

トピックス

NMR から見たアミロイド β ペプチドの線維化機構解析廣明秀^{1,2}¹ 東海国立大学機構名古屋大学・大学院創薬科学研究科・構造分子薬理学分野² 合同会社 BeCellBar

1. アミロイド仮説と修正アミロイド仮説

2021年6月に、アミロイド β ペプチド ($A\beta$) の可溶性オリゴマーに結合する組換え型ヒト IgG 抗体医薬品 アデュカヌマブが、米国食品医薬品局 (FDA) によりアルツハイマー型認知症 (Alzheimer's dementia, AD) 治療薬として認可された。これまで多くの抗 $A\beta$ 抗体の医薬品開発が失敗したなか、1:10,000 の特異性で $A\beta$ 単量体よりも可溶性オリゴマーに結合するアデュカヌマブの承認は快挙と言える。その結果、AD 発症原因ないし創薬標的としての $A\beta$ オリゴマーならびにアミロイド線維の構造多型性が改めて注目されつつある。

AD はアロイス・アルツハイマーが 1906 年にドイツで報告した進行性の認知症で、大脳皮質における神経細胞の減少、大脳の萎縮と老人斑と呼ばれるシミ様の沈着斑、神経細胞内の神経原線維の蓄積、などの所見を特徴としている。このうち老人斑からはアミロイド線維と呼ばれる $A\beta$ の不溶性凝集体が発見された。 $A\beta$ は 40 または 42 アミノ酸 (それぞれ $A\beta(1-40)$, $A\beta(1-42)$ と記載する) の凝集性の高いペプチドである。シナプス形成・修復に関わるアミロイド前駆体タンパク質 APP からプロセッシングにより切り出されてくる。なお $A\beta(1-40)$ が形成する溶解度の低い凝集体は、脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy, CAA) という脳内毛細血管の出血、脳梗塞や白質脳症を伴う疾病の原因分子でもある。AD と CAA のいずれにおいても、アミロイド線維と呼ばれる繊維状の凝集体を含む $A\beta$ の多量体の形成が、病気の発症、進行や重篤性に関わっているとされていた。これが初期のアミロイド仮説である。いくつかの家族性 AD の家系から APP 遺伝子の変異が発見されたこともあり、この仮説には一定の説得力があった。

しかし試験管内の $A\beta$ 研究が進むにつれ、形成されたアミロイド線維の溶解度が低く血流中に拡散しにく

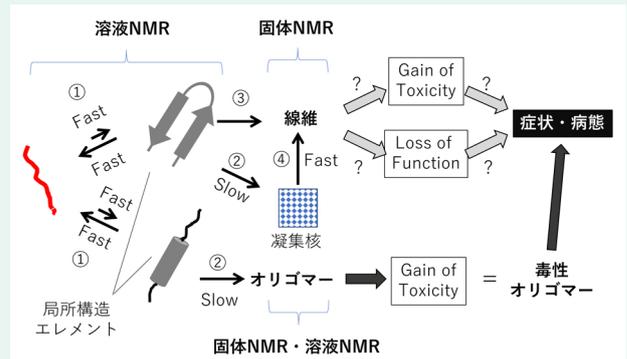


図 1

修正アミロイド仮説に関連した NMR で観察可能な $A\beta$ ペプチドのオリゴマーと線維形成の過程。溶液中では速い交換 (①) のもと $A\beta$ モノマーは複数の局所構造エレメント (模式図中の矢印は β ストランドを、シリンダーは α ヘリックスを表す) をとる。それらは異なる経路で線維形成の凝集核または線維伸長には関係しないオリゴマーをゆっくりと形成すると考えられており (②), 凝集核から線維伸長が起こるとされ (④), 一方③の経路は進みにくい。オリゴマーの中に高毒性の分子種があり、それが神経細胞死を誘導する、というのが最新の修正アミロイド仮説である。

いたため、初期のアミロイド仮説では、AD の神経細胞死を完全には説明できなくなった。その後 globulomer²⁾, ADDL³⁾, ASPD⁴⁾ といった分子量が小さく可溶性、拡散性かつ高毒性を持つオリゴマーが多数発見されるに至り、毒性オリゴマー仮説ないし修正アミロイド仮説として認知されつつある (図 1)^{5),6)}。

