

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2006～2009

課題番号：18208011

研究課題名 (和文)  $\beta$  アミロイドの新しい凝集モデルに基づいた抗体および凝集阻害剤の開発研究課題名 (英文) Development of antibodies and aggregation inhibitors for amyloid  $\beta$  peptides based on the new aggregation model

研究代表者

入江 一浩 (IRIE KAZUHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00168535

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学／生物有機化学

キーワード：アルツハイマー病,  $\beta$  アミロイド, 凝集, 固体 NMR,  $\beta$ -シート,  $A\beta$  抗体

## 1. 研究計画の概要

アルツハイマー病 (AD) は、発症メカニズムの解明ならびに根本的な治療薬の開発が強く望まれている難治性疾患の一つである。42 残基のアミロイド  $\beta$  タンパク ( $A\beta$ 42) が、高い凝集性ととともに神経細胞毒性を示すことから、AD の原因物質と考えられている。本研究代表者らは最近、 $A\beta$ 42 のアミノ酸残基を一残基ずつ網羅的にプロリンで置換した変異体の凝集能ならびに神経細胞毒性を調べることによって、22, 23 番目及び 38, 39 番目にターン構造を有する「毒性コンホメーション」の存在を示唆するとともに、Tyr-10 及び Met-35 が共働した新しい神経細胞毒性発現機構を提唱した。本研究の目的は、

- (1)  $A\beta$ 42 の凝集体に含まれる毒性コンホマーの立体構造を、固体 NMR (核磁気共鳴法) 及び ESR (電子スピン共鳴法) により決定するとともに、上記の神経細胞毒性発現機構を検証すること、
- (2)  $A\beta$ 42 の毒性コンホマーを特異的に認識するモノクローナル抗体を開発すること、
- (3)  $A\beta$ 42 の凝集を阻害する低分子有機化合物を天然に広く探索し、その凝集阻害機構を明らかにすることである。

## 2. 研究の進捗状況

- (1) 野生型  $A\beta$ 42 及び凝集能のきわめて高い変異体である E22K- $A\beta$ 42 (Italian 型) のそれぞれの凝集体中に、22 及び 23 番目にターン構造を有する毒性コンホマーと 25 及び 26 番目にターン構造を有する非毒性コンホマーが存在すること、また C 末端の

38, 39 番目にもターン構造が存在することを固体 NMR によって明らかにした。さらに、10 番目と 35 番目にスピンラベルを導入し、ESR により距離測定を行なったところ、Tyr-10 及び Met-35 の側鎖は、15 Å 以内にあることが判明した。以上の結果は、金属イオン存在下で生じた Tyr-10 のフェノキシラジカルが、22 及び 23 番目におけるターン形成によって Met-35 に近づき、硫黄ラジカルカチオンが効率的に産生されること、また生成した硫黄ラジカルカチオンは、C 末端のカルボキシルアニオンによって安定化されると同時に疎水性コアの形成により凝集が促進されることを強く示唆している。

- (2)  $A\beta$ 42 の毒性コンホマーを特異的に認識するモノクローナル抗体に関する研究成果は、特許申請のため後日公表する予定である。
- (3) 食品の機能成分を含む天然物を広く探索した結果、マリアアザミ種子のメタノール抽出物由来のフラボノイドであるタキシフォリンが、 $A\beta$ 42 の凝集を顕著に阻害することを見いだした。タキシフォリンのような *o*-hydroxyphenol 構造を有するフラボノイド類は、容易に酸化されて *o*-キノン体に変換されることが知られている。そこで過ヨウ素酸ナトリウムを用いて  $A\beta$ 42 存在下タキシフォリンを酸化し、凝集阻害活性を評価したところ、酸化剤の濃度依存的にタキシフォリンによる  $A\beta$ 42 凝集阻害活性が顕著に上昇することが明らかになった。さらにフェニレン

ジアミンによって  $\alpha$ -キノン体を捕捉することにも成功した。本結果はこの  $\alpha$ -キノン体が A $\beta$ 42 の求核性アミノ酸残基と不可逆的に結合することにより、A $\beta$ 42 の凝集を阻害している可能性を示唆している。

