

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)

入江 由美

京都大学 大学院農学研究科
食品生物科学専攻 生命有機化学分野

1. 序 論

アルツハイマー病 (AD) は、認知症の中で最も多い神経変性疾患である。Alois Alzheimer による発見から 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 年に団塊の世代が 75 歳を迎える日本においては、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、その対策が急務の課題となっている。

AD の病理学的特徴の一つである老人斑は、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 $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ など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。近年、 $A\beta$ の高分子凝集体 (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 (分子量, 立体構造) には不明な点が多い¹⁾。そのため、化学的に単一で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。

指導教授の入江らはこれまでに、 $A\beta_{42}$ の系統的なプロリン置換法、固体の核磁気共鳴法 (NMR)、電子スピン共鳴 (ESR) 法による解析から、中央部分 (Glu22, Asp23) でのターン構造 (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 量体モデルを提唱している²⁾(**図 1**)。中央部分のターン形成により、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、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 末端のカルボキシラートアニオンによって安定化されるというものである。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 (毒性配座理論)。本研究では、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。

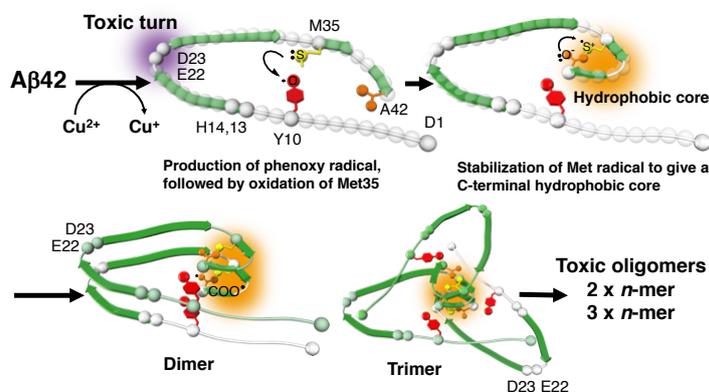


図 1 $A\beta_{42}$ のラジカル化を介するオリゴマー形成機構と 2 量体及び 3 量体モデルの構造。²⁾

2. Aβ40 の準安定な 2 量体モデルの合成と機能解析³⁾

これまで、凝集性が比較的低く、合成が容易な Aβ40 を用いた 2 量体モデルが複数報告されている⁴⁾。これらの多くは、ランダム構造をとる Aβ の N 末端領域において共有結合で架橋したものであるが、いずれの 2 量体モデルも凝集性が高く安定なアミロイド線維を形成する。2 量体モデルにおいて、C 末端の疎水性相互作用が重要と考えられることから、C 末端領域の分子間平行 β-シート構造に関与しない Ala30、あるいは C 末端疎水性コアの中心となる Gly38 の 2 箇所それぞれ架橋した 2 量体モデル (1~3) の合成を計画した (図 2 A, B)。リンカーは、L,L-2,6-ジアミノピメリン酸 (DAP) と L,L-2,8-ジアミノアゼライン酸 (DAZ) を選択した。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。なお Aβ40 として、毒性ターンを形成しやすい E22P 変異体を用いた。

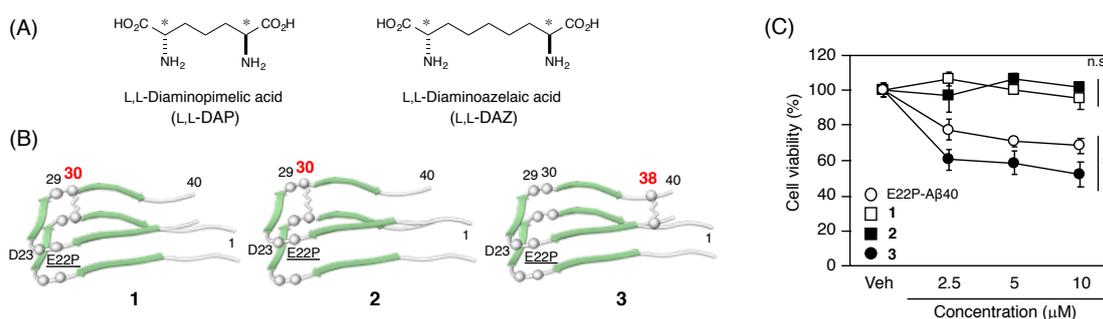


図 2 (A) 2 量体リンカーの構造. (B) 2 量体モデルの構造. (C) SH-SY5Y 細胞に対する神経細胞毒性. (16 h 後, * $p < 0.05$, n.s.: not significant)

2 量体モデル (1~3) は、連続フロー型 of 合成機 (PioneerTM, Applied Biosystems) を用いた Fmoc 固相法により合成した。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それぞれ導入した。得られた 2 量体モデルの 2 次構造は円二色性 (CD) スペクトルで、凝集能はチオフラビン T (Th-T) 法ならびに電子顕微鏡で、神経細胞毒性は SH-SY5Y 細胞を用いた MTT 法でそれぞれ評価した。2 量体 2 及び 3 の β-シート含量は、1 よりも顕著に高かったが、Ala30 での架橋体 (1, 2) はいずれも神経細胞毒性を示さなかった (図 2 C)。