アミロイド仮説ならびに修正アミロイド仮説の研究を進めるにあたり、NMR 法の果たしてきた役割は大きい。近年のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析の高分解能化が達成されるまで、凝集性が高く単結晶が得られにくい $A\beta$ 線維の精密原子モデル構築は固体 NMR 法の独壇場であった。一方で水溶液中では高い構造揺らぎを有すると考えられている $A\beta$ モノマーや、界面活性剤存在下などの特殊な条件下のみ観測される安定な $A\beta$ の二量体・三量体などの構造解析には、安定同位体標識を用いた溶液 NMR 法が大きく貢献した。

Insights into the Mechanisms of Oligomerization/Fibrilization of Amyloid β Peptide from Nuclear Magnetic ResonanceHidekazu HIROAKI^{1,2}¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University² BeCellBar LLC.

ただし、修正アミロイド仮説の登場により分子病態解明の本命と目されている毒性オリゴマーについては、低分解能の電子顕微鏡像が知られているのみで、精密な構造情報は未だ得られていない。現在多くの研究者が、これら毒性オリゴマーはアミロイド線維が伸長するための凝集核とは別の構造体であり、凝集のための中間体ではないと考えている (図 1)。そのため、毒性オリゴマーの形成阻害や排出が、新たな AD 治療薬の創薬戦略として注目されている。

2. 固体 NMR が明らかにしたアミロイド線維の構造

これまで、試験管内の凝集実験からは、A β 線維の形成最初期に、数分子からなる凝集核が形成され、そこに単量体 A β が付加して伸長していく核依存的凝集過程が提案されていた。固体 NMR 研究者は、由来の異なる A β 線維試料のスペクトルの違いから、A β 線維の構造多型の存在を予見していた。更に、一度形成させた線維を超音波などで破断し、そこに新規にモノマーを添加して重合させるという破断と成長のプロセスを複数回繰り返す、多型性の少ない試料調製の方法も確立された。この手法を AD 患者の脳由来試料に適用することで、臨床検体由来の線維に特徴的な多型が明らかになった⁷⁾。図 2 はこれまで PDB に登録されている A β 線維と単量体の固体・溶液 NMR および電子顕微鏡構造から、特徴的なパッキングを有する構造を抜粋した。また、図 2D のみは、2 回対称軸のあるモノマー分子内と分子間での複雑なパッキングがわかるように

側鎖を図解した。

構造中では A β の主鎖が形成する長い 1 本の β ストランドが上下方向に大きく湾曲し、分子内では側鎖間の密な疎水的相互作用が、その特徴的な分子構造を固定している。こうして構成された A β の 2 分子ないし 3 分子からなる層が、繰り返して積層し、アミロイド線維の特徴であるクロス β 構造として分子層間で平行 β シートを形成している点が共通している。しかし興味深いことに多型間で共通する側鎖間相互作用はない。このような構造の形成過程は、線維の第 1~3 層からなる凝集核を鋳型として、線維構造が伸長していくというモデルによってのみ説明可能である。また、これらの結果から、A β の二量体を基本構造とするものと三量体を基本構造とするものの少なくとも二系統が存在することが明らかになった。

3. 溶液 NMR から見た A β モノマーの構造

それではこうした A β 線維を作る「原料」であるモノマーの溶液構造はどのようになっているであろうか？この疑問に適した手法が溶液 NMR 法である。溶液 NMR 法は、解析可能な分子量の上限があるという点で、A β 線維やオリゴマーの解析には向かないものの、安定同位体標識と組み合わせることで、水溶液中のみならず有機溶媒や界面活性剤中での分子の立体構造や平衡状態を捉えることが可能である。2021 年 6 月の時点で、PDB には 15 を超える A β モノマー (A β (1-40), A β (1-42) およびそれらの部分ペプチドを含む) の NMR

