アミロイドβの毒性配座理論を基盤としたアルツハイマー病の予防戦略

京都大学大学院農学研究科　入　江　一　浩

はじめに

アルツハイマー病（AD）は最も患者数の多い神経変性疾患であるが，根本的な治療薬は見いだされていない．アセチルコリンエステラーゼ阻害薬，NMDA受容体拮抗薬などの症状改善薬は一定の効果をあげているが，正確な早期診断法の確立と食事や運動などの生活習慣の改善による発症の遅延が，最も現実的な対応の一つとして考えられている．ADは，40代から始まるアミロイドβタンパク質（Aβ）の蓄積（老人斑の形成），タウタンパク質のリン酸化（神経原線維変化），神経細胞の脱落の順序で進行するとされる．当初，高分子量のアミロイド線維がADの発症を引き起こすと考えられていたが，その後Aβの毒性本体は，準安定なオリゴマーであると考えられるようになった．したがって，ADの早期診断薬や予防薬を開発するためには，毒性を示すAβオリゴマーに特徴的な立体構造を明らかにし，それに対する抗体や低分子化合物を設計する必要がある．しかしながら，36~43残基からなるAβの中で最も毒性の高いAβ42は，C末端側に嵩高い疎水性アミノ酸残基を連続してもつために合成難度が高く，また，容易に凝集することから，その毒性を示す立体構造を特定することはきわめて困難であった．

1.　長鎖疎水性ペプチドの効率的な高純度合成法の確立

筆者は，1990年頃，放線菌の産生するインドールアルカロイド・テレオシジン類とそれらの標的酵素であるプロテインキナーゼC（PKC）との結合様式を研究していた時に，分子生物学的手法では結合活性を保持したPKCを，大量に調製することが困難であることに直面した．その直後，Paul A. Wender教授（米国スタンフォード大）の研究室に留学する機会を得て，同様のPKCリガンドであるホルボールエステルのプロジェクトに，1992年4月から1年間従事した．その間Wender教授のご助言により，PKCγにおける発がんプロモーターの結合部位（約50残基からなるcysteine-rich domain）を固相合成し，亜鉛でフォールディングさせたところ，PKCリガンドに対する結合をわずかではあるが観測することができた．そこで帰国後，福田宏之博士（Applied Biosystems Japan）にご協力いただき，5年の歳月を経て，ポリエチレングリコール–ポリスチレン樹脂を固相担体とし，Carpinoが開発した活性化剤・HATUを用いたFmoc法を，連続フロー型合成機で行うことによって，全PKCアイソザイムのC1ドメインペプチド16種を高純度かつ高収率で得ることに成功した．そして，それぞれのC1ペプチドの各種天然PKCリガンドに対する結合能を網羅的に測定することにより，各PKCアイソザイムの機能的特徴を明らかにした[1]．

一方，福田博士は，白澤卓二博士，清水孝彦博士（旧東京都老人研）とともにAβの家族性変異体の研究を進めておられ，白澤博士らとの出会いが筆者のAβ研究の出発点になっている．上記の合成法を，合成難度の高い各種Aβ42誘導体に適用することにより，以下の研究を効率的に進めることができた．

2.　毒性ターン形成による神経細胞毒性発現機構の提唱

まずターンをとりやすく，かつβシート構造をとりにくいプロリン残基で，Aβ42のアミノ酸残基を1残基ずつ系統的に置換した変異体約40種を合成し，これらの凝集能および神経細胞毒性を測定した．その結果，Glu22, Asp23付近のターン構造（毒性ターン）を特徴とするAβ42の新しい凝集体モデルを提出できた[2]．続いて，Aβ42の各種変異体の電子スピン共鳴法を用いた解析によって，毒性ターンが効率的にMet35の硫黄原子を酸化することにより生じるC末端の疎水性コアが，毒性オリゴマーを形成させることを示唆するデータを得た[3]（図1）．

次に，竹腰清乃理教授（京大院理）のご協力を得て，固体NMR法によるAβ42凝集体の構造解析を行った．その結果，Glu22, Asp23とGly25, Ser26付近にそれぞれターンを有する2つのコンホマーの存在が判明した[4]．そこで，それぞれの推定ターン部位における配座固定アナログを合成したところ，Glu22, Asp23におけるターン構造固定アナログが，顕著な凝集能ならびに神経細胞毒性を示した．これより，Glu22, Asp23付近にターンを有する配座が「毒性配座」であり，ADの発症において重要な役割を果たしていることが強く示唆された．ごく最近，この毒性ターンをもち，C末端領域を共有結合で架橋した2および3量体モデルが，オリゴマーとして長時間安定に存在し，前者が高い神経細胞毒性を示すことを明らかにしている[5]．

