2025年1月14日

＜研究課題＞　アルツハイマー型認知症の予防・治療を目指したプロテオスタシスの理解

代表研究者　東北大学学際科学フロンティア研究所　准教授　奥村　正樹

【抄録】
本課題は、超高齢化社会を迎える我が国におけるアルツハイマー症(AD)に対峙すべく、多階層アプローチを用いて画期的なシャペロン医薬品の実用化に直結する基礎研究を展開する。シャペロン群 Protein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリーは、AD 患者から異常な化学修飾、変異挿入が見つかっており、AD 疾患の治療における新たな作用点として特に着目される。準備研究から amyloid beta (Aβ)のアミロイド線維形成を低減するシャペロンを PDI ファミリーから幾種か見出しており、今後 PDI ファミリーによる AD 疾患の治療開発を加速させ、シャペロン医薬品の分野を涵養する必要がある。そこで本研究で、AD の発症メカニズム解明の鍵を握る PDI ファミリーによる Aβの線維形成抑制機構の理解を基盤とし、疾患モデルマウスで検証することにより、AD 発症の核心に迫り、シャペロンが関わる AD 発症の成因解明を目指す。

１．研究の目的

1-1 高齢化が深刻化する我が国では、認知症の人口が 2025 年には約 700 万人に達すると見積もられており、これは 65 歳以上の 5 人に 1 人に相当する。加齢に伴い発症率が高くなる神経変性疾患の患者がすでに増加し、深刻な社会問題となっている。Amyloid β (Aβ)や Tau の凝集体は老人斑の主成分であり、アルツハイマー(AD)病の病態生理で見られる典型例であり、最終的にシナプスとニューロンが喪失し、脳領域が萎縮する。実際に AD 患者の委縮した脳から抽出した Tau アミロイド線維の構造がクライオ電顕によって決定され(Fitzpatrick et al., *Nature* 2017)、これら疾患の原因がアミロイド線維であるタンパク質構造の蓄積が主要な原因であることは疑いようがないが、未だ発症機構は未解明であり、機序に基づいた合理的な治療法はない。超高齢化社会を迎える我が国において、AD 発症の遅延、緩和、治療法の確立は急務である。

1-2 生命の生存戦略として、アミロイド線維のような構造異常タンパク質の蓄積を防ぐため種間をこえてシャペロンが高く保存されてきた(Balchin, et al., *Science* 2016)。シャペロンによるタンパク質品質管理機構はタンパク質の立体構造形成すなわちフォールディングを厳密に制御するが、老化や遺伝子変異に伴うシャペロン発現の低下がタンパク質品質管理能の低下を引き起こしミスフォールディングが惹起されるため、シャペロンは変性疾患の治療・予防における新たな作用点として注目される(Hipp et al., *Trends Cell Biol.* 2014)。特に、AD 患者から、小胞体内に局在する 20 種類以上ものシャペロン群 Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリーへの異常な化学修飾、変異挿入が見つかっており(Matsusaki et al., *BBA Gen subj* 2020) (図 1)、化学修飾による PDI の失活が AD 疾患の起点となる仮説も提唱されているが(Uehara et al., *Nature* 2006)、 PDI に限られた検証であり、実用や他の変性疾患への応用はない。

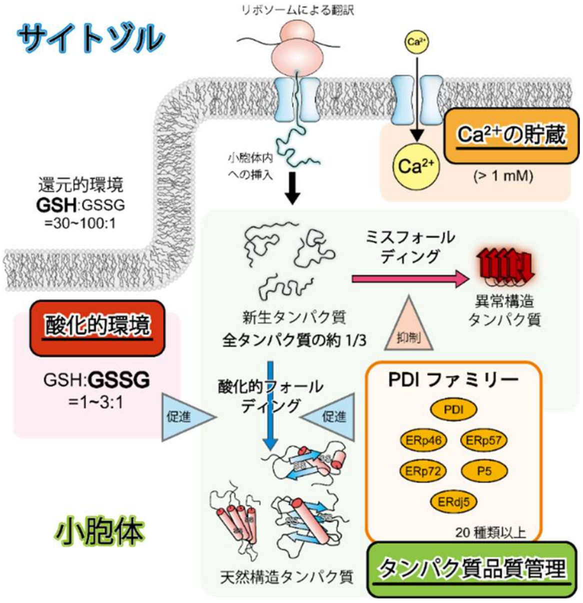

図 1: 小胞体内のタンパク質品質管理機構の破綻が神経変性疾患を引き起こす

1-3 本申請者は、小胞体内 20 種類以上ものシャペロン群 PDI ファミリーに着眼し、個々の PDI ファミリーの新規構造情報を世界に先駆けて発表することで(Okumura et al., ***Nature Chem Biol.*** 2019; Okumura et al., ***Structure*** 2021)、小胞体内シャペロンネットワークの理解を深める基礎知見を集積した(図 1) (Okumura et al., *Curr Opin Stru Biol* 2021; Okumura et al., *Free Radic Biol Med* 2015)。そこで本課題で、PDI ファミリーの中から Aβなどアミロイド線維形成を低減する因子を見出すことを目的とする。

