

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	入江 由美
論文題目	Synthesis and Characterization of Quasi-Stable Toxic Oligomer Models of Amyloid β (準安定なアミロイド β の毒性オリゴマーモデルの合成と機能解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>アルツハイマー病 (AD) の病理学的特徴のひとつである老人斑は、アミロイド β タンパク質 ($A\beta$) の凝集体であり、残基数の違いにより $A\beta_{38}$、$A\beta_{40}$、$A\beta_{42}$ 等数種類の分子種が存在する。これらの中で $A\beta_{40}$ が最も多く存在する一方、$A\beta_{42}$ の凝集性ならびに神経細胞毒性が最も高いことが知られている。近年、$A\beta$ の高分子凝集体 (いわゆるアミロイド線維) よりも、凝集中間体である可溶性オリゴマーが神経細胞に対する毒性を示す本体と考えられている。しかしながら、$A\beta$ の凝集速度は非常に速く、オリゴマーとして長時間存在できないことから、毒性を示すオリゴマーの実態 (すなわち、分子量や立体構造) には不明な点が多い。そのために、化学的に単一かつ長時間安定に存在するオリゴマーモデルを作製することが、より精度の高いオリゴマーの構造解析につながるものと考えられる。</p> <p>入江ら (2016) は、$A\beta_{42}$ の中央部分の $Glu22$ と $Asp23$ でのターン構造 (毒性ターン) を見だし、この毒性ターンと C 末端の疎水性コアを特徴とした 2 量体及び 3 量体のモデルを提唱した。本モデルでは、銅イオンとの反応によって生じた $Tyr10$ のフェノキシラジカルが、$A\beta_{42}$ の中央部分のターン形成により、$Met35$ の硫黄原子を効率的に酸化してカチオンラジカルを発生し、これが C 末端のカルボキシレートアニオンによって安定化されることにより C 末端のコアが生じる。その結果、電荷を失った C 末端のコアは疎水性が高くなって凝集しやすくなり 2 量体及び 3 量体などのオリゴマーが形成される。</p> <p>本論文では、この毒性 2 量体及び 3 量体モデルを実際にそれぞれ複数合成して、それらの構造機能解析を行った。本論文は以下のように要約される。</p> <p>第一章では、アミロイド仮説と $A\beta$ オリゴマー仮説、ならびに $A\beta$ の 2 量体及び 3 量体の AD 病態への関与について説明し、本研究の目的および意義について述べている。</p> <p>第二章では、C 末端の疎水性コアの形成が毒性オリゴマー形成に重要であるというコンセプトのもとに、毒性ターンを形成しやすい E22P 変異体が $Ala30$ あるいは $Gly38$ で架橋された $A\beta_{40}$ の 2 量体モデルとして、E22P-A30DAP-$A\beta_{40}$ dimer (1)、E22P-A30DAZ-$A\beta_{40}$ dimer (2)、E22P-G38DAP-$A\beta_{40}$ dimer (3) を合成した。化合物 1 は、C 末端領域の分子間平行 β-シート構造に関与しない $Ala30$ の位置で L,L-2,6-ジアミノピメリン酸 (DAP) をリンカーとして架橋された 2 量体である。化合物 2 は、$Ala30$ の位置で L,L-2,8-ジアミノアゼライン酸 (DAZ) をリンカーとして架橋された 2 量体である。DAZ は分子間平行 β-シート構造の間隔に近いリンカーである。化合物 3 は、C 末端のコアの中心となる $Gly38$ の位置で DAP をリンカーとして架橋された 2 量体である。これらはいずれも、連続フロー型の合成機 (PioneerTM, Applied</p>			

Biosystems) を用いた Fmoc 固相法により合成した後、C4 ならびに C18 カラムによる HPLC により精製した。合成の際、リンカーは、di-Fmoc-DAP あるいは di-Fmoc-DAZ を、1つのアミノ酸残基として導入した。化合物 **1**~**3** の凝集能はチオフラビン T 法ならびに電子顕微鏡により、凝集度を知るためのオリゴマー解析は ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) により、神経細胞毒性は SH-SY5Y 細胞を用いた MTT 法により、それぞれ評価した。化合物 **1** と **2** は、プロトフィブリルならびにアミロイド線維を形成せず、12 量体以下のオリゴマーとして存在し、神経細胞毒性を示さなかった。一方、**3** は溶解 48 時間後に幅 9 nm 長さ 143 nm のプロトフィブリルを形成し、少なくとも 24 時間 12~24 量体として存在し、強い神経細胞毒性を示した。以上の結果より、A β の毒性発現には C 末端疎水性コアの形成が重要であることと、20 量体程度のオリゴマーサイズが神経細胞毒性に必要であることが示唆された。これらのことから、**3** は準安定な毒性オリゴマーモデルとして有用と考えられた。

