

論文の内容の要旨

論文題目

アミロイド β オリゴマーの安定化を指向したアミロイド β 1-42 誘導体のデザインと合成

山本 将史

【背景・目的】

アルツハイマー病 (AD) は、認知機能の低下を主症状とする神経変性疾患の一つであり、その患者数は年々増加している。AD の病理の一つである老人斑はアミロイド β ペプチド ($A\beta$) が異常に凝集し、その凝集体が蓄積したものである。

様々な凝集体の中で、アミロイド線維よりオリゴマーの方が毒性は強いと考えられている^[1]ことから、毒性本体である $A\beta$ オリゴマーの性質を解析することは AD の原因を解明するために非常に重要である。しかし、 $A\beta$ の凝集混合物の中から毒性本体のオリゴマーを単離しその性質解析することは、オリゴマーが動的に構造変化を起こし、かつ不安定であるため、極めて困難である。そこで、 $A\beta$ の構造をもとに化学修飾する手法により $A\beta$ オリゴマーを安定化し、均一性の高い状態の $A\beta$ オリゴマーを取得することを計画した。

化学修飾によるオリゴマーミミックの安定化は、動的に構造変化を起こすオリゴマーの性質解析に対して有用なアプローチである。しかし、これまでに報告されている化学修飾 $A\beta$ オリゴマーは、いずれもオリゴマーから線維へ凝集状態の変化を起こすことができないものである。本研究では、 $A\beta$ 42 の Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖間の塩橋を共有結合で代替することによって、安定な $A\beta$ 42 オリゴマーを取得することに成功した。さらに、化学的な刺激によってオリゴマーから線維へ変換可能であることを見出した。

【結果・考察】

1. オキシム環化体の設計・合成・性質評価

Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖の塩橋構造は、 $A\beta$ 42 オリゴマーに特徴的に観察されていることが知られている^[2]。そこで、Asp²³ の側鎖のカルボキシル基と Lys²⁸ の側鎖のアミノ基を共有結合で連結することにより、安定な $A\beta$ オリゴマーが取得することができるのではないかと考えた。さらに、可逆的な結合であるオキシム構造を採用することで、リンカーの結合・切断により、オリゴマーと線維の変換が可能になると考え、オキシム誘導体 **2** を設計・合成した。メチオンンを有するネイティブの $A\beta$ 42 誘導体は低溶解性および高い凝集性のため、単離および性質解析が困難であったことから、本研究では $A\beta$ 42 メチオニンスルホキシド体として合成した。

$A\beta$ 42 は、水への低溶解性、高い凝集性のため取り扱いが困難であることから、水への高い溶解性および低凝集性という特長を有する、*O*-アシルイソペプチド構造^[3]を有するオキシム誘導体(**3**)を合成ターゲットとした (図 1)。Fmoc ペプチド固相合成法により得られたオキシム前駆体に対して、Asp²³ の代替として導入したアミノ酸側鎖のアミノアルコール部位の酸化、続く Lys²⁸ の代替として導入したアミノオキシ基を有するアミノ酸側鎖との分子内オキシム化反応を経て **3** を合成した。得られた **3** は中性条件下にて分子内 *O*-to-*N* アシル基転位反応を起こし **2** に変換された。