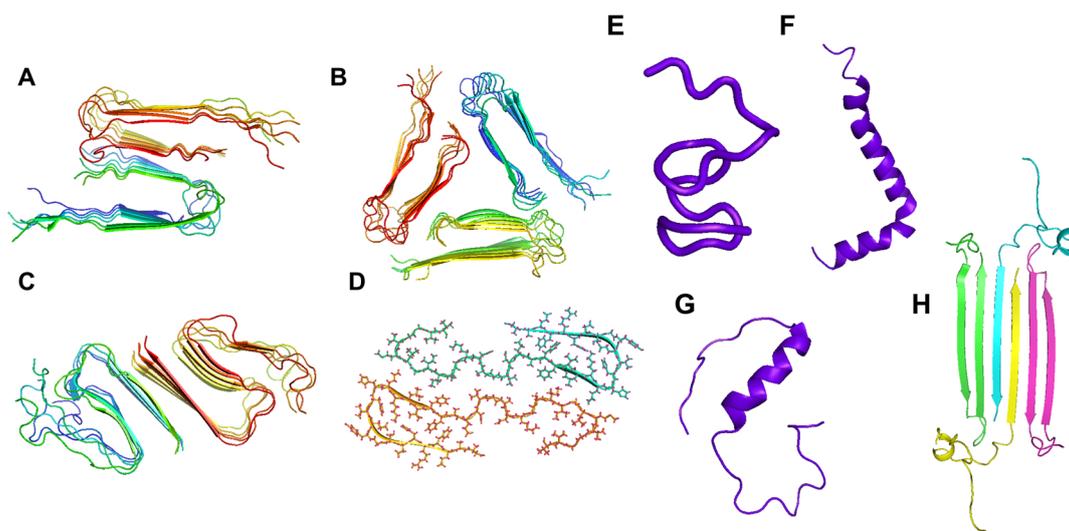


図 2

固体 NMR・クライオ電子顕微鏡・溶液 NMR で決定されたアミロイド線維および A β 単量体の構造。A, PDB ID: 2LMN, A β (1-40), 固体 NMR, B, PDB ID: 2LMQ, A β (1-40), 固体 NMR, 3 回対称軸を持つ珍しい構造, C, PDB ID: 6OC9, Ser8 がリン酸化された A β (1-40), 固体 NMR, D, PDB ID: 6SHS, アルツハイマー病患者脳から抽出された線維を核として再形成された A β (1-42), クライオ電子顕微鏡による単粒子解析。E, PDB ID: 1HZ3, A β (10-35), 中性水溶液, F, PDB ID: 1IYT, A β (1-42), 80% HFIP 中, よく MD 計算に用いられる, G, PDB ID: 2LFM, A β (1-40), 中性リン酸緩衝液中, H, PDB ID: 6RHY, DPC ミセル中の四量体構造。

構造のエントリーがあり、その9割以上は分子全体ないし分子中央部分に α ヘリックス構造を含むパラエティに富んだ構造群をなしている (図 2E~G). ただし単にリボン図を眺めるだけではなくそれぞれの測定条件を精査すると、ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) を含む溶媒やドデシル硫酸ナトリウムなどのミセル中の溶液構造が多い一方で、中性・生理的条件下に近い構造の決定例は少ない. なお HFIP はペプチド化学でよく用いられる α ヘリックスの強力な誘起剤である. また生理的条件下に近い中性付近の水系緩衝液中で Aβ の CD スペクトルを測定すると、 α ヘリックスを含まないランダムコイル様スペクトルが再現よく観察されるため、 α ヘリックスを主体とした多くの NMR 構造との整合性は低い. 数少ない水系溶媒での溶液構造の PDB エントリーは、1HZ3 (図 2E) と 2LFM (図 2G) だけであり、後者は分子中央に短いヘリックスを含むものの N と C 両末端は大きくディスオーダーしている. 水溶液中の Aβ(1-42) のアミド基の ¹H NMR 化学シフトが天然変性タンパク質に典型的な領域 (7.5~8.5 ppm) に観測されることと併せても、Aβ は分子全体において安定でコンパクトな立体構造はとっていないと考えるのが妥当である.

なお DPC ミセル中の溶液 NMR による構造解析では、Aβ が形成する β ヘアピン 2 分子と、Aβ 分子の半分で形成された 1 本の β ストランド 2 分子が組み合わされた四量体構造が観察されている (図 2H). 他の知見とも合わせると、以下のような線維化の初期過程が予想される. すなわち (1) ランダムコイルまたは一部

ヘリックスを含む Aβ が脂質膜上などで集積し、(2) β ヘアピンへと構造転移を起し、(3) それさらに分子間のクロス β ストランド構造へと変化する. それが (4) 凝集核となりアミロイド線維が伸長するのではないか、という機構であり、その検証が待たれている.

