

26. Aβ 毒性コンホマーの細胞内標的タンパク質

村上 一馬

Key words: アルツハイマー病, アミロイド β, オリゴマー, 標的探索, 神経細胞毒性

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

緒言

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 (Aβ42) は、2 あるいは 3 量体を基本単位としてオリゴマー化 (図 1b: 2-24 量体, 2 × *n*-mer or 3 × *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 (オリゴマー仮説)¹⁾. 近年、毒性本体である Aβ42 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ている (図 1b). しかしながら、現在進行中の臨床試験の多くは、細胞外の Aβ 凝集体 (老人斑: 100 量体以上) 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²⁾. 近年、本研究者は、Aβ42 の Glu22, Asp23 付近でのターン構造をもつ「毒性コンホマー」(図 2)³⁾ に対するモノクローナル抗体 (クローン名 11A1: 米国および中国で特許取得, 免疫生物研究所より販売中) 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^{4,5)}. また、毒性コンホマーは図 2 に示す凝集過程を経てフリーラジカルを産生することを明らかにしている. しかしながら、毒性コンホマーが誘導する酸化ストレスだけでは、Aβ42 の細胞毒性を十分に説明できない. 本研究では、「毒性コンホマー」という新しい切り口から細胞内結合タンパク質を同定することによって、毒性オリゴマーの作用機序に関する知見を得ることを目的としている.

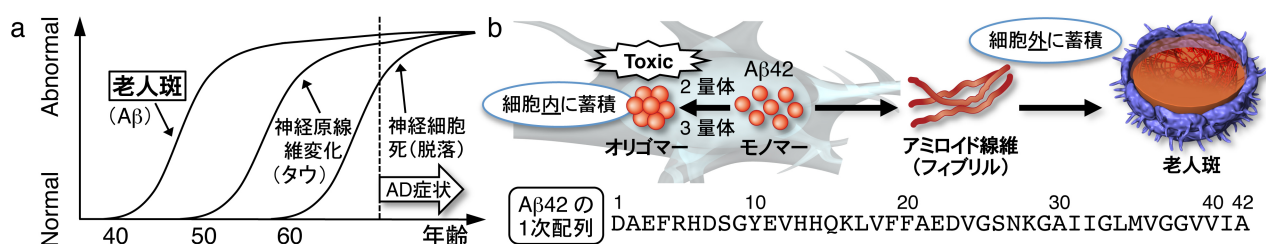


図 1. アルツハイマー病とオリゴマー仮説.

a) AD 病理の特徴と年齢の関係. b) オリゴマー仮説における Aβ42 の凝集過程 (毒性本体はオリゴマー).

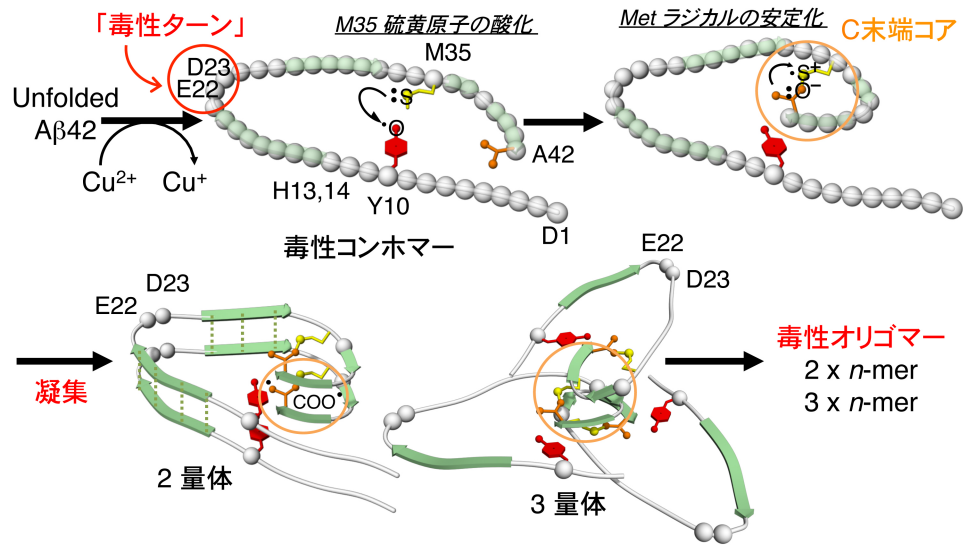


図2. Aβ42の神経細胞毒性発現機構と毒性オリゴマーの推定構造.

