

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

大阪医科薬科大学大学院
薬学研究科

槌田 智裕

略語一覽

AD	Alzheimer's disease
A β	Amyloid β peptide
NFT	Neurofibrillary Tangle
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
MAP kinase	Mitogen-activated protein kinase
PHF	Paired Helical Filament
PRD	Proline-Rich Domain
MBD	Microtubule-Binding Domain
IgG	Immunoglobulin G
Fab	Antigen binding fragment
4RMBD	Four-repeat type microtubule-binding domain
ThS	Thioflavin S
ThT	Thioflavin T
DLS	Dynamic Light Scattering
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
K_d	Dissociation constant
MCSG	Midwest Center for Structural Genomics
PEG	Polyethylene glycol
PDB	Protein Data Bank
CDR	Complementarity Determining Region
V _H	Variable domain of heavy chain of the antibody
V _L	Variable domain of light chain of the antibody
C _{H1}	First constant domain of heavy chain of the antibody
C _L	Constant domain of light chain of the antibody
FR	Framework domain of the antibody
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

アミノ酸表記

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

目 次

序論	1
第一章 Tau 特異的認識抗体による Tau 重合阻害作用機構の解明	5
第一節 Fab2r3 による Tau 重合阻害作用の評価	5
第一項 Tau の β -sheet 状自己重合反応に対する Fab2r3 の阻害効果	6
第二項 動的散乱法を用いた Fab2r3 の Tau 重合阻害効果の評価	7
第三項 Negative-staining 電子顕微鏡撮影法を用いた Tau 重合体の形態観察	8
第四項 小括	10
第二節 Fab2r3 による Tau 分子認識機構についての解析	11
第一項 Fab2r3 の Tau 分子中結合部位の同定	13
第二項 Fab2r3 の $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列中結合残基の同定	15
第三項 小括	17
第三節 Fab2r3 の $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列特異性に対する Ile 278 認識能の重要性	18
第一項 疎水的駆動力による Ile 278 認識	18
第二項 Fab2r3 による Ile 278 特異的認識作用	20
第四節 小括	21
第二章 Fab2r3 による Tau 特異的認識機構の解明	23
第一節 Fab2r3 と Tau の結合様式の解明	23
第一項 Fab2r3-Tau ペプチド複合体結晶の作製	24
第二項 Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造の解明	25
第三項 Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体の全体構造	27
第四項 Fab2r3 と VQIINK ペプチドの結合様式	28
第五項 小括	31

第二節 Fab2r3 の Tau 認識機序の解明	32
第一項 apo Fab2r3 結晶の作製	32
第二項 apo Fab2r3 構造の解明	33
第三項 リガンド結合サイトの構造変化	34
第四項 VQIINK ペプチドとの結合に伴う疎水ポケットの形成	35
第五項 Tau との結合に伴う Fab2r3 全体構造の変化	37
第六項 小活	39
第三節 Fab2r3 の Ile278 側鎖特異的認識機構の解明	40
第一項 Fab2r3-VQIINK 変異ペプチド複合体の結晶析出条件の探索	41
第二項 各複合体構造の解明	42
第三項 各複合体構造のリガンドペプチド構造	43
第四項 Fab2r3 の VQIINK 配列特異性に重要な Ile 側鎖相補的な疎水ポケット	44
第五項 Ile 側鎖相補的な疎水ポケットの形成、及び固定化に関わる水架橋構造	48
第六項 小活	50
総括	51
謝辞	54
実験の部	55
参考文献	61
論文目録	69

序論

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は、脳全体に萎縮が認められる認知症疾患であり、主症状として、近時記憶障害、見当識障害などの認知機能障害や、妄想、幻覚、徘徊などの行動・心理症状が認められる^[1-6]。65 歳以上の高齢者に発症する事が多く、重症例では介護支援が必要となり、患者の家族、友人に対する社会的・経済的な負担も大きいことから、超高齢化社会を迎える我が国において重大な社会問題の一つである^[7-10]。

AD の特徴的な病理学的所見に、Amyloid β ペプチド ($A\beta$) の自己重合体による老人斑と、微小管結合型タンパク質 Tau の自己重合体による神経原線維変化 (Neurofibrillary Tangles: NFT) がある^[5-6, 11-14]。これらの所見は、初期には内側側頭葉の経嗅覚野や嗅覚野で見られ、次いで海馬領域に進展し、最終的に大脳皮質へと病変が広がる^[15-16]。また、老人斑の蓄積は、最も早期から見られ、これに引き続き NFT 蓄積や神経脱落が見られる (Fig. 1)^[17]。この一連のカスケードを、アミロイドカスケード仮説と呼ぶ^[18-20]。この仮説に従うと、 $A\beta$ の産生・蓄積を阻害すれば、その下流にある AD 病態形成を根本的に止められると考えられるため、 $A\beta$ を標的とした多くの治療薬開発が行われてきたが、AD により低下した脳機能を明確に改善する物質は未だ開発されていない^[21-23]。これに対し、Tau 重合体による NFT の進行は、老人斑よりも密接に AD 症状の進行と相関性を示すので^[17]、AD 根本治療薬の標的として近年注目されており、Tau 自己重合機構の解明と重合阻害物質の探索は、AD 根本治療薬の開発において重要な研究課題である。

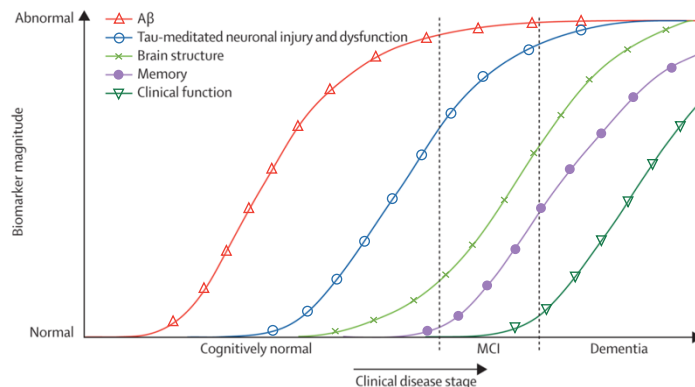


Fig. 1. Dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade.

The graph shows the relationship between the clinical stage and the biomarker magnitude^[17].

Tau は脳内の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、微小管構造安定化や、伸長促進に寄与している^[24-26]。しかし、GSK3 や MAP キナーゼなど様々なリン酸化酵素により Tau が異常にリン酸化されると、微小管結合能が減弱し、微小管構造安定化能と伸長促進能が減少する^[27-29]。更に、解離した Tau は異常な自己重合を起こすようになり、Paired Helical Filaments (PHF) と呼ばれる不溶性線維を形成した後、神経細胞内に沈着する (Fig. 2)。これにより、AD 症状と密接に相関する NFTs が見られるようになる^[30-32]。また、PHF 形成初期に生じる Tau oligomer は、病変細胞から正常な神経細胞に移行し、Tau の自己重合を誘起する事が知られており、これが Tau 病変を急激に拡大する要因の一つと考えられている^[33-36]。

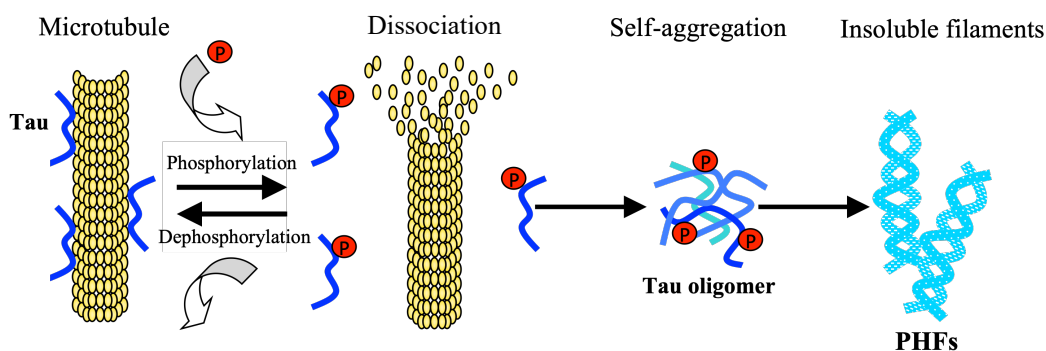


Fig. 2. Formation of insoluble PHFs by tau abnormal self-aggregation.

Tau 遺伝子は、17 番染色体長腕 17q21 に存在する 16 個の Exon からなる。Exon2、Exon3、及び Exon10 の選択的スプライシングによって、6 種のアイソフォームが存在している (Fig. 3)^[37-40]。AD 患者の脳内に見られる異常リン酸化 Tau のリン酸化部位は、Tau の Middle domain に位置する Proline-rich Domain (PRD) 中に多く存在している^[41-44]。PRD 領域の C 末側には、微小管結合領域 (Microtubule-binding domain: MBD) が存在しており、この領域は Tau が有する微小管構造安定化作用等に強く寄与する領域である。その一方、MBD 領域は単独でも重合反応を示すことや^[45-47]、PHF のコア領域のほとんどが MBD 領域で構成されていることから^[48]、微小管から解離した Tau に見られる自己重合反応にも深く関与する領域である^[49-52]。

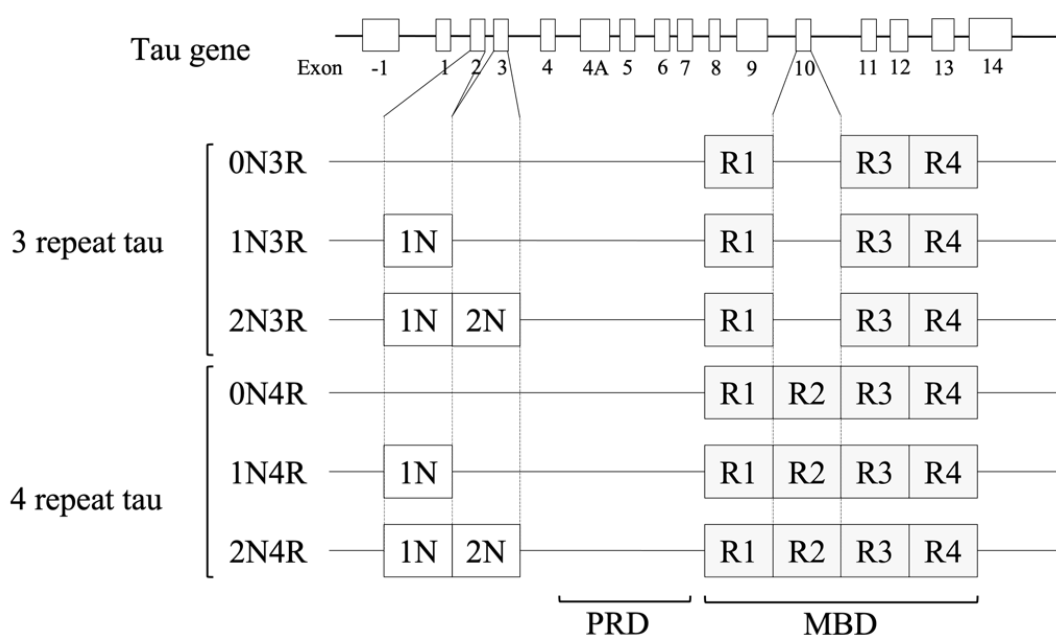


Fig. 3. Six tau isoforms by alternative splicing of exon 2, 3, and 10 in chromosome 17.

The six isoforms are formed by alternative splicing of the tau gene. Tau is classified by the sequence at the N-terminal domain to 0N (no exon 2 and 3), 1N (included just exon 2), or 2N (included exon2 and 3). Also, it's classified by the difference at the C-terminal domain to 3R (no exon 10) and 4R (included exon 10). The middle domain of tau, called the Proline-rich domain (PRD), has a lot of phosphorylated sites.