第三章では、A β 40 の 3 量体モデルを合成した。3 量体モデルには、2 量体モデルにもう 1 分子の A β 40 が分子間平行 β -シートによって結合したものと、3 分子がプロペラ状に配置したものが考えられる。最近、150 kD の A β 42 オリゴマーの固体 NMR 法による解析により、後者の構造が報告された。そこで、A β 40 3 分子がプロペラ状に配置した 3 量体モデルとして、E22P,L34PtA-A β 40 trimer (**4**)、E22P,V36PtA-A β 40 trimer (**5**)、E22P,G38PtA-A β 40 trimer (**6**) を合成した。化合物 **4**、**5**、**6** は、A β 40 の E22P 変異体が Leu34、Val36、Gly38 の位置でそれぞれ、1,3,5-phenyltris-L-alanine (PtA) をリンカーとして架橋された 3 量体である。これらは、昇温可能な超音波タイプのペプチド合成機 (Initiator+ Alstra, Biotage) を用いた Fmoc 固相法により、架橋位置で tri-Fmoc-PtA を結合させることにより合成した後、C4 ならびに C18 カラムによる HPLC により精製した。化合物 **4** と **5** はプロトフィブリルを形成せず、3~12 量体形成にとどまり、神経細胞毒性を示さなかった。化合物 **6** はプロトフィブリルを形成し、9~21 量体として長時間存在したが、神経細胞毒性は非常に低かった。これらのことから、プロペラ型の 3 量体モデルは、毒性発現に必要な一定の大きさのオリゴマーを形成するものの、同じ位置で架橋した 2 量体モデルと比べて、神経細胞毒性は著しく低いことが明らかになった。

なお、**3** に対応する A β 42 の 2 量体モデル (E22P,V40DAP-A β 42 dimer) が、**3** と同程度の神経細胞毒性を示し、12~24 量体として長時間安定に存在することが、Murakami ら (2016) により報告されている。このことから、A β 40 の E22P 変異体を用いた本研究結果は、A β 42 のオリゴマーモデルに対しても適用できるものと考えられる。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400~1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語500~2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病は、認知症の中で最も多い神経変性疾患である。発見から 100 年以上経た現在でも根本的な治療法は確立されておらず、2025 年の日本においては、高齢者の 5 人に 1 人が認知症患者になるとの予測があり、対策が急務となっている。近年、神経細胞に対して毒性を示す本体は、アミロイド β タンパク質 ($A\beta$) の高分子凝集体ではなく、凝集中間体である可溶性オリゴマーと考えられている。しかし、 $A\beta$ の凝集速度は非常に速く、オリゴマーとして長時間存在できないことから、精度の高い構造解析がなされていない。本論文は、 $A\beta$ の 2 量体及び 3 量体モデルの準安定な等価体を、毒性ターンを形成しやすい E22P- $A\beta$ 40 と各種リンカーを用いてそれぞれ 3 種類ずつ合成し、それらの構造機能解析を行った一連の研究をまとめたものである。評価すべき主要な点は以下の二つに要約される。

1. C 末端の疎水性コアの形成が毒性オリゴマー形成に重要であるというコンセプトのもとに、Ala30 あるいは Gly38 で架橋された 3 種類の E22P- $A\beta$ 40 の 2 量体モデル (1~3) を合成した。これらのうち、C 末端コアの中心となる Gly38 の位置で L,L-2,6-ジアミノピメリン酸 (DAP) をリンカーとして架橋された 2 量体である 3 は 12~24 量体として 24 時間以上存在し、プロトフィブリルを形成して、強い神経細胞毒性を示した。化合物 1 と 2 はプロトフィブリルならびにアミロイド線維を形成せず、12 量体以下のオリゴマーの形成にとどまり、神経細胞毒性を示さなかった。
2. 1,3,5-Phenyltris-L-alanine をリンカーとして E22P- $A\beta$ 40 が Leu34、Val36 あるいは Gly38 の位置でそれぞれ架橋されることにより、3 分子がプロペラ状に配置した 3 種類の E22P- $A\beta$ 40 の 3 量体モデル (4~6) を合成した。化合物 6 はプロトフィブリルならびにアミロイド線維を形成したが、4 と 5 は形成しなかった。化合物 6 は 9~21 量体として 24 時間以上存在したが、4 と 5 は 3~12 量体形成にとどまった。化合物 4~6 はいずれも、神経細胞毒性をほとんど示さなかった。

以上のように、本論文は、化学的に単一かつ長時間安定に存在するオリゴマーモデルである 2 量体と 3 量体モデル作製し、 $A\beta$ の C 末端における疎水性コアの形成が安定なオリゴマーを形成する上で不可欠であること、ならびに分子間平行 β -シート構造からなる 2 量体モデルが、プロペラ型の 3 量体モデルよりも毒性オリゴマーを形成しやすいことを明らかにしたものであり、生命有機化学、ペプチド化学、質量分析学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 2 年 2 月 7 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表するこ

とに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）