Aβ42は、22位付近における「毒性ターン」形成を引き金として、Aβ42のラジカル化に重要とされる Tyr10と Met35が相互作用しやすくなった結果、Met側鎖の硫黄原子がラジカル化される。生成したMetラジカルは、分子内βシートを介して安定化される。その結果、C末端コアを核として凝集が進行する一方、一部解離したカルボキシルラジカルが持続的に細胞毒性を示す。毒性コンホマーは、折り重なった2量体構造、プロペラ状の3量体構造を経て、毒性オリゴマーを形成するものと推定される。

方法および結果

1. 毒性 Aβ42 プローブの合成と活性評価

標的探索の戦略として、従来法の多くは、固相担体に Aβ40 (Aβ42 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⁶⁾、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 Aβ42 での実験例もなかった。そこで本研究では、合成した Aβ42 プローブと細胞抽出液を液相で反応させた後、固相担体を用いて結合分子を回収する方法をとることにした。まず Aβ42 の毒性コンホマー (図2: 毒性 Aβ42) のミミックとして、毒性ターン構造を形成しやすい E22P-Aβ42⁷⁾ を用いて、N 末端 (Asp1) をビオチン標識することで毒性 Aβ42 プローブ (図3) を得た。

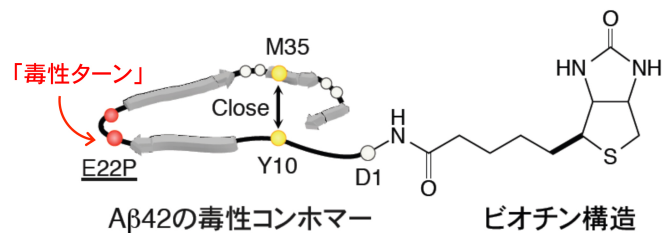


図3. 毒性 Aβ42 プローブの構造.

次に、ビオチン化による E22P-A β 42 の凝集能および神経細胞毒性への影響を評価するために、凝集能をチオフラビン T 蛍光法によって、神経細胞毒性をヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞) を用いた MTT 試験によって、それぞれ調べた。その結果、ビオチン化 E22P-A β 42 の凝集能ならびに神経細胞毒性は、E22P-A β 42 とほぼ同等であり、ビオチン化による影響はほとんどないことがわかった (図 4)。

