

食品由来のアミロイド凝集阻害成分探索のための NMRスクリーニング技術

廣 明 秀 一

名古屋大学大学院創薬科学研究科基盤創薬学専攻 教授

緒 言

アミロイド線維とはタンパク質の規則的な凝集体の一種で、タンパク質の種類に関わらず特定の条件下で形成される難溶解性の直径数十ナノメートルの線維である。人体において、20種類以上のタンパク質がアミロイド線維を形成することが知られており、病変部にアミロイド線維の沈着が観察される疾患を総称して「アミロイドーシス」と呼ぶ。わが国では、アルツハイマー β ペプチド ($A\beta(1-40/1-42)$) の蓄積が認められるアルツハイマー病や^{1,2)}、透析治療の結果、大量に蓄積する $\beta 2$ ミクログロブリンが原因となる透析アミロイドーシスなどがよく知られている。また、微小管結合タンパク質タウが原因となり、アミロイドとは異なる線維 (PHF) を形成して神経細胞死を発症するタウオパシーも、同じカテゴリーに属する疾病である。不溶性線維を形成するもとなるタンパク質の中には、 $A\beta(1-42)$ やタウのように、水溶液中で安定な立体構造を持たない、天然変性タンパク質が含まれている³⁾。

アミロイド形成の分子的特徴は、クロス β 構造と呼ばれる β シートからなる特異な線維が形成されること、難溶解性で生理的に除去されにくいこと、線維形成時に多様な中間体やオリゴマーが形成されること、の3点である。形成されたアミロイド線維は、元となるペプチドのアミノ酸配列にはあまり依存せず、共通の構造的特徴を有する。例えば、色素チオフラビン T (ThT) による蛍光検出が可能である。多くのアミロイド性ペプチドは、天然変性タンパク質であり、単量体は構造を持たず、したがって低分子が結合するポケットも存在しない。そのため、立体構造に基づいた合理的創薬手法を適応しにくい。

本研究では、アミロイド病、とくにアルツハイマー症の予防に焦点を当てた活性成分の探索を合理的に行うために、NMRスクリーニングの手法を開発することをめざす。 $A\beta(1-42)$ ペプチド単量体に作用して、線維化

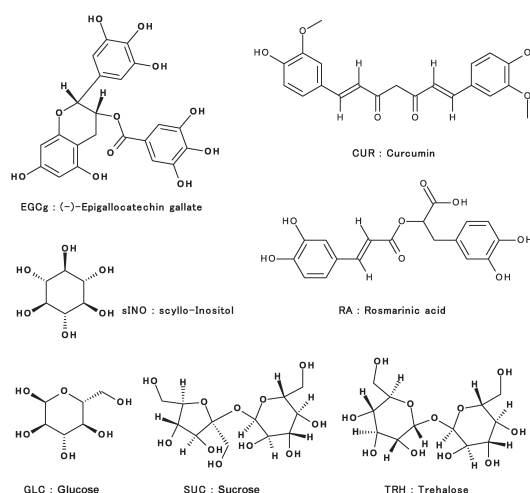


図1 食品成分・食品添加剤成分に存在するアミロイド凝集阻害活性を有する化合物

を阻害する化合物の多くは、構造科学的に弱いアフィニティーしか持たないと予想される。そのため、アミロイド形成阻害剤は、血中に比較的大量に存在していても、副作用や毒性を示さない化合物から探索されねばならない。もともと生体内にある成分、栄養素やビタミンなどの食品成分からの探索研究が必要である。こうした背景のもと、近年、茶カテキン成分の一つ epigallocatechin-3-gallate (EGCg)⁴⁾ ならびにウコンの芳香成分クルクミン⁵⁾ の $A\beta(1-42)$ の凝集阻害活性とそのメカニズムが注目されている。本研究では、既知の食品成分・食品添加剤成分 (図1) を安定同位体標識を施した $A\beta(1-42)$ に添加し、そのNHのNMRシグナルの変化を系統的に分類することで、各化合物の作用機構の特徴づけを行いつつ、新たな化合物のスクリーニング法を開発することを目的としている。

実験方法

安定同位体標識 $A\beta(1-42)$ の調製

$A\beta(1-42)$ は、6残基連続で並んだヒスチジン (以下、 $6\times\text{His}$) とユビキチン (以下、Ub) タグを不可した融