### 3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

[理由] 上述したように、本研究は3年間で当初の研究計画(1)~(3)をほぼ達成し、更なる発展が期待できる。A $\beta$ 42 は凝集するとアミロイド線維を形成するが、最近この線維よりも凝集中間体であるオリゴマー(3~12量体)が神経細胞毒性を示す本体である可能性が指摘され、本オリゴマーによるシナプス機能障害がADの原因と考えられるようになった。本研究で明らかになったA $\beta$ 42の「毒性コンホメーション」は、本オリゴマーの基本構成単位と考えられ、ADの治療薬を開発する上で意義深いものと考えている。

### 4. 今後の研究の推進方策

- (1) A $\beta$ 42の毒性を示すオリゴマーが何量体であるかということ、光アフィニティーラベリングなどの化学的手法を駆使して明らかにする。
- (2) A $\beta$ 42の毒性コンホマーを特異的に認識するモノクローナル抗体のAD診断への応用を検討する。
- (3) 本研究によってA $\beta$ 42凝集阻害が見いだされたタキシフォリンのA $\beta$ 42における結合部位を、MS-MS分析によって明らかにする。さらにその結果に基づいて、新しい凝集阻害剤を設計・合成する。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線) \*Corresponding author

[雑誌論文] (計8件)

- (1) Y. Masuda, (他3名, 2-4番目), K. Takegoshi, T. Shimizu, T. Shirasawa, \*K. Irie, Identification of Physiological and Toxic Conformations in A $\beta$ 42 Aggregates. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 287-295. (査読有)
- (2) \*入江一浩, 増田裕一,  $\beta$ アミロイドの毒性コンホメーション. *化学と生物* **2008**, *46*, 431-434. (査読有)
- (3) Y. Masuda, (他2名, 2-3番目), K. Takegoshi, T. Shimizu, T. Shirasawa, \*K. Irie, Verification of the Intermolecular Parallel  $\beta$ -sheet in E22K-A $\beta$ 42 Aggregates by Solid-state NMR Using Rotational Resonance: Implications for the Supramolecular Arrangement of the Toxic Conformer of A $\beta$ 42. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 2170-2175. (査読有, 日本農芸化学会2008年度BBB論文賞受賞)

- (4) K. Murakami, H. Hara, Y. Masuda, H. Ohigashi, \*K. Irie, Distance Measurement between Tyr-10 and Met-35 in Amyloid  $\beta$  by Site-directed Spin Labeling ESR: Implications for the Stronger Neurotoxicity of A $\beta$ 42 than A $\beta$ 40. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2308-2314. (査読有)
- (5) \*K. Irie, K. Murakami, (他5名, 3-7番目), K. Takegoshi, H. Fukuda, M. Nagao, T. Shimizu, T. Shirasawa, The Toxic Conformation of the 42-residue Amyloid  $\beta$  Peptide and Its Relevance to Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1001-1008. (査読有)

[学会発表] (計36件)

- (1) 入江一浩: 固体NMR及びESRによる $\beta$ アミロイドの立体構造と神経細胞毒性発現機構の解析, 理研シンポジウム「第9回分析・解析技術と化学の最先端」, 平成20年12月9日, 埼玉。
- (2) Kazuhiro Irie: Verification of the intermolecular parallel  $\beta$ -sheet in E22K-A $\beta$ 42 (Italian) aggregates by solid-state NMR using rotational resonance, 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, November 16, 2008, Washington D.C., USA.
- (3) 入江一浩:  $\beta$ アミロイドの立体構造解析と神経細胞毒性発現機構, 第43回天然物化学談話会, 平成20年7月12日, 大阪。
- (4) 入江一浩: アルツハイマー病因ペプチドの毒性コンホメーション, 2008年度日本農芸化学会大会, 平成20年3月29日, 名古屋。
- (5) Kazuhiro Irie: Toxic conformer of the 42-mer amyloid  $\beta$  (A $\beta$ 42), 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, November 6, 2007, San Diego, USA.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称:  $\beta$ アミロイド, 及びそれを用いたアルツハイマー病治療薬又は予防薬のスクリーニング方法

発明者: 入江一浩, 村上一馬, 大東 肇, 永尾雅哉, 白澤卓二, 清水孝彦

権利者: 同上

種類: 公開特許公報 (A)

番号: 特開 2006-265189 (P2006-265189A)

出願年月日: 平成17年3月24日

国内外の別: 国内