

# アミロイド $\beta$ の毒性配座固定化合物と その特異抗体複合体の結晶構造解析

## Crystal structure analysis of the toxic conformer-constrained amyloid $\beta$ complexed with its specific antibody

入江一浩<sup>1,\*</sup>, 入江由美<sup>1</sup>, 喜田昭子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院農学研究科,

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

<sup>2</sup>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,

Kazuhiro IRIE<sup>1,\*</sup>, Yumi IRIE<sup>1</sup>, and Akiko KITA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

<sup>2</sup>Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University,

Kumatori, Sen-nan, Osaka 590-0494, Japan

### 1 はじめに

アルツハイマー病 (AD) の病理学的特徴である老人斑の構成成分は、アミロイド  $\beta$  タンパク質 ( $A\beta$ ) である。 $A\beta$  のうち、42 残基からなる  $A\beta_{42}$  は凝集 (オリゴマー化) しやすく、顕著な神経細胞毒性を示すと同時に、不溶性の凝集体 (フィブリル) をより速く形成する。 $A\beta_{42}$  の毒性は準安定なオリゴマーによるものと考えられていることから、 $A\beta$  オリゴマーは AD の治療標的のひとつとして注目されている。我々は、 $A\beta_{42}$  の神経細胞毒性に関わるコンホメーションとして、Glu22 及び Asp23 残基でのターン構造 (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  $A\beta_{42}$  が会合することによって毒性オリゴマーになるという、独自の毒性配座理論を提唱した [1-5]。 $A\beta_{42}$  の毒性コンホマーを標的とした立体構造特異抗体を開発できれば、副作用の少ない抗体医薬になるとともに、病態初期の AD 診断に応用できるものと考えられる。

我々は  $A\beta_{42}$  の Glu22 をプロリン置換することによって毒性コンホマーに固定した E22P- $A\beta_{42}$  に強く結合する抗体である 24B3 [6] と 11A1 [7], ならびに強毒性分子内 S-S 架橋体 (L17C,K28C-SS- $A\beta_{42}$ ) [8] その特異抗体 10A1 を開発してきた [9]。本課題においては、特に L17C,K28C-SS- $A\beta_{15-30}$  (SS- $A\beta_{15-30}$ ) とその特異抗体 10A1 の Fab ドメインとの複合体の X 線結晶構造解析を行い、10A1 による分子内 S-S 架橋  $A\beta$  誘導体の認識機構を明らかにした [9]。

### 2 実験

Leu17, Lys28 をシステインに置換した SS- $A\beta_{42}$  の様々な長さのフラグメントペプチドを作製し、10A1 の Fab ドメインとの共結晶化を行った。N 末, C 末をトランケートした SS- $A\beta_{15-30}$  を用いて 10A1 の Fab ドメインと共結晶化を試みた際に、ポリエチレ

ングリコールを主たる沈澱剤とする複数の結晶化条件から非常に細い針状結晶が得られ、そのうち、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル (PEGMME) 5,000 を用いた条件から、細い柱状結晶を得ることに成功した。

エチレングリコールをクライオプロテクタントとして結晶を液体窒素温度に冷却し、PF へ送付して BL-1A で自動測定により回折データ収集を行った。反射強度データ処理はプログラム XDS [10] で行い、先に構造解析に成功していた 24B3 の Fab ドメインの原子座標 (PDBcode: 7Y3J) [11] を用いた分子置換法をプログラム Molrep [12] で適用して構造解析を行った。構造の精密化にはプログラム Refmac [13] を用いた。PEG (結晶化試薬である PEGMME 由来), エチレングリコール, 水分子を含めた最終分子モデルの 2.5Å 分解能の反射強度データに対する R/R<sub>Free</sub> は 0.191/0.244 であった。

