

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12744

研究課題名(和文)細胞内アミロイド の新しい標的分子の探索

研究課題名(英文) Search for novel target molecules of intracellular amyloid beta

研究代表者

村上 一馬 (Murakami, Kazuma)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80571281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド (A₄₂) は、神経細胞内でオリゴマー化することで細胞毒性を示す。本研究では、A₄₂の毒性オリゴマーの細胞内機序解明を目的として、毒性オリゴマーを形成しやすい2量体分子プローブの合成と標的タンパク質の探索を行った。分子プローブとして、毒性オリゴマーを形成しやすいE22P変異に着目するとともに、C末端コア内で2価性のL,L-ジアミノピメリン酸で架橋し、N末端をビオチン標識した2量体モデルを用いた。本プローブとSH-SY5Y細胞の細胞質抽出液とを反応させた後、MS/MS解析を行った結果、毒性オリゴマーに特異的に結合するタンパク質3種を同定した。

研究成果の概要(英文)：The 42-mer amyloid β -protein (A₄₂) oligomerizes (2-24-mer: 2 or 3 x n-mer) intracellularly to show the neurotoxicity in the pathogenesis of Alzheimer's disease. There are few studies on the mode of action of intracellular toxic oligomers of A₄₂ and their target molecules. We developed a molecular probe of toxic oligomers of A₄₂ and searched for their associated proteins within the cell. The design of the probe was based on the toxic-conformation constrained E22P-A₄₂ and L,L-2,6-diaminopimelic acid (DAP) linker at position 40 in the C-terminal hydrophobic core, the formation of which plays a critical role in the oligomerization of A₄₂. The dimer probe of A₄₂ generated oligomers (12-24-mer) with the potent neurotoxicity against human SH-SY5Y neuroblastoma cells. After reacting the probe with cytosolic lysates of SH-SY5Y, three proteins preferably bound to the dimer probe were identified by MS/MS analysis using the biotin-avidin technology.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド オリゴマー 標的探索 MS/MS シグナル伝達 ビオチン化 磁性ビーズ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) の主な病理学的特徴として、神経細胞外に蓄積する老人斑 (無症状の初期段階から蓄積) ならびに神経細胞内に見られる神経原線維変化 (老人斑蓄積から約 10 年後に形成) が知られている (図 1A). 老人斑の構成成分である 42 残基のアミロイド β タンパク質 ($A\beta_{42}$) は、凝集 (オリゴマー化: 2~24 量体, 2 or 3 x n -mer) することによって神経細胞毒性 (シナプス毒性) を示すことから、治療標的の一つと考えられている (図 1B: オリゴマー仮説). 近年、毒性本体である $A\beta_{42}$ オリゴマーは細胞外ではなく、細胞内に蓄積しやすいことが明らかになった. しかしながら、現在進行中の臨床試験の多くは、細胞外の $A\beta$ 凝集体 (老人斑, フィブリル) を標的とした従来の戦略に基づいたものであり、重篤な副作用などによってあまり良い結果が得られていない (Abbott, A. & Dolgin, E. *Nature* **2016**, *540*, 15). $A\beta_{42}$ オリゴマーに関する研究は世界中で激しい競争の下で行われているが、2~24 量体の様々な分子量の“新オリゴマー”が報告されるだけで、構造解析や標的分子の同定も進んでいない.

近年、本研究代表者らは、 $A\beta_{42}$ の Glu22, Asp23 付近でのターン構造をもつ「毒性コンホマー」 (図 2: 「毒性配座理論」 Murakami, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15168; Masuda, Y. *et al.*, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 287) に対するモノクローナル抗体 (クローン名 11A1: 2012 年 3 月より免疫生物研究所から販売, 米国および中国で特許取得済み US8710193 B2; CN ZL201080046483.9) を開発し、「毒性コンホマー」からなる毒性オリゴマーの蓄積を神経細胞内で見いだした (Murakami, K. *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 747; Kondo, T. *et al.*, *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 487). また臨床データより、AD 患者脳において細胞内 $A\beta_{42}$ が老人斑に先行して蓄積することが注目されている (LaFerla, F. M. *et al.*, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 499).