これまでに、MBD 領域と作用し重合阻害作用を示す物質は多数発見されている^[53-55]。特に、Methylene blue は、Tau 分子中 Cys のチオール基を酸化することで、非常に強い Tau 重合阻害作用を発揮すると考えられているが^[56]、Tau との結合様式や作用機序に関する構造化学的知見は得られておらず、構造をベースとした新規 Tau 重合阻害物質開発への応用が困難という課題が残っている。このことから、新規 Tau 重合阻害物質開発研究において、結合部位や作用機序に関する構造化学的知見が得られるリード化合物の開発が期待されている。構造化学的知見の収集に適するリード物質として、抗体がある。抗体は、高い抗原特異性を有していることから結合部位の同定が可能であり、更にその Fab 領域は結晶性が良く詳細な立体構造解析が可能であるため、原子レベルでの機能解析が可能な物質であり、新規 Tau 重合阻害物質開発研究における有効なリード化合物に成り得る。このような背景から、当研究グループでは以前より、Tau 分子中の MBD 領域を特異的に認識する抗体の作製に取り組んでいる。

我々が標的としている MBD 領域は、類似した 31~32 残基のアミノ酸が 3~4 回繰り返した特徴的な構造を有した領域である (Fig. 4)。これらの各リピートドメイン (R1~R4) の働きは異なり、

特に MBD 領域中 R2 ドメインの $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列と、R3 ドメインの $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 配列が、Tau 自己重合反応に必須な配列である [57-60]。特に、 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列は、脳内での Tau 病変の拡大に関与する Tau oligomer の形成にも深く関与しており (Fig. 2)、 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列をモチーフにした Tau 重合阻害物質が、Tau oligomer の細胞間伝播を抑制することが示されている [61]。このような背景から、当研究グループでは Tau oligomer の形成に深く関わる $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 領域を認識する抗体の作製に取り組み、 $^{272}\text{GGKVQIINKKLD}^{283}$ ペプチドをエピトープとするマウスモノクローナル IgG2a 抗体 (Tau2r3) の作製に成功した。本論文では、Tau2r3 の Fab 領域 (Fab2r3) を作製し、Fab2r3 の Tau 重合阻害作用及び Tau 特異的認識機構について原子レベルでの解析を行った。

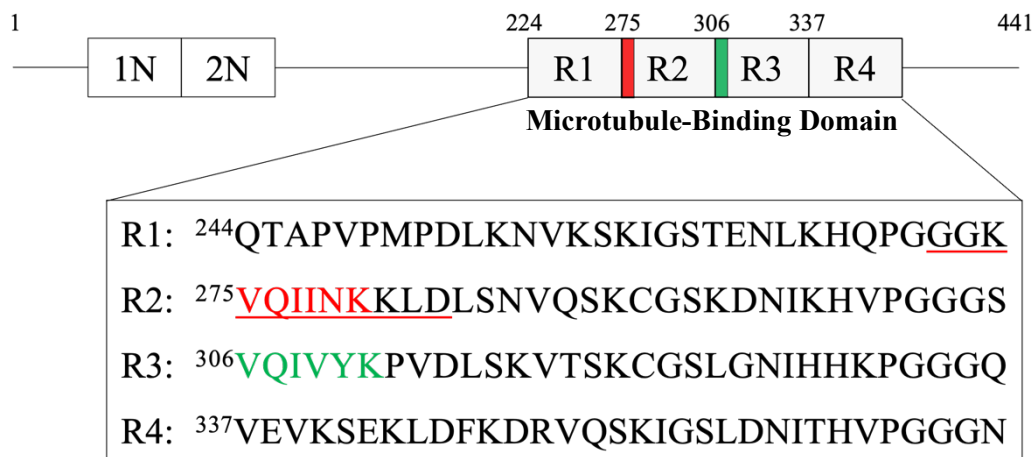


Fig. 4. Amino acid sequence of MBD in tau.

The R1 to R4 represent the first to fourth repeat regions of MBD. Two six-amino acids, which the necessary sequences of tau self-aggregation, are colored to red ($^{275}\text{VQIINK}^{280}$) and green ($^{306}\text{VQIVYK}^{311}$), and the epitope sequence represents of red under line.

本論

第一章 Tau 特異的認識抗体による Tau 重合阻害機構の解明

本章では、Tau 特異的認識抗体 (Tau2r3) の Fab 領域 (Fab2r3) が有する Tau 自己重合阻害作用の評価と、その作用機序についての解析を、分光学的、及び熱力学的手法を用いて行った。

本実験では、Tau タンパク質としてアイソフォームの 1 つである 0N4R と、その MBD 領域である 4RMBD を用いた (Fig. 5)。

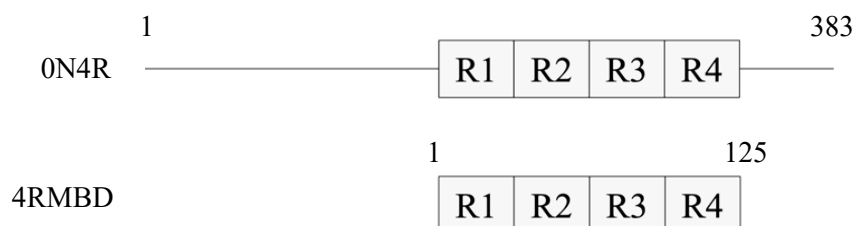


Fig. 5. Schematic images of 0N4R and 4RMBD.

第一節 Fab2r3 による Tau 重合阻害作用の評価

0N4R 及び 4RMBD 溶液に Fab2r3 を共存させることで Fab2r3 の重合阻害作用を、蛍光色素 Thioflavin S (ThS) を利用した蛍光強度測定、動的光散乱法による粒子径測定、及び電子顕微鏡を用いた形態観察により評価した。なお、Tau 自己重合は非常に速度の遅い反応であるため、*in vitro* で行う本実験は、Heparin を添加することにより重合反応を促進させた [62-63]。

第一項 Tau の β -sheet 状自己重合反応に対する Fab2r3 の阻害効果

Tau は、溶液中において一定の構造をとらないランダムコイル構造を示すが、Tau 異常自己重合体は、 β -sheet 構造を核とする cross- β 構造を形成する^[64-65]。蛍光色素 Thioflavin S (ThS) 及び Thioflavin T (ThT) は (Fig.6)、Tau の cross- β 構造状重合体に取り込まれ、それぞれ 480~520nm 及び 445~492nm の蛍光を発する性質を有している^[66-67]。これら色素を利用した蛍光強度測定は、経時的に進む Tau 重合反応を蛍光強度の上昇で示すことができるため、Tau 重合反応に関する解析によく用いられる手法である^[68-72]。この中でも ThS は、ThT よりも形成される Tau 重合体 (Amyloid 体) に対する選択能が高いため^[67]、本項では ThS を用いて Fab2r3 による Tau の β -sheet 状自己重合反応に対する阻害効果を観察した。

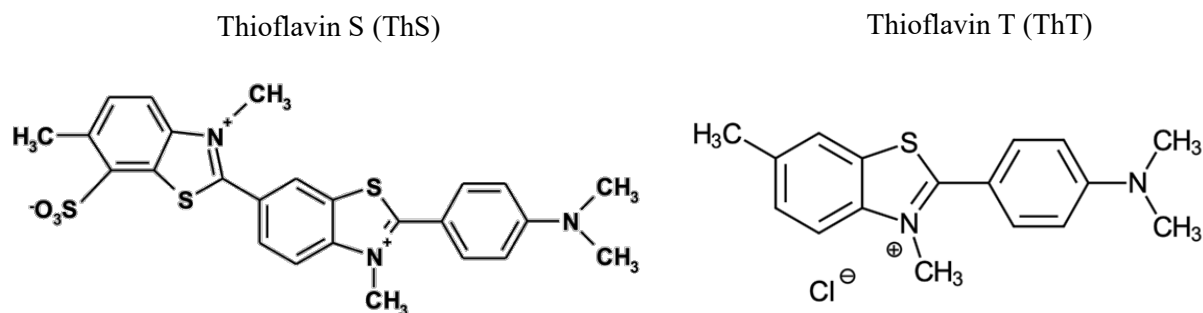


Fig. 6. The structures of Thioflavin S (ThS) and Thioflavin T (ThT).

Fig. 7a に、0N4R を、Fig. 7b に 4RMBD を用いた ThS 蛍光強度測定結果を示す。各測定は、ヘパリンを添加した時点と、その後 1 時間ごとに合計 6 回 (5 時間) 行った。0N4R はヘパリン添加後すぐに蛍光強度の上昇が観察された。これに対し、Fab2r3 共存下では、蛍光強度の上昇が抑制されている (Fig. 7b)。また、4RMBD を用いた測定でも 0N4R と同様に、時間経過に伴い蛍光強度の上昇が見られたが、Fab2r3 共存下では、蛍光強度の上昇は全く見られなかった (Fig. 7b)。

これらの測定結果では、Fab2r3 の添加により、0N4R 及び 4RMBD の重合反応に伴う蛍光強度の上昇が抑制されていることから、Fab2r3 は 0N4R 及び 4RMBD の重合反応を阻害していると推察される。

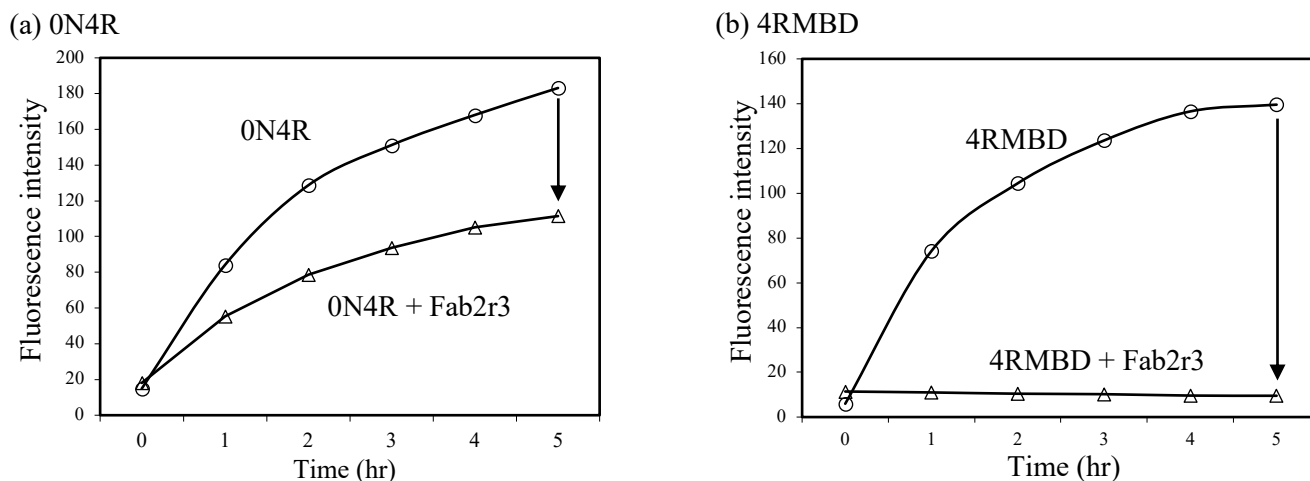


Fig. 7. The results of ThS fluorescence measurement.

ThS fluorescence curves of 0N4R (a; circular), 0N4R + Fab2r3 (a; triangle), 4RMBD (b; circular), and 4RMBD + Fab2r3.

第二項 動的光散乱法を用いた Fab2r3 の Tau 重合阻害効果の評価

Tau 重合反応に伴う線維成長は、代表的な粒子測定法の一つである動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering; DLS) を用いると、経時的に進む平均粒子径増加によって観察できる^[73]。この DLS 測定法を利用し、0N4R 及び 4RMBD の重合反応に対する Fab2r3 の阻害効果を観察した。

本項中の DLS 測定は、ヘパリンを添加後から 1 分毎に 180 分間サンプルの平均粒子径を測定した。0N4R はヘパリン添加による重合反応開始直後から平均粒子径の増大を示している (Fig. 8a)。これに対し、Fab2r3 共存下では平均粒子径の増大は観察されなかった。更に、4RMBD についても同様に、ヘパリン添加直後から平均粒子径の増大が観察されたが、Fab2r3 共存下では平均粒子径の増大は見られなかった (Fig. 8b)。

両結果では、Fab2r3 非共存下で見られた経時的な平均粒子径増大が、Fab2r3 の添加により抑制される結果が示されていることから、Fab2r3 が Tau の重合反応を阻害し、重合反応に伴う線維成長を抑制していると推察した。

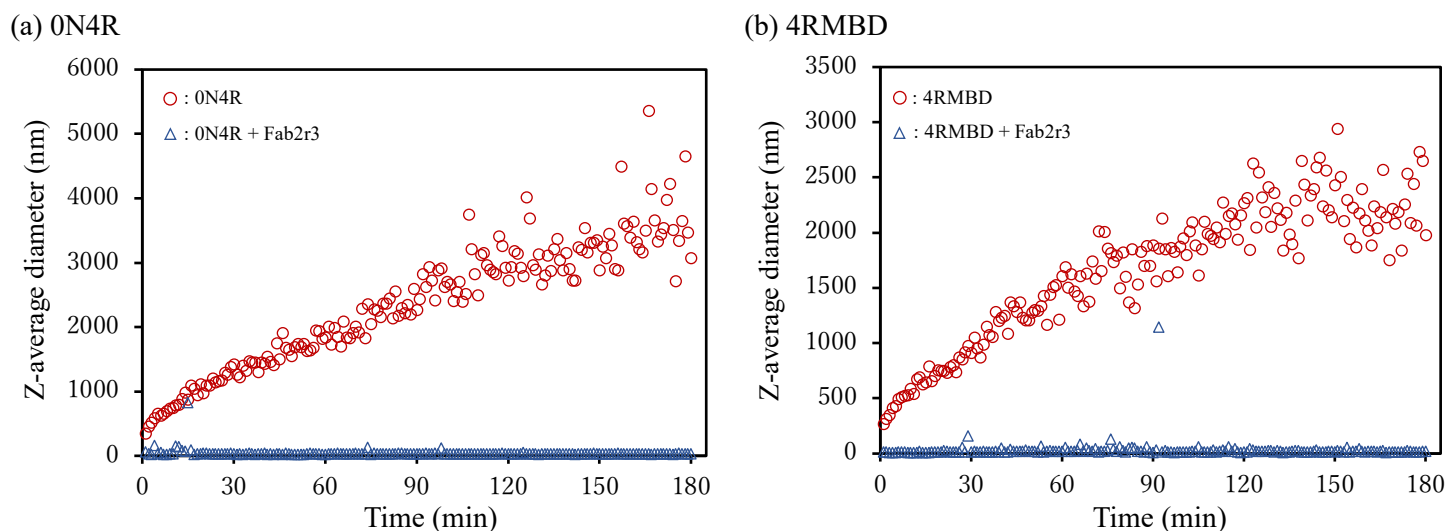


Fig. 8. The results of the DLS measurement.