一方，Aβ42凝集体の精密な立体構造解析は，凝集能の高さと合成の困難さにより難航していたが，最近3つの研究グループによりほぼ同時に発表された[6]．毒性の低いAβ40凝集体と異なる点は，Glu22, Asp23付近でのターン構造の存在であり，筆者らの提唱した毒性ターンを支持するものであった．

3.　早期のAD診断薬とAD予防薬の開発に向けた基礎研究

3-1.　Aβ42の毒性ターンを認識する抗体の開発

Aβ42の毒性ターンを認識する抗体は，早期のAD診断薬ならびに予防薬になる可能性がある．そこで，免疫生物研究所（IBL）のご協力を得て，この毒性ターンを模倣したプロリン置

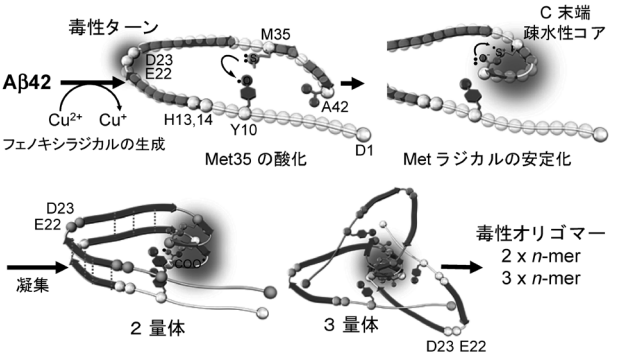

図1　Aβ42の毒性オリゴマーの推定構造と生成機構[2,3]

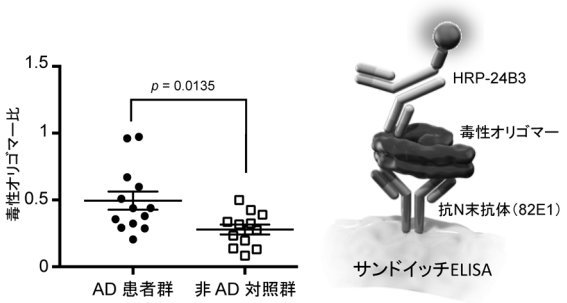

図2 サンドイッチ ELISA によるヒト脳脊髄液の分析[8)]

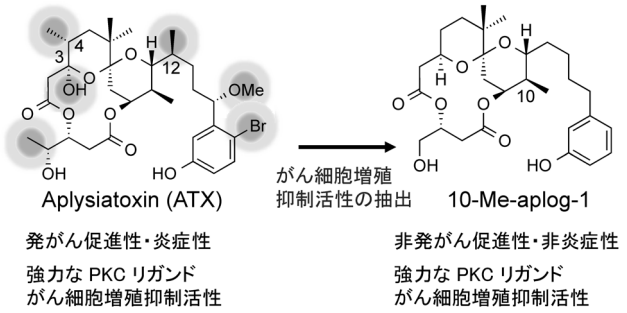

図3 ATX の単純化による新規PKC リガンドの設計[11,12)]

換ペプチドを，キャリアータンパク質に結合させたものを抗原としてマウスに免疫することにより，抗原ペプチドに選択的に結合する2種のモノクローナル抗体（11A1, 24B3）を開発した．11A1抗体を用いたヒト脳切片の免疫組織学的染色において，既存抗体では染色が困難であった細胞内Aβオリゴマーや AD 病態を反映した染色像を観測できた[7)]．一方，24B3抗体は，毒性ターンをきわめて特異的に認識したことから，既存のN末端抗体とのサンドイッチ ELISA を IBL 社と共同開発し，徳田隆彦教授（京都府立医大）のご協力を得て，AD の脳脊髄液診断に応用できる可能性を示した[8)]（図2）．両抗体は IBL より研究試薬として販売され，国内外で多くの研究者に使用されている．さらに，24B3抗体を AD モデルマウスに受動免疫することにより，認知機能障害が緩和されることも判明した[9)]．

