

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	内野 歩美
論文題目	Synthesis and structure-function analyses of propeller- and parallel-type trimer models of amyloid β 40 (アミロイド β 40のプロペラ型および平行型3量体モデルの合成と構造機能解析)		
(論文内容の要旨)			
アルツハイマー病（AD）の病理学的特徴である脳内の老人斑は、アミロイド β ($A\beta$) タンパク質が高度に凝集することによって形成される。$A\beta$ は主として 40 または 42 残基のアミノ酸から構成される ($A\beta$40、$A\beta$42)。$A\beta$ の凝集中間体（オリゴマー）が毒性本体であるとの仮説が近年支持されているが、オリゴマーは準安定であり、他の凝集体との平衡状態にあることから、その毒性構造には不明な点が多い。所属研究室では $A\beta$42 の系統的なプロリン置換法、固体の核磁気共鳴（ss-NMR）法、電子スピン共鳴法などを用いた解析から、22、23 位でのターン構造（毒性ターン）と C 末端の疎水性コアが毒性発現に重要であることを提唱している。 本論文は、$A\beta$ オリゴマーの最小構成単位のひとつである 3 量体に着目し、毒性発現に関わる構造的特徴（立体配座並びに重合度）を明らかにすることを目的として、凝集体の核となる C 末端領域を各種多価アミノ酸リンカーで架橋した 3 量体モデルを合成・構造機能解析した結果をとりまとめたものである。 第 1 章では、AD の背景、アミロイド仮説、AD の遺伝的要因、現在の治療法、$A\beta$42 における毒性ターン、並びに多価アミノ酸リンカーの合成法に関する先行研究について述べ、本研究の目的および意義について説明している。 第 2 章では、$A\beta$40 の 3 量体構造として、$A\beta$42 オリゴマーの ss-NMR 法による解析に基づいて提唱された 3 回対称のプロペラ型モデルを設計・合成・構造機能解析した結果を述べている。3 回対称のプロペラ型モデルについては所属研究室における過去の研究から、平面性の高い芳香環リンカーによる架橋は、毒性ターンの形成にとって適切でないことが示唆されたため、柔軟性の高いアルキルリンカーによる架橋を計画した。設計した 3 回対称プロペラ型リンカーとなる 3 価性アミノ酸は過去に合成例がなかったため、3-シクロペンテン-1-カルボン酸を出発物質として、Horner-Wadsworth-Emmons 反応と続く加圧不斉水素化反応による α-アミノ酸部位の導入を鍵反応として、14 工程総収率 5.2%で合成した。本リンカーを用いて、毒性ターン構造をとりやすい E22P-$A\beta$40 の 3 量体モデルを、36 位もしくは 38 位を架橋位置として固相合成した。これらを精製後、細胞毒性、凝集性、オリゴマー形成能を評価した結果、36 位で架橋したプロペラ型 3 量体モデルが、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に対して E22P-$A\beta$40 と同程度の毒性を示した。これより先行研究で報告されている 3 回対称のプロペラ型構造が、毒性を示す $A\beta$ オリゴマー構造のひとつであることが示唆された。 第 3 章では、$A\beta$40 の 3 量体構造として、3 分子の $A\beta$ が分子間平行 β-シート形成により会合した平行型モデルを設計・合成・構造機能解析した結果を述べている。平行型 3 量体モデルは所属研究室における 2 量体モデルの研究結果に基づいて架橋位置と			

架橋長を決定した。第2章で合成したプロペラ型リンカーと同様に、設計した平行型リンカーとなる3価性アミノ酸も過去に合成例がなかったため、イソシアノ酢酸 *tert*-ブチルを出発物質として、Horner–Wadsworth–Emmons 反応と、続く加圧不斉水素化反応による α -アミノ酸部位の導入を鍵反応として、架橋長の異なる3種のリンカーを10工程総収率 8.3~20.5%で合成した。これらのリンカーを用いて、架橋位置を38位に固定した E22P-A β 40 の3量体モデル3種（架橋長：炭素2、3、5個分）を固相合成した。これらを精製後、細胞毒性、凝集性、オリゴマー形成能を評価した結果、平行型3量体モデルでは架橋長が短いものほど高い細胞毒性と凝集性を示す傾向があり、これは2量体モデルの研究結果とも矛盾がなかった。架橋長が最短の2炭素原子の3量体モデルについては野生型 A β 40 のモデルも合成したが、その細胞毒性は E22P-A β 40 の3量体モデルと同程度であり、対応する E22P-A β 40 の2量体モデルの細胞毒性には及ばなかった。

第4章では、第2章と第3章から得られる結論を総括して述べており、第5章では、詳細な実験手順について記載されている。

以上のように、本論文では A β 40 の3量体を構成単位とするオリゴマーにおいては、プロペラ型モデルとともに平行型モデルも細胞毒性の発現に寄与する立体配座であることを示した。また、細胞毒性を示した3量体モデルはいずれも、700,000以上の高分子量オリゴマー（プロトフィブリル）を形成した一方で、毒性をほとんど示さなかったモデルはいずれも 50,000~700,000 程度の低分子量オリゴマーに留まった。これより、高分子量オリゴマーを形成できる3量体モデルが細胞毒性の発現において重要であることが明らかになった。

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)

A β の凝集中間体 (オリゴマー) が、アルツハイマー病 (AD) を引き起こす毒性本体であるという仮説が近年支持されているが、オリゴマーは立体構造の異なる他のオリゴマーや単量体、フィブリルへと可逆的に変換されることから、その毒性立体構造は未解明の課題になっている。本論文では、A β の毒性オリゴマーに対する 3 量体の寄与を明らかにすることを目的とし、凝集体の核となる C 末端領域において、芳香環をもたない 3 回対称の 3 価性アミノ酸リンカーで架橋した E22P-A β 40 のプロペラ型 3 量体モデルに加えて、3 分子の E22P-A β 40 が分子間平行 β -シート構造により結合した平行型モデルを設計・合成・構造機能解析した。評価すべき主要な点は以下の 3 つに要約される。

1. これまで報告のなかったアルキル鎖で架橋されたプロペラ型と平行型 3 量体モデルを初めて設計・合成した。これらのモデルでは 3 量体リンカーのアルキル鎖長を変えた分子を合成することが可能であり、これらを合成することによって初めて 3 量体モデルの構造活性相関を厳密に議論することを可能にした。
2. プロペラ型と平行型モデルを比較検討することにより、毒性を発現する 3 量体構造の全容を明らかにした。すなわち、平行型並びにプロペラ型 3 量体モデルはともに A β の毒性オリゴマーに寄与していることが判明した。
3. 細胞毒性を示す 3 量体モデルは、最終的に高分子量オリゴマー (プロトフィブリル) を形成できること、一方で、低分子量オリゴマーに留まる 3 量体モデルは細胞毒性を示さないことを明らかにした。

以上のように、3 分子の E22P-A β 40 が連結したプロペラ型および平行型 3 量体モデルは、A β オリゴマーの毒性立体構造解析およびその細胞毒性評価において有用であることが示された。本結果は、AD 治療薬の開発の基盤となることに加えて、生物有機化学、ペプチド化学、並びに神経化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 7 年 1 月 23 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)