The Z-average diameters by DLS measurement show the 0N4R (a) and 4RMBD (b). The circles present the results without Fab2r3, and the triangles present the with Fab2r3.

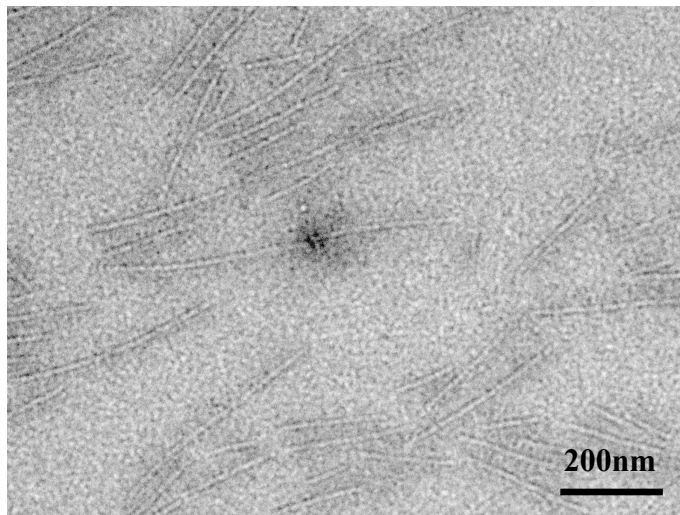
第三項 Negative-staining 電子顕微鏡を用いた Tau 重合体の形態観察

Tau 重合反応の進行により形成される Tau 線維の形態を直接観察できる Negative-staining 電子顕微鏡撮影により、Tau 重合に伴う線維形成反応に対する Fab2r3 の阻害効果を観察した。観察した試料は、ヘパリン添加後 48 時間経過したものを、2%酢酸ウランで染色したものである。

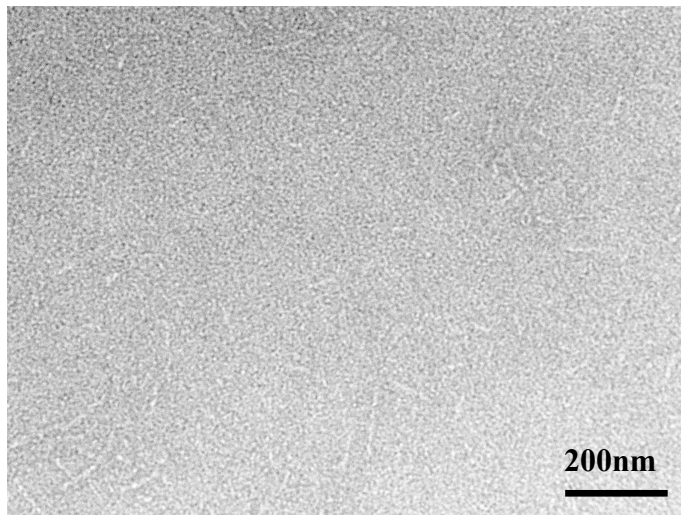
0N4R の撮影像では、明確な線維状物質が観察された (Fig. 9a)。これは 0N4R の重合反応に伴い形成される不溶性線維であると考えられる。これに対し、Fab2r3 共存下の撮影像は、明らかに形成される線維数や線維長が減少している (Fig. 9b)。また、4RMBD の撮影像においても、数多くの不溶性線維が観察されたが、Fab2r3 共存下では、線維数や線維長が明らかに減少していた (Fig. 9c, 9d)。

これらの結果では、Fab2r3 の添加により、重合反応に伴い形成される 0N4R、4RMBD の不溶性線維は、明らかに減少しており、更に線維長も短くなる結果が得られた。従って、Fab2r3 が 0N4R 及び、4RMBD の重合反応を阻害することで、重合に伴う不溶性線維の形成を抑制すると考えられる。

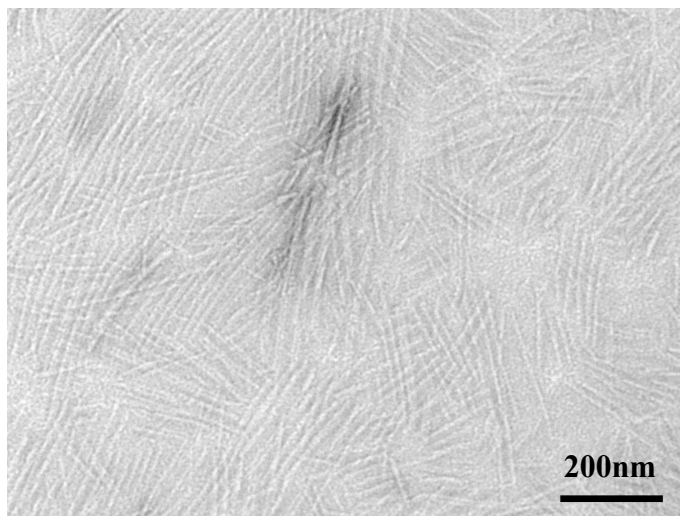
(a) 0N4R



(b) 0N4R + Fab2r3



(c) 4RMBD



(d) 4RMBD + Fab2r3

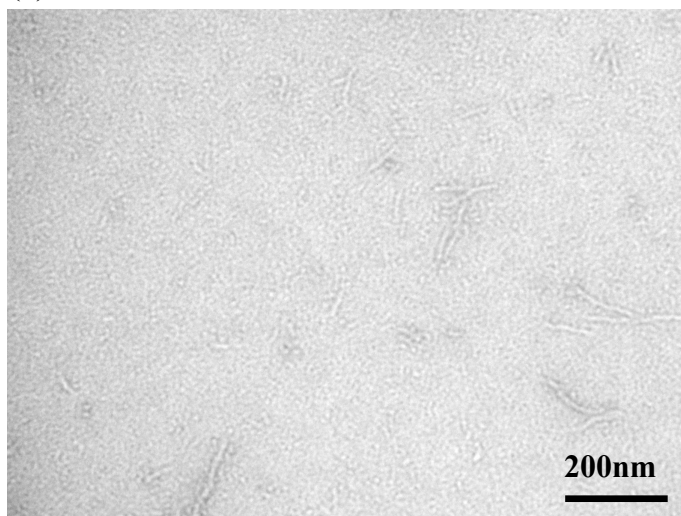


Fig. 9. The electron micrographs of 0N4R (a), 0N4R + Fab2r3 (b), 4RMBD (c), and 4RMBD + Fab2r3 (d).

The samples are negatively stained with 2% uranyl acetate. The magnification is 15k.

第四項 小括

本節では、ThS を用いた蛍光強度測定、動的光散乱法を用いた粒子径測定、及び電子顕微鏡による形態学的観察により、Fab2r3 の Tau 自己重合反応に対する阻害作用を評価した。まず、ThS 蛍光強度測定では、0N4R、4RMBD 溶液に Fab2r3 を共存させることで、両者の自己重合反応に伴う経時的な蛍光強度上昇が抑制される結果が示された (Fig. 7)。また、Tau 重合反応の進行に伴う線維成長を観察するため、動的光散乱法を用い経時的な粒子径変化を測定したところ、Fab2r3 の共存により重合反応に伴う粒子径増大が阻害される結果が得られた (Fig. 8)。更に、0N4R、4RMBD が形成する不溶性線維は、Fab2r3 の共存により形成数が大きく減少し、更に線維長も小さくなるのが、電子顕微鏡による観察によってわかった (Fig. 9)。これらの結果から、Fab2r3 は 0N4R 及び 4RMBD の重合反応に対して阻害効果を有しており、これによって重合反応に伴う線維成長の抑制や不溶性線維数の大幅な減少が見られたと考えられる。また、4RMBD は 0N4R の微小管結合領域であることから、Fab2r3 の有する Tau 自己重合阻害作用は、Tau 分子中 MBD 領域との相互作用によって生じると推測できる。

本実験系では、Tau の重合反応を促進するためヘパリンを添加している。近年のクライオ電子顕微鏡を用いた Tau 線維の構造解析結果は、ヘパリンによって誘導された Tau 線維のコア領域が、ヒトの脳内で形成される PHF のコア領域と異なる構造であることを示している [52, 74-75]。このような構造の違いは、ヘパリンによる Tau 重合促進機構が生体内の重合機構と異なるため生じたと考えられ、今回私が示した Fab2r3 の Tau 重合阻害効果について、*in vivo* 系を用いた詳細な解析を行う必要があると考えている。

第二節 Fab2r3 による Tau 分子認識機構についての解析

第一節の結果から、Fab2r3 が Tau 分子中 MBD 領域に作用し、Tau 自己重合反応に対して強い阻害作用を示す事がわかった。Fab2r3 が有する Tau 重合阻害効果の作用機序について解析を行うため、熱力学的解析法を用いて、エピトープ配列中の Fab2r3 結合部位の同定を行い、またその認識機序について解析を行った。

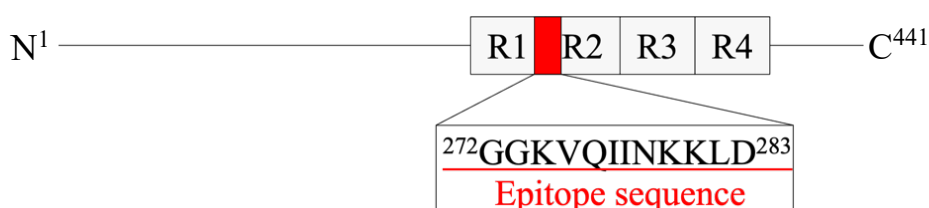


Fig. 10. The epitope sequence of Tau2r3.

