

博士論文（要約）

論文題目 アルツハイマー病の原因物質の構造解明を指向した
安定なアミロイド β オリゴマーの合成

氏 名 篠田 清道

背景・目的

アミロイド β ($A\beta$) は、アルツハイマー病 (AD) に関与するとされる、凝集性・神経毒性を特徴とするペプチドである。¹ $A\beta$ 単量体が凝集するとオリゴマー、フィブリル等の様々な凝集体が形成されるが、それらの中で神経毒性を主に担うのはオリゴマーであるとされている。² したがって、対 AD の創薬研究を行う上で、 $A\beta$ オリゴマーは極めて有望な標的であると考えられる。

$A\beta$ オリゴマーを標的とした創薬を行うにあたり、その X 線結晶構造情報は極めて有用であるが、現在までほとんど明らかになっていない。 $A\beta$ オリゴマーの会合度は $A\beta$ の凝集性ゆえに動的に変化するため、単一会合度のオリゴマーが安定に存在することはなく、不均一・不安定である (Figure 1a)。しかし、X 線結晶構造解析を行う上では一般に、均一性・安定性が必要である。したがって、 $A\beta$ オリゴマーの X 線結晶構造解析は凝集性ゆえに困難になっていると考えられる。

上記課題を解決し $A\beta$ オリゴマーの X 線結晶構造解析に至っているのは、Nowick らのグループのみである (Figure 1b)。彼らは、 $A\beta$ 部分配列 ($A\beta_{17-23}$ および $A\beta_{30-36}$) を搭載した環状ペプチドが構成する三量体の結晶構造を報告している。³ 主鎖アミド結合の N-メチル化およびアミノ酸の置換によって $A\beta$ 由来の凝集性を低減させたことで、結晶化が達成されたと推察される。しかしこの報告は、化学修飾を $A\beta$ 鎖の構造自体に施している点に改善の余地を残している。本来直鎖構造をとる $A\beta$ を環状化したと共に、主鎖アミド結合を N-メチル化しアミノ酸を置換したことにより、得られる結晶構造と $A\beta$ オリゴマーが本来とっている立体構造との間の相同性が損なわれてしまう可能性があるためである。また、この分子設計では三量体以外のオリゴマー (二量体、四量体、五量体など) の結晶構造を取得することができない点も、得られる構造生物学的知見が限られてしまうゆえ、改善が望まれると言える。

以上を踏まえ本研究では、Nowick らの先行研究とは異なる分子設計により先述の 2 つの問題点を解決し、 $A\beta$ オリゴマーの結晶構造を解明することを目指した。分子設計の際に満たされるべき要件として、(1) 凝集性低減のための化学修飾を $A\beta$ 鎖の構造自体には施さないこと、(2) 三量体以外のオリゴマーの結晶構造が取得可能な設計にすること、の 2 項目を設定した。

