

Structure–Function Analysis of Conformationally Fixed Analogs of Amyloid β 42 and Development of Antibodies against the Toxic Conformer

(アミロイド β 42 の毒性配座固定誘導体の構造–機能解析と抗毒性配座特異抗体の開発)

松島 由佳

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

アルツハイマー型認知症 (AD) は認知症全体の半分以上を占める神経変性疾患である。AD は、脳内にアミロイド β ($A\beta$) タンパク質が凝集・蓄積した老人斑の形成を特徴としている。近年、複数の抗 $A\beta$ 抗体薬が脳内の $A\beta$ 凝集体を除去することにより、認知機能低下の遅延に成功している。 $A\beta$ の凝集過程で生成する準安定なオリゴマーがシナプスや細胞を障害すると考えられており、特に 42 残基の $A\beta$ 42 が高い凝集性と細胞毒性を示すことが知られている。しかしながら、毒性を示す $A\beta$ 42 オリゴマーの構造やその作用機序には不明な点が多い。入江らは系統的なプロリン置換や固体 NMR 法などを用いて、 $A\beta$ 42 が Glu22 および Asp23 におけるターン構造 (毒性ターン) を特徴とする毒性配座をとることによって、きわめて高い凝集性と細胞毒性を示すことを明らかにした¹⁾。毒性ターン構造が形成されると、金属イオン存在下で生じた Tyr10 のフェノキシラジカルが Met35 の硫黄原子を酸化して硫黄ラジカルカチオンを生成し、これが C 末端の分子内 β シート構造によって安定化されることで、疎水性の高い C 末端コアが形成されて凝集が促進すると考えられている¹⁾ (図 1)。

毒性配座をとりやすい E22P- $A\beta$ 9–35 をハプテンとして開発された 24B3 抗体を用いた複数の研究により、毒性配座をもつ $A\beta$ の $A\beta$ 42 に対する比率が AD 発症を予測するバイオマーカーになりうることが示唆されている¹⁾。一方でプロリン置換は、野生型 $A\beta$ の毒性配座に対する抗体の反応性に影響を与える可能性があるため、毒性配座を標的として AD の診断・治療に用いるには、毒性ターン部分に野生型の配列を保持した毒性配座固定 $A\beta$ アナログを抗原とするのが望ましい。本研究では、野生型 $A\beta$ 42 の毒性配座に対する反応性の高い抗体の開発を目的として、毒性ターン部分の配列を野生型に保持したまま分子内ジスルフィド結合により架橋した各種配座固定 $A\beta$ 42 誘導体を合成した。

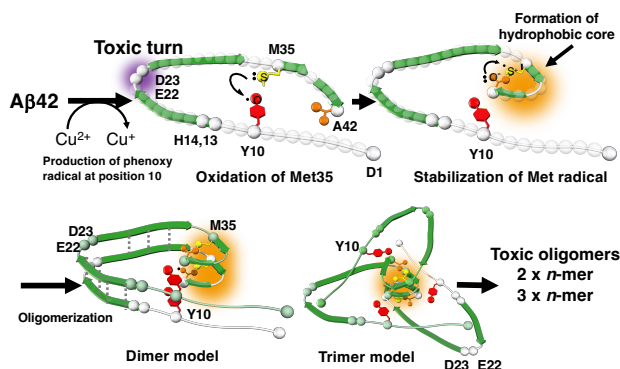


図 1 $A\beta$ 42 の毒性配座理論¹⁾。

2. 分子内ジスルフィド架橋による Aβ42 配座固定アナログの合成と活性評価^{2,3)}

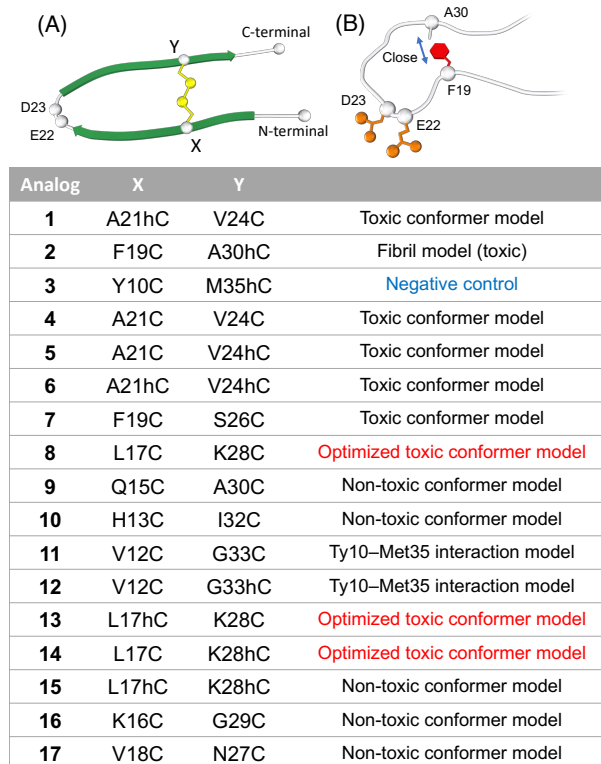


図 2 (A) 各種配座固定アナログ^{2,3)} と (B) 固体 NMR 法による Aβ42 凝集体の構造解析⁷⁾.