合タンパク質として、大腸菌BL21 (DE3) により組換え発現することで得た。 ^{15}N 標識されたM9培地を用いて大腸菌BL21 (DE3) に封入体として発現させ、破碎、洗浄、グアニジン溶液による可溶化、アフィニティー精製、タグ切断を経て、最終的に逆相HPLCによる精製を行うことで、 ^{15}N -A β (1-42) を得た。6 \times His-Ubタグを切断は酵母由来Ub加水分解酵素を用いた。非標識A β (1-42) についても同様に調製した。精製されたA β (1-42) は凍結乾燥後、TFA/アセトニトリルによる再溶解→凍結乾燥→HFIP処理を行い、最終精製物とした。

アミロイド形成阻害反応アッセイ

凍結乾燥された50 nmolのA β (1-42) を、20 μl のDMSOで溶解した後、速やかに0.5 \times PBS 1 mlで希釈することによりアミロイド化反応を開始した。その後、図1の各化合物を溶かした0.5 \times PBS 1 mlと混合し、1 mM ThTを10 μl 添加した。ただしRAは、PBSには直接溶解できなかったため、DMSOに2.5 mMとなるように溶解し、このRA/DMSO溶液にA β (1-42) を溶解した。反応液をスターラーバー入りの石英セルに入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ で攪拌しながら、5分ごとに蛍光（励起波長440 nm、蛍光波長484 nm）を測定した。測定には、日立F-7000分光蛍光光度計を用い、フォトマル電圧700 V、励起側スリット5.0 nm、蛍光側スリット2.5 nmで行った。

電子顕微鏡観察

25 mM (0.1 mg/ μl) のA β (1-42) の重合前ならびに0.5 \times PBS中で60分間重合させた試料を用いて電子顕微鏡観察を行った。あらかじめ親水化処理を施したグリッド（エラスチックカーボン支持膜STEM100Cuグリッド、グリッドピッチ100 μm 、応研商事株式会社）に、アミロイド線維を含む試料溶液5 μl を載せた。負染色は、そこに5 μl 2%酢酸ウランを加え、余剰の液を吸った後、グリッドを10 μl の酢酸ウランで洗浄することで行った。電子顕微鏡はJEM1200 EX-II（日本電子）を、加速電圧70 kVで使用し、12,000倍の像を得た。像の記録にはELECTRON-MICROSCOPIC FILM FG (FUJIFILM)を使用した。

NMRによるアミロイド形成阻害剤によるA β (1-42) の信号変化の観察ならびにデータ処理

NMR温度変化実験については、100 μM の ^{15}N -A β (1-42)を含む試料溶液300 μl (20 mM PB, pH 7.2, 2% DMSO,

5% D $_2$ O) を用いシゲミ微量試料管を用いて測定した。NMR装置はBruker社 AVANCEまたは AVANCE-II 600 MHz デジタルNMR装置を使用した。温度は283 K, 288 K, 298 K, 303 K, 310 Kの5点の温度で、 ^1H - ^{15}N -HSQC測定を行った。化合物添加実験については、75 μM の ^{15}N -A β (1-42) を含む試料溶液300 μl (0.5 \times PBS, pH 7.4, 1% d6-DMSO, 10% D $_2$ O, 283 K) に各化合物を添加したものをシゲミ微量試料管に封入して測定した。測定したデータはソフトウェアNMRPipeおよびSPARKYを用いて解析した。さらに、得られたシグナルの位置を、 ^{15}N と ^1H のシグナルごとに正規化して連結して一次元のベクトルとしたのち、主成分分析を行った。主成分分析は、octave 3.8.0を用いた。

結 果

アミロイド線維形成反応の確認 (図2)