[等温滴定型熱量測定法 (Isothermal Titration Calorimetry: ITC)]

本論文で用いた熱力学的解析法は、等温滴定型熱量測定法である。この測定法では、二種類の分子間で見られる結合反応に関連する熱力学的パラメーターを明らかにできる^[76]。

本実験で用いた MicroCal iTC200 は、Fig.11a の略図で示される装置である。ITC 測定ではまず、リガンドの滴定によって生じるサンプル-リガンド間の結合反応熱が、サンプルセル内の温度を変化させ、リファレンスセルとの間に生じた温度差をゼロにするために使用した補償電氣量を、時間に対してプロットしたグラフを作成する (Fig. 11b)。本論文では、ORIGIN software を用いて、得られたグラフの各ピーク面積を縦軸にとり、横軸にモル比をプロットしたグラフを作成し (Fig. 11c)、フィッティングを行うことで得られるシグモイド曲線から、結合定数 (K_a) とエンタルピー変化量 (ΔH) を求めた。更に、下記のギブスの自由エネルギー変化の理論式 (式[1]) に、得られた K_a 値と ΔH を代入することで、ギブスの自由エネルギー変化量 (ΔG) とエントロピー変化量 (ΔS) といった熱力学的パラメーターを算出した。また、解離定数 K_d は式[2]から算出した。

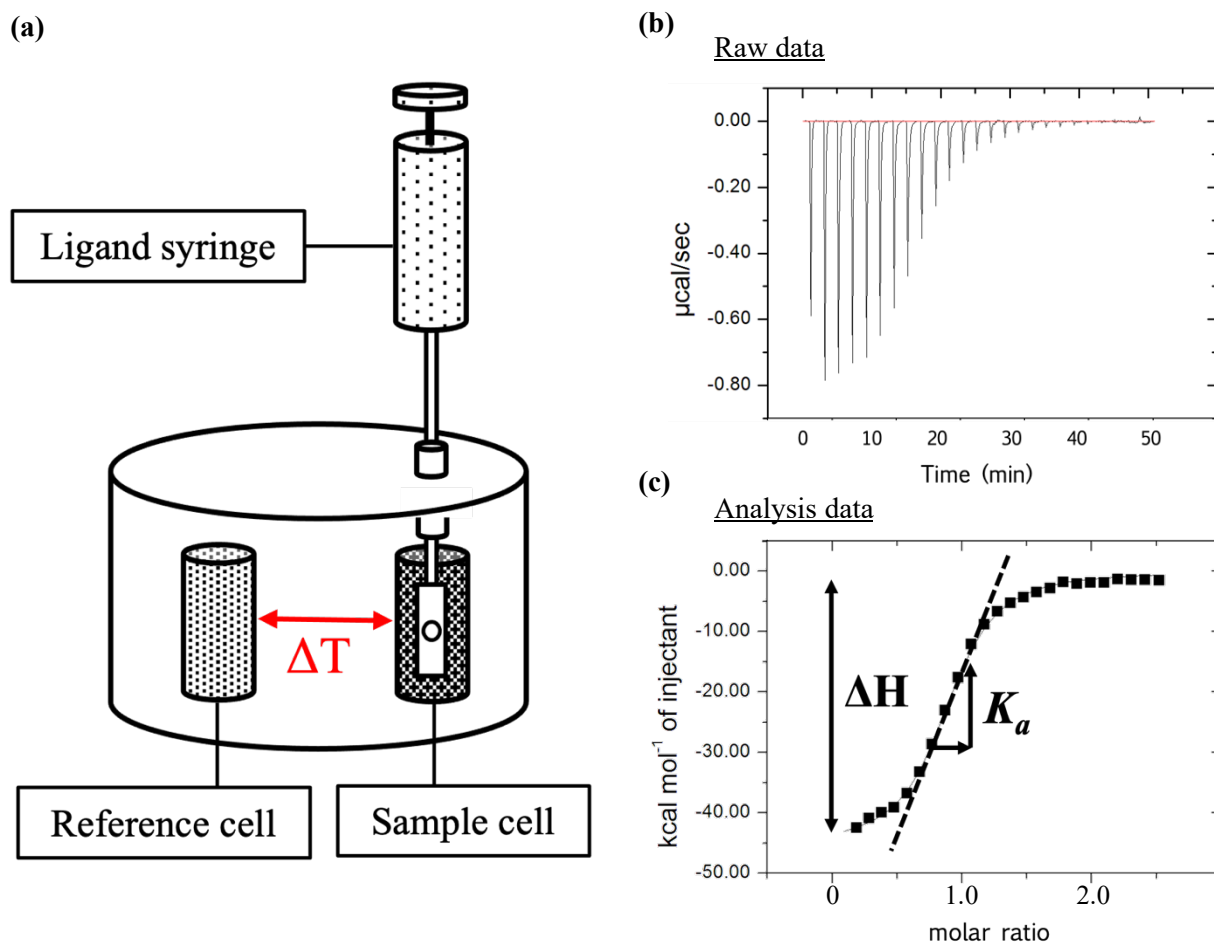


Fig. 11. MicroCal iTC200 system schematic (a), raw data chart (b), and analysis data diagram (c).

(a) The schematic image of MicroCal iTC200. (b) The line chart of the relation between the electric power and time on ITC measurement. (c) The diagram of the relation between the enthalpy change and molar ratio from the raw data.

$$\Delta G = -RT\ln(K_a) = \Delta H - T \Delta S \quad [1]$$

$$K_d = 1/K_a \quad [2]$$

第一項 Fab2r3 の Tau 分子中結合部位の同定

Tau 分子中 Fab2r3 認識領域を明らかにするため、4RMBD 及び Tau ペプチドと Fab2r3 の相互作用解析を行った。結合強度の比較には、結合強度と相関する解離定数 (K_d) の値を用いた。

Fab2r3 と 4RMBD 及びエピトープ配列ペプチド (GGKVQIINKKLD) との結合強度測定を行ったところ、どちらの結果においてもシグモイド型の熱量変化が見られ、得られた解離定数は $K_d=3.13\mu\text{M}$ と $K_d=0.14\mu\text{M}$ であった (Fig. 12a, 12b)。この結果は、Fab2r3 が MBD 領域中のエピトープ配列と結合することを示唆している。更に、Fab2r3 認識領域を絞るため、エピトープ内の前半領域 (GKVQIINK)、及び後半領域 (VQIINKKLD) ペプチドとの相互作用解析を行ったところ、得られた解離定数 ($K_d=0.16\mu\text{M}$ 、 $K_d=0.69\mu\text{M}$) は同桁であったことから、両ペプチドとも同程度の強度で Fab2r3 と結合していることが示された (Fig. 12c, 12d)。

ここまで Fab2r3 と結合強度測定を行ったペプチドには、全て VQIINK 配列が含まれていることから、Fab2r3 のリガンド認識作用は VQIINK 配列に対する認識機構が中心となって生じていると推測できる。そこで、Fab2r3 と VQIINK ペプチドの結合強度測定を行ったところ、得られた解離定数は $K_d=0.41\mu\text{M}$ であり (Fig. 12e)、他のペプチドと同桁の値が示されたことから、Fab2r3 とリガンドの結合反応は、VQIINK 配列との相互作用が中心となり生じると考えるに至った。

Fab2r3 との結合が示された VQIINK 配列は、Tau 分子中では R2 ドメインに存在しており、Tau 重合反応の開始に必須な配列の一つである (Fig. 4)。Tau 分子中には、VQIINK 配列と同様に重合反応に関わる配列として R3 ドメインの N 末端側に存在する VQIVYK 配列がある。両配列は、類似性があることから、VQIVYK ペプチドと Fab2r3 の結合強度解析を行った。その結果、シグモイド型の熱量変化は観察されず、概算された解離定数も $K_d=21.7\mu\text{M}$ であり (Fig. 12f)、VQIINK ペプチドより約 50 倍高い値であった。これは Fab2r3 が VQIVYK 配列と VQIINK 配列の違いを正確に読み取り、VQIINK 配列にのみ特異性を示すことを示唆している。これらの結果から、Fab2r3 は Tau 分子中の VQIINK 配列に選択的に結合することで、第一節で示された Tau 重合阻害作用を示すことが推察できる。

Table 1, Thermodynamic parameters from ITC results.

Peptide	K_d (μM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg.)
4RMBD	3.13	-7.56	-22.1	-49.1
²⁷² G-G-K-V-Q-I-I-N-K-K-L-D ²⁸³	0.14	-8.01	-44.5	-123
²⁷³ G-K-V-Q-I-I-N-K ²⁸⁰	0.16	-9.40	-38.6	-98.4
²⁷⁵ V-Q-I-I-N-K-K-L-D ²⁸³	0.69	-8.53	-35.1	-89.4
²⁷⁵ V-Q-I-I-N-K ²⁸⁰	0.41	-8.87	-41.0	-108
³⁰⁶ V-Q-I-V-Y-K ³¹¹	21.7	-6.42	-17.9	-38.8

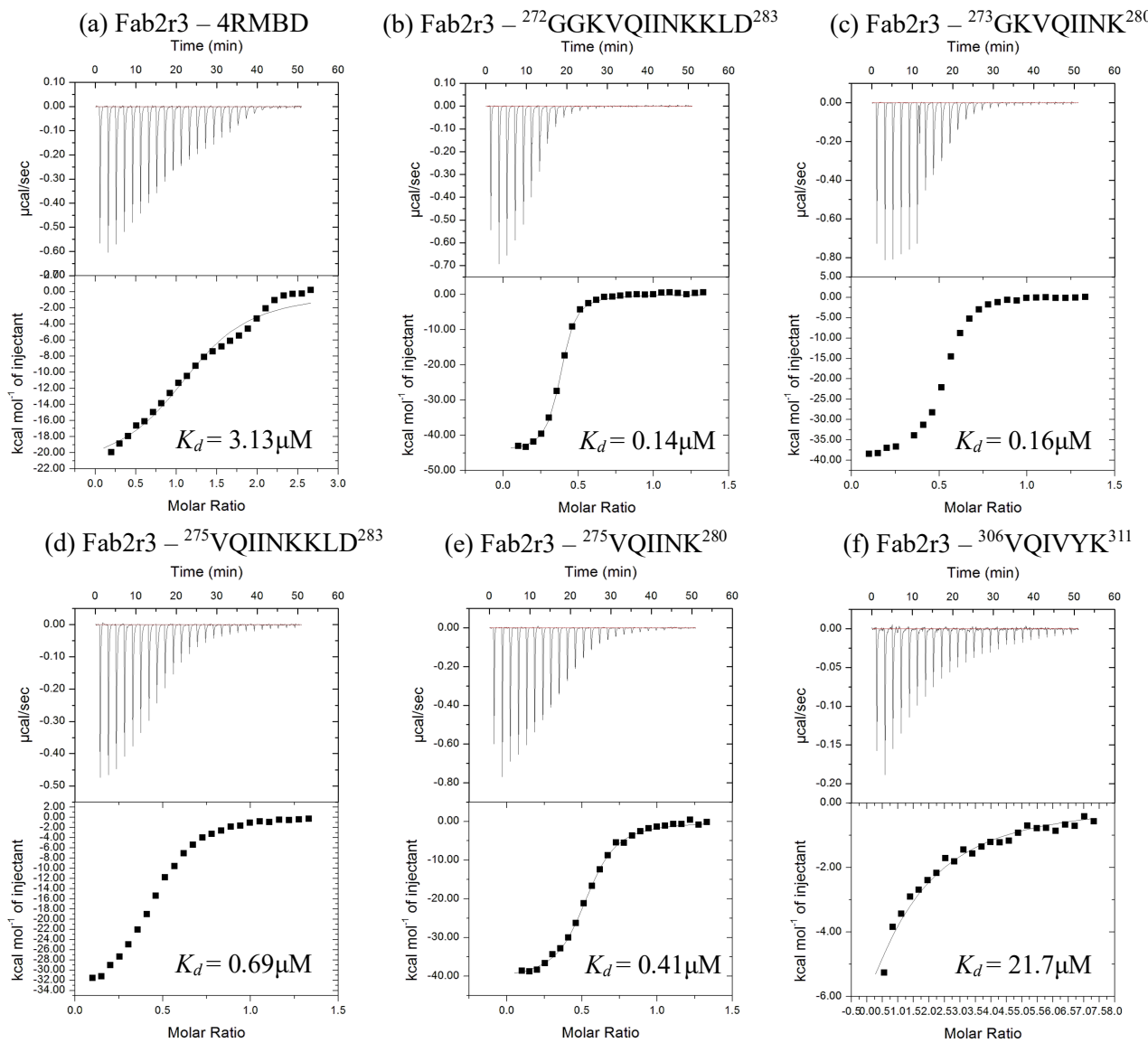


Fig. 12. ITC results for Fab2r3 with 4RMBD (a), ²⁷²GGKVQIINKKLD²⁸³ (b), ²⁷³GKVQIINK²⁸⁰ (c), ²⁷⁵VQIINKKLD²⁸³ (d), ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ (e), and ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ peptide. The top panel shows the raw data, and the bottom panel shows the peak area from top panel.

第二項 Fab2r3 の $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列中結合残基の同定

前項では、Fab2r3 がエピトープ配列中の VQIINK 配列と結合することが示され、Fab2r3 の Tau 重合阻害作用が Tau 分子中 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 領域との結合に起因して生じることが示唆された。本項では、Fab2r3 の $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列認識機構についてより詳細に解析するため、 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列中の親水性残基 (Gln²⁷⁶、Asn²⁷⁹、Lys²⁸⁰) と、疎水性残基 (Val²⁷⁵、Ile²⁷⁷、Ile²⁷⁸) を、それぞれ Ala に変異させた $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 変異ペプチドと Fab2r3 の結合強度解析を行った。

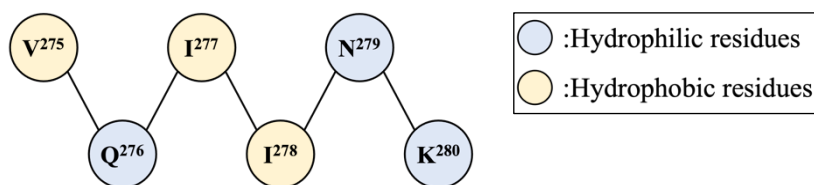


Fig. 13. The hydrophilic and hydrophobic residues at the $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ region in tau.