しかしながら、細胞内 $A\beta_{42}$ の毒性発現における作用機序については不明な点が多い. そこで、現在明らかになっている上記の知見に基づいて、毒性オリゴマーを形成しやすい「毒性コンホマー」という切り口から細胞内結合タンパク質を探索することによって、新しい AD 治療戦略を見いだせないかという着想に至った. 最近本研究代表者らは、 $A\beta_{42}$ の毒性コンホマー固定アナログ (E22P- $A\beta_{42}$) を用いて、細胞内標的分子の探索を試みたが、不特定多数の結合タンパク質が、ウェスタンブロットで検出された. 分子プローブとして用いた E22P- $A\beta_{42}$ 単量体は、毒性オリゴマーを形成しやすい反面、きわめて速くフィブリル化することが一因と考えられた. このため、単量体を分子プローブとして用いる方法では、毒性オリゴマー特異的な結合タンパク質を同定することは困難であることがわかった.

ごく最近、所属研究室において関連する研究課題「基盤研究 (S) 「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新しい予防戦略」: 入江一浩代表] で確立された L,L-ジアミノピメリン酸 (L,L-DAP) を分子リンカーとした架橋法 (Murakami, K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *466*, 463-467) を用いることにより、E22P- $A\beta_{42}$ の 2 量体モデルの合成に成功した. この 2 量体モデルは数日間安定な毒性オリゴマー (6~8 量体以上) として存在することがわかった (Murakami, K. *et al.*, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29038). 従って、本 2 量体モデルをプローブ化すれば、これまでの問題点を解決できるのではないかと考えた.

2. 研究の目的

$A\beta_{42}$ の毒性オリゴマーの細胞内における作用機序の分子レベルでの解明を目的として、毒性オリゴマー特異的な分子プローブの開発および標的タンパク質の探索を行った.

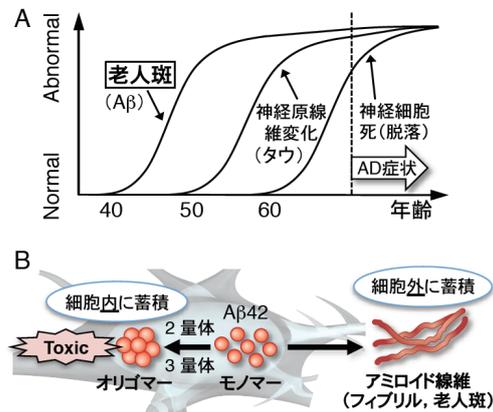


図 1 (A) AD 病理の特徴と年齢の相関. (B) オリゴマー仮説における $A\beta_{42}$ の凝集過程 (毒性本体はオリゴマー).

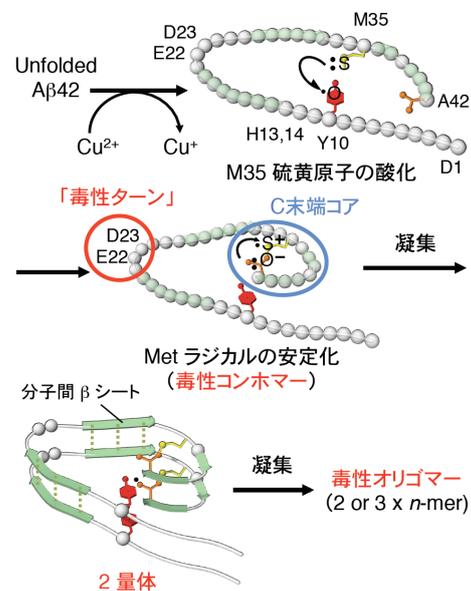


図 2 $A\beta_{42}$ の毒性配座 (コンホマー) 理論と毒性 2 量体の推定構造.