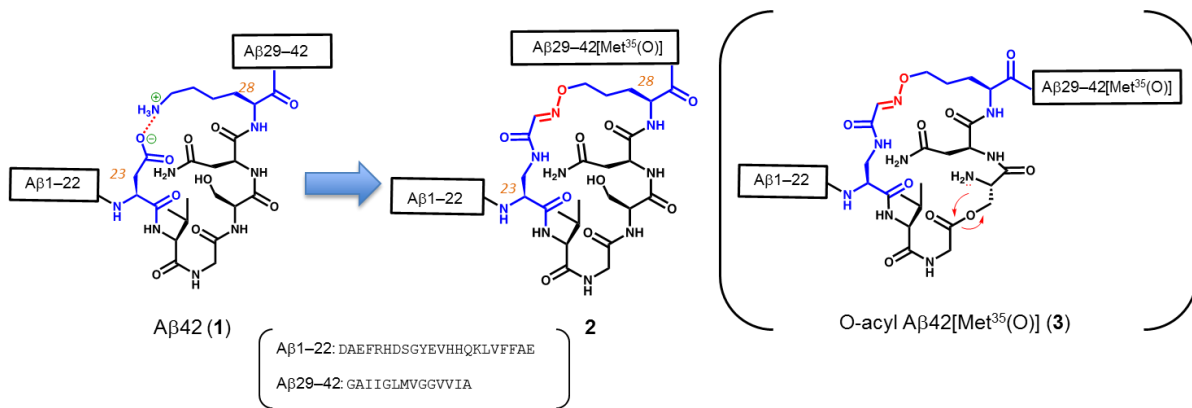


図1 Asp²³-Lys²⁸の塩橋構造を基にしたオキシム環化体の設計

2をAFM解析したところ、インキュベート直後から24時間後まで小さな粒上のオリゴマーが観察されたが、アミロイド特有の線維は観察されなかった(図2a)。また、2のSDS-PAGE解析では、インキュベート直後において低分子量オリゴマーに加え、250 kDa付近にオリゴマーが観察され、72時間後まで維持された。一方、オキシム結合を持たないインタクトな Asp²³と

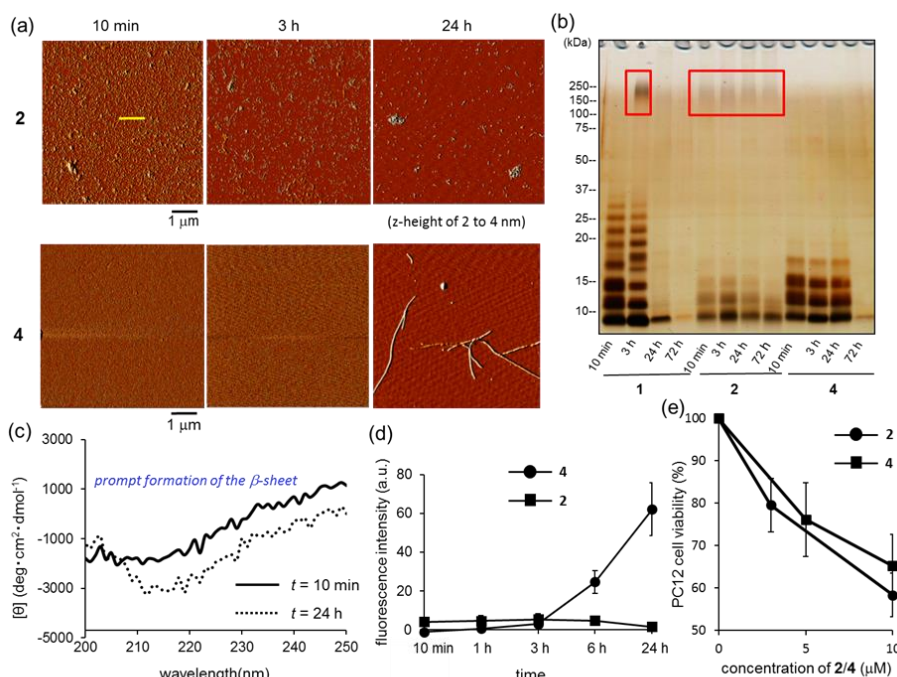


図2 オキシム環化体の性質評価

Lys²⁸である4では低分子量オリゴマーのみ観察され、72時間後では低分子量オリゴマーも観察されず、大きな会合体に凝集し、バンドが消失した(図2b)。本結果は、AFMでの解析結果と一致しており、オキシムリンカーで架橋した2では安定なオリゴマーが速やかに形成され、リンカーを持たない4では低分子量オリゴマーを形成し、急速に大きな凝集体へと成長したことが示唆された。したがって、2でのオリゴマー形成には、Asp²³とLys²⁸の側鎖でのオキシム結合が重要であることが分かった。

2のCDスペクトルによる解析では、インキュベート直後からβ-シート構造の存在を示唆するCDスペクトルを与え、24時間後には典型的なβ-シート構造由来のスペクトルを与えた(図2c)。また、凝集に伴い生成するクロスβ-シート構造を認識して蛍光を放つ、チオフラビンT色素を用いた蛍光強度アッセイにより凝集体のクロスβ-シート量を評価した。その結果、2は比較的小さな蛍光強度を示し、全インキュベート時間においてその蛍光値が維持された(図2d)。アミロイドオリゴマーのチオフラビンT蛍光値は線維と比べ顕著に小さい値をとることが報告されている^[4]ことから、2はアミロイドに特徴的なクロスβ-シート構造を保持している安定オリゴマーと考えられる。

2の神経毒性を検証した結果、濃度依存的に細胞生存率の低下が見られ、2の神経毒性はオキシムリンカーを有さない4とほぼ同程度であったことから、2はアミロイドの神経毒性を保持していると考えられる(図2e)。