Fab2r3 の Tau 認識機構における親水性残基の影響

$^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列の親水性残基をそれぞれ Ala に変異させた、VAIINK、VQIIAK、VQIINA ペプチドと Fab2r3 の結合強度解析を、ITC 測定法を用いて行った。ITC 測定結果を Table 2 に示す。

まず、Fab2r3 と Asn²⁷⁹ 変異ペプチド (VQIIAK) の解析結果では、シグモイド型の熱量変化が観察され、得られた熱力学的パラメーターも VQIINK ペプチドと類似していたことから、Asn²⁷⁹ の側鎖は、Fab2r3 の VQIINK 配列認識機構に関与していないことが推測された (Fig. 14b)。これに対し、Fab2r3 と Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ 変異型ペプチド (VAIINK、VQIINA) とは、結合反応に伴う反応熱が検出されていなかったため、結合反応が生じていないことがわかった。従って、Fab2r3 と Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ の両側鎖が相互作用を形成していることが示唆された (Fig. 14a, 14c)。また、Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ のどちらかの残基が変異しても結合反応を起こさなかったことから、Fab2r3 の Tau 認識には両残基が同時に存在する事が必須である事がわかった。

Table 2, Thermodynamic parameters from ITC results

Peptide	K_d (μM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg.)
V-Q-I-I-N-K	0.41	-8.87	-41.0	-108
V- A -I-I-N-K	Not Binding			
V-Q-I-I- A -K	0.40	-8.82	-49.5	-137
V-Q-I-I-N- A	Not Binding			

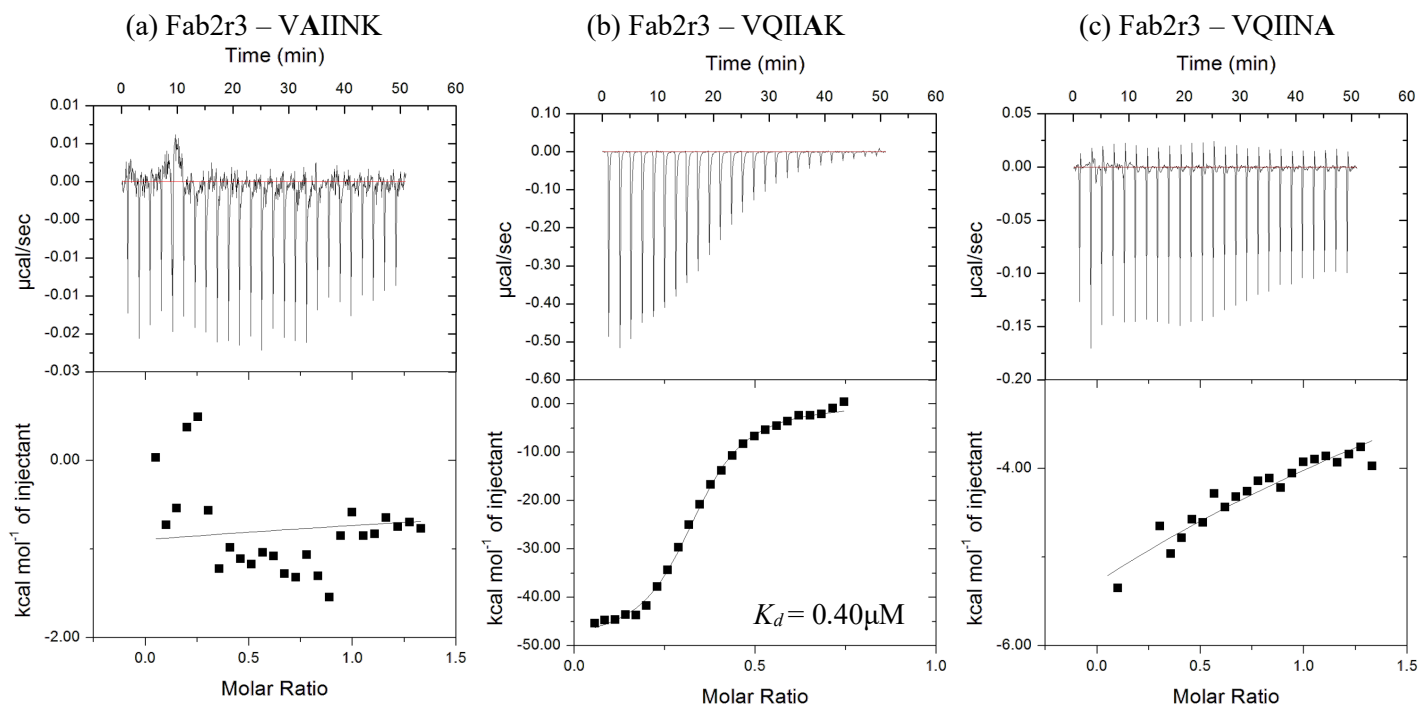


Fig. 14. ITC results for Fab2r3 with VAIINK (a), VQIIAK (b), and VQIINA (c).

The top panel shows the raw data, and the bottom panel shows the peak area from top panel.

Fab2r3 の Tau 認識機構における疎水性残基の影響

Fab2r3 と Tau との結合には親水性残基 Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ が必須である事がわかった。次に、VQIINK 配列中の疎水性残基をそれぞれ Ala に変異させた、AQIINK、VQAINK、VQIANK ペプチドと Fab2r3 の結合強度解析を、ITC 測定法を用いて行い、Fab2r3 と ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ 配列間に形成される疎水性相互作用について解析を行った。得られた熱力学的パラメーターを Table 3 に示す。

解析の結果、Fab2r3 と Val²⁷⁵、Ile²⁷⁷ 変異ペプチド (AQIINK、VQAINK) は、VQIINK ペプチドとの結果と同様に、シグモイド型の熱量変化が見られ、解離定数の値も同桁であったことから、VQIINK ペプチドとの結合強度と同程度の強度で Fab2r3 と結合することが示された (Fig. 15a, 15b)。従って、Val²⁷⁵、Ile²⁷⁷ の両残基の側鎖は Fab2r3 との結合反応に必須でない事が示唆された。これに対し、Fab2r3 と Ile²⁷⁸ 変異型ペプチド (VQIANK) との ITC 測定結果では、明確な反応熱が検出できなかったことから、結合反応が生じていないことがわかり、Fab2r3 は Ile²⁷⁸ の側鎖と疎水性相互作用を形成していることが示唆された (Fig. 15c)。

Table 3, Thermodynamic parameters from ITC results

Peptide	K_d (μ M)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg.)
V – Q – I – I – N – K	0.41	-8.87	-41.0	-108
A – Q – I – I – N – K	0.37	-8.92	-55.6	-157
V – Q – A – I – N – K	0.70	-8.53	-51.6	-145
V – Q – I – A – N – K	Not Binding			

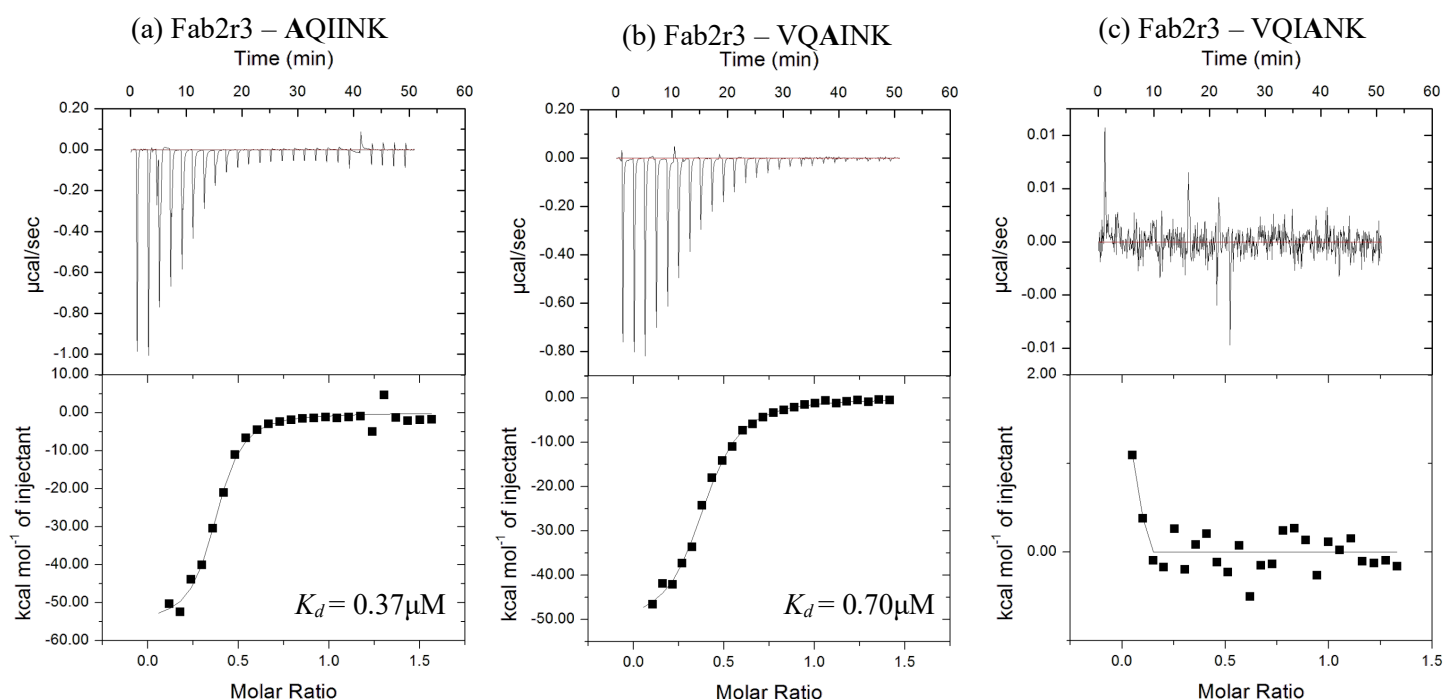


Fig. 15. ITC results for Fab2r3 with AQIINK (a), VQAIINK (b), and VQIANK (c).

The top panel shows the raw data, and the bottom panel shows the peak area from top panel.

第三項 小括

ここまでの結果から、Fab2r3 は Tau 分子中の VQIINK ペプチドと結合することがわかり、第一節で示された Fab2r3 の Tau 自己重合阻害作用が、MBD 領域中の ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ 領域との結合に起因することが推察できた。また、この Fab2r3 と VQIINK との結合について詳細な解析を行ったところ、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ 領域中の親水性残基 Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ と、疎水性残基 Ile²⁷⁸ のいずれかの残基が Ala へ変異すると、Fab2r3 は結合反応を起こさなかったことから、これらの残基の側鎖が Fab2r3 との結合に必須であることが示された。

第三節 Fab2r3 の $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列特異性に対する Ile^{278} 認識能の重要性

ここまでの結果で、Fab2r3 の VQIINK 配列との結合には Gln^{276} 、 Ile^{278} 、 Lys^{280} との相互作用が重要であることを示した (Fig. 16)。第一節で、VQIINK 配列と類似した VQIVYK 配列との結合強度が約 50 倍低下することを示しており (Fig. 12e, 12f, Table 1)、この結合強度の低下は Ile^{278} の変異に起因することが推測される。よって本節では、Fab2r3 が有する VQIINK 配列特異性についての詳細な解析のため、 Ile^{278} 変異型 VQIINK 類似ペプチドと Fab2r3 の結合強度解析を行った。

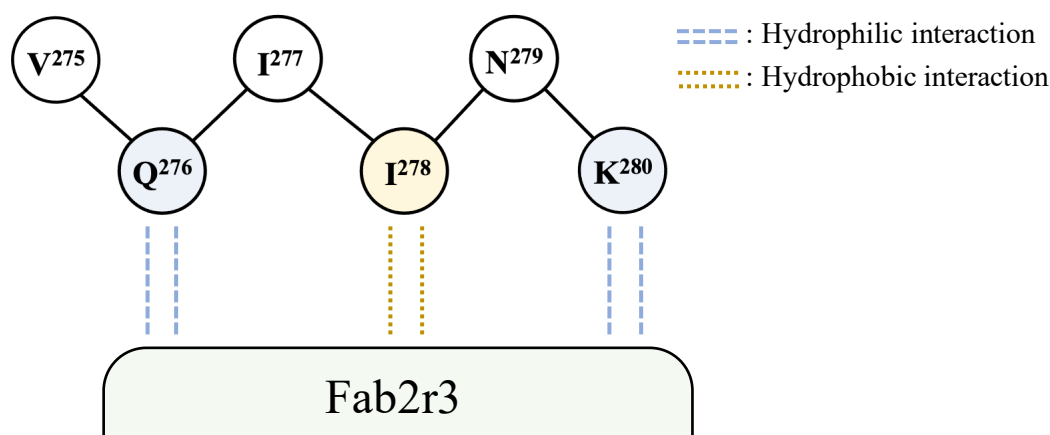


Fig. 16. The interactions between the $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ peptide and Fab2r3.

