

平成 21 年 10 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (A)  
 研究期間：2006～2008  
 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

研究成果の概要:アルツハイマー病の原因物質である 42 残基のアミロイド  $\beta$  タンパク ( $A\beta_{42}$ ) の凝集体中に存在する複数のコンホマーのうち、22, 23 番目及び 38, 39 番目の 2 箇所にターン構造を有する「毒性コンホマー」が、ラジカル化を介した神経細胞毒性発現において重要であることを明らかにした。本結果に基づき、毒性コンホマーを特異的に認識・排除する抗体の作成を試みるとともに、 $A\beta_{42}$  の凝集を阻害する化合物を広く天然に求め、ポリフェノールの一つであるタキシフォリンに顕著な活性を認めた。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 19,200,000 | 5,760,000 | 24,960,000 |
| 2007年度 | 5,000,000  | 1,500,000 | 6,500,000  |
| 2008年度 | 5,000,000  | 1,500,000 | 6,500,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 29,200,000 | 8,760,000 | 37,960,000 |

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, ESR

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、神経変性疾患の一種であり、パーキンソン病やプリオン病などがその類似疾患として知られている。現時点で有効な治療法はほとんどなく、本疾患の発症メカニズムの解明ならびに根本的治療法の確立が強く望まれている。

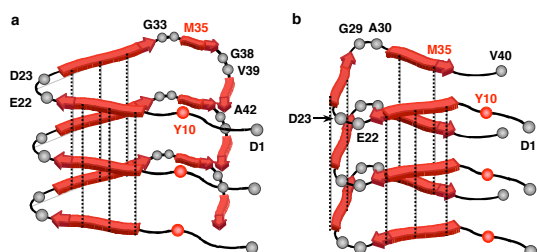
AD の原因物質であるアミロイド  $\beta$  タンパク ( $A\beta$ ) は、アミロイド前駆タンパク質の膜貫通部分がプロテアーゼによって切断されることにより産生される。 $A\beta$  には主とし

て、アミノ酸 42 残基の  $A\beta_{42}$  とその C 末端が 2 残基短い  $A\beta_{40}$  の 2 種類が存在する。これらのうち  $A\beta_{42}$  の過剰産生が、遺伝性のアルツハイマー病において共通に見られること、また  $A\beta_{42}$  の凝集能ならびに神経細胞毒性が特に高いことから、 $A\beta_{42}$  がアルツハイマー病の発症に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし本ペプチドは、C 末端側に嵩高い疎水性アミノ酸を連続して有するため合成難度が高く、また酸性条件下での精製が困難であるため、 $A\beta_{42}$  凝集体の立体

構造ならびに神経細胞毒性発現機構の解析はほとんどなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究代表者らは、A $\beta$ 42 を高収率かつ高純度で合成する方法を確立し、そのプロリン置換を網羅的に行なうことによって、A $\beta$ 42 の新しい凝集体モデルを提唱した (図 1a)。本研究は、本研究代表者らが提唱する A $\beta$ 42 の新しい凝集体モデルを、核磁気共鳴法 (NMR) および電子スピン共鳴法 (ESR) を駆使して精密化し、その結果に基づき、A $\beta$ 42 の凝集および神経細胞毒性を阻害する抗体や低分子化合物を設計・開発することを目的とした。アルツハイマー病は、治療と同時に予防することが急務の課題であることから、A $\beta$ 42 の凝集を阻害する低分子化合物としては、特に食品成分を含む天然有機化合物に注目した。



A $\beta$ 42: DAEFRHDSGY EVHHQKLVFV AEDVGSNKGAI IIGLMVGGVV IA

図 1 (a) 本研究代表者らの A $\beta$ 42 の凝集体モデル。  
(b) Williams らの A $\beta$ 40 の凝集体モデル。22, 23 番目におけるターン構造は共通であるが、C 末端の  $\beta$ -sheet 構造は、A $\beta$ 42 に特異的に見られるものであり、本構造が A $\beta$ 42 の高い神経細胞毒性の原因になっていると推定される。点線は分子間  $\beta$ -sheet 構造を示す。