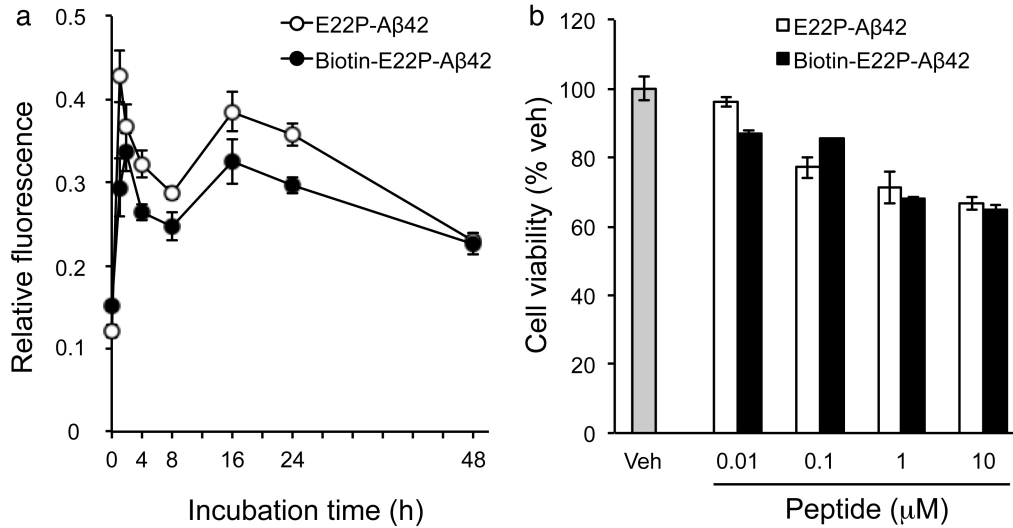


図 4. N 末端ビオチン化による E22P-A β 42 の凝集能および神経細胞毒性への影響。

a) A β (25 μ M) 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 β (0.01-10 μ M) 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 処理群の生存率を 100% とした。Veh = Vehicle. $n = 3$ 。

2. 毒性 A β 42 の細胞内標的タンパク質の探索

A β 42 は疎水性が高いペプチドであることから、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。また、A β 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もいくつかある。Laurén らは A β 42 オリゴマーの結合分子として、脂質ラフトと会合した細胞膜糖タンパク質であるプリオンを報告したが⁸⁾、シナプス毒性発現への関与を否定する報告⁹⁾が相次ぐなど、問題点も多い。そこで、本研究では SH-SY5Y 細胞の膜成分を除去した細胞質画分を用いることにした。

固相担体には、半田ら (東工大) が開発した機能性ナノ磁性微粒子 (FG ビーズ) をアビジン化したものを用いた。毒性 A β 42 プローブと細胞質画分を 4°C で 2 時間インキュベーションした後、アビジン化 FG ビーズを加えて標的候補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。続いて、電気泳動・銀染色を行うとともに、E22P-A β 42 を過剰量加えることによる競合実験も併せて行った結果、プローブに特異的な標的バンド (20 kDa, 40 kDa 及び 100 kDa 付近) を複数検出した (図 5)。バンド①から③は、E22P-A β 42 によって競争的に阻害されたことから、毒性 A β 42 を認識していると考えられる。一方、バンド④は E22P-A β 42 の添加によって、バンド強度が増大したことから、④は E22P-A β 42 の凝集体を認識している可能性がある。現在、これらのバンドを脱染色した酵素消化反応液について、MALDI-TOF-MS/MS 測定により、標的タンパク質の解析を進めている。

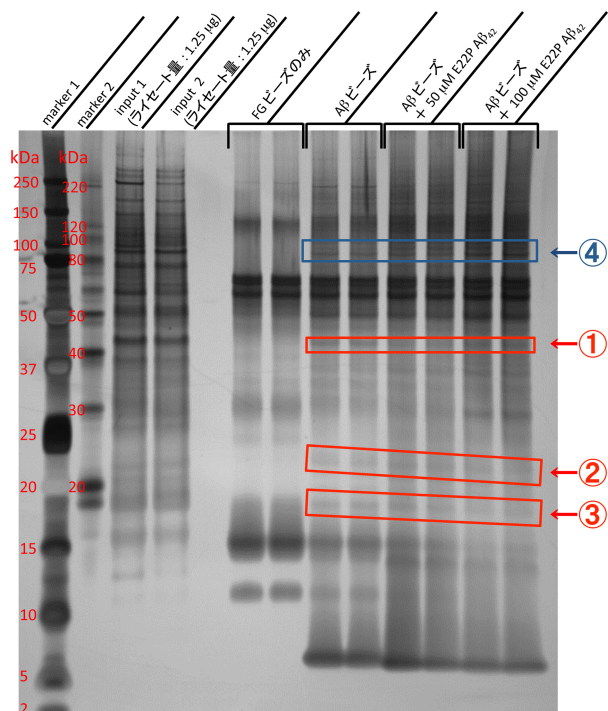


図5. 電気泳動・銀染色法を用いた細胞質画分における毒性 Aβ42 の標的探索.

毒性 Aβ42 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 10% Bis-Tris ゲル) を行った. 泳動後, SilverQuest を用いて銀染色を行った. 実験は, それぞれ 2 連で行った.