本研究で使用したA β (1-42) はすべて大腸菌発現系に

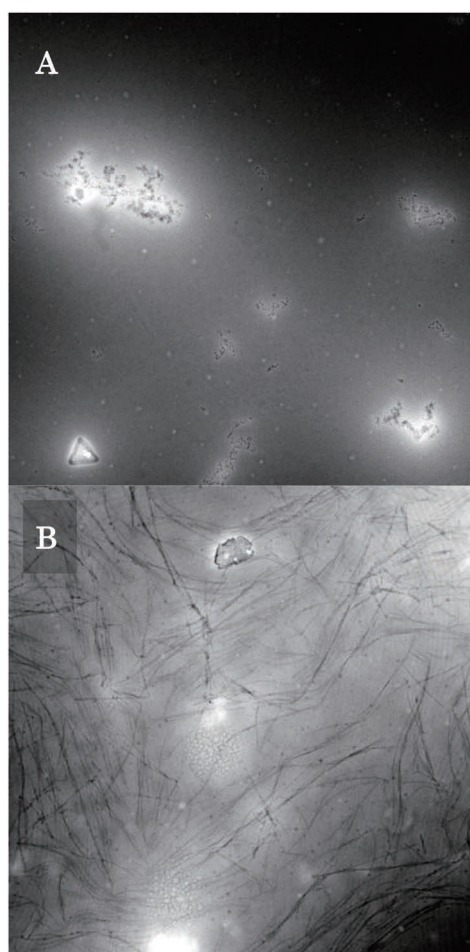


図2 A β (1-42) より調製したアミロイド線維の負染色電子顕微鏡画像。(A) 重合開始直後、(B) 同60分後

より筆者の研究室で調製したものである。大腸菌由来のA β (1-42)には凝集核が含まれやすいという報告があるが⁶⁾、筆者らもその現象が再現できた。本実験で用いたA β (1-42)は、新たにアミロイド核を添加しなくても、およそ30分後に線維形成が始まるものであった(図3)。また、そのアミロイド形成曲線は、核形成プロセスに対応するラグ部分と、線維伸長プロセスに対応する部分の二相からなる、典型的な曲線を示した。図2には、0.5×PBS添加後すぐのA β (1-42)と、線維形成反応開始後60分後の試料の、負染色電子顕微鏡像を示した。直径の揃った直線状の線維が多数観察された。

化合物によるアミロイド形成阻害 (図3)

ついで、このロットの試料を用いて、図1に表示した化合物によるアミロイド形成阻害効果の評価を行った。今回使用した阻害剤は、それぞれについてすでにアミロイド形成阻害活性が報告されている。しかし、すべての化合物のThT蛍光アッセイによる連続的時系列データが報告されているわけではなく、また、A β (1-42)の初期濃度、重合核の添加などの条件も異なるため、文献値を互いに比較することができない。そこで、図1に示し

た化合物について、統一的な条件でアミロイド線維形成阻害実験を行った(図3)。

今回の研究でも、高濃度のTRHならびにEGCgは、測定範囲内でのA β (1-42)のアミロイド形成をほぼ完全に阻害した。SUC、GLCはTRHに較べて阻害活性はやや弱かった(図3A)。阻害活性をさらに詳細に比較するために、100 mM、250 mMの中間的な濃度についても測定した(data not shown)。中間的な濃度では差が顕著であり、阻害活性はTRH>SUC>GLCの順であった。また、そのような条件下では、核形成阻害とみられる凝集の遅延が見られた。一方、古くから知られている凝集阻害剤であるScyllo-inositolは、今回の実験では凝集阻害を示さなかった。RAは部分的な凝集阻害を示した。凝集曲線からは、核形成の阻害が考えられた(図3B)。CURは、化合物の持つ紫外吸収部がThTの蛍光励起波長と重なるため、本アッセイは適用できなかった。

A β (1-42)のNMR信号の変化 (図4、図5)

京都大学の星野らは、A β (1-40)のNMRスペクトルが温度変化に応じて特徴的なシグナル移動ならびにシグナル消失を示すこと、またその変化はA β (1-40)のランダム構造と局所的なヘアピン構造の平衡移動によるものであることを報告した⁷⁾。一方、EGCgおよび合成アミロイド阻害剤CLR01とA β (1-40)の相互作用のNMR研究⁸⁾やRAおよびフラボノイドmyricetinとA β (1-42)の相互作用のNMR研究⁹⁾などの報告で、A β ペプチドのNMRシグナルは化合物添加でも大きく変化することが知られている。先行研究ではNMRシグナル変化から低分子の相互作用部位を求めようとしているが、A β ペプチドが天然変性タンパク質であることを考えると、その解釈の妥当性には限界がある。むしろ、化合物添加による化学シフト変化も、温度変化による化学シフト変化も、A β (1-42)の局所構造間の平衡の変化を反映していると捉えるべきである。そこで筆者は、A β (1-42)のNMRスペクトルの温度変化(図4A)および化合物による滴定実験(図4B)のデータを、化学シフトの数値データとして正規化し、主成分分析にかけて解析した(図5)。

