

氏名	つちだ ともひろ 槌田 智裕
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	甲博薬第1号
学位授与の日付	令和4年2月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	アルツハイマー型認知症関連タンパク質 Tau 特異的認識抗体による、Tau 異常自己重合阻害作用及び Tau 特異的認識機構の解明
論文審査委員	(主査) 教授 福森 亮雄 (副査) 教授 戸塚 裕一 (副査) 准教授 友尾 幸司

論文内容の要旨

アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease; AD) は、神経変性に伴う脳萎縮が認められる認知症疾患の一つであり、主症状として認知機能障害や、行動・心理症状が認められる。AD に特徴的な病理学的所見の一つとして、微小管結合型タンパク質 Tau の異常自己重合体形成に伴う神経原線維変化がある。この神経原線維変化の進行は、AD 患者の脳機能の低下と正の相関を示すことから、Tau タンパク質の異常自己重合体形成機構の解明と重合阻害物質の探索は、AD 発症機構の解明並びに AD 治療薬開発において重要な研究課題である。

Tau は通常、成人の脳神経細胞軸索に局在する微小管結合型タンパク質の一種であり、微小管構造の安定化や伸長促進に寄与している。しかし、AD 患者の脳内では、Tau は過剰なリン酸化を受け、微小管から解離する。解離した Tau は自己重合を示すようになり、Paired Helical Filaments (PHF) と呼ばれる不溶性線維を形成する。この PHF が神経細胞内に沈着することにより、神経原線維変化が見られるようになる。

Tau 分子中に存在する微小管結合領域 (Microtubule-Binding Domain; MBD) は、Tau 本来の機能である微小管の構造安定化に寄与する一方で、Tau の異常自己重合体形成にも

深く関与する領域であることが知られている。特に、MBD 領域中の $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列と、 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 配列は、Tau の自己重合反応に必須な配列であり、中でも $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列は、脳内での Tau 病変の拡大に強く関与することが報告されている。従って、VQIINK 配列を認識し、Tau 重合反応を阻害する物質は、AD の根本治療薬として有効な物質に成り得ると考えられる。このような背景から、当研究グループでは $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 領域を認識する Tau 認識抗体に着目し、Tau 分子中 MBD 領域内の $^{272}\text{GGKVQIINKKLD}^{283}$ ペプチドをエピトープとしたマウスモノクローナル抗体 (Tau2r3) の作製に成功した。本論文では、Tau2r3 の Fab 領域 (Fab2r3) が示す、Tau 重合阻害作用及び Tau 特異的認識機構について解析を行った。

第一章では、分光学的解析法を用い、Fab2r3 が有する Tau 自己重合阻害作用を Full-Tau (0N4R) 及び MBD 領域 (4RMBD) を用いて評価した。その結果、Fab2r3 が 0N4R および 4RMBD の自己重合反応を阻害することが確認できた。更に、等温滴定型熱量測定法 (ITC) を用いた相互作用解析により、Fab2r3 と VQIINK ペプチド間に結合が確認出来、Fab2r3 の Tau 重合阻害作用が、 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列への結合に起因することが示唆された。Fab2r3 の $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列特異性を詳細に検討するために、先に記した Tau 自己重合反応に必須な配列である $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ ペプチドと、Fab2r3 の相互作用解析を行った。その結果、VQIVYK ペプチドは VQIINK ペプチドに比べ、Fab2r3 との結合強度が大きく低下することが分かった。以上の結果から、Fab2r3 は Tau 分子中の VQIINK 配列を特異的に認識し、Tau 重合阻害作用を示すことが推察された。

これまでに確認できた、Fab2r3 の Tau 分子中の VQIINK 配列特異的認識機構について詳細に解析を行うため、VQIINK 配列に変異を導入した VQIINK 類似ペプチドと Fab2r3 との ITC 測定を行った。その結果、 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列中の Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ の親水性残基と、Ile²⁷⁸ の疎水性残基が Fab2r3 との結合に重要に関与していることが明らかとなった。更に、Ile²⁷⁸ を他の疎水性残基へ変異させたペプチド (VQIVNK、VQILNK、VQIFNK) と Fab2r3 との ITC 解析を行ったところ、それら全てのペプチドにおいて結合強度が大きく低下する結果となり、Fab2r3 が $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列の Ile²⁷⁸ 残基の側鎖構造を特異的に認識していることがわかった。