一方、Gly38 での架橋体 (3) は、E22P-Aβ40 (単量体) と比べて強い毒性を示した。溶解 48 時間後、3 は幅 9 nm 長さ 143 nm のプロトフィブリルを

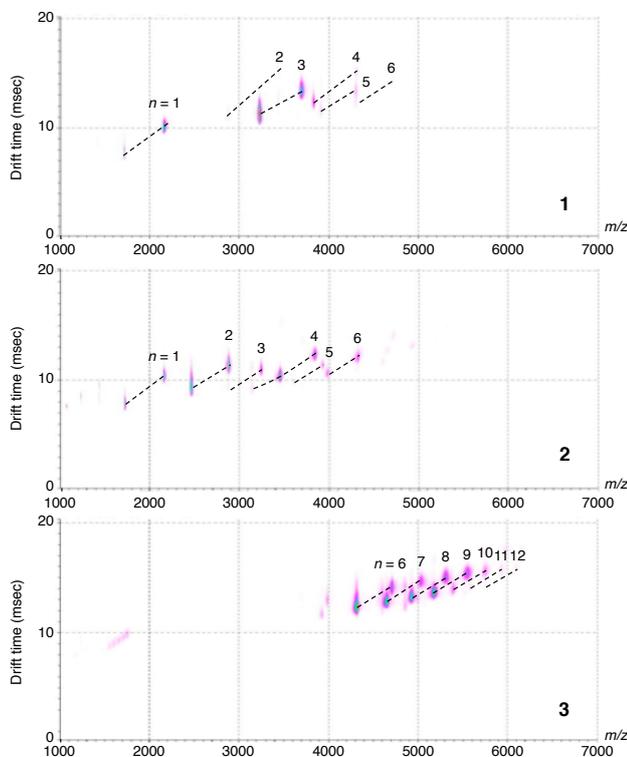


図 3 2 量体モデルの IM-MS 法によるオリゴマー解析 (4 h 後). n = number of each dimer.

形成し、さらに ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) による解析から、12~24 量体として存在していることが明らかになった (図 3)。毒性を示さなかった **1** 及び **2** は、2~12 量体の形成に留まった。以上の結果より、A β の毒性発現には C 末端コア形成が重要であること、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。2 量体 **3** は少なくとも 24 時間、12~24 量体として存在したことから、準安定な毒性オリゴマーモデルとして有用である。

3. A β 40 の準安定な 3 量体モデルの合成と機能解析⁵⁾

A β オリゴマーの最小基本単位は 2 及び 3 量体であるが、3 量体の方が高いシナプス毒性を示すとの報告もある。これまで、A β フラグメントの 3 量体モデルの報告は複数あるが、全長 A β の 3 量体モデルの報告はない。3 量体モデルには、2 量体モデル (**1**~**3**) 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⁶⁾により、後者の構造が報告されている (図 4 A (i))。

そこで、1,3,5-phenyltris-L-alanine (PtA) をリンカーとして、Leu34, Val36, Gly38 の位置でそれぞれ架橋した 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 (図 4 B)。120 残基にも及ぶこれらのペプチドの合成は、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行い、C4 ならびに C18 カラムによる HPLC 精製を経て目的物を得ることに成功した。なお 3 量体モデルは、連続フロー型の合成機 (PioneerTM, Applied Biosystems) では合成できなかったが、昇温可能な超音波タイプのペプチド合成機 (Initiator+Alstra, Biotage) を用いることにより達成された。

これら 3 量体モデル (**4**~**6**) の神経細胞毒性を MTT 試験により調べたところ、いずれも 2 量体モデル (**3**) と比べてほとんど毒性を示さなかった (図 5 A)。次に、凝集能を Th-T 法ならびに電子顕微鏡で調べ

たところ、単量体 (E22P-A β 40) と **6** はアミロイド線維を形成したのに対して、**4** 及び **5** はアミロイド線維を形成しなかった。さらに IM-MS 解析を行ったところ、12~24 量体を形成した 2 量体 (**3**) と同様に、Gly38 の位置で架橋した **6** が、9~21 量体として長時間存在することが判明した (図 5 B)。一方、**4** 及び **5** は 3~12 量体に留まり、それ以上の凝集体を形成しなかった。以上の結果より、Huang ら⁶⁾ が報告している 150 kD の A β 42 オリゴマー中に存在するプロペラ型の 3 量体に基づいて設計した 3 量体モデル (**6**) は、9~21 量体の比較的大きなオリゴマーを形成するが、