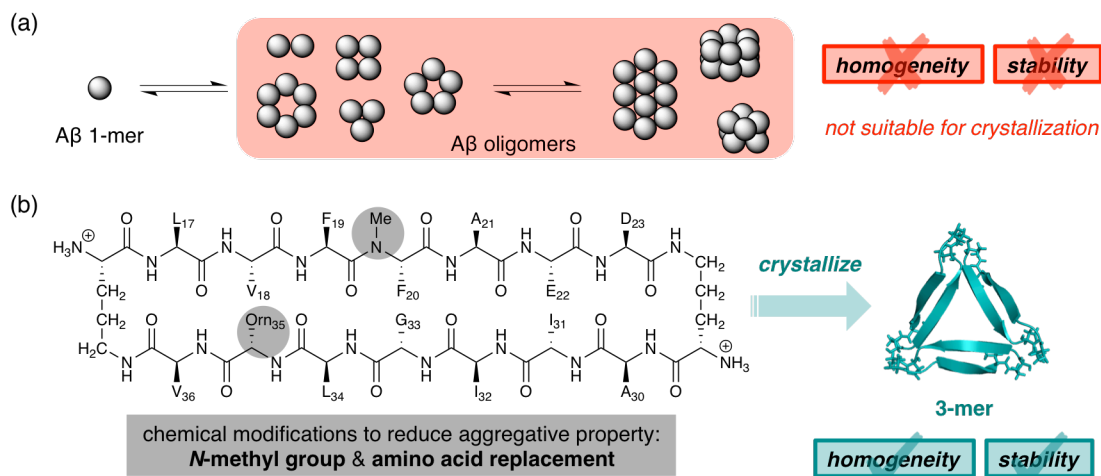


Figure 1. (a) $A\beta$ オリゴマーの結晶化は、その凝集性ゆえに困難である。(b) 化学修飾により凝集性を低減させたことで、均一性・安定性を付与し結晶化を達成した、Nowick らの先行研究。

方法・結果

上記二要件を満たす分子設計として私は、環状ペプチド骨格に A β 鎖を共有結合させた A β オリゴマーモデル分子を考案した (Figure 2)。A β 鎖の代わりに環状ペプチド骨格に化学修飾を施すようにすることで、上記要件 (1) を満足できると考えた。また、共有結合させる A β 鎖の数を変えることで、同様の分子設計にて種々の A β オリゴマーを合成できることから、上記要件 (2) も満足できると考えた。この作業仮説に基づき、私は修士課程において毒性部分配列 A β_{25-35} の三量体モデル分子 **1a** の合成を達成したが、**1a** は不安定であり結晶化には適さないと推察された。⁴

安定性を向上させるための戦略として私は、環状ペプチド骨格に電荷を有する官能基を導入することを計画した。そのような官能基により誘起される三量体分子間の静電反発によって、三量体分子の安定性が向上すると推測した。そこで、中性緩衝液中で正電荷を有するグアニジノ基を導入した **1b**、⁵ および負電荷を有するカルボキシ基を導入した **1c** を合成した。両者の安定性を、凝集体を遠心分離により沈殿させて上清中の非凝集体の量を調べる sedimentation assay⁶ により評価したところ、**1b** の安定性は **1a** と同程度に低いが、**1c** では安定性が向上したことが示唆された。この結果より、安定性向上には負電荷の導入が有効であると推定されたことから、私は続いて種々の酸構造を有する三量体 **1d-f** を合成した。具体的には、**1d** にはスルホ基を、**1e** にはリン酸モノエステル基を、**1f** にはマロニル基を導入した。これらの凝集性を sedimentation assay により評価した結果、安定性の順序は **1c** \cong **1d** < **1e** < **1f** となっていることが示唆された。この結果は、**1c-f** が有する負電荷の数によって説明可能である。すなわち、**1c-f** の酸構造の pK_a 値と sedimentation assay で用いている緩衝液の pH 値 (7.4) を比較することで、各三量体の負電荷数を概算すると **1c** \cong **1d** < **1e** < **1f** となり、先の結果と一致する。したがって、安定性の順序と負電荷の数には正の相関があると推察される。

負電荷の導入により安定性は向上したものの、**1f** は 1 日後には凝集してしまうことが示唆されていた。また、三量体以外のオリゴマーを合成すべく、**1f** の環状骨格を用いて A β_{25-35} の四量体・五量体を合成した際、会合度の大きいオリゴマーほど凝集性が高いことが示唆されていた。しかし、タンパク質の結晶化には 1 週間程度の時間が必要であるため、上記程度の安定性では不十分であると推察された。そこで、安定性をさらに向上させるべく、先述の正の相関に基づき負電荷の数 (マロニル基の数) を **1f** の 2 倍にした A β_{25-35} 三量体 **2** を合成した。凝集性を評価した結果、**2** は少なくとも 4 日間は凝集せず安定であり、安定性が大幅に向上したことが示唆された。