## 3. 研究の方法

### (1) A $\beta$ 42 凝集体のターン部位の固体 NMR を用いた立体構造解析

本研究分担者である竹腰らが独自に開発した  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  二次元距離相関固体 NMR 法 (溶液 NMR における NOESY に相当) である DARR 法 ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar-assisted rotational resonance) を用いて解析した。特に、A $\beta$ 42 の凝集の鍵を握っていると推定された 22, 23 番目のターン構造に注目した。これらのターン構造それぞれにおいて、 $^{13}\text{C}$  でフルラベルした野生型 A $\beta$ 42 および凝集能が特に高い E22K-A $\beta$ 42 (Italian 変異) をそれぞれ合成し、DARR 法によって核間距離を測定した。次に、A $\beta$ 42 の高い凝集能の原因と考えられる C 末端のターン構造については、Met-35 と Ala-42 との空間距離を rotational resonance 法 (R2 法) で測定することにより解析した。

### (2) A $\beta$ 42 の ESR を用いた立体構造解析

$\beta$  アミロイドのような結晶化が困難な試料の場合、固体 NMR が有効な立体構造解析手段になっている。しかしながら、本法を用いて測定できる核間距離は最大 6 Å 程度までであり、それ以上の距離を測定する手段として、ESR が最近注目されている。ESR による構造解析は、結晶化および分子量の制限がなく、しかも長い距離 (5~15 Å) の測定ができることから、NMR による構造解析と相補的な方法と言える。

図 1 に示した A $\beta$ 42 の凝集体モデルにおいて最も重要な点は、22 及び 23 番目でターン構造をとることによって、A $\beta$ 42 の毒性発現において重要と考えられている Tyr-10 と Met-35 が空間的に近づくことである。このことを証明するため、10 番目及び 35 番目のアミノ酸残基をシステイン残基に改変し、それらを足がかりとしてスピンラベルを導入した。両スピンラベル間の双極子-双極子相互作用は、連続波およびパルス ESR により解析した。これらの測定は、ブルカーバイオスピンの原 英之氏にご協力いただいた。

### (3) A $\beta$ 42 の毒性コンホマーに見られる 22 及び 23 番目におけるターン構造を認識するモノクローナル抗体の作成

Glu-22 をプロリン置換することにより、22 及び 23 番目においてターン構造をとりやすくした E22P-A $\beta$ 10-35 の N 末端にシステイン残基を導入し、その SH 基を介して bovine thyroglobulin に結合させたものを抗原としてモノクローナル抗体を作成した。本モノクローナル抗体を使ってヒト AD 脳を免疫組織染色し、市販の N 末端抗体による染色結果と比較した。なお、AD 患者脳を用いた実験計画は、東京都健康長寿医療センター研究所・村山繁雄研究部長と本研究分担者である清水孝彦が連名で当研究所の倫理委員会に申請し、承認を得た研究計画である。

### (4) A $\beta$ 42 の凝集を阻害する低分子有機化合物の探索

食品の機能性成分を含む天然物 20 種 (hesperidin, quercetin, caffeine, rutin, gallic acid, 13-hydroxy-10-oxo-trans-11-octadecenoic acid, turmerone, zerumbone, luteolin, silymarin, genistein, ursolic acid, ferulic acid, vitamin C, tangeretin, benzyl isothiocyanate, bergamottin, 1'-acetoxychavicol acetate, nobiletin, curcumin) について、A $\beta$ 42 凝集阻害活性を、遠沈法 (遠心分離後、上清の HPLC による定量) ならびにチオフラビン-T 法 (Th-T 法) により評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Aβ42 凝集体のターン部位の固体 NMR を用いた立体構造解析