### 3 結果

得られた結晶の空間群は C2, 格子定数は  $a = 185.0 \text{ \AA}$ ,  $b = 40.5 \text{ \AA}$ ,  $c = 69.4 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 97.2^\circ$  で、その非対称単位内には 1 つの 10A1 Fab-SS- $A\beta_{15-30}$  複合体が含まれていた。図 1 (a) に 10A1 Fab-SS- $A\beta_{15-30}$  複合体全体構造を、(b) に SS- $A\beta_{15-30}$  の結合部位を示す。ペプチド結合部位には、SS- $A\beta_{15-30}$  の毒性ターン構造を含む 16-28 の電子密度が観測できた [9]。本結果は、10A1 の Fab が Glu22 及び Asp23 を中心とする毒性ターン構造を認識していることを示すものであり、抗毒性ターン抗体の結合する毒性ターン構造が、結晶構造内で確認された初めての例である。10A1 は、AD 発症に寄与すると考えられている毒性ターン構造をもつ  $A\beta_{42}$  に対して選択的に結合することから、新しい AD 診断ツールや抗体医薬としての応用が期待される。

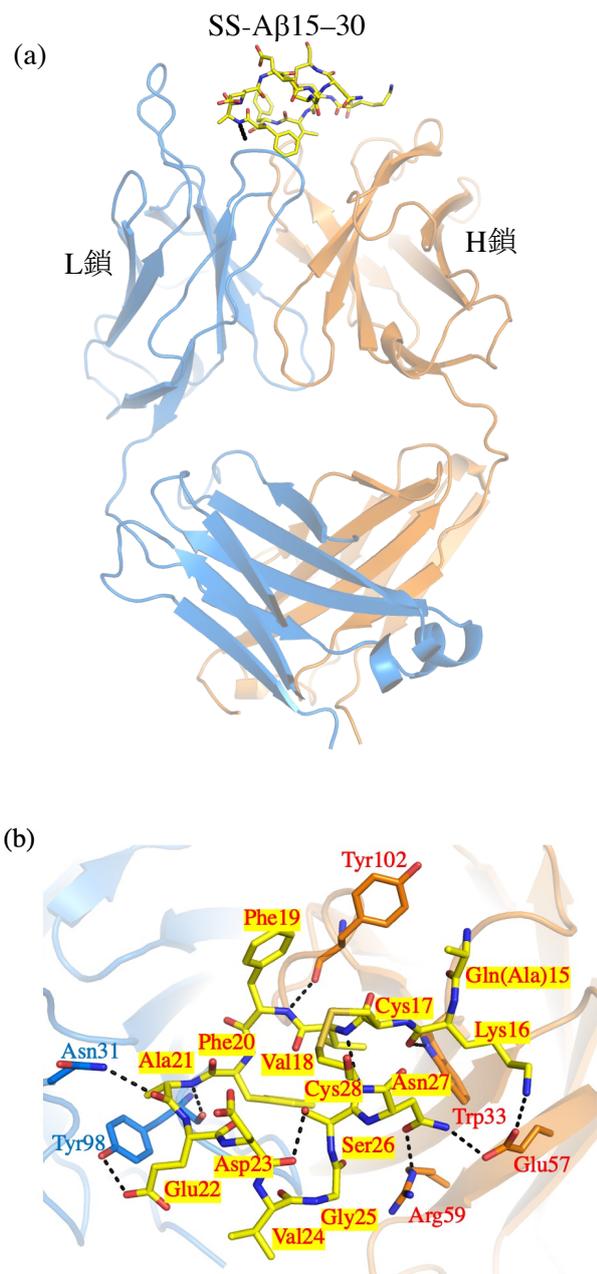


図 1. 10A1 Fab-SS-Aβ15-30 複合体の構造 (PDB code: 7E6P)  
10A1 Fab L 鎖: シアン, H 鎖: オレンジ  
SS-Aβ15-30: イエロー  
(a) 10A1 Fab-SS-Aβ15-30 複合体構造  
(b) SS-Aβ15-30 結合部位

#### 謝辞

本研究の一部は、科研費・基盤研究 (A) により行われました (課題番号: 19H00921)。

#### 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.*, *Sci. Rep.*, **6**, 29038 (2016).
- [7] K. Murakami *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.*, **1**, 747 (2010).
- [8] Y. Matsushima *et al.*, *Chem. Commun.*, **56**, 4118 (2020).
- [9] Y. Kageyama *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.*, **12**, 3418 (2021).
- [10] W. Kabsch, *Acta Crystallogr.*, **D66**, 125 (2010).
- [11] Y. Irie *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **621**, 162 (2022).
- [12] A. Vagin *et al.*, *Acta Crystallogr.*, **D66**, 22 (2010).
- [13] G. N. Murshudov *et al.*, *Acta Crystallogr.*, **D67**, 355 (2011).

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