そのため、*in vitro* スクリーニング法を樹立し、AD 疾患治療候補シャペロンを絞り込む。またアミロイド原生タンパク質と PDI ファミリー間複合体構造解析によるメカニズムを解明する。

２．研究方法と経過

2-1 AD 疾患治療候補シャペロンを絞り込むため、*in vitro* スクリーニング法の樹立を行った。その方法として、Aβ40、Aβ42、インスリンのアミロイド線維形成について、アミロイド線維を検出可能なチオフラビン T(ThT)を用いた蛍光測定、原子間力顕微鏡(AFM)や透過型電子顕微鏡(TEM)観察、円偏光二色性(CD)スペクトル、ラマン分光測定によって *in vitro* スクリーニング法を樹立した。現在までに、保有する 12 種類の PDI ファミリーのうち、5 種類まで検証を終えている。また、予想しない結果として、PDI ファミリーひとつ PDIA6 の相分離という現象が、Aβ40 とインスリンのアミロイド線維形成を強く抑制することを発見し、この相分離現象のメカニズム解明を 2-2 で進めた。

2-2 アミロイド原生タンパク質と PDI ファミリー間複合体構造解析によるメカニズムの探求を目指した。PDI ファミリーがどの部位のどのような相互作用でアミロイド原性タンパク質のどの部位を認識しているかを原子レベルで明らかにするため、手法として、安定同位体ラベルした PDI ファミリーあるいはアミロイド原性タンパク質の二次元 NMR 解析を採用する。2-1 で発見した PDI ファミリーのひとつ PDIA6 の相分離因子に焦点を当て、PDIA6 の 450 残基におよぶアミノ酸の帰属に成功した。さらに相分離に重要な構造部位の特定に至った。また、クライオ電顕の手法を採用し、シャペロンと Aβ40, Aβ42 との複合体構造解析を目指した。別財源で設置した Vitrobot を用いて、現在試料作成条件の最適化の検討中である。

３．研究の成果

3-1 PDI ファミリーひとつ PDIA6 の相分離が Aβ40 のアミロイド線維形成を強く抑制することを発見した。これは、本課題で樹立した *in vitro* スクリーニング法から新たに見出されたシャペロンの新機能である。この PDIA6 への基質取込に対する各論を担保するため、Aβ40 以外にインスリンを用いたところ、蛍光標識したインスリンが PDIA6 の相分離に取り込まれていることを蛍光顕微鏡から明らかにした。またインスリンのアミロイド線維形成も強く抑制することをわかった(図 2)。

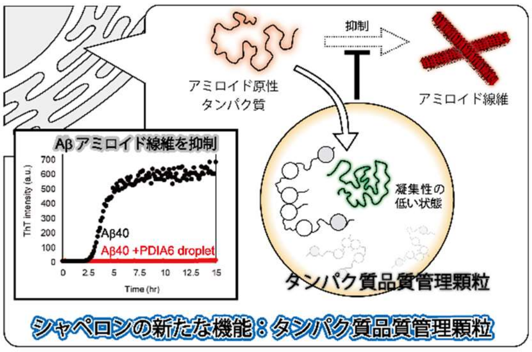

図 2: PDI ファミリーのひとつ PDIA6 が相分離し、Aβ40 のアミロイド線維化を強く抑制する

3-2 PDIA6 の相分離駆動を構造学的に解釈するため、NMR による解析を進めた。本相分離は小胞体に~mM order 存在するカルシウムが駆動するシャペロン相分離である。そこで NMR 測定による構造解析を行った結果、カルシウム結合位置を特定し、P5 が構成される 3 つのドメインのうち、最初と最後のドメインに化学摂動を観測し、カルシウム結合位置を特定した(図 3)。さらに、生化学実験より、天然変性領域を持たない PDIA6 の相分離機構を明らかにするため、液滴形成に必要な最小単位の領域を特定し、最初と最後のドメイン間の相互作用が重要であることを突き止めた(図 4)。ここで、液滴の表面や内部の構造情報を得るため、屈折率を活かしたホロトモグラフィー顕微鏡を用いた。各ドメインを分離し相分離能を位相差顕微鏡やホログラフィック顕微鏡で評価した結果、相分離に不可欠な領域を特定出来た。