た⁷⁾(図 2B). さらに毒性配座において近接する Tyr10 と Met35 の位置で架橋した **3** と、その近傍で架橋した **11** および **12** を合成した. これらの架橋体について凝集性とヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y に対する毒性を評価したところ、ターン構造を強固に固定した **1** が最も高い凝集性と細胞毒性を示した. Wälti らのフィブリル構造⁷⁾を模した **2** は凝集速度が遅く細胞毒性もやや低かったが、透過型電子顕微鏡下で野生型と同様のフィブリルの形成が観察された. 凝集過程において重要と考えられる残基同士またはその近傍で架橋した **3**, **11**, **12** はいずれも凝集性、神経細胞毒性ともに極めて低かった.

22 位, 23 位でのターン構造の固定により毒性が保持されたことから、この 2 残基を中心として系統的にジスルフィド架橋したアナログ **7–10** を合成した. その結果、17 位と 28 位で架橋した **8** が野生型 Aβ42 よりも顕著に高い凝集性と神経細胞毒性を示した. そこで、架橋長を最適化するため 17 位と 28 位における Cys と hCys の組み合わせの異なる架橋体 **8**, **13–15** を合成し活性を比較したところ、最も架橋長の長い hCys 同士で架橋した **15** を除く **8**, **13**, **14** がほぼ同等の高い凝集性 (図 3A) と神経細胞毒性を示した. これらの配座固定アナログはマクローファージ (ミクログリア) のモデルである THP-1 細胞に対して、10 nM という低濃度で細胞毒性を示した (図 3B).

Aβ オリゴマーはシナプス機能を障害することが知られていることから、シナプス可塑性のモデルである長期増強 (LTP) に対するアナログ **8**, **9**, **12**, **15** の影響を評価した. その結果、**8** および **12** は 20 nM で顕著に LTP を抑制した一方で、**9** および **15** はほとんど抑制しなかった. 高い凝集性と細胞毒性を示す **8** とともに、いずれの活性もほとんど

分子内ジスルフィド架橋による Aβ の構造–機能解析は、複数のグループにより報告されているが^{4–6)}、毒性ターン構造の固定を目的として系統的に分子内ジスルフィド架橋を行った例はなかった. 本研究では Aβ42 の 2 残基をシステイン (Cys) またはホモシステイン (hCys) に置換したペプチドを Fmoc 固相合成法により調製し、ジメチルスルホキシドを用いた酸化反応により分子内ジスルフィド結合を形成させた (図 2A). まず 22 位, 23 位でのターン構造を強固に固定することを目的として隣接する 21 位と 24 位で架橋した **1** を合成した. 一方、2015–2016 年にかけて 3 つの研究グループから報告された Aβ42 のフィブリル構造の解析結果は、いずれも 22 位, 23 位においてターン構造をとっていた. そこで Wälti らによる構造解析結果において近接していた 19 位と 30 位を架橋した **2** を合成した

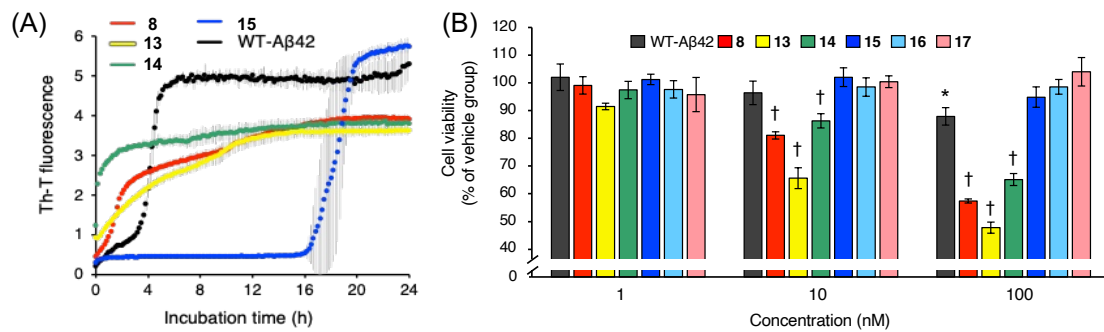


図3 各種配座固定アナログの (A) 凝集性 (Th-T 試験) と (B) THP-1 細胞に対する毒性.