第二章では、第一章で示した Fab2r3 の Tau 特異的認識機構について、X線結晶構造解析法による構造化学的解析を行った。まず、第一節では、Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造を決定し、Fab2r3 と VQIINK ペプチドとの結合様式について解析を行った。得られた複合体構造から、Fab2r3 の相補鎖決定領域 (Complementarity determining regions; CDR) が、 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ ペプチドの Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ 側鎖と多くの水素結合を形成していること、Fab2r3 の CDR が形成する疎水ポケットが、Ile²⁷⁸ 側鎖と疎水性相互作用を形成していることがわかった。

第二節では、apo Fab2r3 構造を決定し、VQIINK ペプチド複合体構造との構造比較を行うことで、VQIINK ペプチドとの結合に伴う Fab2r3 の構造変化について解析を行った。その結果、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ 側鎖と相互作用する Fab2r3 の疎水ポケットが、apo 体では形成されていないことがわかった。この結果は、Fab2r3 の疎水ポケットが、VQIINK ペプチドとの結合に伴い形成されることを示すと共に、Fab2r3 の Ile²⁷⁸ 側鎖の特異的認識に重要であることを示唆している。

第二章三節では、前節で確認された Fab2r3 の疎水ポケット形成と VQIINK 配列特異的認識機構との相関を構造化学的に解析することを目的として、3 種類の Ile²⁷⁸ 変異型 VQIINK 類似ペプチド (VQIVYK、VQILNK、VQIFNK) と Fab2r3 の複合体構造を決定し、Fab2r3 が有する Ile²⁷⁸ 選択性について解析を行った。その結果、結合するリガンドペプチドの種類に関わらず、Fab2r3 のリガンド結合領域は一定の形状を保っていることがわかった。また、表面電位図を用いた詳細な解析を行ったところ、Fab2r3 の疎水ポケットは、全ての構造で Ile 側鎖構造に相補的な形状であり、Ile 以外の残基では相補性が不十分であることが明らかとなった。従って、Fab2r3 の有する ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ 配列特異的認識機構は、Ile²⁷⁸ にのみ相補性を示す疎水ポケット形成機構が重要であると考えられた。更に、Fab2r3 と VQIINK 類似ペプチド複合体の立体構造から、Fab2r3 分子中に存在する水分子を介した水架橋構造が、疎水ポケットの創出とその形状固定に深く関与していることがわかった。以上の結果から、Fab2r3 が有する Tau 分子中 VQIINK 配列特異的認識機構は、親水性残基側鎖との水素結合対の形成と、Ile 側鎖構造相補的な疎水ポケットの形成が極めて重要であることが明らかとなった。

アルツハイマー病は非常に多くの症例が報告されているにも関わらず、未だに有効な治療法が確立されていないことから、その治療薬の開発は強く期待されている。本論文で明らかにした Fab2r3 の Tau 重合阻害作用、及び Tau 特異的認識機構に関する構造化学的知見は、Fab2r3 の構造をベースとする Tau 重合阻害物質の開発に有効な知見であり、より強力な Tau 重合阻害物質の開発、延いては新規 AD 治療薬の開発に大きく貢献するものである。

論文審査の結果の要旨

Tau は脳の神経細胞の軸索に主に存在する微小管結合タンパク質である。生理的状態では、Tau は微小管に結合し、その安定に寄与するが、異常にリン酸化されると微小管への結合能を失い、異常自己重合を起こし、不溶性の重合体を形成し、神経やグリア細胞内に蓄積する。このような Tau 重合体はアルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)患者の脳内で見られ、神経原線維変化と呼ばれている。Tau 分子中の C 末側には、相同性の高い約 30 のアミノ酸残基が 3 回または 4 回繰り返している微小管結合部位 (microtubule binding domain; MBD)が存在する。この MBD はその部位単独でも重合することから、Tau 重合体形成に必須の領域であると考えられている。

Tau 重合体は神経やグリアの細胞内の病理であり、細胞内での凝集過程の病態と考えられてきたが、近年、細胞外に放出される Tau オリゴマーが発見され、隣接する神経細胞に伝播することで AD が進展すると考えられてきている。そのため、2016 年頃から、細胞外の Tau オリゴマーを標的とする Tau 抗体療法の臨床試験が世界的に行われてきた。2022 年現在、当初開発された N 末抗体のほとんどが失敗し、MBD 領域を標的とする抗体が開発の中心となってきている。従って、この領域を標的とする抗体の結合特性を理解することは AD の治療薬や診断薬の開発への貢献が期待できる。