3. 研究の方法

(1) A β 42 の毒性オリゴマーの分子プローブ化

標的探索の戦略として、従来法の多くは、固相担体に A β 40 (A β 42 に比べて凝集能が著しく低い) の N 末端アミノ基を直接反応させるものであったことから (Calero, M. *et al. Methods Mol. Biol.* **2012**, 849, 213), プローブ自体が毒性オリゴマー構造をとりにくいという問題点があった。さらに、凝集能が高い A β 42 あるいはそのオリゴマーを用いた実験例もなかった。これより本実験では、A β 42 の毒性オリゴマープローブと細胞抽出液を液相 (低温下) で反応させた後、固相担体を用いて結合分子を回収する方法をとることとした。

まず A β 42 の毒性コンホマー (図 2) のミミックとして、毒性ターン構造を形成しやすいプロリン置換体である E22P 変異型 (Murakami, K. *et al. J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 46179) に着目し、オリゴマー化に重要な疎水性 C 末端コア領域内の Val40 で架橋した。N 末端 (Asp1) をビオチン標識することで A β 42 の毒性オリゴマープローブ (図 3) とした。架橋反応は、Val40 を 0.5 当量 (通常のアミノ酸は 4 当量を使用) の L,L-DAP で置換することによって行った。

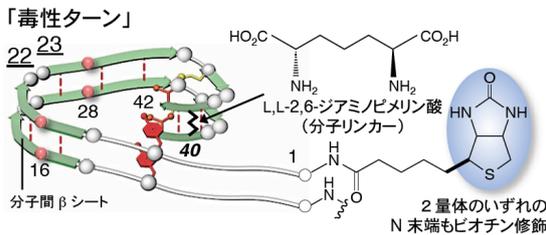


図 3 A β 42 の毒性オリゴマープローブの構造。22, 23 番目付近における毒性ターンを形成しやすい 2 量体構造 (E22P 変異) は、毒性オリゴマーの基本構成単位である。

(2) ビオチン標識した E22P-V40DAP-A β 42 dimer の各種活性の評価

ビオチン化した E22P-A β 42 の 2 量体モデルの凝集能 (アミロイド線維形成能とオリゴマー形成能) ならびに神経細胞毒性への影響を評価した。アミロイド線維形成能はチオフラビン T 蛍光法によって、オリゴマー形成能はグルロ過法によって、神経細胞毒性はヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞) を用いた MTT 試験によって、それぞれ調べた。

(3) FG ビーズを用いた A β 42 の毒性オリゴマーモデルの細胞内標的タンパク質の抽出

A β 42 は疎水性が高いことから、従来法のように標的探索に細胞全抽出液を用いた場合、A β 42 と標的分子が非特異的に結合する可能性が懸念される。実際にこれまで報告さ

れた A β 42 標的分子の多くは、脂溶性の高い膜タンパク質であり、その多くは A β 42 が誘発する神経細胞死の病態機序を十分に説明できるものではなかった (Overk, C. R. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, *111*, 13680)。以上より、本研究では SH-SY5Y 細胞の細胞質画分を用いた。

固相担体には、半田ら (東京医科大学) が開発した機能性ナノ磁性微粒子 (FG ビーズ) をニュートラアビジン化したものを用いた。A β 42 の毒性オリゴマープローブと細胞質画分を 4 °C で 1 時間インキュベーションした後、ニュートラアビジン化 FG ビーズを加えて標的タンパク質を回収した。なお、細胞質成分の抽出には、界面活性剤として 1% Triton X-100 を含む HEPES バッファーを用いた。その後、電気泳動ならびに SYPRO Ruby 蛍光染色によって候補タンパク質を決定した。

(4) A β 42 の毒性オリゴマーモデルの細胞内標的タンパク質の MS/MS 解析 (ペプチドマスマフィンガープリント法)

目的のバンドを脱染色後、酵素消化反応液を MALDI-TOF-MS/MS 解析し、データベースを用いて偽陽性ピークの排除ならびに翻訳後修飾等の有無の検証を行うことによって、標的タンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) A β 42 の毒性オリゴマーの分子プローブ化

Fmoc 固相合成によって、ビオチン標識した E22P-V40DAP-A β 42 dimer を高純度 (98% 以上) かつ高収率 (3.4%) で得た。

(2) ビオチン標識した E22P-V40DAP-A β 42 dimer の各種活性の評価

ビオチン化 E22P-A β 42 の 2 量体モデルのチオフラビン T 蛍光試験の結果、336 時間後までほとんど増大せず、ビオチン化なしの 2 量体ペプチドと同様であった (図 4A)。一方で、E22P-A β 42 単量体は 4 時間後に蛍光値が増大し、典型的なアミロイドフィブリル (線維) を形成していることを電子顕微鏡によって確認した。ビオチン化 2 量体モデルがオリゴマーを形成しているかどうかを調べるため、グルロ過法で解析したところ、非ビオチン化 2 量体と同様に、比較的安定な 6~8 量体以上のオリゴマーを形成していた (図 4B)。