The illustration represents the interactions between the VQIINK peptide and Fab2r3. The Gln^{276} and Lys^{280} , which show at the light blue circles, and the Ile^{278} , which show at the light yellow circles, are necessary residues at the binding reaction with Fab2r3. The dotted lines present the hydrophilic interactions (light blue) and hydrophobic interaction (light yellow).

第一項 疎水的駆動力による Ile^{278} 認識

Fab2r3 の Tau 結合反応に重要な Ile^{278} 認識機構を明らかにするため、 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列中 Ile^{278} 残基を親水性残基 (Ser, Thr, Asn, Asp, Lys) に変異させたペプチド (VQISNK, VQITNK, VQINNK, VQIDNK, VQIKNK) と Fab2r3 の結合強度解析を、ITC 測定法を用いて行った。

解析の結果、Fab2r3 は全てのペプチドと結合反応に伴う反応熱が検出されていないことから、結合反応が生じていないことが示された。この結果は、Fab2r3 は VQIINK 配列中の Ile^{278} 疎水性側鎖を、疎水的駆動力によって認識していることを示している (Fig. 17a-17e)。

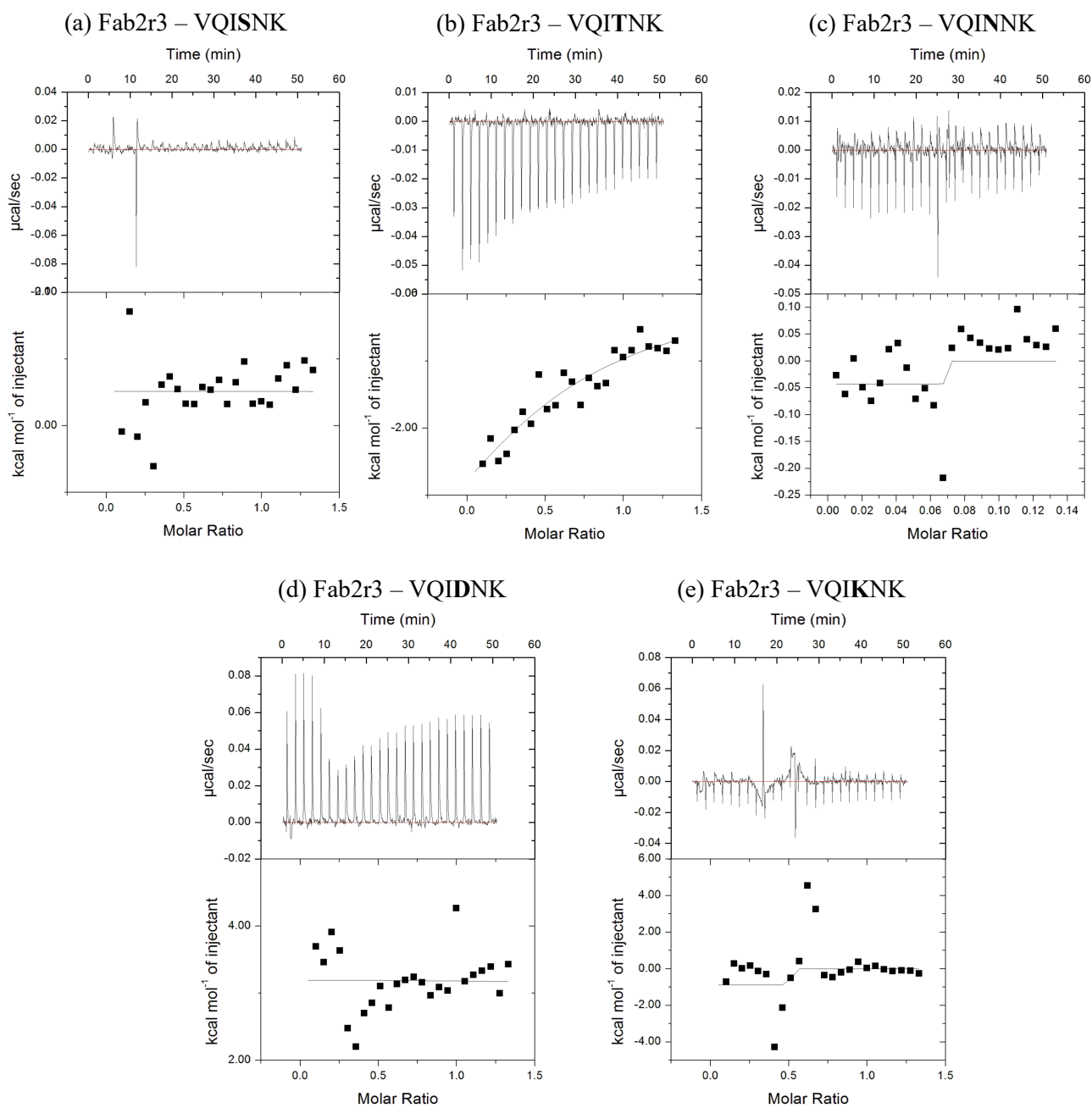


Fig. 17. ITC results for Fab2r3 with VQISNK (a), VQITNK (b), VQINNK (c), VQIDNK (d), and VQIKNK peptide (e).

The top panel shows the raw data, and the bottom panel shows the peak area from top panel.

第二項 Fab2r3 による Ile²⁷⁸ 特異的認識作用

Fab2r3 の Ile²⁷⁸ 疎水性側鎖認識機構について解析するため、Ile²⁷⁸ を他の疎水性残基 (Val、Leu、Phe) に変異させた ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ 類似ペプチド (VQIVNK、VQILNK、VQIFNK) と Fab2r3 の相互作用解析を、ITC 測定法により行った。ITC 測定の結果を Table 4 に示す。

Fab2r3 と全ての Ile²⁷⁸ 変異ペプチドとの結合反応において、観察された熱量変化はシグモイド型を示しておらず、概算された解離定数の値も 10 倍以上増加していたことから、結合強度が大きく低下していることがわかった (Fig. 18a-18c)。また、Leu は Ile の構造異性体であり、非常に類似した側鎖構造を有するにも関わらず結合強度が約 40 倍低下している。この結果は、Fab2r3 が正確な Ile 側鎖構造認識機構を有していることを示している。

Table 4, Thermodynamic parameters from ITC results

Peptide	K_d (μ M)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg.)
V-Q-I-I-N-K	0.41	-8.87	-41.0	-108
V-Q-I- V -N-K	35.0	-6.12	-19.1	-43.7
V-Q-I- L -N-K	16.7	-6.76	-44.8	-128
V-Q-I- F -N-K	7.69	-7.04	-26.8	-66.5

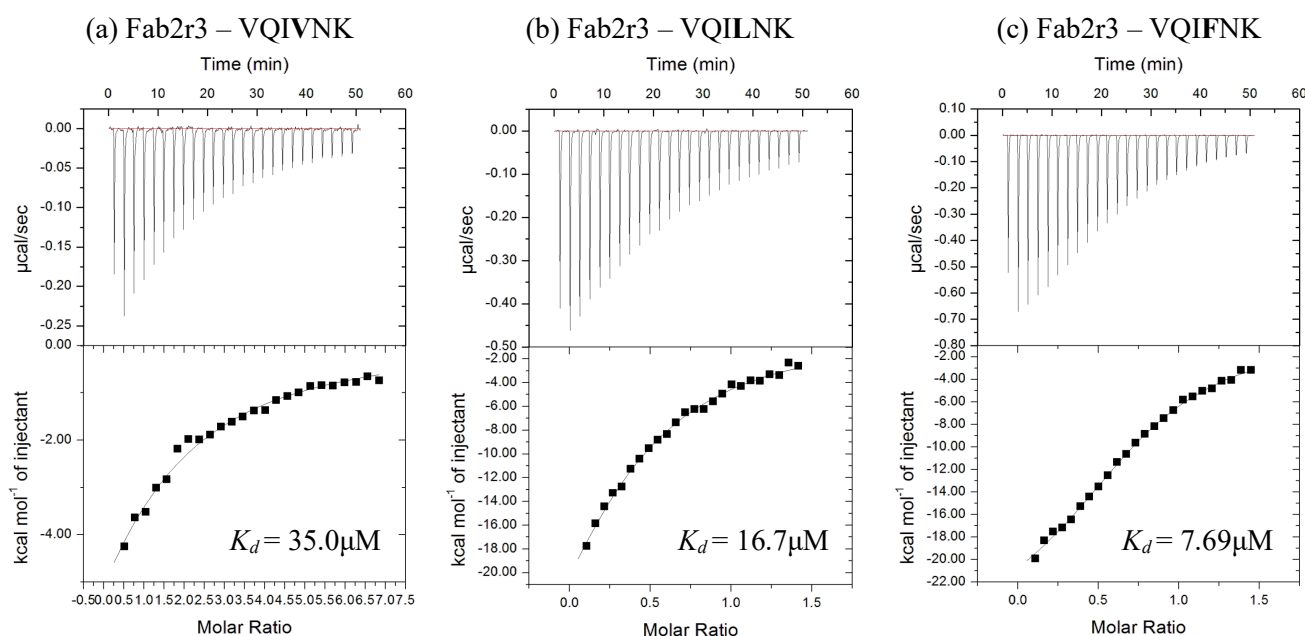


Fig. 18. ITC results for Fab2r3 with VQIVNK (a), VQILNK (b), and VQIFNK peptide (c).

The top panel shows the raw data, and the bottom panel shows the peak area from top panel.

第四節 小括

本章では、Tau 自己重合に深く関与する MBD 領域に対する抗体 Tau2r3 の Fab 領域が有する Tau 自己重合阻害作用について解析を行った。第一節では、ThS 蛍光強度測定法と動的光散乱法、及び電子顕微鏡による形態学的観察法を用いて、Fab2r3 が有する Tau 重合阻害作用について評価した。その結果、Fab2r3 が Tau 重合阻害作用を阻害し、不溶性線維の形成や伸長促進を抑制する結果が示されたため、Fab2r3 は Tau の自己重合反応を阻害していることが推測された (Fig. 7, 8, 9)。

第二節では、第一節で示唆された Fab2r3 の Tau 重合阻害機構について詳細に解析するため、ITC 測定法を用いて、Fab2r3 の Tau 認識機構についての解析を行った。その結果、Fab2r3 が Tau 自己重合開始に必須な配列の一つである $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列に結合することが示され (Fig. 12)、更に $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列中の Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ との静電的相互作用と、疎水性残基 Ile²⁷⁸ との疎水的相互作用が、Fab2r3 との結合に必須であることがわかった (Fig. 14,15)。

第二節の結果では、Fab2r3 は Tau 自己重合開始に必須な配列である VQIINK 配列と結合することを示した。更に、VQIINK 配列と同様に重合反応に関与する配列であり、類似性の高い VQIVYK 配列ペプチドと Fab2r3 の結合強度測定を行ったところ、解離定数は約 50 倍増加した値が示されたことから、Fab2r3 と VQIVYK 配列の結合強度は、VQIINK と比べて大きく低下することがわかった (Fig. 12f)。そこで第三節では、Fab2r3 の VQIINK 配列に対する特異性について詳細な知見を得るため、Fab2r3 と Ile²⁷⁸ 変異型 VQIINK 類似ペプチドの結合強度測定を行った。まず、Ile²⁷⁸ を親水性残基に変異させたペプチドとの結合強度測定の結果では、結合反応に伴い生じる反応熱は観察されなかったことから、Fab2r3 が疎水的駆動力により Ile²⁷⁸ の疎水性側鎖を認識することが推察された (Fig. 17)。更に、Ile²⁷⁸ を他の疎水性残基に変異させたところ、その全てにおいて結合強度が大きく低下する結果が示された (Fig. 18, Table 4)。特にこの中でも、Ile²⁷⁸ 側鎖と非常に類似した、Ile の構造異性体である Leu 変異ペプチド (VQILNK) に対しても、結合強度を大きく減弱させていたことから、Fab2r3 は Ile 側鎖構造を正確に認識していることが示唆された。