樋田智裕君は、この MBD 領域を標的とする Tau2r3 を共同研究者らと共に開発し、Tau2r3 抗体の Tau 重合阻害作用及び構造解析による抗原との結合特異性を調べる研究を行った。以下に記す研究では、Tau2r3 から抗原認識部位である Fab ドメインを切り出し、精製した Fab2r3 を用いた。

まず、Fab2r3 の重合阻害作用を調べるために、重合した物質の β シート構造に入り込むことで蛍光を発する Thioflavin S を用いる蛍光信号測定を行った。その結果、Fab2r3 は、全長および MBD 領域のみの Tau が重合により発する蛍光信号を抑制した。さらに電子顕微鏡による形態学的観察から、Fab2r3 の添加により、Tau の重合繊維が減少していた。これらの結果から、Fab2r3 は MBD 領域への結合を通じて、Tau の凝集を阻害することが示唆された。

次に Fab2r3 と Tau の結合強度や結合領域を調べるために、等温滴定型熱量測定 (ITC) 解析を行った。まず、Fab2r3 と全長抗原ペプチドの結合解離定数は $0.14\mu\text{M}$ であった。また、エピトープマッピング解析から絞り込んだ VQIINK ペプチドとの結合解離定数は $0.41\mu\text{M}$ であったことから、この 6 アミノ酸が Fab2r3 の認識領域であることが示された。また、結合特異性をアミノ酸レベルで調べるために数種類のエピトープ配列置換ペプチドを合成し、Fab2r3 との ITC 解析を行った。その結果、Fab2r3 と VQIINK の

結合にはペプチド配列中の Gln²⁷⁶、Ile²⁷⁸、Lys²⁸⁰ が必須であり、それらのアミノ酸の側鎖を特異的に認識する機構が存在することが示唆された。

次に Fab2r3 がアミノ酸 Gln²⁷⁶、Ile²⁷⁸、Lys²⁸⁰ の側鎖を特異的に認識する機構を解明するために、X 線結晶構造解析法による原子レベルの解析を行った。Fab2r3 単独(apo 体)及び Fab2r3 と VQIINK ペプチドとの複合体の両者の結晶化及び X 線構造解析に成功し、それぞれのアミノ酸と Fab2r3 との結合機構を解明した。まず、親水性アミノ酸 Gln²⁷⁶ 及び Lys²⁸⁰ の側鎖は、Fab2r3 の相補鎖決定領域 (Complementarity determining region; CDR) の重鎖 (CDRH3)、および軽鎖 (CDRL1、CDRL3) の各領域と多くの水素結合を形成していたことから、それらの水素結合が特異性の形成の基盤であることが示唆された。一方、Ile²⁷⁸ の疎水性側鎖は、CDRH3 と CDRL3 により形成される疎水性に富んだ領域に入り込んだ構造をしていた。この疎水ポケットは apo 体では観察されなかったことから、VQIINK 分子の結合に伴う疎水ポケット形成が特異的認識に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に Fab2r3 が Ile²⁷⁸ の疎水性側鎖を認識する機構を調べるために、Ile²⁷⁸ を様々な疎水性アミノ酸に置換したペプチドとの結合解析を行った。ITC による相互作用解析では、Ile²⁷⁸ を Val、Leu、Phe に置換したペプチドと Fab2r3 との結合は低下しており、疎水性側鎖を一般的に認識しているのではないことが示唆された。さらにこの結合力の低下を構造化学的に解明するために、Fab2r3 とこれら置換ペプチド (VQIVYK, VQILNK, VQIFNK) との複合体結晶を作成し、X 線結晶構造解析を行った。各置換ペプチド複合体と VQIINK 複合体の構造比較から、Fab2r3 の疎水ポケットは、全ての置換ペプチド複合体構造において、VQIINK 複合体構造で観察された Ile²⁷⁸ 残基側鎖に相補的な構造が保持されていた。このことから、疎水ポケットは Ile 残基を特異的に受け入れる構造となっていることが示唆された。さらに、Fab2r3 と全ペプチド複合体の構造解析結果から、この疎水ポケットの構造保持には、重鎖と軽鎖間に形成される 2 つの水分子を介した水素結合ネットワークが関与することが示唆された。

本研究では、抗Tau抗体Fab2r3は、Tauの自己重合を阻害することが示唆された。またTauに対する特異的認識には、水素結合以外にも、疎水ポケットの形成が必要であることを構造化学的に示した。本研究で得られた知見は、強力なTau重合阻害効果を有する人工抗体の開発、並びに新規アルツハイマー病治療薬や診断薬の開発に有益な情報をもたらす結果であると思われる。

以上により、上記の論文は、博士(薬学)論文として適当と判断する。