3. Aβ42 の神経細胞内への取り込み

これまで Aβ42 の神経細胞内への取り込みについて, 経時的な定量実験はあまり行われておらず, 顕微鏡観察を中心とした報告が多い. そこで, 予備実験として野生型 Aβ42 を SH-SY5Y 細胞に添加し, 経時的に細胞質抽出液を調製した後, Aβ量を ELISA 法で定量した. その結果, 1 ~ 4 時間の間に野生型 Aβ42 が速やかに細胞内に取り込まれることが明らかになった (図6). 今後, 毒性コンホマーと細胞内取り込みとの関係を明らかにするために, E22P-Aβ42 ならびに毒性ターンをとりにくい E22V-Aβ42 を用いた検討が必要である.

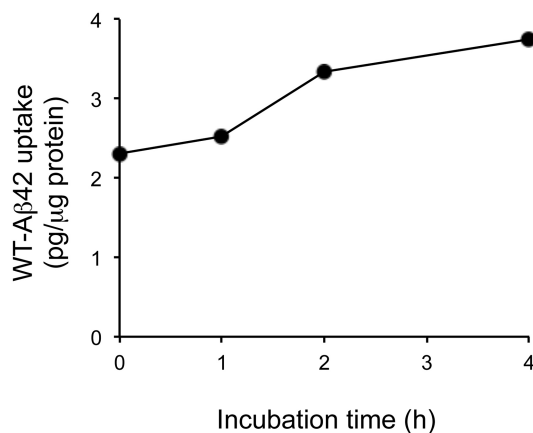


図6. 野生型 Aβ42 の細胞内取り込み.

野生型 Aβ42 (25 μM) を SH-SY5Y 細胞 (10⁵ cells/well) に添加した後, 経時的に細胞質抽出液を調製した. なお, 細胞質成分の抽出には, 界面活性剤として 0.05% NP-40 を含むトリス塩酸バッファーを用いた. タンパク質定量を行った後, 抽出液に含まれる全 Aβ量を ELISA (IBL 社 No. 27729) で定量した. n = 1.

考 察

図5の標的探索の結果、推定される分子量の大きさから、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(図7)。また、E22P-A β 42はオリゴマー化しやすいことから、「毒性オリゴマー」形成は細胞内に取り込まれ、毒性を発現するために必要であることが示唆された。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¹⁰、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。

