

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22603006

研究課題名（和文）

アミロイドβの毒性オリゴマー特異的な RNA アプタマーの開発

研究課題名（英文）

Development of RNA aptamer against toxic Aβ oligomer

研究代表者

村上 一馬 (MURAKAMI KAZUMA)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80571281

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の原因物質と考えられているアミロイドβ（Aβ）は、凝集することによって神経細胞毒性を示す。近年、準安定な凝集中間体であるオリゴマー（毒性ダイマー）が真の毒性本体として注目されている。これまでに、Aβの22、23番目におけるターン構造が、毒性ダイマー形成において重要であることを明らかにした。しかしながら、Aβは非常に凝集しやすいことから、Aβダイマーの合成は容易ではない。本研究では、Aβ40の毒性ダイマーを標的としたRNAアプタマーの開発を目的として、ジアミノピメリン酸をリンカーとして用いることによって、Ala30で架橋したE22P-Aβ40ダイマーを合成することに成功した。現在、本ダイマーを標的としたアプタマーの作製を行っている。

研究成果の概要（英文）：Amyloid β-protein (Aβ), a causative agent of Alzheimer's disease, aggregates and shows neurotoxicity. It has been well documented that Aβ oligomer (toxic dimer) is mostly related to the neurotoxicity. We have demonstrated that the formation of turn structure at position 22 and 23 plays a critical role in the oligomerization of Aβ. However, it is quite difficult to synthesize Aβ oligomer due to the potent ability of Aβ to aggregate. To develop RNA aptamer against toxic Aβ dimer, we synthesized Aβ40 dimer, in which Ala30 was substituted with diaminopimelic acid used as an intermolecular linker. The development of aptamer against Aβ40 dimer is under way.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：アルツハイマー病, アミロイドβ, 凝集, オリゴマー, アプタマー, RNA

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、認知症を引き起こす主要な疾患の一種であり、その発症メカニズムの解明とそれに基づく診断方法及び治療法の確立が急務となっている。脳内で産生されるアミロイドβ (Aβ) は、凝集することにより神経細胞毒性を示すこと、ならびに凝集中間体であるオリゴマーがシナプス毒性を示すことから、AβオリゴマーがADの毒性本体と考えられている。Aβには、40あるいは42残基からなるAβ40、Aβ42が存在し、Aβ42の方が強い凝集能と細胞毒性を示す。しかしながら、本ペプチドは合成難度が非常に高いため、Aβ42オリゴマーの構造及び毒性発現機構に関する研究はほとんど行われていなかった。

本研究代表者らは、Aβ42を高純度かつ高収率で合成する方法を確立し (Murakami, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 46179), Aβの系統的プロリン置換及び電子スピン共鳴法を用いた手法により、22, 23番目でのターン形成を特徴としたAβ42の毒性コンホマーに基づく新しい神経細胞毒性発現機構を提示した (図1: Murakami, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15168; *ChemBioChem* **2007**, 8, 2308)。

近年、ADの有望な治療法の一つとして、Aβに対するワクチン療法が注目されている。しかしながら、Aβ42を能動免疫した臨床第II相試験は重篤な脳内炎症が起きたために中止された (Orgogozo, J. M. *et al.*, *Neurology*, **2003**, 61, 46)。現在、臨床試験は再開されているが、慎重に進められている。

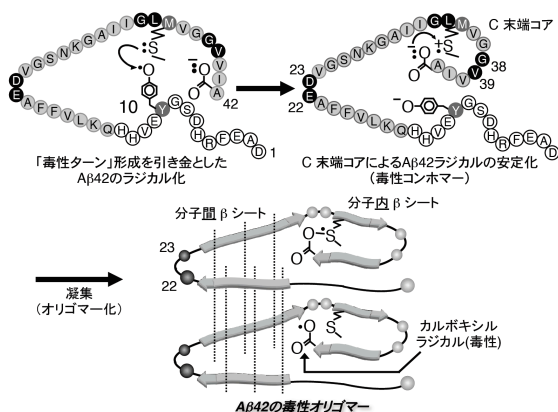


図1. Aβ42の神経細胞毒性発現機構とAβ42の「毒性オリゴマー」の推定構造

2. 研究の目的

本研究代表者らは、臨床試験で認められた副作用の原因について、Aβ42の生理的なコンホマー (22, 23番目にターンを形成しないAβ42)、ならびに毒性をもたないAβ42モノマーあるいは線維 (最終凝集体) が抗原として認識されたためと考えた。そこで、Aβ42の毒性コンホマーのみを選択的に除去することにより、副作用を軽減することを目的として、毒性コンホマーから生成する「毒性オリゴマー (ダイマー)」 (図1) を抗AD薬のターゲットにするという着想に至った。本研究は、Aβの毒性ダイマーを合成し、本ダイマーを標的として、RNAアプタマー¹⁾を開発することを目的とした。

¹⁾ RNAアプタマー: 抗体に代わる新しい薬剤として近年注目を集めている核酸分子。抗体は、RNAアプタマーと同様、標的に対して選択的な高い結合能をもつが、分子量が大きいため組織内に浸透しにくく、血中に長時間滞留しにくいという欠点がある。一方、RNAアプタマーの分子量は比較的小さく、生体内での不安定性は化学的な修飾で補えることから、抗体に代わる新しいツールとして期待されている。