さらに、SH-SY5Y 細胞を用いた MTT 試験を行ったところ、ビオチン化 E22P-V40DAP-A β 42 dimer の神経細胞毒性は、ビオチン化なしのペプチドとほぼ同等であった (図 5)。以上の結果より、ビオチン化によるこれらの活性に対する影響はほとんどないことがわかった。

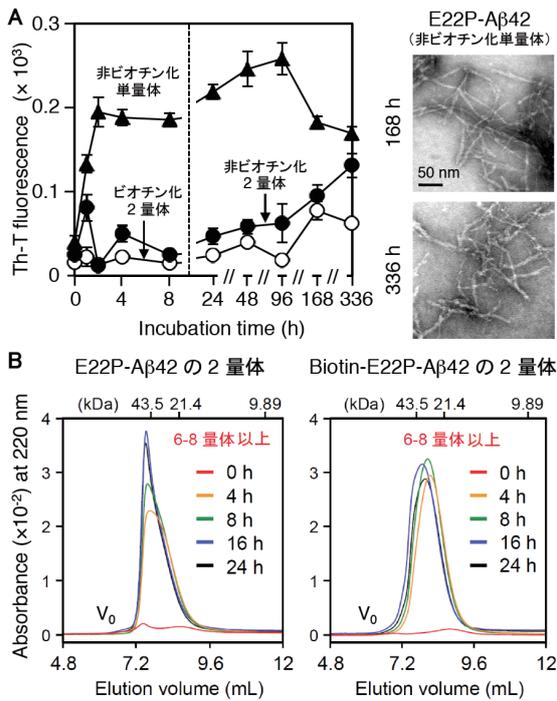


図4 N末端ビオチン化によるE22P-Aβ42の2量体モデルの凝集能への影響。(A) アミロイド線維形成能および(B) オリゴマー形成能。(A) Aβ (25 μM) を 50 mM のリン酸バッファー (pH 7.4) 中でインキュベーション (37°C) し、経時的に凝集能をチオフラビン T 蛍光法で測定した。(B) A と同様に調製した E22P-V40DAP-Aβ42 dimer 溶液を Superdex75 10/300GL カラムでゲルろ過分析した。V₀ = void volume

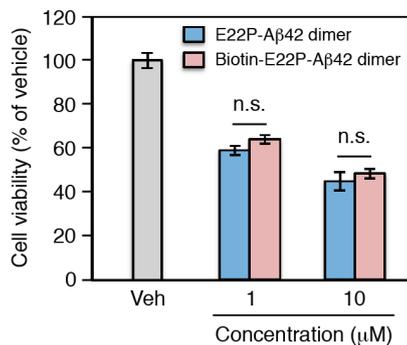


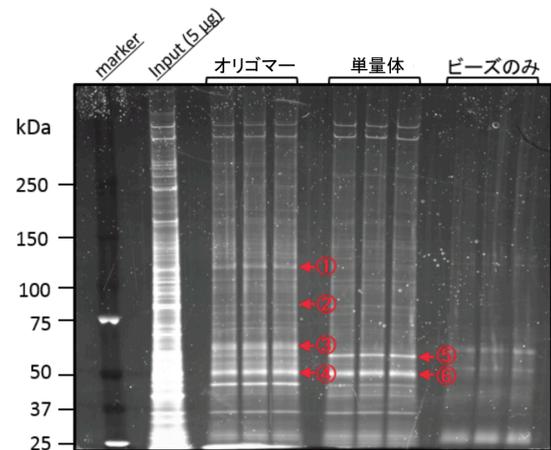
図5 N末端ビオチン化によるE22P-Aβ42の2量体モデルの神経細胞毒性への影響。Aβ (1, 10 μM) を DMEM 培地中で培養した SH-SY5Y 細胞に添加した。48 時間インキュベーション (37°C) 後、神経細胞の生存率を MTT 法で測定した。Veh (Vehicle) 処理群の生存率を 100% とした。n.s.: not significant