野生型 Aβ42 及び凝集能のきわめて高い変異体である E22K-Aβ42 (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コンホマーと 25 及び 26 番目にターン構造を有するコンホマーが存在すること、また C 末端の 38 及び 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。

22 及び 23 番目の側鎖間でラクタム環を形成させることによりターン構造を固定したアナログは、野生型 Aβ42 よりも顕著に高い凝集能及び神経細胞毒性を示した。一方、25 及び 26 番目においてターン構造を固定したアナログの凝集能及び神経細胞毒性は低かった。以上の結果より、22 及び 23 番目にターン構造を有するコンホマーが「毒性コンホマー」であると考えられた。また、E22K-Aβ42 では、Lys-22 と Asp-23 の静電的相互作用が、毒性コンホマーの割合を増大させているものと推定される。

##### (2) Aβ42 の ESR を用いた立体構造解析

Aβ42 の 10 番目と 35 番目にスピラベルを導入し、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。一方、凝集能ならびに神経細胞毒性の低い Aβ40 においては、これらの側鎖間の距離は約 30 Å であった。

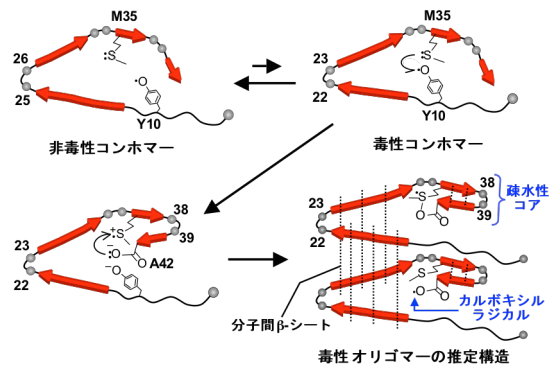


図2 ラジカル化を介した Aβ42 の凝集ならびに神経細胞毒性発現機構。

以上の結果と固体 NMR 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 (図 2)。これ

は、Aβ42 と Aβ40 の凝集能ならびに神経細胞毒性の違いを明快に説明できる初めてのモデルである。

##### (3) Aβ42 の毒性コンホマーに見られる 22, 23 番目におけるターン構造を認識するモノクローナル抗体の作成

E22P-Aβ10-35 をハプテンとして得られたモノクローナル抗体は、野生型 Aβ 及び E22P-Aβ42 を強く認識した一方で、22, 23 番目においてターン構造をとりにくい E22V-Aβ42 に対する結合能は低かった。また、Aβ の 18 ~ 22 番目のアミノ酸残基をエピトープとした市販の抗体 (4G8) は、E22P-Aβ42 を認識しなかった。以上の結果より、今回得られた抗体は、Aβ42 の 22, 23 番目付近のターン構造を認識している可能性が示唆された。本抗体は、4G8 抗体によって染色されない AD 脳の神経細胞内物質を染色することを見いだした。毒性コンホマーをハプテンとすることにより新しい抗体の開発につながる可能性を期待させる成果である。

##### (4) Aβ42 の凝集を阻害する低分子有機化合物の探索

スクリーニングの結果、マリアアザミに含まれるポリフェノール (silymarin) の一種であるタキシフォリンに顕著な Aβ42 凝集阻害活性と神経細胞毒性抑制活性を見いだした。タキシフォリンは、*o*-ヒドロキシフェノール構造を有し、容易に *o*-キノン体に酸化される。そこで、タキシフォリン酸化体の Aβ42 凝集阻害活性を調べることを目的として、タンパク質とはほとんど反応しないことが知られている酸化剤・NaIO<sub>4</sub> を用いて Aβ42 存在下タキシフォリンを酸化し、その凝集阻害活性を評価した。その結果、NaIO<sub>4</sub> の濃度依存的にタキシフォリンの Aβ42 凝集阻害活性が顕著に上昇することが明らかになった。一方、NaIO<sub>4</sub> 単独ではまったく Aβ42 の凝集を阻害しなかった。さらにフェニレンジアミンによって、*o*-キノン体を捕捉することにも成功した。

