β アミロイドの 毒性コンホメーション

アルツハイマー病 (AD) は、認知症をひき起こす主要な疾患の一つであり、その詳細な発症メカニズムの解明とそれに基づく予防法および治療法の確立が急務の課題となっている。AD の病理学的特徴の一つは、β アミロイド (Aβ) と呼ばれるペプチドが脳内に沈着して老人斑が形成されることである。Aβ は凝集することにより神経細胞を死滅させることから、Aβ の凝集が AD の病因であるというアミロイド仮説が広く受け入れられている (図 1-A)。Aβ 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りだされることにより産生される。Aβ には主として、アミノ酸 42 残基の Aβ42

とその C 末端が 2 残基短い Aβ40 の 2 種類存在し、Aβ42 の凝集能ならびに神経細胞毒性が特に高い。したがって、Aβ42 の凝集ならびに毒性発現機構の解明が強く望まれている。

Aβ 凝集体は単結晶ではないので、X 線結晶構造解析が適用できない。また、水中での溶解度が低く、短時間で凝集するため、溶液 NMR による解析も困難である。これまで、X 線回折法、赤外分光法などによる構造解析によって、Aβ 凝集体は主として分子間 β-シート構造を形成していることが明らかにされている。さらに最近、固体 NMR 法による Aβ 凝集体の解析結果に基づいて、

図 1 ■ アミロイド仮説 (A)
(B) は Aβ42 とプリオンタンパク質 (PrP) のアミノ酸配列を示す。下線のついたアミノ酸は、ターンを形成しやすい部位を示す。

図2 ■ 系統的なプロリン置換による Aβ42 の二次構造解析

各プロリン置換体 25 μM をリン酸緩衝液中 (pH 7.4), 37°C, 120 時間インキュベーション後の単量体濃度を示す。

中央部分 (Glu-22~Lys-28) にターン構造を有し、その前後の領域で分子間平行β-シートを形成する凝集体モデルが提示された⁽¹⁾。しかし、Aβ凝集体の立体構造と神経細胞毒性との関連については不明な点が多い。筆者らは過去7年間にわたって、Aβ42の凝集ならびに毒性発現機構に関する研究を、有機化学的視点から行ってきた^(2,3)。本稿ではこれらの研究成果について紹介する。

系統的なプロリン置換によるAβ42凝集体の二次構造解析

一般に、ペプチドの立体構造と活性との関係調べるためには、系統的なアミノ酸置換が有効である。特に系統的プロリン置換は、β-シート構造とそれ以外の立体構造を区別することができ、Aβ42の解析に最も適した方法と考えられた。しかし、Aβ42にはC末端にかき高い疎水性アミノ酸残基が連続して存在するため (図1-B)、その合成の難度は高いものであった。筆者らは、70残基程度のペプチドを、フラグメント縮合を用いることなく一度に合成する方法を、プロテインキナーゼCの構造機能解析を通じて確立していた⁽⁴⁾ので、その方法を用いて、短期間にAβ42の系統的プロリン置換を行なうことができた。

一連のプロリン置換体が単量体と凝集体との間で平衡に達したときの臨界濃度を測定し、それぞれの凝集体の熱力学的安定性を調べた。その結果、E22P-Aβ42, D23P-Aβ42, G25P-Aβ42 および S26P-Aβ42 は、その他の中央部位のプロリン置換体と比べて顕著に安定な凝集体を形成していた (図2)。これより、Aβ42凝集体には、22, 23番目のアミノ酸残基付近にターン構造を有するコンホマーと、25, 26番目のアミノ酸残基付近にターン構造を有するコンホマーの2種類が含まれていることが示唆された。遺伝性の家族性AD (Dutch, Italian, Arctic, Iowa 家系) の変異は22, 23番目に集中していることから (図1-B)、本部位におけるターン構造の形成が凝集ならびに毒性発現に関連していることが予想された。

固体 NMR によるターン構造の検証と毒性コンホマーの同定

上記のターン構造が実際にAβ42凝集体に存在するかどうかを調べる目的で、固体NMRによる構造解析を行った。野生型Aβ42とともに凝集能がきわめて高いE22K-Aβ42 (Italian型) の21~27番目のアミノ酸残基を¹³Cおよび¹⁵N標識し、共同研究者の竹腰教授 (京大院理) らによって開発されたDARR (¹³C-¹H dipolar-assisted rotational resonance) 法⁽⁵⁾によって炭素間距離を測定した。DARR法は、溶液NMRでの核オーバーハウザー効果 (NOE) を用いた¹H-¹Hの距離相関NMR (NOESY) に対応する固体NMR法であり、¹³C-¹³C二次元距離相関NMRを実現するものである。測定の結果、Asp-23およびGly-25にそれぞれ2組のシグナルが観測され、野生型およびItalian型両凝集体において、2種類のコンホマーが存在することが明らかになった。DARR法による詳細な構造解析ならびに化学シフト値に基づく2次構造予測によって、22, 23番目と25, 26番目にそれぞれターン構造を有する2つのコンホメーションの存在が判明した (図3-A~C)。興味深いことに、2つのコンホマーの存在比は野生型およびItalian型で異なっており (野生型1.5:1, Italian型1.1:1)、Italian型では野生型に比べて22, 23番目にターン構造を有するコンホマーが多く存在していた。これは、Glu-22がLysに置換されたItalian型では、Lys-22とAsp-23との間の静電的相互作用により、本部位におけるターン形成が促進されるためと考えられる (図3-C)。