(3) FG ビーズを用いた細胞内標的タンパク質の抽出

2 量体モデルのビオチン化プローブは、水溶液中で安定な毒性オリゴマーを形成したことから、24 時間プレインキュベーション (37

°C) したオリゴマー溶液と SH-SY5Y 細胞の細胞質抽出液とを反応させた後、ニュートラアビジン FG ビーズを用いて回収し、結合タンパク質を電気泳動したゲルを SYPRO Ruby で蛍光染色した。比較対照には、N 末端をビオチン化した E22P-Aβ42 単量体を用いた。

その結果、オリゴマーに特異的に結合する複数のバンドが認められた (図 6 の ①と③)。一方、これらは FG ビーズにはほとんど結合しないことを確認している。なお、2 量体モデルをプレインキュベーションせずに (オリゴマー、フィブリルを形成させない条件下) 同様に標的探索したところ、先に見いだされた特異的バンドの強度は減少した。これより、特異的バンドに含まれるタンパク質は、2 量体を構成単位とした毒性オリゴマーに選択的に結合している可能性がある。



SDS-PAGE : NuPAGE Novex 3-8 % Tris-Acetate gel
Running buffer : NuPAGE Tris-Acetate SDS Running buffer
Stain : SYPRO Ruby protein gel stain

図6 Aβ42 の毒性オリゴマーモデルが結合する細胞質画分の電気泳動。毒性オリゴマーあるいは単量体プローブと SH-SY5Y 細胞抽出液 (0.5 mg/mL) を 2 時間反応 (4°C) させた後、結合タンパク質を FG ビーズで回収し、電気泳動解析 (NuPAGE Novex 3-8% Tris-Acetate ゲル) を行った。泳動後、SYPRO Ruby で蛍光染色した。実験は、それぞれ 3 連で行った。

(4) 細胞内標的タンパク質の MS/MS 解析 (ペプチドマスフィンガープリント法)

2 量体に特異的なバンドを脱染色した酵素消化反応液について、MS/MS 解析を行ったところ、細胞質に局在するタンパク質 3 種が同定された (投稿準備中)。以上より、本 2 量体モデルは毒性オリゴマーの細胞内標的探索に有用な分子プローブである可能性が高い。

(5) 細胞内標的タンパク質に関する考察

標的探索の結果 (図 6), 細胞内取り込みあるいは細胞内輸送に関わるタンパク質が標的分子の候補の一つとして予想される (次頁図 7). また, E22P-A β 42 の 2 量体モデルはオリゴマー化しやすいことから, 「毒性オリゴマー」形成は, A β 42 が細胞内に取り込まれ, シナプス毒性 (神経細胞死) を発現するために必要である可能性がある. 一方, これまで本研究者らは, スーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) 欠損による細胞質酸化ストレスが, A β オリゴマー形成能を促進させることを動物実験で明らかにしていることから (Murakami, K. *et al. J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 44557), Keap1 等の酸化ストレス誘導に関連するタンパク質である可能性も考えられる.

一般に, シナプス前膜のニューレキシンとシナプス後膜のニューロリギンは接着分子を介して結合することによって, シナプスの機能が維持されている. ごく最近, ADDLs (A β オリゴマーの一種で約 24 量体を形成している) がこれらの相互作用を阻害することで, シナプス毒性および記憶異常を誘発することが報告された. (Brito-Moreira, J. *et al. J. Biol. Chem.* **2017**, 292, 7327). 興味深いことに, プローブとして用いた 2 量体モデルのオリゴマー形成能を, イオンモビリティ質量分析で詳細に調べたところ, 安定な 12~24 量体を形成することが判明している. 今後, 本研究で見出された候補タンパク質とシナプス維持あるいはシナプス毒性との関わりについての研究が期待される.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

- (1) 京都大学農学研究科食品生物科学専攻
生命有機化学分野ホームページ
<http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>
- (2) 京都大学教育研究活動データベース
<http://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/zP8kX>
- (3) アウトリーチ活動
 - ① 村上一馬：認知症の食品予防に関する化学的研究. 京都大学オープンキャンパス 2015, 京都大学農学部総合館 (京都市) 平成 27 年 8 月 7 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 一馬 (MURAKAMI, Kazuma)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：80571281

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

泉 俊輔 (IZUMI, Shunsuke)
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：90203116

久米 利明 (KUME, Toshiaki)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：10303843