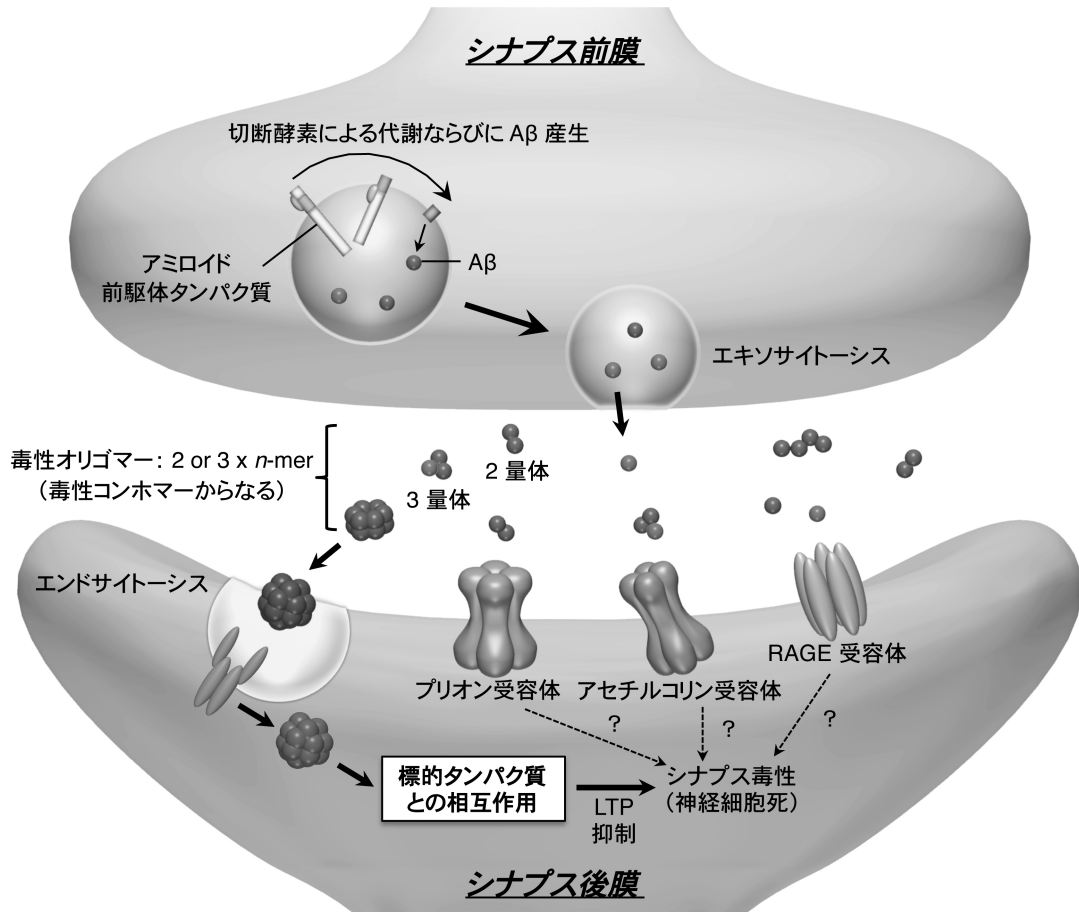


図7. シナプスにおけるA β オリゴマーの形成機序と細胞内動態の推定経路。

A β 42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、A β 42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いくつか知られている⁸⁾。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院農学研究科の入江一浩、徳田真樹、花木瑞穂である。

文 献

- 1) Murakami, K. : Conformation-specific antibodies to target amyloid β oligomers and their application to immunotherapy for Alzheimer's disease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78** : 1293-1305, 2014.
- 2) Gravitz, L. : Drugs: a tangled web of targets. *Nature*, **475** : S9-11, 2011.
- 3) Murakami, K., Irie, K., Ohigashi, H., Hara, H., Nagao, M., Shimizu, T. & Shirasawa, T. : Formation and stabilization model of the 42-mer A β radical: implications for the long-lasting oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Am. Chem. Soc.*, **127** : 15168-15174, 2005.
- 4) Murakami, K., Horikoshi-Sakuraba, Y., Murata, N., Noda, Y., Masuda, Y., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Shirasawa, T., Shimizu, T. & Irie, K. : Monoclonal antibody against the turn of the 42-residue amyloid β protein at positions 22 and 23. *ACS Chem. Neurosci.*, **1** : 747-756, 2010.
- 5) Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, K., Takahashi, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Watanabe, K., Kadoya, C., Nakano, R., Watanabe, D., Maruyama, K., Hori, O., Hibino, S., Choshi, T., Nakahata, T., Hioki, H., Kaneko, T., Naitoh, M., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Hata, R., Ueno, S., Seki, T., Kobayashi, K., Toda, T., Murakami, K., Irie, K., Klein, W. L., Mori, H., Asada, T., Takahashi, R., Iwata, N., Yamanaka, S. & Inoue, H. : Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*, **12** : 487-496, 2013.
- 6) Calero, M., Rostagno, A. & Ghiso, J. : Search for amyloid-binding proteins by affinity chromatography. *Methods Mol. Biol.*, **849** : 213-223, 2012.
- 7) Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T. & Shirasawa, T. : Neurotoxicity and physicochemical properties of A β mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, **278** : 46179-46187, 2003.
- 8) Lauren, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W. & Strittmatter, S. M. : Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers. *Nature*, **457** : 1128-1132, 2009.
- 9) Kessels, H. W., Nguyen, L. N., Nabavi, S. & Malinow, R. : The prion protein as a receptor for amyloid- β . *Nature*, **466** : E3-4, 2010.
- 10) Murakami, K., Murata, N., Noda, Y., Tahara, S., Kaneko, T., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Barnham, K. J., Irie, K., Shirasawa, T. & Shimizu, T. : SOD1 (Copper/Zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.*, **286** : 44557-44568, 2011.