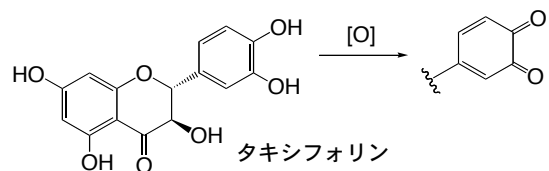


図3 タキシフォリン及びその酸化体の構造

以上の結果より、タキシフォリンの酸化によって生じた  $\sigma$ -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が示唆された。

#### 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) \*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) \*入江一造, 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) \*村上一馬, 清水孝彦, 白澤卓二, 入江一造, アミロイド  $\beta$  (A $\beta$ 42) の毒性コンホメーションの提唱. *基礎老化研究* **2008**, *32*, 25-29. (査読有, 第 31 回日本基礎老化学会奨励賞受賞総説)
- (5) K. Murakami, M. Uno, Y. Masuda, T. Shimizu, T. Shirasawa, \*K. Irie, Isomerization and/or racemization at Asp23 of A $\beta$ 42 do not increase its aggregative ability, neurotoxicity, and radical productivity *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *366*, 745-751. (査読有)
- (6) Y. Masuda, (他 3 名, 2-4 番目), K. Takegoshi, T. Shimizu, T. Shirasawa, \*K. Irie, Verification of the C-terminal intramolecular  $\beta$ -sheet in A $\beta$ 42 aggregates using solid-state NMR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3206-3210. (査読有)
- (7) 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)
- (8) \*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) 入江一造: 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) 入江一造:  $\beta$  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) 入江一造: 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.
- (6) 入江一造: 固体 NMR ならびに ESR によるアミロイド  $\beta$  (A $\beta$ 42) の毒性コンホメーションの解析, 第 49 回天然有機化合物討論会, 平成 19 年 9 月 19 日, 札幌.
- (7) 入江一造: アルツハイマー病因ペプチド (A $\beta$ 42) の神経細胞毒性発現機構, 東北薬科大学ハイテクリサーチセンター第 2 回シンポジウム, 平成 19 年 5 月 25 日, 仙台.
- (8) Kazuhiro Irie: Malignant conformation of the 42-mer amyloid  $\beta$  peptide, 2nd International Symposium on Biomolecules and Related Compounds, November 10, 2006, Kyoto, Japan.
- (9) Kazuma Murakami: Formation and stabilization mechanism of the  $\beta$ -amyloid radical, ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products, July 24, 2006, Kyoto, Japan. (IUPAC 天然物化学国際会議ポスター賞受賞)

[図書] (計 2 件)

- (1) Y. Masuda, (他 3 名), K. Takegoshi, \*K. Irie, Identification of toxic conformation in A $\beta$ 42 aggregates using solid-state NMR. In *Peptide*

*Science* 2008, M. Nomizu (Ed.), The Japanese Peptide Society. pp.25-28 (2009).  
(査読有, 第45回ペプチド討論会若手口頭発表優秀賞受賞)

- (2) K. Murakami, \*K. Irie, (他3名), T. Shimizu, T. Shirasawa, 'Malignant' conformation of Alzheimer's  $\beta$  peptide (A $\beta$ 42) through radical formation. In *Peptide Science 2006*, H. Ishida and H. Mihara (Eds.), The Japanese Peptide Society, pp.19-20 (2006). (査読有, 第43回ペプチド討論会&第4回ペプチド工学国際会議若手奨励賞受賞)

[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

[その他]

ホームページ等

<http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

竹腰 清乃理 (TAKEGOSHI KIYONORI)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 10206964

清水 孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号: 40301791

### (3) 連携研究者

なし