

提出日:2024 年 5 月 10 日

2023 年度 Bio-SPM 技術共同研究事業

## 研究成果の概要

実験課題名	高速 AFM を用いたアミロイドの脱凝集過程におけるシャペロン動態の観察		
申請者 (実験責任者)	氏名	田中 元雅	
	所属機関名・部局名	理化学研究所 脳神経科学研究センター タンパク質構造疾患研究チーム	
	職名	チームリーダー	
利用した Bio-SPM 技術 (該当の技術の右欄に○)		<input type="checkbox"/>	原子分解能/3D-AFM
		<input checked="" type="checkbox"/>	高速 AFM
		<input type="checkbox"/>	SICM
		<input type="checkbox"/>	細胞測定 AFM
NanoLSI 受入担当教員名	ナノ生命科学研究所 准教授 中山 隆宏		

神経変性疾患では、 $\alpha$ シヌクレインやタウなどの原因タンパク質により形成したアミロイドとよばれる線維上の凝集体が脳組織に蓄積する。アミロイド構造の差異により、アミロイドが脳内に広がる速度、つまり細胞間伝播が異なるため、アミロイドの構造の違いが同疾患の進行や疾患型に深く関与していると示唆されている。細胞内において、アミロイドは細胞内因子の一つである分子シャペロンにより断片化されることで細胞伝播性を得ると示唆されているが、シャペロンがどのようにしてアミロイドを断片化し伝播構造体を産出するのか不明な点が多い。

本研究では、これまで神経変性疾患の研究で用いられてきた酵母プリオン Sup35 を用いて、アミロイドの脱凝集におけるシャペロンの動的構造変化の解明を目的とする。これまで、申請者らは、*in vitro* 再構築系における Sup35 を用いた脱凝集反応を構築し、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)によるアミロイドの脱凝集反応におけるシャペロンの結合の観察を行ってきた(Nakagawa et al., 2022)。しかし、TIRF により観察できる解像度は限られていて、詳細な脱凝集の観察には至っていない。そのため、本研究では、高速原子間力顕微鏡を用いて、高い時空間分解能へ発展させることで、アミロイド結合に伴うシャペロンの動的構造の変化をモニターし、アミロイド脱凝集の詳細なメカニズムを理解する。

これまでに、マイカ表面へのシャペロンの非特異結合が多く、脱凝集実験の再現性が悪い問題があったため、本共同研究では、ストレプトアビジン二次元結晶の脂質二重膜上に、Sup35 アミロイドを固定し、その上にシャペロンタンパク質を添加した。その結果、シャペロンタンパク質のマイカ表面への非特異吸着が抑えられることで、アミロイドの断片化やシャペロンタンパク質の結合と見られる斑点の確認もできた。また、シャペロンタンパク質の結合には、一時的に結合しているものと、長時間滞在している違いもあり、これまで TIRF 実験で得た結果と一致した。今後、更にアミロイドとシャペロンタンパク質の構造を高解像度で観察できる条件を検討することで、これらの構造変化の観察も期待できる。