次に、これらの2種類のコンホマーのどちらが神経細胞毒性発現に寄与しているかを調べる目的で、22, 23番目のアミノ酸残基の側鎖間をアミド結合で連結することにより、Italian型の静電的相互作用 (図3-C) を模倣した配座固定アナログ [Aβ42-lactam(22K-23E)] を合成した。25, 26番目におけるターン構造の固定アナログも同様に合成した [Aβ42-lactam(25K-26E)]。Aβ42-lactam(22K-23E) は野生型Aβ42よりもはるかに速く凝集し、

図3 ■ 固体 NMR により同定された Aβ42 凝集体の立体構造モデル (A) 野生型 Aβ42 の生理的コンホマー, (B) 野生型 Aβ42 の毒性コンホマー, (C) E22K-Aβ42 の毒性コンホマー

PC12 細胞に対して顕著に高い毒性を示した (IC_{50} : 36 nM; 野生型では 140 nM). 一方で, Aβ42-lactam(25K-26 E) の凝集速度は E22K-Aβ42 よりも低く, 神経細胞毒性も弱かった (IC_{50} : 1,900 nM). 以上の事実, 22, 23 番目にターン構造を有するコンホマーが, 凝集能ならびに神経細胞毒性の高い「毒性コンホマー」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を強く示唆している.

● ラジカル化を介した神経細胞毒性発現機構

Aβ の神経細胞毒性発現機構の一つとして, ラジカル産生による酸化ストレスが注目されている^(6,7). 銅などの金属イオンが N 末端領域の His 残基 (His-6, 13, 14) に配位し, 還元剤存在下で $O_2^{\cdot -}$ から産生される過酸化水素と Tyr-10 のフェノキシラジカルとともに, Met-35 の硫黄原子のラジカル化が毒性発現に重要と考えられていた. 特に, Met-35 の硫黄原子のラジカルカチオンは, 神経細胞毒性をもたらすラジカル種であることが指摘されていたが, その生成機構は不明であった. 毒性コンホマーでは, 22, 23 番目におけるターン構造の形成により Tyr-10 と Met-35 が空間的に近づくことから, 金属イオン存在下におけるこれらのアミノ酸残基の相互作用によって Met-35 の硫黄原子が酸化され, 硫黄ラジカルカチオンが効率的に産生されるものと考えられた (図 4). この仮説を検証する目的で, Aβ42 の 10 番目と 35 番目

のアミノ酸残基にスピンラベルを導入し, これらの空間距離を電子スピン共鳴法により測定した結果, 両残基はラジカル反応が十分起こりうる 15Å 以下の距離にあることが判明した⁽⁸⁾. さらに, Tyr-10 および Met-35 をそれぞれ Phe-10 および *nor*-Val-35 に置換した Aβ42 の凝集能, 神経細胞毒性, ラジカル産生能が野生型 Aβ42 と比べて顕著に低下することも確認している⁽⁹⁾.

ところで, 一般に硫黄ラジカルカチオンは寿命が短く, 拡散が律速となる細胞内では, 何らかの機構で安定化されない限り毒性を発現しにくい⁽⁷⁾. 筆者らは, Aβ42 の系統的なプロリン置換によって, C 末端部分には 2 つの β-シート領域 (35~37 および 40~42 番目) が存在することを明らかにしている (図 2). もしこれが分子内の逆平行 β-シートならば, 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可能性がある (図 4).

