasers Med Sci* 29: 1701-1707.
- 3 Kawasaki T, Imai T, Tsukiyama K (2014) Use of a Mid-Infrared Free-Electron Laser (MIR-FEL) for Dissociation of the Amyloid Fibril Aggregates of a Peptide. *J Anal Sci Meth Instrum* 4: 9-18.
- 4 Kawasaki T, Yaji T, Imai T, Ohta T, Tsukiyama K (2014) Synchrotron-Infrared Microscopy Analysis of Amyloid Fibrils Irradiated by Mid-Infrared Free-Electron Laser. *Am J Anal Chem* 5: 384-394.
- 5 Kawasaki T, Yaji T, Ohta T, Tsukiyama K (2016) Application of mid-infrared free electron laser tuned to amide bands for dissociation of aggregate structure of protein. *J Synchrotron Rad* 23: 152-157.
- 6 Kawasaki T, Nakamura K (2016) Dissociation of protein aggregates by mid-infrared laser. *Electronic Journal of Biology* 12: 363-366.
- 7 Kawasaki T, Ohori G, Chiba T, Tsukiyama K, Nakamura K (2016) Picosecond pulsed infrared laser tuned to amide I band dissociates polyglutamine fibrils in cells. *Lasers Med Sci* 31: 1425-1431.

研究成果公開方法／産業への応用・展開について

・論文発表

T. Kawasaki, T. Yaji, T. Ohta, K. Tsukiyama and K. Nakamura “Dissociation of β -sheet stacking of amyloid β fibrils by irradiation of intense, short-pulsed mid-infrared laser ” *Cellular and Molecular Neurobiology* (2018) *in press*.