

抗原認識部位の異なる抗アミロイドβ抗体・11A1およびTxCo-1による ヒトAD剖検脳の免疫組織化学的染色の比較

Comparison of immunohistochemical staining of human AD autopsy brains using anti-amyloid β antibodies 11A1 and TxCo-1, which have different antigen recognition sites

入江一浩^{1,2,*}, 入江由美¹, 喜田昭子³, 景山裕介⁴

¹京都大学大学院農学研究科

²同志社大学研究開発推進機構

〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷

³京都大学複合原子力科学研究所

〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町

⁴滋賀医科大学人体病理学

〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町

Kazuhiro IRIE^{1,2,*}, Yumi IRIE¹, Akiko KITA³, and Yusuke KAGEYAMA⁴

¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

²Organization for Research Initiatives and Development, Doshisha University
Tatara Miyakodani, Kyotanabe 610-0394, Japan

³Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University
Kumatori, Sen-nan, Osaka 590-0494, Japan

⁴Department of Pathology (Human Pathology), Shiga University of Medical Science
Otsu 520-2192, Japan

1. はじめに

アミロイドβタンパク質 (Aβ) は、アルツハイマー病 (AD) に特異的な病理学的特徴である老人斑の構成成分の一つである。様々な長さの Aβ バリエーションのうち、42 残基からなる Aβ42 はオリゴマー化しやすく、顕著な神経細胞毒性を示すとともに、速やかに不溶性の凝集体 (フィブリル) を形成する。Aβ42 の毒性は準安定なオリゴマーによってもたらされるものと考えられており、Aβ オリゴマーは AD の治療標的の一つとして注目されている。筆者の一人である入江らは、系統的なプロリン置換や固体 NMR 法を用いて、Aβ42 の Glu22, Asp23 残基付近でのターン構造 (毒性ターン) を特徴とした「毒性コンホマー」の存在を明らかにし、毒性コンホマーをもつ Aβ42 が会合することによって毒性オリゴマーになるという、毒性配座理論を提唱した [1-5]。続いて入江らは、Aβ42 の Glu22 を Pro 置換することにより、毒性ターン構造を模倣した配座固定ペプチド E22P-Aβ9-35 をマウスに免疫することによって、E22P-Aβ42 に強く結合する 11A1 及び 24B3 抗体を得ることに成功した [6,7]。24B3 抗体と E22P-Aβ11-34 複合体の X 線結晶構造解析により、24B3 抗体は E22P を中心とした Val18-Ser26 の領域を認識していることが判明している [8]。

本稿では、11A1 抗体の Aβ の認識領域を明らかにするために実施した 11A1 Fab-E22P-Aβ10-34 複合体の X 線結晶構造解析の結果 [9] と、分子内ジスルフィド結合により毒性ターンを固定した L17C,K28C-SS-Aβ42 を抗原として作製した TxCo-1 抗体 [9,10] の抗原結合様式との比較を行った。さらに、これらの抗体による AD 患者の剖検脳の免疫組織化学的染色結果の違いについて、上記の結合様式の観点から考察した。

2. 実験と結果

E22P-Aβ42 を様々な長さに切断した E22P 変異ペプチドと、11A1 抗体から調製した Fab ドメインとの共結晶化を行った。エチレングリコールをクライオプロテクタントとして多数の共結晶の回折強度データ収集を行った結果、ポリエチレングリコール (PEG) 3,350 に NaCl を含む条件で 11A1 Fab と E22P-Aβ10-34 との複合体結晶を得ることができた。最も高分解能の反射強度データは、ARNE3A での回折実験で得られた。この結晶は空間群 $P2_1$ に属し、格子定数は $a = 40.6 \text{ \AA}$, $b = 123.8 \text{ \AA}$, $c = 45.7 \text{ \AA}$, $\beta = 99.7^\circ$ であった [9]。データ処理を XDS [11] で行い、構造解析は細菌抗体 (PDB code: 1MNU) [12] をモデルにした分子置換法で、プログラムパッケージ CCP4 [13] のプログラム Molrep [14] を用いて行った。構造精密化はブ

ログラム RefMac5 [15] と Coot [16] を用いて進め、1.75Å 分解能のデータに対して $R_{work}/R_{free}=0.166/0.194$ の最終構造を得た [9].