3. 研究の方法

Aβ42は非常に高い凝集能を示すことから、アプタマー開発のためのAβ42ダイマーの大量供給は難しい。本研究では、以下に示す3種のアプローチによって、安定なAβダイマーの合成を試みた。

(1) 光架橋反応を用いたAβダイマー合成

Aβ42を光アフィニティーラベリングするため、22, 23番目のターン部位に近いLeu-17を光反応性のL-photo-leucine残基 (図2) に置換した誘導体を化学合成し、光照射により野生型Aβ42と架橋させた。L-Photo-leucineを光照射することにより得られるカルベンは反応性が高いことから、近傍のアミノ酸残基との特異的な架橋が期待される。HPLCによる反応液の精製後、MALDI-TOF-MSで解析した (以下、同様)。

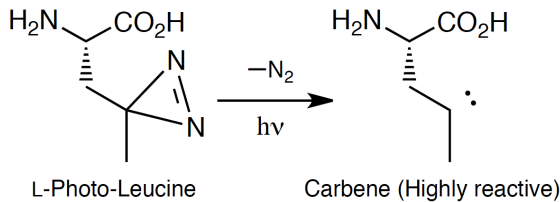


図 2. L-Photo-Leucine の光反応

(2) Huisgen 反応を用いた Aβ ダイマー合成

Huisgen [3+2] 環化反応 (図 3: クリックケミストリー) において, 架橋部位には凝集活性に影響の少ない Lys28 残基に着目した. アジドリジンならびに側鎖にプロパギル基をそれぞれ導入した Aβ42 変異体をそれぞれ合成し, 得られた 2 種類の Aβ42 変異体を, 炭酸水素ナトリウム溶液中, 銅イオン存在下で 1 時間反応させた.

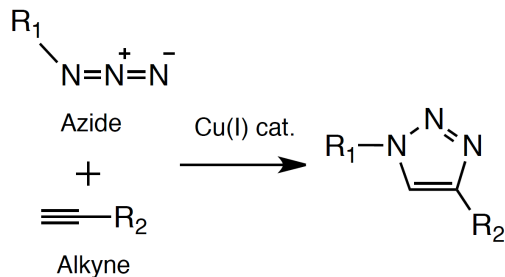


図 3. Huisgen [3+2] 環化反応

(3) ジアミノピメリン酸をリンカーとした Aβ ダイマー合成

毒性ダイマーを形成しやすい Aβ アナログとして, 22, 23 番目での毒性ターン構造を固定した E22P 変異をもつ Aβ 誘導体 (E22P-Aβ) を用いた. また凝集活性に影響のない Ala30 に着目し, ジアミノピメリン酸 (DAP) をリンカーとした架橋法を用いることで, A30(DAP)-Aβ の Fmoc 固相合成を行った. なお, 固相合成法は Aβ42 の合成法に準じた (Murakami, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 46179).

4. 研究成果

(1) 光架橋反応を用いた Aβ ダイマー合成

照射により Aβ42 誘導体と野生型 Aβ42 と架橋させるところ, 2 量体に相当するピークを MALDI-TOF-MS において観測したが, 痕跡量であった. 照射時間等の条件検討を行ったが, 架橋部位の同定のための MS-MS 解析に必要な収量は得られなかったため, 本方法は断念した.

(2) Huisgen 反応を用いた Aβ ダイマー合成

Lys28 残基で架橋した Aβ42 ダイマーを Huisgen 反応によって調製したが, 収率は十分とは言えず, さらに RNA アプタマーをセレクトする際のリン酸バッファー中で, 得られた Aβ42 ダイマーがきわめて短時間 (30 分以内) で凝集して線維 (フィブリル) 化してしまうことがわかったため, 本方法も断念した.

(3) ジアミノピメリン酸をリンカーとした Aβ ダイマー合成

そこで, 戦略を立て直し, Aβ42 の全長ではなく, 毒性発現に必要な部分配列の誘導体である E22P-Aβ10-35 を用いることにした. なお, これまでに本配列を用いて, Aβ42 の毒性オリゴマーを認識するモノクローナル抗体の作製に成功している (Murakami, K. *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 747).

Ala30 をジアミノピメリン酸で架橋して合成したところ, この場合でも凝集してしまっていたが, C 末端側に 1 残基伸ばした E22P-Aβ10-36 を用いてダイマーを合成したところ, 少なくとも 4 時間以上, リン酸バッファー中で安定であることがわかった. そこで, 全長での合成を試みたが, 凝集活性が高い Aβ42 ではダイマー合成あるいは精製が困難であった. 次に, Aβ42 に比べて活性は低い Aβ 全体の約 9 割を占める Aβ40 を用いて, 同様の反応を行った結果, Aβ40 ダイマーを高純度かつ高収率で得ることに成功した.

現在, ダイマーのリン酸バッファー中での安定性を調べるとともに, 核酸アプタマーの取得のためのライブラリーの作製を終えたところであり, 今後の展開が期待される.

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)

なし

[学会発表] (計 0 件)

なし

[その他]

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ホームページ
<http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

京都大学教育研究活動データベース
<http://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/zP8kX>

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・助教
研究者番号：80571281

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

清水 孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・客員准教授
研究者番号：40301791