

アミロイド線維構造多型形成反応の 直接観察による追跡

宗 正 智*

Direct Observation of Amyloid Polymorphism Formation

Masatomo SO*

Amyloid fibrils are pathological hallmarks of neurodegenerative diseases and exhibit structural polymorphism depending on sequence and environmental conditions. However, the mechanisms governing polymorph formation remain unclear, and thioflavin T (ThT) assays have limited ability to distinguish structurally distinct states. A fluorescence-based platform was developed to discriminate amyloid polymorphs and detect intermediate aggregation states using α -synuclein (α Syn) and its familial mutants (A30P, E46K, H50Q). Screening identified probes that produced distinct fluorescence responses to different fibril structures. Kinetic analyses with a selected probe and ThT revealed variant-dependent pathways and transient intermediates preceding ThT-positive cross- β structures. A Couette-cell-based fluorescence assay compatible with Rheo-NMR was also established, enabling multiprobe monitoring under shear conditions suitable for atomic-resolution analysis.

1. 研究の背景と目的

蛋白質の異常凝集によって形成されるアミロイド線維は、アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとするアミロイドーシスの主要な病理学的特徴である。クライオ電子顕微鏡や固体 NMR などによる原子分解能構造解析の進展により、アミロイド線維がアミノ酸配列の違いや溶液環境の差異に応じて複数の構造多型をとることが明らかになってきた。さらに、これらの構造差が疾患表現型や病態進行の違いに関与する可能性が示されている。

一方で、こうした構造多型がどのような凝集キネティクスや分子間相互作用を経て形成されるのかについては、十分に理解されていない。この課題を解決するためには、アミロイド形成過程を時間分解的かつ定量的に追跡し、多型形成の背景にある物理化学的要因を評価できる実験手法が必要である。アミロイド線維特異的蛍光プローブであるチオフラビン T (ThT) は、 β シート構造に富む線維の形成を高感度に検出できるため、凝集反応のモニタリングに広く用いられてきた。しかし、ThT は主として成熟したクロス β 構造を反映するため、構造的に異なる多型や形成途中の中間状態を区別することは困難である。本研究は、ThT を補完しうる新たな検出手法として、アミロイド線維構造多型を識別し、これまでに捉えられなかった中間的な凝集状態を捉えることが可能な蛍光ベースの検出プラットフォームの開発を目的とした。さらに、NMR による原子分解能解析を目的としたアッセイ系の構築をめざした。

2. アミロイド多型検出蛍光プローブのスクリーニング

本研究では、モデル蛋白質としてパーキンソン病などの疾患に関わる α シヌクレイン (α Syn) を用いて実験をおこなった。 α Syn は溶液環境や変異により異なる構造のアミロイド線維が形成されることがすでに知られている。まず、基本的なアミロイド線維形成条件で形成された変異体 (A30P, E46K, H50Q) のアミロイド線維に対して、15 種類の候補化学プローブについて系統的なスクリーニングを行い、異なる α Syn アミロイド構造に対する結合特性と蛍光応答を評価した。これらのプローブのうち、3 種類がアミロイドの多型状態を識別する明確な可能性を示した (図 1)。アミロイド線維形成は極めて複雑な反応であり、特定の構造多型の選択は、さ

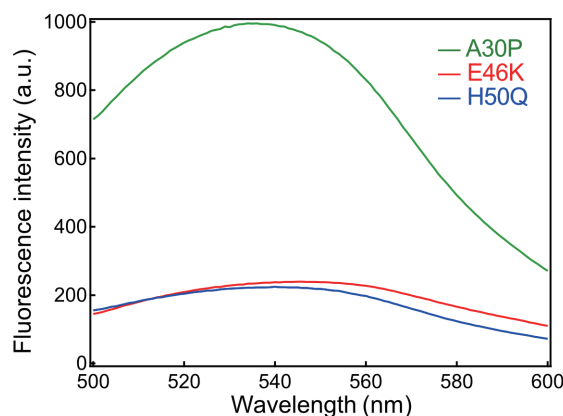


図 1 多型を検出した新規蛍光プローブのスペクトル。

2026年2月26日 受理

* 豊田理研スカラー

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

さまざまな疾患の発症に直結する極めて重要な問題である。異なる α Syn 変異体から形成されたアミロイド線維がそれぞれ固有の蛍光スペクトルを示したことは、これらの変異体が異なる構造を持つアミロイド線維を形成しており、かつ蛍光プローブがそれらの構造的バリエーションを認識可能であることを示唆している。これらの結果は、臨床診断や創薬スクリーニングにおける、これらプローブの新たな応用の可能性を示している。