11A1 Fab-E22P-Aβ10-34 複合体の結合部位の構造を図 1 に示す。11A1 Fab は、当初予想された 22, 23 位の毒性ターン構造ではなく、N 末端の Tyr10-His14 領域を認識して結合していた [9]。Aβ42 の N 末端領域を認識する抗体はこれまで複数種報告されていたが、Tyr10-His14 領域を認識する抗体は 11A1 が初めての例である。Aβ42 の N 末端領域の 14 残基はその凝集体においてランダム構造を取っていることが知られているが、AD 患者と AD でない人の剖検脳の免疫組織化学的染色の結果、11A1 は AD 病態に関わりなく様々なタイプの Aβ 凝集体に反応した [9]。これより、Tyr10-His14 は AD 病態に特異的なエピトープではないことが明らかになった。

一方、AD 患者の脳切片中の老人斑ならびに血管壁の Aβ 凝集体を選択的に認識する TxCo-1 抗体 [9,10] の Fab と、22, 23 位の毒性ターン構造を分子内ジスルフィド架橋によって固定した L17C,K28C-SS-Aβ42 のペプチド断片 L17C,K28C-SS-Aβ15-30 の中性条件下での複合体構造において、TxCo-1 Fab は配座固定ペプチドの毒性ターン領域を認識していた (図 2) [9]。TxCo-1 Fab は酸性条件下でも、L17C,K28C-SS-Aβ42 の毒性ターン構造を認識することが以前の研究により判明している [10].

以上の結果は、22, 23 位の毒性ターン構造が AD 病態に特徴的なエピトープである可能性を示している。従って、TxCo-1 は副作用を抑えた次世代抗体医薬品シーズになる可能性がある。現在、TxCo-1 を用いた AD モデルマウスの治療実験を実施している。

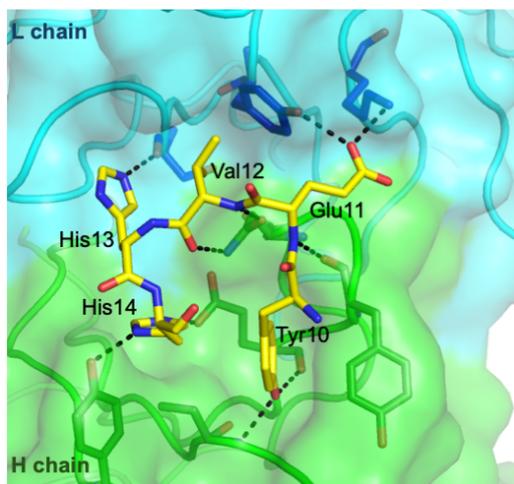


図 1. 11A1 Fab-E22P-Aβ10-34 複合体の Aβ 誘導体結合部位。Aβ 誘導体 (黄色 stick モデル) に残基番号を記した。Aβ 誘導体の Tyr10-His14 が 11A1 Fab に結合している。

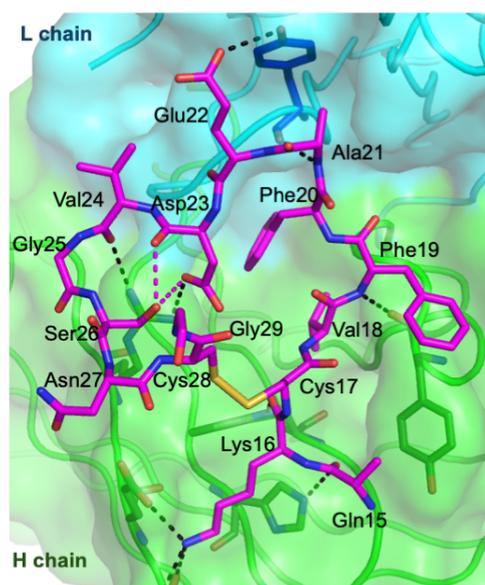


図 2. TxCo-1 Fab-L17C,K28C-SS-Aβ15-30 複合体の Aβ 誘導体結合部位。Aβ 誘導体 (マゼンタ stick モデル) に残基番号を記した。Aβ 誘導体の Gln15-Val24 が TxCo-1 Fab に結合している。

参考文献

- [1] A. Morimoto *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 52781 (2004).
- [2] K. Irie *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 437 (2005).
- [3] K. Murakami *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15168 (2005).
- [4] Y. Masuda *et al.*, *ChemBioChem.*, **10**, 287 (2009).
- [5] K. Irie, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**, 1 (2020).
- [6] K. Murakami *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.*, **1**, 747 (2010).
- [7] K. Murakami *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 29038 (2016).
- [8] Y. Irie *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **621**, 162 (2022).
- [9] R. Fukui *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **758**, 151655 (2025).
- [10] Y. Kageyama *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.*, **12**, 3418 (2021).
- [11] W. Kabsch, *Acta Crystallogr.*, **D66**, 125 (2010).
- [12] J. van den Elsen *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **274**, 1495 (1999).
- [13] M. D. Winn *et al.*, *Acta Crystallogr.*, **D67**, 235 (2011).
- [14] A. Vagin *et al.*, *Acta Crystallogr.*, **D66**, 22 (2010).
- [15] A. Vagin *et al.*, *Acta Crystallogr.*, **D60**, 2184 (2004).
- [16] P. Emsley *et al.*, *Acta Crystallogr.*, **D60**, 2126 (2004).

本研究は、科研費・基盤研究 (S) および (A) により行われた (課題番号: 26221202, 19H00921, 23H00325)。

* irie.kazuhiro.2z@kyoto-u.jp