主成分分析は、第一、第二、第三主成分の寄与率がそれぞれ59.3%、40.4%、0.27%と極めて良好にデータを分類することができた。第三主成分までを用いて各データを散布図としたところ、「温度変化」によるデータ系列と「化合物添加」によるデータ系列が、二つのク

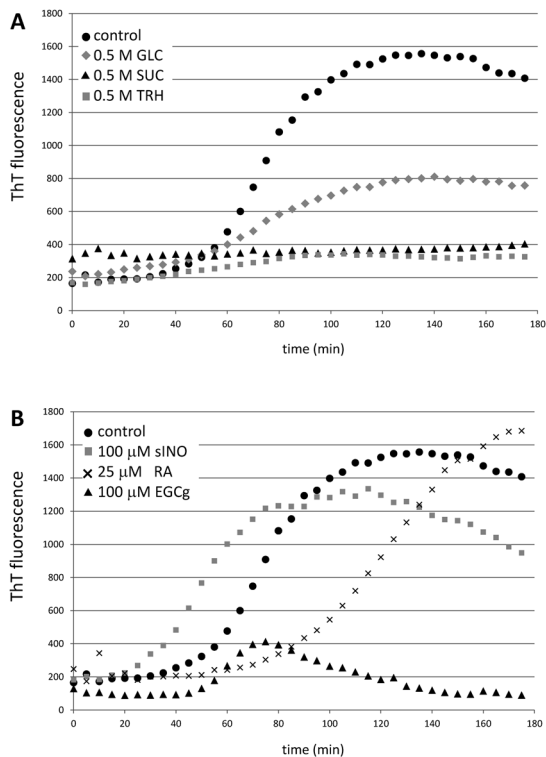


図3 ThT 蛍光によるA β (1-42)のアミロイド線維重合アッセイ。(A) 糖による凝集阻害 (B) 食品由来成分による凝集阻害

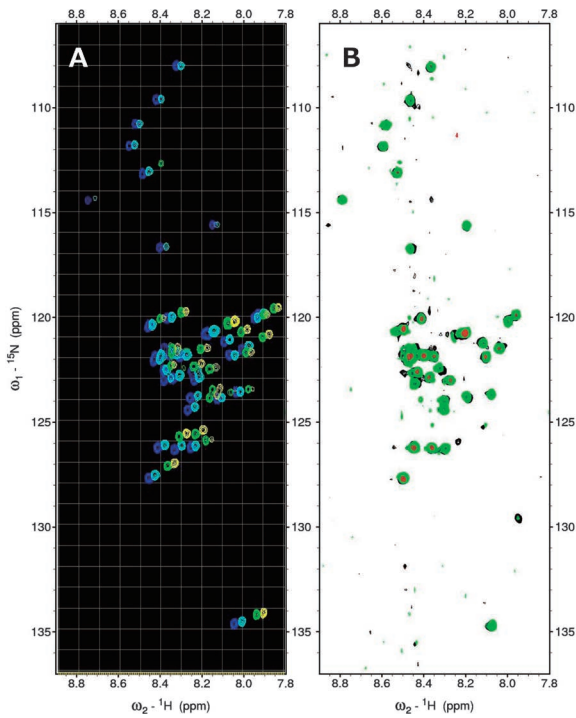


図4 $A\beta(1-42)$ の 1H - ^{15}N 2D-NMRのシグナル変化の様子。(A) 温度による変化 (B) 化合物 (ロスマリン酸) 添加による変化