そこで, C 末端をアミド型にした Aβ42 変異体を合成し, そのラジカル産生能および細胞毒性を調べたところ, いずれも野生型に比べて顕著に低下した⁽⁹⁾. また, G38P-Aβ42 のラジカル生成能は野生型に比べて顕著に増大したのに対して, A42P-Aβ42 は野生型を下回った. これらの事実から, 38, 39 番目付近にターンを有する分子内 β-シートの形成により Met-35 に接近した C 末端カルボキシルアニオンが, 硫黄ラジカルカチオンの安定化に重要な役割を果たしていることが強く示唆された. 本反応により C 末端領域の電荷が消失するため, 凝集しや

図4 ■ ラジカル化を介した Aβ42 の神経細胞毒性発現機構 (毒性コンホメーションモデル)

すくなり、凝集体は、平衡反応によってラジカルを持続的に放出することによって、酸化ストレスを示すものと思われる。筆者らが提唱する毒性コンホメーションモデル（図4）は、A β 42の立体構造変化がラジカル産生、そして凝集、毒性をひき起こすという一連の流れを網羅的かつ明快に説明するものである。Williamsらは系統的なプロリン置換により、A β 40凝集体のC末端領域は β -シート構造を形成していないことを報告している。したがって、A β 42の凝集能および神経細胞毒性がA β 40に比べてはるかに高い原因は、C末端領域における β -シート構造の有無であると考えられる。

最近、アミロイド線維よりも凝集中間体のオリゴマーが神経細胞毒性を示す本体である可能性が指摘されている⁽¹⁰⁾。実際、毒性コンホメーション固定アナログであるA β 42-lactam (22K-23E)は、野生型A β 42と比べてオリゴマー（3および4量体）の存在量が顕著に高い。A β オリゴマーは、細胞膜に作用してカルシウムチャンネルを阻害している可能性も指摘されており、その毒性発現機構に興味をもたれる。

おわりに

以上に述べたように、ADの原因物質であるA β 42は、22, 23番目および38, 39番目においてターン構造をとることによって、安定なラジカルを形成するとともに凝集し、毒性をもったオリゴマーとなることが明らかになった。したがって、これらのターン構造を特異的に認識して排除する抗体は、ADの新しい治療薬になる可能性がある。1999年にSchenkらによってA β の免疫療法が提唱されたが、臨床試験中に重篤な脳内炎症という副作用のあることがわかり、さらなる臨床試験は中止されている。本免疫療法で作製された抗体は、ランダム構造をとるA β のN末端領域を認識していたことから、すべてのA β をクリアランスすることができ、そのことが逆に副作用をひき起こしたものと考えられる。A β 42の生理的なコンホマー（図3-A）との免疫反応を最小限に抑え、毒性コンホマー（図3-B, C）を特異的に認識する抗体は、副作用の少ないAD治療薬になる可能性が期待される。

一方で、カレー粉に含まれるクルクミンや食品中のフラボノイド類がA β の凝集を阻害することが報告されている。ADは治療よりも予防が重要と考えられることから、食品によるADの予防は魅力的な戦略である。そのためには、これらの化合物の阻害機構を精密に解析する必要がある。特に固体NMRは、低分子化合物の凝集阻

害機構を明らかにする上で最も有効と考えられ、現在研究を進めている。

ADと類似の疾患として、プリオン病およびパーキンソン病などが知られている。プリオン病は、プリオンタンパク質（PrP）の凝集による神経細胞死を特徴としているが、最近、PrPとA β との構造上の共通性が指摘されている⁽¹¹⁾。たとえば、A β , PrPともに金属イオン配位部位としてのヒスチジン残基、膜貫通部位であるGxxxGモチーフ、ラジカル産生に関わるメチオニンおよびチロシン残基を有していることなどである（図1-B）。特筆すべきことは、A β の毒性発現に必須のメチオニン残基が、プリオン病においてもきわめて重要と考えられている点である。家族性プリオン病の一つであるゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群において見られる約7 kDのアミロイドフラグメント（～88 to ～146）のC末端においても、A β 42と同様のターン構造が予想され、メチオニンの硫黄ラジカルカチオンの安定化が起こっている可能性が考えられる。筆者らが提唱するA β 42のラジカル化を介した毒性発現メカニズムは、PrPの毒性発現機構に関してヒントを与えるものである。

- 1) R. Tycko: *Q. Rev. Biophys.*, **39**, 1 (2006).
- 2) K. Irie *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 437 (2005).
- 3) K. Irie *et al.*: *Mini-Rev. Med. Chem.*, **7**, 1001 (2007).
- 4) K. Irie *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9159 (1998).
- 5) K. Takegoshi *et al.*: *J. Chem. Phys.*, **118**, 2325 (2003).
- 6) K. J. Barnham *et al.*: *Nature Rev. Drug Discov.*, **3**, 205 (2004).
- 7) D. A. Butterfield *et al.*: *Neurobiol. Aging*, **23**, 655 (2002).
- 8) K. Murakami *et al.*: *ChemBioChem*, **8**, 2308 (2007).
- 9) K. Murakami *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15168 (2005).
- 10) C. Haass & D. J. Selkoe: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 101 (2007).
- 11) K. J. Barnham *et al.*: *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 465 (2006).

（入江一浩，増田裕一，京都大学大学院農学研究科）