3-2. 機能性食品成分などによる Aβ42凝集抑制機構の解明

食品中のフラボノイドは，AD モデルマウスに対して病状を緩和させることが知られているが，化合物のタイプによりそれぞれ異なった作用機構によって Aβ42 の凝集を抑制していることを明らかにした．例えば，赤タマネギなどに含まれるタキシフォリン（カテコール型）は，溶存酸素により酸化された *o*-ジケトンが，Aβ42 の 16 番目あるいは 28 番目のリシン残基と直接共有結合（マイケル付加体を形成）することにより凝集を抑制していることを，実験的に確かめた[10)]．一方，カレー粉の色素成分であるクルクミンのような非カテコール型のフラボノイドは，Aβ42 の分子間水素結合領域にインターカレーションすることにより，また，生薬に含まれるウンカリン酸のようなトリテルペンカルボン酸誘導体は，Aβ42 のリシン残基と塩橋を形成することにより，それぞれ凝集（オリゴマー化）を抑制することが判明した．これらの結果は，様々な機能性食品成分や生薬成分の構造要因 ①カテコール構造，②平面性，③カルボキシ基から，Aβ42 の凝集抑制活性の有無とその作用機構の予測を可能にするものであり，天然物による AD 予防法の確立につながる基礎的知見である．

3-3. 副作用を取り除いた新規PKC リガンドの開発

細胞内情報伝達の鍵酵素であるプロテインキナーゼ C（PKC）αならびにεの活性化が，Aβ42 の産生抑制あるいは分解促進をそれぞれ引き起こすことから，PKC 活性化剤は AD の予防薬になる可能性がある．しかしながら，天然の PKC 活性化剤の多くが発がん促進物質であり，そのままでは医薬品にはなりえない．海洋生物由来の bryostatin-1（bryo-1）は，発がん促進活性をほとんど示さない強力な PKC 活性化剤であるが，bryo-1 の天然からの単離収量はきわめて低く，また全合成も多段階を必要とすることから構造最適化が困難であり，bryo-1 に代わる新しい薬剤の開発が強く望まれていた．

筆者らは，アメフラシ由来の aplysiatoxin（ATX）が bryo-1 に一部類似した骨格を有することに着目し，ATX の単純化アナログ・aplog-1 を開発した[11)]．ATX は発がん促進活性ならびに強い炎症作用を示すが，aplog-1 は PKC に強く結合する一方で，これらの副作用をほとんど示さなかった．そこで aplog-1 の構造最適化を試みた結果，ATX と同程度の PKC 結合能をもつ 10-Me-aplog-1 を開発できた[12)]（図3）．最近，数百mg の 10-Me-aplog-1 を合成し，マウスを用いた *in vivo* 実験において低毒性であることも確認した．したがって 10-Me-aplog-1 は，AD の新しい予防薬のシードとしての展開が期待される．

おわりに

以上のように，Aβ42 の毒性配座理論に基づいた抗毒性ターン抗体・24B3 は，AD の早期診断ならびに予防に有用であることが明らかになった．今後測定法の更なる高感度化により，血漿を用いた超早期診断も可能と考えている．一方，Aβのオリゴマー化を抑制する天然物に共通する 3 つの構造上の特徴を明らかにするとともに，天然の PKC 活性化剤を用いた AD 予防に繋がる基礎的知見も得られた．これらの結果は，超早期診断後の AD 予防に役立つものと期待される．

（引用文献）

1）K. Irie *et al., J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9159–9167.
2）A. Morimoto *et al., J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52781–52788.
3）K. Murakami *et al., J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15168–15174.
4）Y. Masuda *et al., ChemBioChem* **2009**, *10*, 287–295.
5）Y. Irie *et al., Chem. Commun.* **2019**, *55*, 182–185.
6）Y. Xiao *et al., Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 499–505 など.
7）K. Murakami *et al., ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 747–756.
8）K. Murakami *et al., Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29038.
9）N. Izuo *et al., Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11811.
10）M. Sato *et al., J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 23212–23224.
11）Y. Nakagawa *et al., J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7573–7579.
12）M. Kikumori *et al., J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614–5626.

謝　辞　本研究は，テレオシジン類の研究が出発点になっており，直接ご指導を賜りました小清水弘一先生（京都大学名誉教授），ならびに本研究に対してご支援いただきました大東　肇先生（京都大学名誉教授），白澤卓二先生（御茶の水健康長寿クリニック）に心より感謝申し上げます．本研究は，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で行われたものであり，研究にご協力いただいた当分野の教職員・学生の方々，ならびに共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます．最後に，テレオシジン類の研究に対して多大なるご協力を賜りました林　英雄先生（大阪府立大学名誉教授）に心より感謝いたします．なお，本研究は主として，科研費と各種財団（武田，上原，内藤，アサヒグループ）の助成金によって行われました．深謝いたします．