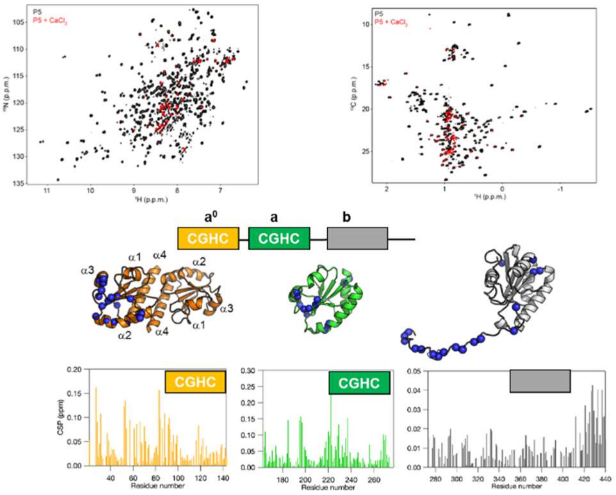

図 3: NMR 解析により、PDIA6 に対する複数のカルシウム結合位置を特定した

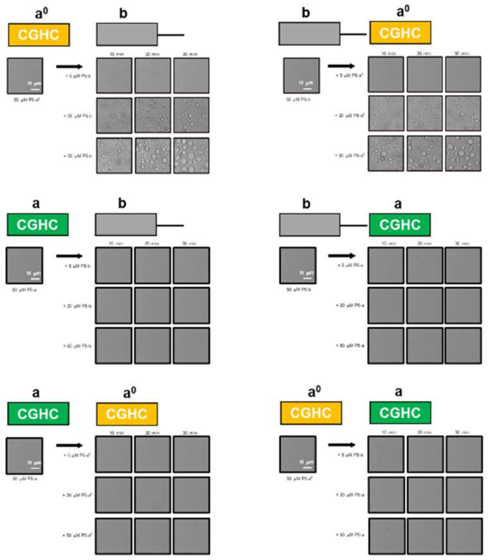

図 4: PDIA6 の各ドメインの組み合わせによる液滴形成の評価

4．今後の課題

本課題で進めた試験管内でのシャペロン相分離によるアミロイド線維化の抑制は、今後細胞内検証へと展開する必要がある。さらに各神経変性疾患モデルマウスへの効果検証にも展開し、将来的にシャペロン相分離を標的にした薬剤開発に繋がる基礎知見を提供する必要がある。

以上本課題の達成は AD の予防・治療に繋がることが期待でき、本課題はその起点となる内容である。本課題で見出したわが国独自の発見：シャペロン相分離によるアミロイド原性タンパク質の構造不良化を抑制するメカニズムをさらに追求する必要がある。従って本課題で取組、得られた成果は、アミロイド線維を抑制するシャペロン相分離を標的とし神経変性疾患の成因解明に至る基礎研究の知見であるが、神経変性疾患の発症メカニズムの理解のふかまりが未だ合理的な治療法がない関連疾患の発症遅延、緩和、治療法の確立に繋がることを考慮すると、その社会的意義は極めて高い。

5．研究成果の公表方法

現在シャペロン相分離の内容はNature姉妹紙に論文審査中であり、今後順次発見したアミロイド線維抑制因子は国際一流紙に投稿する。

以上

Understanding protein homeostasis mechanisms to reduce the risk of Alzheimer's disease

Primary Researcher: Masaki Okumura
Associate Professor, Tohoku University,

This project aims to identify important chaperones to combat Alzheimer's disease (AD), which is facing a super-aging society. The chaperone group Protein Disulfide Isomerase (PDI) family is also known as an endoplasmic reticulum (ER)-localized enzyme, and abnormal chemical modifications and mutation insertions have been found in AD patients. There are more than 20 members of the PDI family in the ER, but their functions is still unknown. Therefore, this project aims to find factors that reduce the risk of the accumulation of protein aggregation from the PDI family, the ER-resident chapeorne.

To this end, our group established an *in vitro* screening method to search for factors that reduce the risk of the accumulation of protein aggregation. In addition, our group tackled to elucidate the mechanism by the structure of the complex between amyloidogenic proteins and the PDI family is determined.

From the *in vitro* screening method established in this project, we discovered that the phase separation of PDIA6, a member of the PDI family, strongly inhibits amyloid fibril formation. This is a newly discovered new function of chaperones. To confirm the specifics of substrate uptake into PDIA6, we next used insulin and detected the substrate uptake by fluorescence microscopy. This results revealed that the dye-labeled insulin is incorporated into the phase separation of PDIA6. We also found that the phase separation of PDIA6 strongly inhibited amyloid fibril formation of insulin.

To interpret the phase separation mechanism of PDIA6 from the viewpoint of structural biology, we further carried out NMR analysis. The phase separation of PDIA6 is driven by calcium, which present in the ER at ~mM order. We identified the calcium binding site, and observed chemical perturbation in the first and last domains of the three domains within PDIA6, and identified the calcium binding site. Furthermore, in order to clarify the phase separation mechanism of PDIA6, which does not have an intrinsically disordered region, we identified the minimum unit domain required for the droplet formation through biochemical experiments. Transient but specific electrostatic interactions occur between the first and last domains to form the droplet. Here, we used a holotomography microscope that takes advantage of the refractive index to obtain structural information inside of the droplet. By separating each domain and evaluating the phase separation ability using a phase contrast microscope and a holographic microscope, we were able to identify the region essential for the phase separation.

The inhibition of amyloid fibril formation by chaperone phase separation needs to be verified intracellularly in the future. It will also need to be verified in model mice of various neurodegenerative diseases.

The results obtained through this project are basic research findings that target chaperone phase separation, which inhibits amyloid fibrils, and lead to elucidation of the causes of neurodegenerative diseases. A deeper understanding of the mechanisms of neurodegenerative diseases will lead to the establishment of treatments.