4. Aβ 阻害剤探索, その現状と展望

以上のように、Aβ 単量体は生理的条件下の水溶液中で天然変性状態にあるが、毒性オリゴマー形成や線維伸長の核形成の際には特定のコンフォメーションに固定される必要がある. そのため、この構造転移を阻害する低分子化合物の探索が古くから試みられてきた. しかし明確な薬剤結合ポケットを持たない Aβ は、鍵と鍵穴を想定した従来の創薬スキームを適用しにくく、現時点でも高活性の阻害剤は見出されていない.

筆者らは ¹⁵N 標識した Aβ(1-42) の二次元 NMR スペクトルの変化を指標に、凝集阻害活性が報告されているポリフェノール類とオスマライト (糖類) の評価を行った. トレハロース・スクロースなどの糖類を高濃度に添加した溶液中と、生理条件下の緩衝液中とでは Aβ(1-42) の取りうる構造アンサンブルがごくわずかに変化する. 高濃度オスマライトは実際に核形成を阻害し、最終的に線維形成を阻害すると考えられている. 他方、クルクミンや EGCG といったフェノール性の食品成分は、トレハロースやスクロースと異なり、はるかに低い濃度で Aβ(1-42) の線維化を抑制する. ほぼ同等の条件下で、Aβ(1-42) のアミド基の化学シフトが変化するが、その変化は高濃度オスマライトが与えるそれとは異

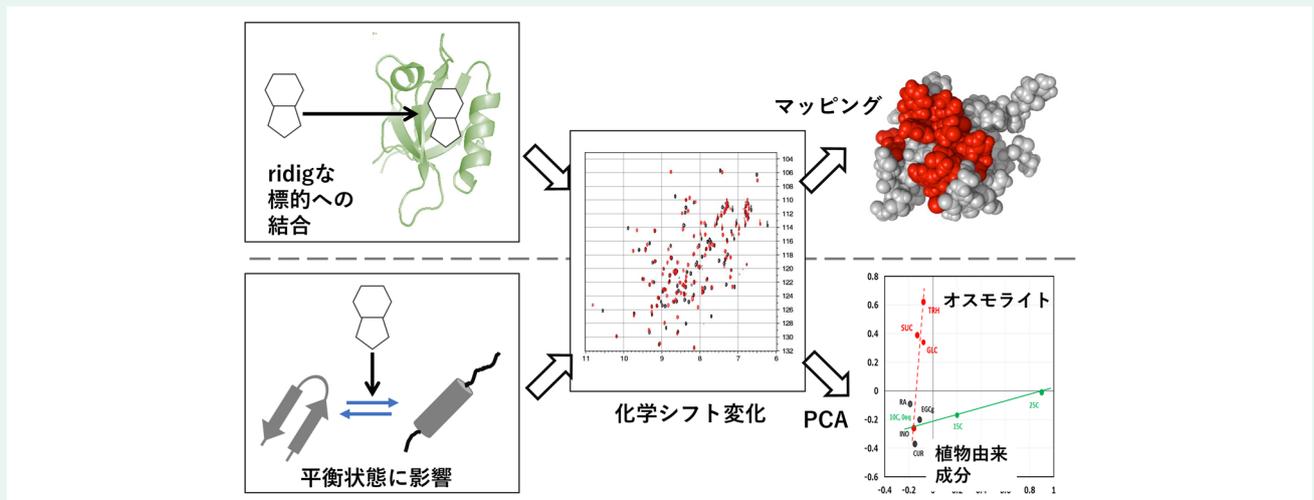


図 3 rigid な標的のタンパク質に対する NMR 医薬品スクリーニング [破線より上] と天然変性タンパク質を標的とした NMR スクリーニング [破線より下] の違い. 化合物の結合に伴い rigid な創薬標的はその立体構造をほとんど変化しない. 化合物の添加により例えば ¹H-¹⁵N 二次元 NMR スペクトルのアミド基シグナルは変化するが、その変化は化合物の接近による影響のみと解釈可能なため、変化量を立体構造上にマッピングすることで結合部位が可視化できる (右上). 標的が天然変性タンパク質の場合は、化合物の直接結合のみならず化合物による液性条件のわずかな変化でも、異なる局所構造間の平衡状態が変化しやすい、そのような平衡状態の変化も NMR スペクトルに顕れるが、それを単一の立体構造上にマッピングするのは適切とは言えない.