3. アミロイド多型形成の速度論解析

アミロイド線維形成メカニズムを調べるために、新規蛍光プローブのスクリーニングにより見出されたプローブの1つ(プローブX)とThTを用いてアミロイド線維形成キネティクスの追跡をおこなった。得られた蛍光データは、蛋白質変異体間や実験条件間でのキネティクスを比較するため、Finke-Watzkyの2段階核形成・自己触媒モデル¹⁾を改変したモデルを用いて解析した。アミロイド形成キネティクスの概略は、変異体によって異なっていた。興味深いことに、H50QのプローブX蛍光は、ラグタイムの後に顕著に上昇し、その後減少に転じる挙動を示した(図2)。一方で、ThT蛍光はプローブXの上昇から遅れて増加し、その後の減少は見られなかった。

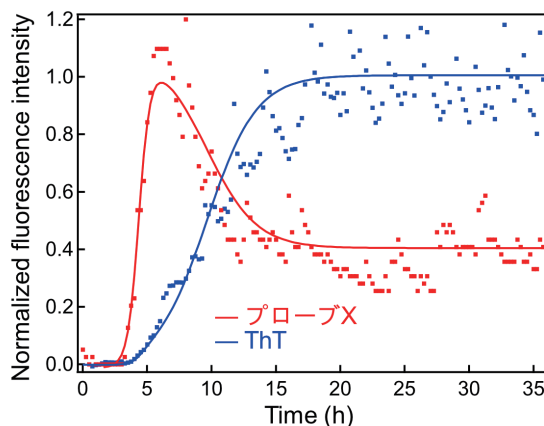


図2 新規プローブとThTを用いた反応の追跡。

ThTによって通常同定される典型的なクロス β 構造の形成に先立つ分子間相互作用を検出することで、モノマーから中間体であるオリゴマー、そして最終的な成熟線維に至る経路が変異体間で異なることを実証した。さらに、初期のオリゴマー中間体がアミロイド様の協同的な形成プロセスを示すという観察結果は、主鎖間の相互作用が支配的な「アミロイド骨格」が、凝集プロセスの早い段階で形成されることを示唆している。その後、成熟プロセスは動的な構造再編を経て進行する。各変異体における化学的性質や相互作用のわずかな違いが、これら凝集状態の相対的な安定性や一過性の分布を制御しており、それらはマルチプローブ蛍光アプローチを用いることで効果的に解明することが可能である。

4. 原子分解能測定に向けた測定系開発

アミロイド線維形成は、核形成の高いエネルギー障壁を超える段階を含むため、反応を進行させるには溶液への物理的的刺激、特に攪拌が必要である。マグネティックスターラーや振とう、超音波などが用いられてきたが、これらの方法では溶液中に乱流や不均一な流れが生じやすく、せん断条件を定量的に定義することが難しい。その結果、実験の再現性が低下するだけでなく、流動状態を精密に制御する必要がある原子分解能解析、特にNMR測定の障害となる。この課題を克服するために、同心円筒間に定義されたせん断場を形成できるクエットセルを用いたRheo-NMR技術が開発されてきた²⁾。本研究では、このRheo-NMRをアミロイド線維形成反応の解析へと展開することを目的とし、同一のクエットセル条件下で蛍光測定を行うクエットセル蛍光アッセイ系を構築した。すなわち、剪断速度や温度などの物理条件を統一したまま、線維形成の進行をリアルタイムで分光学的に追跡できる系を設計した。クエットセルにマルチチャンネル分光器を接続することで、単一波長の強度変化に依存しないスペクトル情報の取得を可能とし、複数の蛍光プローブを同時に検出できる構成とした。これにより、核形成、伸長、さらには線維の構造転移といった複雑な反応過程を、時間分解スペクトルとして解析できる。ThT蛍光の増大およびスペクトル形状の変化から、 α Synのアミロイド線維化過程を連続的に追跡できることを示した。さらに、条件に応じて蛍光極大波長や強度変化の挙動に差異が認められ、形成された線維構造の違いを反映している可能性が示唆された。

5. 今後の展望

本研究により、アミロイド多型を識別可能な蛍光プローブ群と、それらを用いた速度論解析手法、さらにRheo-NMRと接続可能な測定基盤を構築した。今後は、選抜したプローブの結合様式をRheo-NMRやクライオ電子顕微鏡解析と組み合わせ検証し、蛍光応答と原子レベル構造との対応関係を明確にする必要がある。また、家族性変異体や翻訳後修飾体へ適用範囲を拡張し、多型選択性と毒性発現との関連を定量的に評価する。さらに、細胞抽出液や生体試料への応用を通じて、病態関連多型の検出法としての有効性を検証し、診断および創薬研究への展開を目指す。

REFERENCES

- 1) Morris, *et al.*, *Biochemistry*, **47** (2008) 2413-2427.
- 2) Iwakawa, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **143** (2021) 10604-10613.