Fab2r3 とエピトープペプチドの結合強度測定で、算出された解離定数は $K_d=0.14\mu\text{M}$ であった (Fig. 12b)。一般的に、抗原抗体相互作用における解離定数の値は、 $K_d=10\mu\text{M} \sim 1.0\text{pM}$ オーダーの範囲にあることが多いことから [77-80]、一般の抗体と比べ Fab2r3 のリガンドに対する結合強度は低い値である。しかし、第一節で示した Fab2r3 の Tau 自己重合阻害効果は明らかであることから、Fab2r3 は、Tau 重合阻害物質として十分に有効な結合強度を有していると考えている。一方 Fab2r3 は、Tau 重合反応に重要な VQIINK 配列に対して高い特異性を示しており、特に VQIINK 配列中の Ile²⁷⁸ に対して正確な選択能を有している。Fab2r3 のような高い特異性を有する抗体は、

近年の抗体医薬品に見られる、交差反応性に起因した副作用を少なく抑えることが期待できる。これらのことから、Fab2r3 は新規 Tau 重合阻害物質開発におけるリード化合物として有効な物質に成り得ると考えられるため、第二章では、Fab2r3 が有する Tau 特異的認識機構について構造化学的観点から解析を行った。

第二章 Fab2r3 による Tau 認識機構の解明

第一章の熱力学的解析により、Fab2r3 が Tau 分子中の VQIINK 配列に対して特異的に結合することが示唆された。本章では、示唆された Fab2r3 の VQIINK 配列特異的認識機構について更に詳細な知見を得るため、4 種類の Fab2r3 とリガンドペプチド複合体構造、及び apo 体の構造を X 線結晶構造解析法によって明らかにし、結合様式やリガンド特異性についての構造化学的解析を行った。

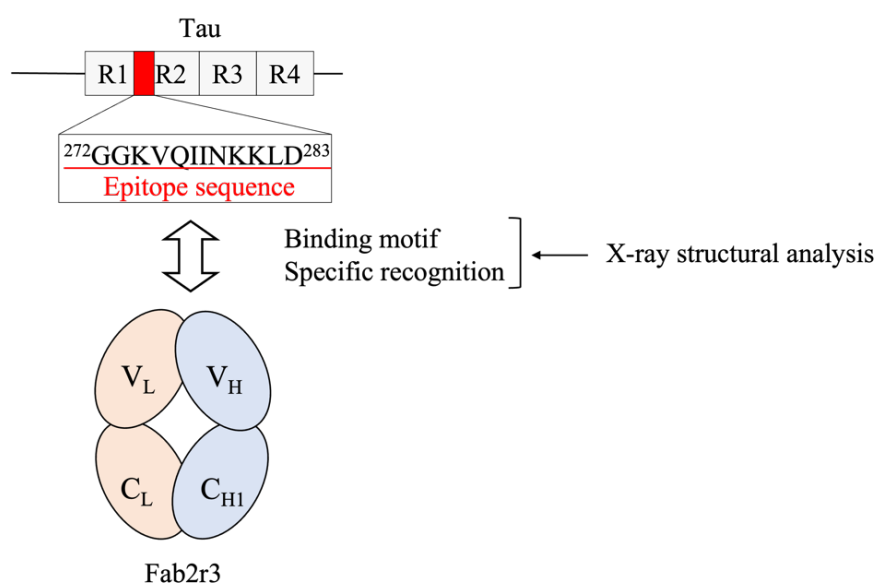


Fig. 19, Structural analysis of tau and Fab2r3 by x-ray crystallography.

第一節 Fab2r3 と Tau の結合様式の解明

本節では、Fab2r3 と Tau の結合様式解明のため、Fab2r3 と Tau ペプチドとの複合体結晶の作製に取り組み、X 線結晶構造解析法により、複合体構造を解明した。用いた Tau ペプチドは、Fab2r3 のエピトープ配列 (GGKVQIINKKLD)、及びその内部配列 (KVQIINKKLD、VQIINKKLD、GKVQIINK、VQIINK) ペプチドである。

第一項 Fab2r3-Tau ペプチド複合体結晶の作製

結晶析出条件スクリーニングキット (MCSG-1~4 kit 及び PEG/Ion screening kit) を用いて、Fab2r3 の結晶析出条件を探索したところ、PEG3350 と NH₄I を用いた条件で微結晶が得られた。この条件を基に、各種複合体結晶作製に取り組んだ。

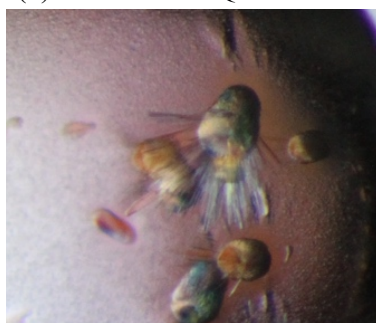
Fab2r3 と各種 Tau ペプチド複合体の結晶化

PEG3350 濃度や Fab2r3 濃度、pH 等、様々な条件を調節し、Fab2r3 と Tau ペプチドの複合体結晶析出条件を探索した。しかしながら、得られた Tau ペプチドとの複合体構造は、重なりが多く X 線結晶構造解析には向かない結晶であった (Fig. 20a-20d)。唯一、最も短い VQIINK ペプチドとの複合体結晶のみ、重なりが見られない平板状の結晶が得ることに成功した (Fig. 20e)。

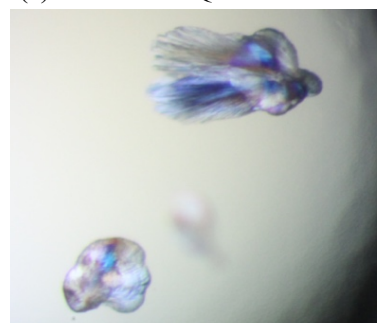
(a) Fab2r3 - GGKVQIINKKLD



(b) Fab2r3 - KVQIINKKLD



(c) Fab2r3 - VQIINKKLD



(d) Fab2r3 - GKVQIINK



(e) Fab2r3 - VQIINK

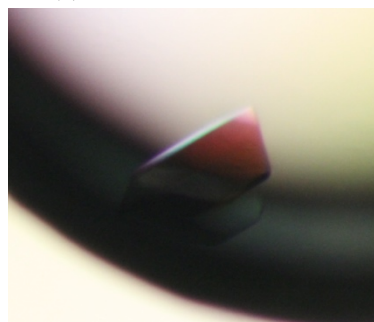


Fig. 20. The complex crystals of the Fab2r3 - GGKVQIINKKLD (a), KVQIINKKLD (b), GKVQIINK (c), VQIINKKLD (d), and VQIINK peptide complexes (e).

Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチド複合体結晶

Fig. 20 で得られた Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体結晶は小さく、十分な X 線回折強度が得られなかった。十分な X 線回折強度が得られるほど大きな結晶を得るため、Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体結晶の安定化を目的として Glycerol を添加した条件で結晶化条件の探索を行った。その結果、幅広い条件で重なりのない大きな結晶を得る事に成功した。Fig. 21 に X 線回折強度測定に用いた結晶とその析出条件を示す。

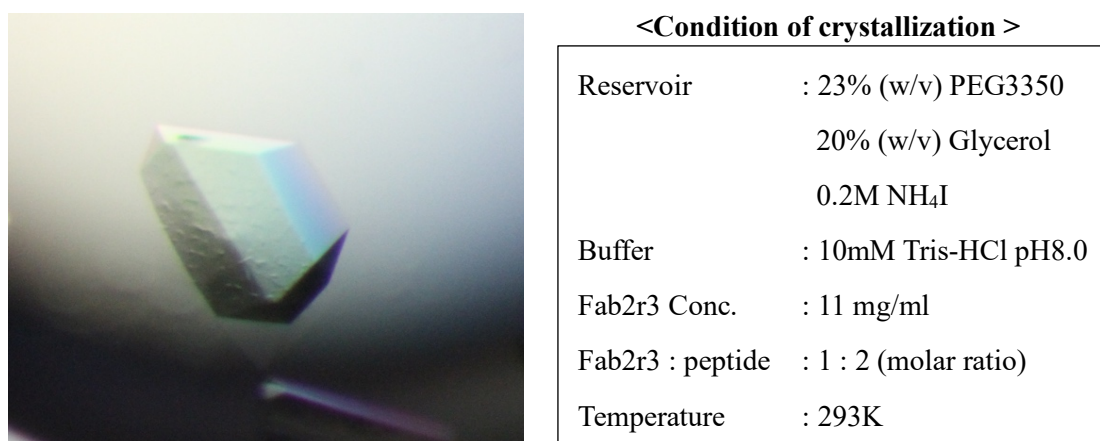


Fig. 21. The complex crystals of the Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide.

第二項 Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造の解明

X 線回折強度測定を行い、Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体結晶から X 線回折データを収集した。収集したデータを基に分子置換法を用いて初期構造を決定し、Refmac5 と coot を用いて、構造精密化の信頼度因子である R 因子 (Final R_{cryst}) が 19.07%になるまで精密化した (一般的なタンパク質構造解析において、R 因子は 20%程度以下であれば良いとされる^[81-82])。その結果、1.90 Å の分解能で、Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造を決定した。Table 5 に、収集した X 線回折データと精密化後の構造データを示す。

Table 5, Summary of data collection and refinement statistics of Fab2r3-VQIINK peptide complex.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Parameter	Value
Data collections	
Space group	$P2_12_12_1$
a, b, c (Å)	59.65, 70.98, 118.37
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00
Resolution range (Å)	30.41 - 1.90 (1.97 - 1.90)
Total No. of reflections	273002
No. of unique reflections	39804
Completeness (%)	99.0 (97.7)
Redundancy	6.86 (6.82)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	14.9 (4.70)
Rmerge (%) ^a	7.00 (30.3)
Refinement	
Space group	$P2_12_12_1$
Resolution range (Å)	30.423 - 1.90
Completeness (%)	98.91
Final R_{cryst}	19.07
Final R_{free}	25.37
No. of non-H atoms	
Protein	3945
Water	606
Total	4551
R. m. s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.0101
Angles (°)	1.7113

第三項 Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体の全体構造

Fig. 22a に Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造を示す。Fab2r3 は可変部領域と定常部領域の二つのドメインに大別できる。両領域の間にはエルボー領域があり、この領域は抗体のヒンジ部と同様に、抗体の柔軟性に関与する領域である^[83]。VQIINK ペプチドは、Fab2r3 の相補鎖決定領域 (Complementarity determining regions: CDR) で形成される結合ポケットに位置していた (Fig. 22b)。CDR は、Heavy 鎖の N 末端側から CDRH1 (30-36 番)、CDRH2 (49-65 残基間)、CDRH3 (97-104 残基間)、Light 鎖の N 末端側から CDRL1 (27-35 残基間)、CDRL2 (49-59 残基間)、CDRL3 (94-104 残基間) の 6 つのループ構造である^[84]。