なっていた。また、NMR 測定濃度・条件における A β (1-42)は、5°C では長時間にわたり単量体状態を保っているが、37°C に昇温すると速やかに白濁を始めるとともにアミド基の化学シフトにも変化が現れ、その構造アンサンブルが変化すると推測された。そこで NMR で観測されたこれらのわずかな化学シフト変化を可視化すべく、二次元 NMR シグナルの化学シフトそのものを主成分分析することで、アミロイド形成阻害の機構の分類を試みた (図 3)⁸⁾。通常の創薬標的と候補薬剤による NMR 滴定実験は化学シフト変化の大きさを色別に立体構造上にマップする表示法が一般的である (図 3 破線より上)。しかしこの方法は化合物の結合に伴い標的タンパク質の構造が変化しないことが大前提であり、天然変性タンパク質である A β の系には利用できない。一方で、標的が天然変性タンパク質である場合は、化合物や溶媒成分が、標的分子の複数の過渡的な局所構造間の平衡状態に影響を与えることになる (図 3 破線より下)。主成分分析は、化学シフトマッピングにかわる方法であると期待している。

5. | おわりに

世界的な高齢化社会の進行に伴い、我が国のみならず中国、欧州、米国でも、認知症の治療と予防は喫緊の社会的課題となりつつある。しかし AD の発症機序については修正アミロイド仮説の他にも、Tau 仮説、歯周病菌原因説など、多くの仮説が乱立し、創薬戦略が確定しづらい。アデュカヌマブの承認は朗報だが、抗体療法が高価であることを考えると、低分子治療薬の開発は急務である。しかし溶解度の低さ・凝集性の高さから A β (1-42)やそのオリゴマー試料の取り扱いには困難であり、前述のように A β 毒性オリゴマーの立体

構造は未だ解明されていない。クライオ電子顕微鏡法の長足の進歩、1.2 GHz を超える超高磁場高感度 NMR の実用化など、新規技術が今後の A β 研究に積極的に活用されることを期待したい。

文 献

- 1) Sevigny, J. *et al.* (2016) *Nature* **537**, 50-56. DOI: 10.1038/nature19323.
- 2) Barghorn, S. *et al.* (2005) *J. Neurochem.* **95**, 834-847. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03407.x.
- 3) Lambert, M. P. *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6448-6453. DOI: 10.1073/pnas.95.11.6448.
- 4) Hoshi, M. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6370-6375. DOI: 10.1073/pnas.1237107100.
- 5) Shigemitsu, Y., Hiroaki, H. (2018) *J. Biochem.* **163**, 11-18. DOI: 10.1093/jb/mvx056.
- 6) Nguyen, P. H. *et al.* (2021) *Chem. Rev.* **121**, 2545-2647. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c01122.
- 7) Kollmer, M. *et al.* (2019) *Nat. Commun.* **10**, 4760. DOI: 10.1038/s41467-019-12683-8.
- 8) Iwaya, N. *et al.* (2020) *Arch. Biochem. Biophys.* **690**, 108446. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108446.



廣明秀一

廣明秀一 (ひろあき ひでかず)

東海国立大学機構名古屋大学院創薬科学研究科教授・研究科長

大阪大学大学院薬学研究科修了、日本ロシュ研究所、F Hoffman La Roche 研究所、(株)生物分子工学研究所、横浜市立大学、神戸大学、名古屋大学理学部附属構造生物学研究センターを経て 2012 年より現職、2021 年研究科長。

研究内容：タンパク質の NMR 構造生物学、相互作用解析、タンパク質相互作用阻害剤探索
連絡先：〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町

E-mail: hiroaki.hidekazu@f.mbox.nagoya-u.ac.jp

URL: <http://presat-vector.org/hiroaki-lab/>