続いて、23番目と28番目の側鎖を架橋しているオキシムリンカーを、可逆的なオキシム交換反応によって切断することにより、オリゴマー/線維の変換が可能かについて検討を行った。2のリン酸緩衝溶液に、NH₂OMe塩酸塩を加え、室温にて24時間インキュベートした。その結果、2から5への変換率はNH₂OMeの濃度が大きくなるに伴い上昇し、NH₂OMe 10 mMの反応液をAFMにて解析したところ、線維が観察された。コントロールとして、MeNH₂塩酸塩の水溶液を10 mMの濃度になるように加え、室温にて24時間インキュベートした場合は、2は5へ変換することなく、AFM解析からオリゴマーが主に観察された(図3)。これらの解析より、2は23番目と28番目の側鎖間でオキシム形成しているときはオリゴマー状態をとり、オキシムが開環されると線維へ変換することが示された。

2. ラクトム環化体の設計・合成・性質評価

2が安定なアミロイドオリゴマー状態を維持したことは、Aβの23番目と28番目の側鎖間に存在する塩橋がオリゴマーの形成と安定化に重要な役割を果たしていることを示唆している。2の結果がオキシム構造特有の結果ではないことを検証するために、Aβ42のAsp²³とLys²⁸の側鎖においてラクトム結合した6を合成し、その性質

を評価した。6も、*O*-アシルイソペプチド体^[3]として合成し、中性条件下にて分子内*O*-to-*N*アシル基転位反応により、アッセイの直前にて6を調製して性質評価した(図4a)。

6のAFMでは、インキュベート直後に高分子量オリゴマー/プロトフィブリル状の化学種が観察され、24時間後においても維持された。しかし、6ではアミロイド線維は観察されなかったことから、6のラクトムリンカーがAβ42のオリゴマー形成を促進し、オリゴマーが安定であることが示された(図4b)。6のCDスペクトル解析では、インキュベート直後ではランダムコイルを示すスペクトルを与えたが、3時間後にはβ-シート構造に特徴的なスペクトルを与えた(図4c)。また、チオフラビンT蛍光アッセイからも、6の蛍光値はインキュベート1時間に緩やかに上昇しており、クロスβ-シート構造を取っていることが示唆された。6の蛍光値は全インキュベート時間を通して、変化が比較的少なく、これは、4がラグフェーズ後に蛍光値が大きく上昇する結果とは対照的であった(図4d)。神経毒性について検証した結果、6は4とほぼ同程度の細胞生存率の低下をもたらした(図4e)。

これらの結果から、Aβ42のAsp²³とLys²⁸の側鎖をラクトム結合で閉環した誘導体6は、アミロイドに特徴的なクロスβ-シート構造や神経毒性を有するオリゴマーの形成を促進した。他方、Asp²³とLys²⁸の側鎖をラクトム結合で閉環したAβ40誘導体は、線維の形成を促進することが報告されている^[5]。したがって、Aβ42におけるAsp²³とLys²⁸の塩橋構造は、線維化に至らない安定オリゴマーを速やかに