示さない **12** がシナプス毒性を示したことは、細胞毒性とシナプス毒性に対して寄与する立体構造またはオリゴマーサイズが異なることを示唆している。

3. 毒性配座固定アナログに対する抗体の作製と機能解析

毒性ターン部分に野生型の配列をもつ新規毒性配座固定アナログである **8**, **13**, **14** を抗原として抗体を作製した. その結果, **8** を抗原として得られた抗体の中からアナログ **8**, **13**, **14** に対して結合選択性を示すモノクローナル抗体 TxCo-1 が得られた (図 4A). これら以外の各種配座固定アナログに対する選択性についても enzyme immunoassay (EIA) により評価したところ, TxCo-1 は凝集性・細胞毒性を示さないがシナプス毒性を示す **12** に対しても比較的高い結合能を示した. 一方で, TxCo-1 は既存の抗毒性配座抗体 24B3 が結合する毒性配座固定アナログ E22P-Aβ42 には結合しなかった.

TxCo-1 が認識する立体構造を明らかにするため, TxCo-1 の Fab 領域と L17C,K28C-SS-Aβ10-30 との複合体に対する中性条件下での X 線結晶構造解析を実施した. その結果, TxCo-1 は Glu22 を含む Gln15-Val24 の領域を認識することが判明した (図 4B). Aβ の Glu22 側鎖と TxCo-1 Fab の Tyr98 側鎖との間で水素結合の存在が推定されたことから, TxCo-1 が E22P-Aβ42 に反応性を示さない一因として Glu22 のプロリン置換である可能性が考えられる. また TxCo-1 は, EIA では野生型 Aβ に対してほとんど結合しなかった一方で, AD 患者剖検脳の免疫組織化学的染色において Aβ 凝集体を顕著に染色したことから, TxCo-1 は AD 患者脳に蓄積した Aβ 凝集体中の毒性配座を認識する新規抗体であることが示唆された⁸⁾.

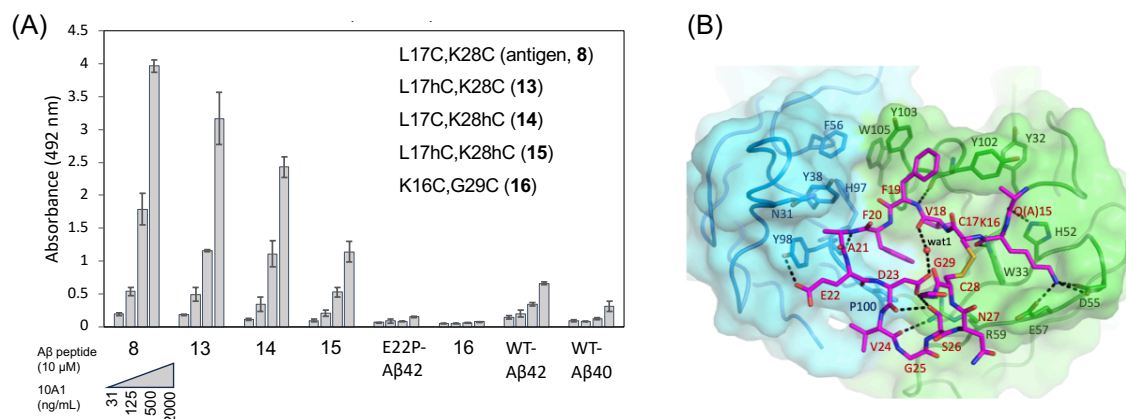


図4 (A) EIA による TxCo-1 に対する各種配座固定アナログの反応性の解析.
(B) TxCo-1 Fab と L17C,K28C-SS-Aβ10-30 との複合体の X 線結晶構造解析.