安定性を向上させたことで、**2** が A β の特徴を喪失した可能性が想定された。そのような特徴の 1 つが、A β 凝集体に特徴的な高次構造であるクロス β -シート構造⁷ を形成する能力である。そこで私は、当該構造を認識し蛍光を発する色素であるチオフラビン T (ThT) を用いた蛍光強度アッセイ⁸ を行った。その結果、**2** では蛍光強度の増大が認められたことから、**2** はクロス β -シート構

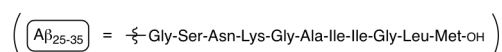
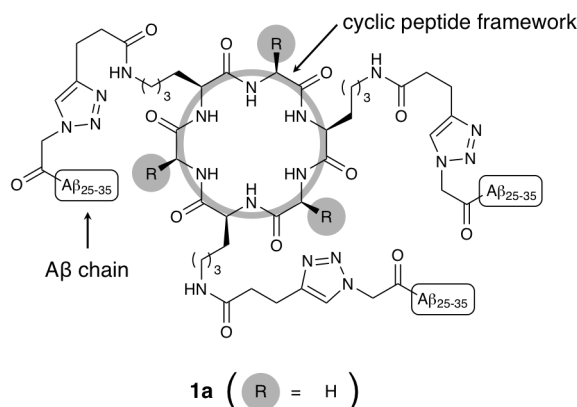


Figure 2. (a) A β_{25-35} 三量体モデル分子 **1a** の構造式。

造を形成する能力を失っていないことが示唆された。

安定性向上に伴い喪失しうる A β のさらなる特徴として神経細胞毒性が挙げられる。そこで、ラット副腎髄質由来の神経様細胞である PC12 を用いた細胞生存率試験を行ったところ、**2** の細胞毒性は、対応する単量体である A β_{25-35} 、および **2** の環状骨格分子である **3** が示す細胞毒性と比べて有意に強かったことから、神経細胞毒性も失っていないことが示唆された。したがって **2** は、安定でありながらも A β の特徴であるクロス β -シート構造形成能・神経様細胞に対する毒性を喪失しておらず、研究目的である「A β オリゴマーの結晶構造解明」の達成に現状最も近いと期待される。

総括

以上私は、A β オリゴマーの X 線結晶構造解明を指向し、安定な A β オリゴマーモデル分子の合成に取り組んだ。その結果、負電荷の数と安定性の間に正の相関があることを見出したと共に、安定でありながらも A β の特徴であるクロス β -シート構造形成能・神経様細胞に対する毒性を喪失していない A β_{25-35} 三量体である **2** の創製に成功した。**2** は現状最も研究目的達成に近いと期待されるため、現在はその結晶化検討を行っている。また、種々のオリゴマー間で構造を比較することを指向し、**2** の環状ペプチド骨格を用いての二量体、四量体、五量体などの合成にも取り組んでいる。さらに、毒性構造の全容解明を目指し、部分配列 A β_{25-35} の代わりに全長 A β である 40 残基のアミノ酸からなる A β_{1-40} を結合させた三量体モデル分子の合成にも取り組んでいる。

〈参考文献〉

- (1) (a) Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, 297, 353. (b) Selkoe, D. J.; Hardy, J. *EMBO Mol. Med.* **2016**, 8, 595.
- (2) Benilova, I.; Karran, E.; De Strooper, B. *Nat. Neurosci.* **2012**, 15, 349.
- (3) Spencer, R. K.; Li, H.; Nowick, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 5595.
- (4) Shinoda, K.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 2976.
- (5) Shinoda, K.; Sohma, Y.; Kanai, M. In *Peptide Science 2016 (The Proceedings of 53rd Japanese Peptide Symposium)*; 2017; pp 187–188.
- (6) O’Nuallain, B.; Thakur, A. K.; Williams, A. D.; Bhattacharyya, A. M.; Chen, S.; Thiagarajan, G.; Wetzel, R. In *Methods in Enzymology*; 2006; Vol. 413, pp 34–74.
- (7) Kirschner, D. A.; Abraham, C.; Selkoe, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 503. (8) LeVine III, H. In *Methods in Enzymology*; 1999; Vol. 309, pp 274–284.