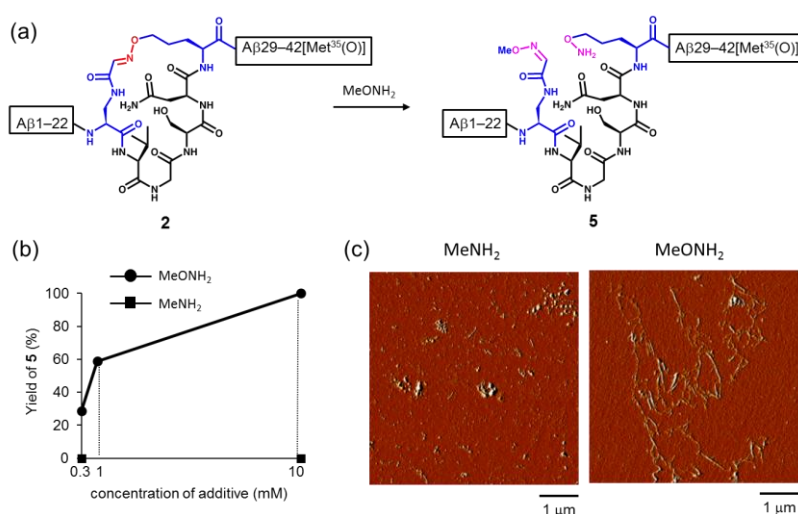


図3 オキシムリンカーの切断

形成するものであり、Asp²³とLys²⁸の塩橋構造はAβ₄₂とAβ₄₀ではその性質が異なることが示唆された。

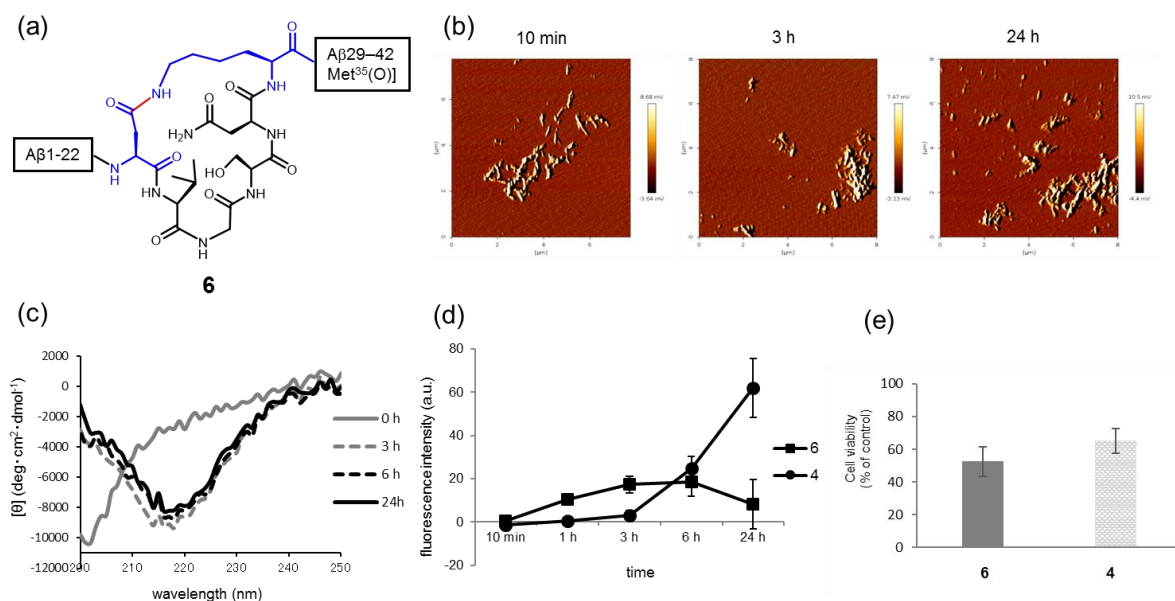


図4 ラクトム環化体の性質評価

【総括】

本研究では、全長 Aβ₄₂ に対し、Asp²³とLys²⁸の側鎖に存在する塩橋構造代替としてオキシム結合を導入することにより、リンカーの開閉によるオリゴマー／線維の化学変換に成功した^[6]。また、塩橋構造をラクトム結合で代替した誘導体も、オリゴマー状態を安定化した^[7]ことから、Aβ₄₂の塩橋は、オリゴマー状態の形成に役割を担っていることが示唆された。このような、凝集状態の化学変換システムやラクトム誘導体での知見が、今後 Aβ の機能研究に活かされることを期待する。

【参考文献】

- [1] (a) Iwatsubo, T.; Odaka, A.; Suzuki, N.; Mizusawa, H.; Nukina, N; Ihara, Y. *Neuron* **1994**, *13*, 45–53; (b) Younkin, S. G. *Ann. Neurol.* **1995**, *37*, 287–288.
- [2] Parthasarathy, S.; Inoue, M.; Xiao, Y.; Matsumura, Y.; Nabeshima, Y.; Hoshi, M.; Ishii, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6480–6483.
- [3] Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5965.
- [4] (a) Roychaudhuri, R.; Lomakin, A.; Bernstein, S.; Zheng, X.; Condrón, M. M.; Benedek, G. B.; Bowers, M.; Teplow, D. B. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2422–2441. (b) Bitan, G.; Lomakin, A.; Teplow, D. B. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35176–35184.
- [5] Particles with 2-to-4 nanometer z-height are typically observed in oligomer states. See: Stine, W. B. J.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11612–11622.
- [6] Yamamoto, M.; Shinoda, K.; Ni, J.; Sasaki, D.; Kanai, M.; Sohma, Y. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, *16*, 6537–6542.
- [7] Yamamoto, M.; Shinoda, K.; Sasaki, D.; Kanai, M.; Sohma, Y. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2019**, *27*, 888–893.