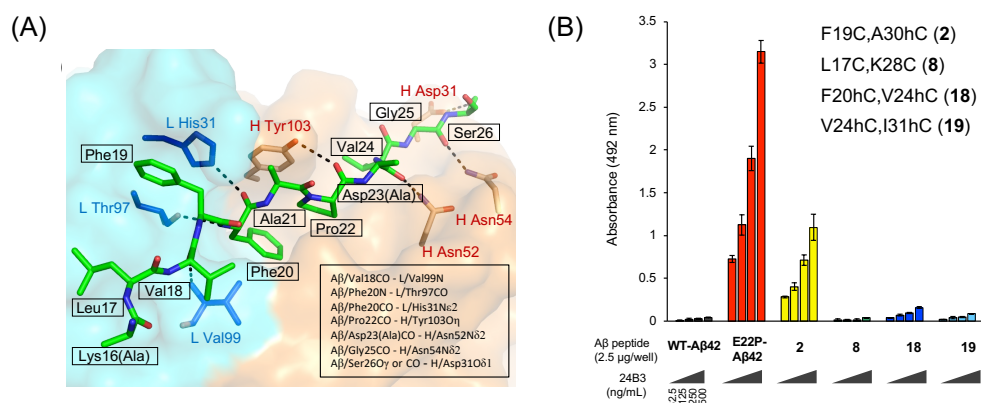


図 5 (A) 24B3 Fab と E22P-Aβ11-34 との複合体の X 線結晶構造解析.
(B) EIA による 24B3 に対する各種配座固定アナログの反応性の解析.

4. 各種配座固定 Aβ 誘導体に対する抗毒性配座抗体 24B3 の反応性の解析⁹⁾

毒性ターンをとりやすい E22P-Aβ を抗原として開発された 24B3 抗体は、E22P-Aβ42 に高い反応性を示し、脳脊髄液を用いた複数の研究で AD 診断に有用であることが示唆されているが、24B3 が認識する Aβ オリゴマー中の立体構造は不明であった。そこでまず、24B3 の Fab 領域と E22P-Aβ11-34 との複合体に対する X 線結晶構造解析を実施した結果、24B3 は毒性ターンを構成する 22 位、23 位を含む領域に結合することが明らかになった (図 5A)。さらに、24B3 が認識する野生型 Aβ42 の立体構造を明らかにするため、24B3 が結合する配座固定 Aβ 誘導体のスクリーニングを実施した。その結果、24B3 は TxCo-1 の抗原ペプチドである **8** ではなく、Aβ42 のフィブリル構造⁷⁾を模した **2** に対して選択的に結合した (図 5B)。このフィブリル構造において 22 位、23 位がターン構造を形成していたことを考慮すると、24B3 は野生型 Aβ42 の毒性配座の一部を認識している可能性が高い。一方で、24B3 と TxCo-1 とでは認識する Aβ の毒性配座の部位が異なることも明らかになった。

5. 結 語

本研究では、野生型 Aβ42 の毒性ターン構造を選択的に認識する抗体の開発を目的として、Aβ42 の様々な位置で分子内ジスルフィド架橋を形成させることにより、毒性ターン部分の配列を野生型に保持した各種配座固定 Aβ42 誘導体の合成を試みた。その結果、17 位と 28 位を Cys 同士、または Cys と hCys の組み合わせで置換してジスルフィド架橋したアナログ **8, 13, 14** が、野生型 Aβ42 よりも顕著に高い凝集性と細胞毒性を示すことが明らかになった。これらのうち **8** を抗原として得られた抗体 TxCo-1 が、**8, 13, 14** に対して選択的に結合した。抗原ペプチドフラグメントとの X 線共結晶構造解析において、TxCo-1 は Glu22 を中心とする緩やかなターン構造を認識することが判明し、AD 患者剖検脳のアミロイド凝集体を選択的に染色した⁸⁾。これより本抗体は、Aβ 凝集体中の毒性配座を認識する新規抗体であり、ヒト脳組織中に存在する毒性 Aβ 凝集体の研究に役立つものである。一方で、既存の抗毒性配座抗体である 24B3 抗体は、抗原ペプチドとの X 線共結晶構造解析では TxCo-1 と同様に 22 位を中心とした領域を認識していることが示されたものの **8** には結合せず、Aβ42 フィブリル構造を模した **2** に選択

的に結合したことから、TxCo-1 とは認識する毒性配座の部位が異なることが明らかとなった。以上より、分子内ジスルフィド結合による A β 42 の系統的な配座固定は、A β 42 の構造–機能解析ならびに毒性立体構造に特異的な抗体の作製において有用であることが示された。

引用文献

- 1) Irie, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2020**, *84*, 1–16.
- 2) Matsushima, Y. *et al.*, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 4118–4121.
- 3) Matsushima, Y. *et al.*, *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202200029.
- 4) Shivaprasad, S. *et al.*, *Biochemistry* **2004**, *43*, 15310–15317.
- 5) Sandberg, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 15595–15600.
- 6) Lendel, C. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12756–12760.
- 7) Wälti, M. A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, E4976–4984.
- 8) Kageyama, Y. *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* **2021**, *12*, 3418–3432.
- 9) Irie, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *621*, 162–167.