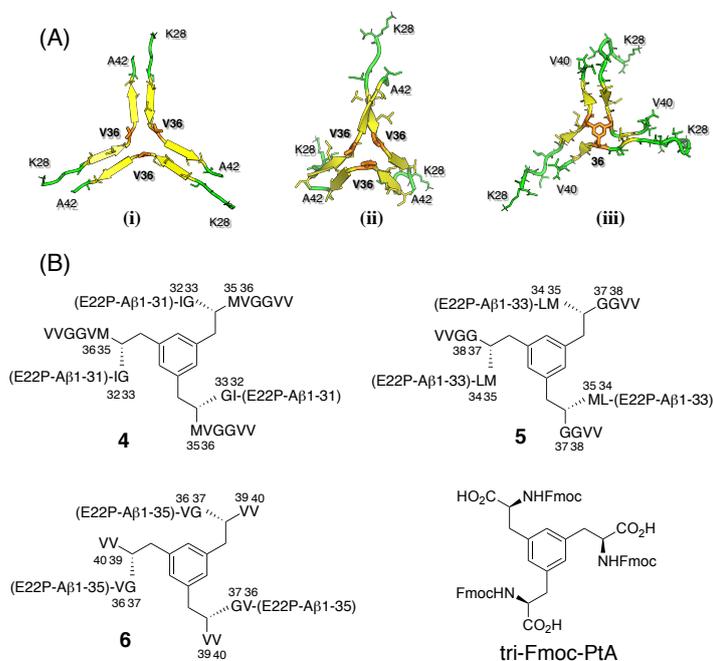


図 4 (A) 3 量体モデルの構造 (K28-A42 領域) (i) Huang ら⁶⁾ のモデル; (ii) 分子動力学シミュレーションによる構造最適化; (iii) 3 量体リンカー (PtA) を V36 で結合させた構造モデル. (B) 3 量体モデル (**4**~**6**) の全長構造と tri-Fmoc-PtA の構造.

同じ位置で架橋した 2 量体モデル (3) 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。また、架橋位置が C 末端に近いほど、2 量体モデルと同様に分子量の大きいオリゴマーを形成し、神経細胞毒性を示す傾向があることも判明した。

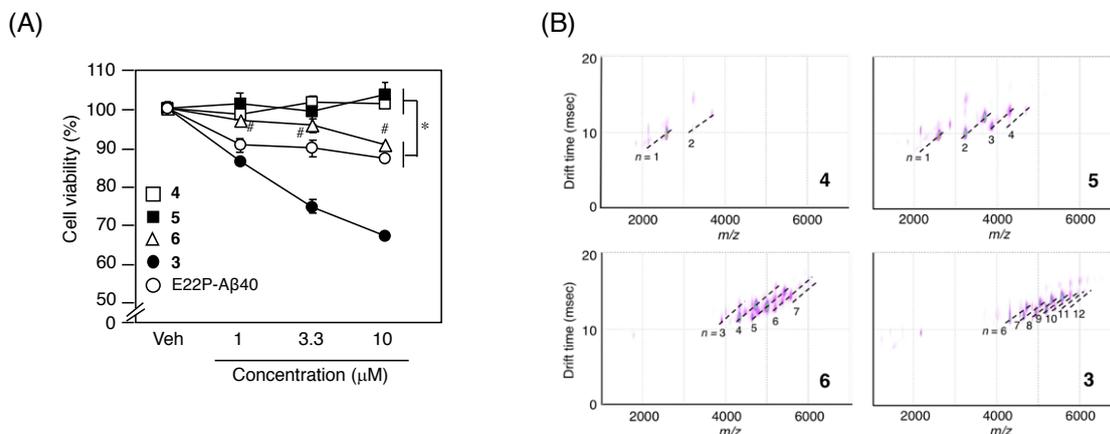


図 5 3 量体モデルの (A) SH-SY5Y 細胞に対する神経細胞毒性 (16 h 後) * $p < 0.05$, # $p < 0.05$ versus vehicle (B) IM-MS 法によるオリゴマー解析 (4 h 後). n = number of each trimer.

4. 結 語

本研究では、入江らが提唱した A β 42 の 2 量体及び 3 量体モデル²⁾ の等価体を、E22P-A β 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。C 末端領域で架橋した A β 40 の 2 量体モデル、ならびに全長 A β 40 を用いた 3 量体モデルの合成は初めてである。その結果、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、また、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が明らかになった。なお、今回合成した 2 量体モデル (3) に対応する A β 42 の 2 量体モデル (E22P,V40DAP-A β 42 dimer) も同等の神経細胞毒性を示し⁷⁾、12~24 量体として長時間安定に存在した。したがって、E22P-A β 40 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。

5. 引用文献

- 1) Benilova, I. *et al.*, *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 349-357.
- 2) Irie, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2020**, *84*, 1-16; 入江一浩, *化学* **2016**, *71* (11), 41-44.
- 3) Irie, Y. *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 807-816.
- 4) For example, Kok, W. M. *et al.*, *Chem. Commun.* **2009**, 6228-6230; O’Nuallain, B. *et al.*, *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 14411-14419.
- 5) Irie, Y. *et al.*, *Chem. Commun.*, **2019**, *55*, 182-185.
- 6) Huang, D. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2319-2328.
- 7) Murakami, K. *et al.*, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29038.