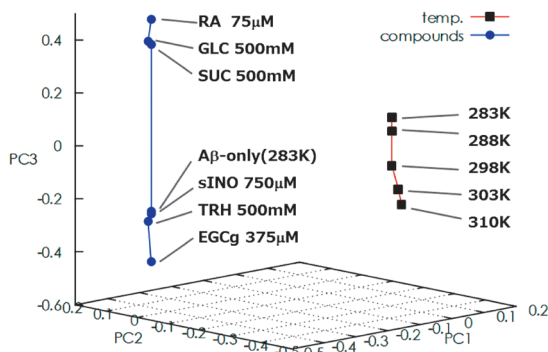


図5 $A\beta(1-42)$ の 1H - ^{15}N 2D-NMRのシグナル変化の主成分解析による分類

ラストとして明確に分離できた。それぞれのデータ群は、ほぼ同じ第一・第二主成分の組成を持ち、第三主成分軸に沿って分布している。ここで、温度変化によるデータ系列を見れば明らかのように、第三主成分は $A\beta(1-42)$ のNMRスペクトルに反映される局所構造の熱安定性に沿った軸と考えられる。さらに興味深いことに化合物添加のデータ系列は、グループA (凝集阻害が起こらない群、 $A\beta$ -onlyおよびsINO (750 μ M))、グループB (凝集核形成阻害のみが見られた群、RA、GLC、SUC) およびグループC (ほぼ完全に凝集が阻害できた群、高濃度TRHおよびEGCg) の三つに分類で

きた。

考 察

今回まず明らかになったのは、 $A\beta(1-42)$ のアミロイド形成阻害において、三種類の糖類化合物 (TRH、SUC、GLC) の阻害効果が、この順で序列化できたことである。これら糖類は、高濃度でしか $A\beta(1-42)$ のアミロイド形成阻害活性を示さない。これは、それぞれの分子が特異的に $A\beta(1-42)$ に作用するのではなく、いわゆる osmolyte として、 $A\beta(1-42)$ の構造安定性に影響を与えていると考えることができる。Osmolyteとしての性質のひとつに preferential hydration があるが、その効果の強さは、強い順に TRH、SUC、GLC となっており、今回得られた順序と一致した。

また、今回のNMR研究により、複数の異なる種類の化合物による $A\beta(1-42)$ への効果は、そのNMRスペクトルを主成分解析することで整理できることが明らかになった。第一・第二主成分は、化学シフトのパターンに顕れた、測定条件の違い (特に $A\beta(1-42)$ の試料濃度とDMSO濃度) を反映しているのではないかと考えられる。第三主成分軸が、温度変化実験の温度軸にほぼ対応していること、化合物の添加もまた、第三主成分軸にそった $A\beta(1-42)$ のスペクトル変化にのみ反映されるといふ今回の観察は極めて興味深い。アミロイド形成に不都合な特定の局所コンフォメーションが化合物により安定化され、37°Cのポピュレーションの状態からずれた状態で固定されることにより、アミロイド形成が大きく抑制されることが、本解析により示された。今後、さらに多種類の化合物のデータを合わせて統合的に解析することで、 $A\beta(1-42)$ のアミロイド形成過程における化合物の役割を解明していきたい。

要 約

アルツハイマー型認知症の発症原因物質の一つと考えられる $A\beta(1-42)$ ペプチドについて、アミロイド形成反応阻害活性を持つ食品成分・食品添加剤成分との相互作用を 1H - ^{15}N NMRを用いて統一的に解析した。NMRスペクトルを主成分解析することで、それぞれの化合物の作用機構を分類することができた。また、分類された化合物群について、溶液中の $A\beta(1-42)$ の局所構造の安定性と関連付けることができた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、文部科学省科学研究費および公益財団法人三島海雲記念財団のご支援をいただきました。またNMR測定に岐阜大学の鎌足雄司博士、電顕測定に名古屋大学の松崎瑞希氏、 $A\beta(1-42)$ の試料取扱いに京都大学の星美奈子客員准教授、osmolyteのデータの解釈に九州大学の阿部義人准教授の協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) D. J. Selkoe: *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**, 373-403, 1994.
- 2) J. Hardy, D. J. Selkoe: *Science*, **297**, 353-356, 2002.
- 3) R. Linding, et al.: *J. Mol. Biol.*, **342**, 345-353, 2004.
- 4) D. E. Ehrnhoefer, et al.: *Nature Str. Mol. Biol.*, **15**, 558-566, 2008.
- 5) F. S. Yang, et al.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 5892-5901, 2005.
- 6) M. Dasari, et al.: *Chembiochem*, **12**, 407-423, 2011.
- 7) T. Yamaguchi, et al.: *FEBS Lett.*, **585**, 1097-1102, 2011.
- 8) S. Sinha, et al.: *ACS Chem. Neurosci.*, **3**, 451-458, 2012.
- 9) K. Ono, et al.: *J. Biol. Chem.*, **287**, 14631-14643, 2012.