(4) 研究協力者

徳田 真樹 (TOKUDA, Maki)
2015 年度大学院生

片岡 翔太郎 (KATAOKA, Shotaro)
2016 年度大学院生

(次頁に図 7 を掲載)

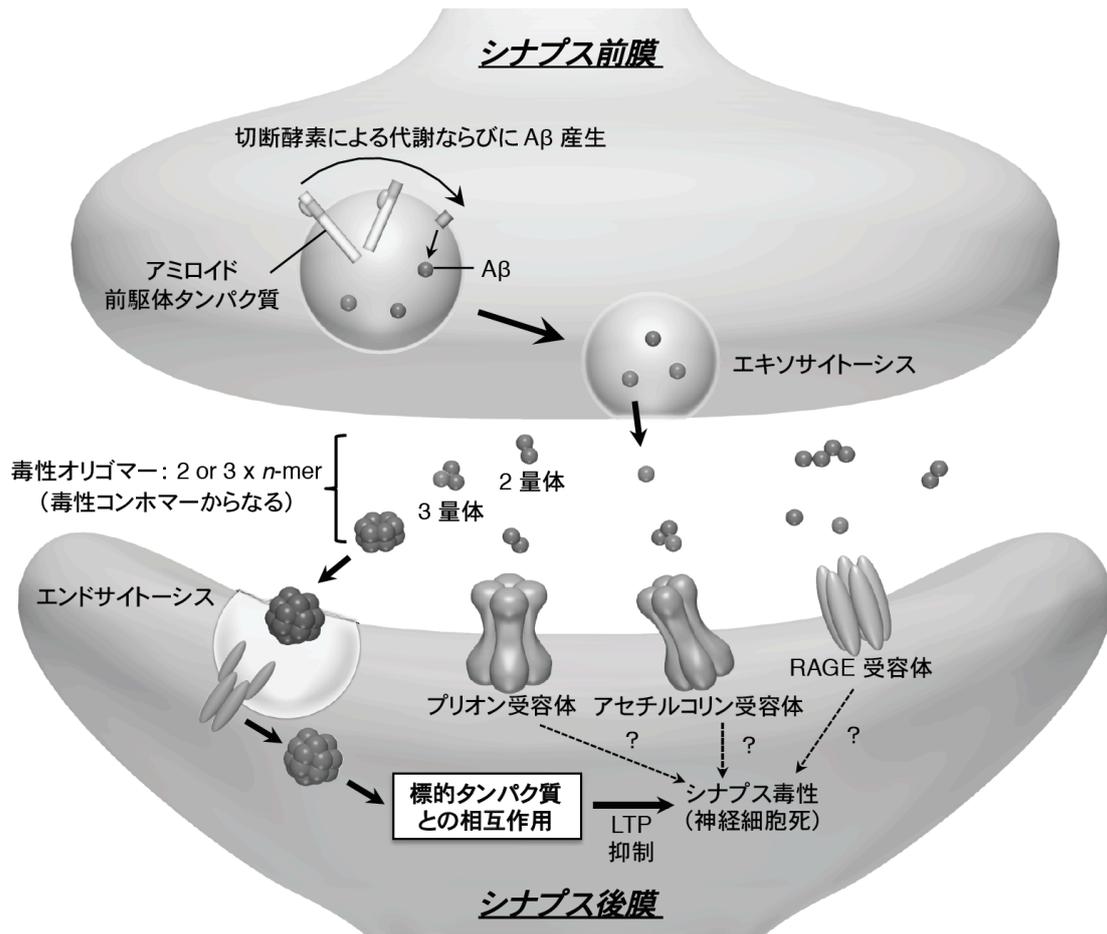


図 7. シナプスにおける Aβ オリゴマーの形成機序と細胞内動態の推定経路.

Aβ₄₂ は、シナプス前膜内でアミロイド前駆体タンパク質から 2 種類の切断酵素反応によって産生され、単量体として神経細胞外に分泌される。その後の凝集過程によって蓄積する場所が異なると考えられており、Aβ₄₂ オリゴマーは細胞内 (シナプス後膜) において長期増強 (LTP) を抑制することで、シナプス毒性 (神経細胞死) を誘導する。従来の標的分子として、オリゴマーを細胞内に取り込むための受容体タンパク質の報告例がある。