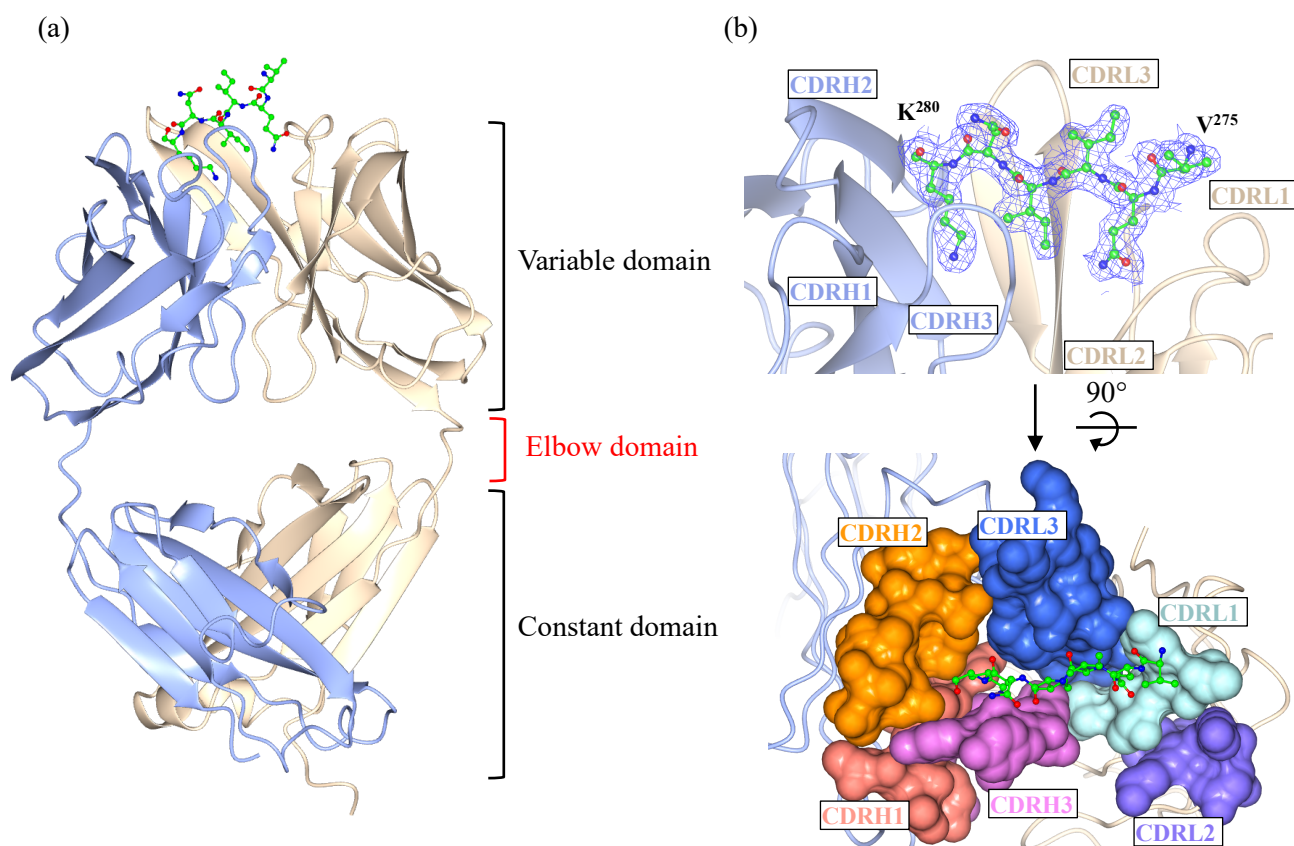


Fig. 22. Crystal structure of the Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide complex.

The overall structure of Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide complex (a) and the zoom image of the binding site of Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide (b). The conformation model represents the heavy chain (ice blue ribbon), the light chain (bisque ribbon), and the ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide (ball and stick model). Electron density of the VQIINK peptide is colored blue mesh. The surface of CDRs is colored the CDRH1 (peach), the CDRH2 (orange), the CDRH3 (crimson), the CDRL1 (sky blue), the CDRL2 (purple), and the CDRL3 (blue).

第四項 Fab2r3 と $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ ペプチドの結合様式

Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ 認識機構

Fab2r3 の CDR ループのうち、 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ ペプチドとの結合に関与しているのは CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL3 の 5 つであり、これらのループと VQIINK ペプチド間で合計 12 本の水素結合と 3 本の水架橋結合、2 つの疎水性相互作用が形成されていた (Fig. 23, Table 6)。特に、Fab2r3 の CDRH3、CDRL1、CDRL3 ループが、 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ ペプチド中の Gln²⁷⁶ 側鎖と、Lys²⁸⁰ 側鎖との間に 7 本の水素結合を形成していることから、両側鎖と強く結合していることが推測できる。また、両残基は第一章の ITC 測定で示した Fab2r3 のリガンド認識に必須な残基であることから、Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ 側鎖と多くの水素結合を形成する CDRH3、CDRL1、CDRL3 ループは、Fab2r3 のリガンド認識において重要な働きを有していることが示唆された。

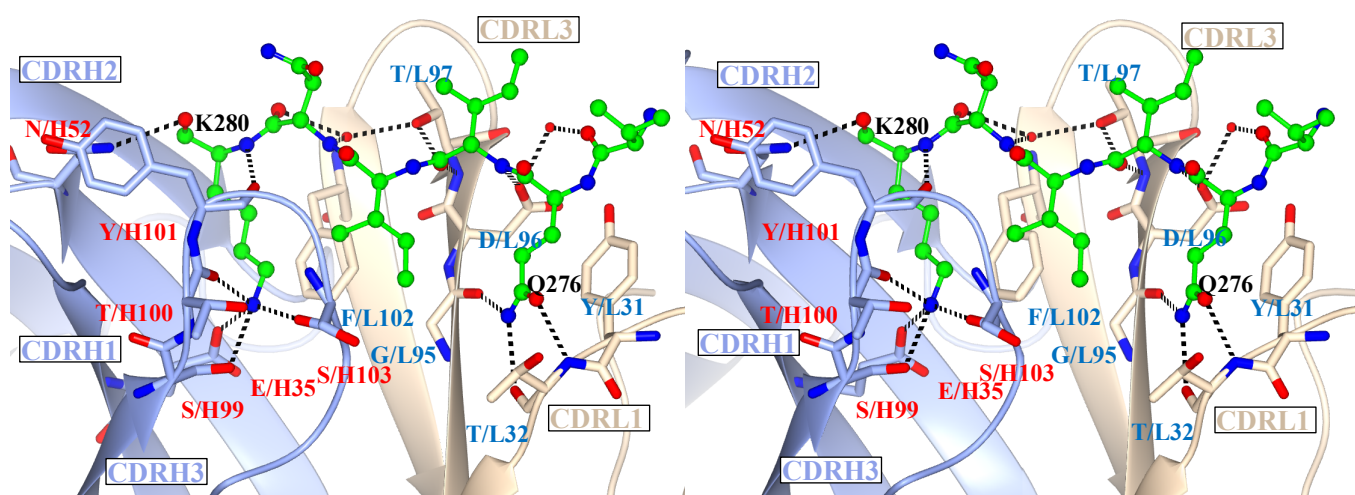


Fig. 23. Binding motif of the Fab2r3- $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ peptide complex structure.

The stereo image of binding site, showing the heavy chain (ice blue ribbon), the light chain (bisque ribbon), the $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ peptide (ball and stick model), and water molecules (red spheres). Dotted lines represent hydrogen bonds and dotted circle shows the water crosslink structure between CDRH3, CDRL1, and CDRL3 loops.

Table 6 Hydrogen bonds and hydrophobic interactions between Fab2r3 and the ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide.

Atom	Distance(Å)	Atom	Distance(Å)	Atom
[Hydrogen bonds]				
<i>Heavy chain - ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide</i>				
Glu H35 OE2	2.78	Lys 280 NZ		
Asn H52 NG2	3.04	Lys 280 O		
Ser H99 OG	2.82	Lys 280 NZ		
Thr H100 O	2.92	Lys 280 NZ		
Tyr H101 O	2.92	Lys 280 N		
Ser H103 O	2.83	Lys 280 NZ		
<i>Light chain - ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide</i>				
Thr L32 N	2.77	Gln 276 OE1		
Thr L32 O	3.04	Gln 276 NE2		
Gly L95 O	2.77	Gln 276 NE2		
Asp L96 OD1	3.06	Ile 277 N		
Asp L96 OD1	2.57	HOH 47	2.83	Val 275 O
Thr L97 N	2.90	Ile 277 O		
Thr L97 OG1	2.54	Ile 277 O		
Thr L97 OG1	2.68	HOH 639	2.86	Asn 279 N
Thr L97 OG1	2.68	HOH 639	3.00	Asn 279 O
<i>Others</i>				
Gly H104 N	2.76	HOH 60	2.56	Glu L34 OE2
Thr L32 O	2.74	HOH 66	2.99	Gly L95 N
Glu L34 OE1	2.87	HOH 66	2.63	HOH 60
Asp L96 OD2	2.55	Tyr L31 OH		
HOH 639	2.82	HOH 644	2.80	Asn 279 O
[Hydrophobic interactions]				
Tyr L31 benzene ring	~3.86	Gln 276 CB		
Phe L102 benzene ring	~4.58	Lys 280 CD		
Phe L102 benzene ring	~4.85	Lys 280 C		

Ile²⁷⁸ 認識機構

Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチド複合体構造の表面電位図を用いた解析を行った。²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ 側鎖は、Fab2r3 の CDRH3 ループの Tyr^{H102}-Gly^{H104} が形成する無電荷領域と、CDRL3 ループの無電荷領域に挟まれるように存在している (Fig. 24)。これらの領域は、Fab2r3 のリガンド結合サイト内に疎水性領域を創出していることから、Fab2r3 の「疎水ポケット」と呼んでいる。Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造では、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ 側鎖が構造相補的に疎水ポケット内に入り込んでおり、疎水ポケットとの間に疎水性相互作用を形成していることが観察された。

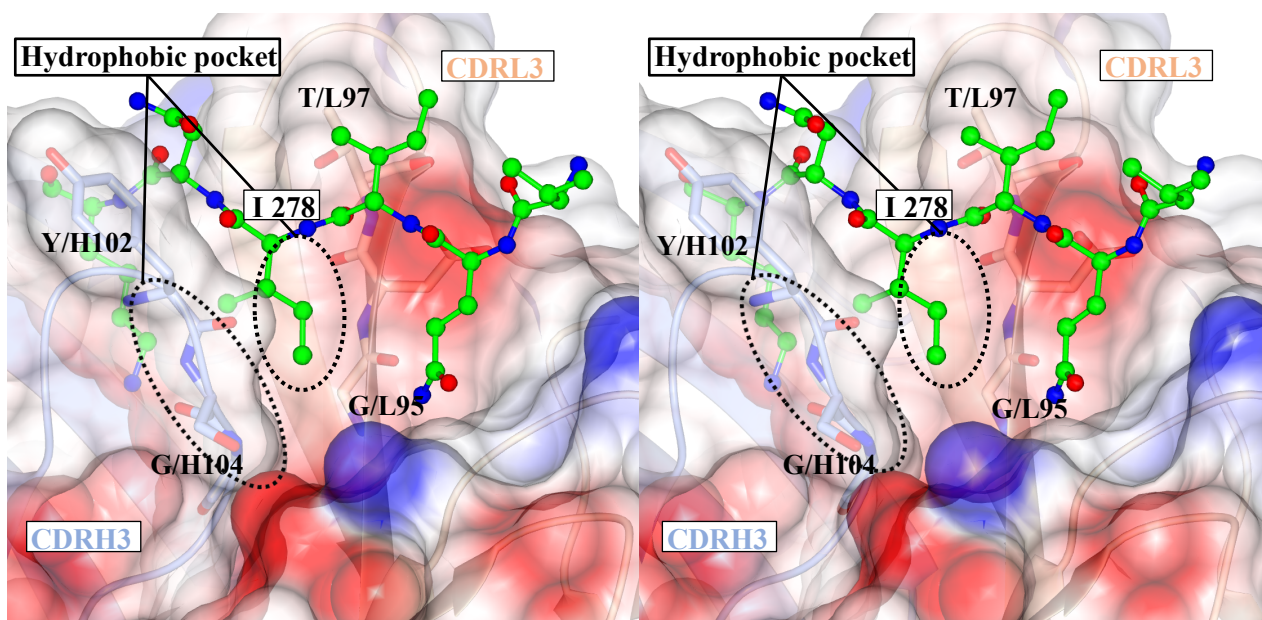


Fig. 24. Surface electron map of the Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide complex structure.

The stereo image of the surface electron map at the ligand-binding site in Fab2r3, showing the heavy chain (ice blue ribbon), the light chain (bisque ribbon), and the ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide (ball and stick model). The surface is colored based on charge: negative (red), positive (blue), and neutral (white). The hydrophobic pocket is shown in black dotted circle.

第五項 小括

本節では、Fab2r3 の VQIINK 配列認識機構を原子レベルで解明するため、Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチド複合体の構造解析を行った。その結果、1.90 Å の分解能での複合体構造の決定に成功した。得られた Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチド複合体構造からは、Fab2r3 が ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドと 12 本の水素結合を形成しており、その内 7 本が Fab2r3 の CDRH3、CDRL1、CDRL3 ループとペプチド中 Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ 側鎖との間に形成されていることがわかった (Fig. 23)。また、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチド中 Ile²⁷⁸ 側鎖は Fab2r3 の CDRH3、CDRL3 ループの無電荷領域によって形成される「疎水ポケット」内に構造相補的に入り込み、疎水ポケットとの間に疎水性相互作用を形成していた (Fig. 24)。Fab2r3 と VQIINK ペプチドの結合には、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチド中の Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ の親水性残基と、Ile²⁷⁸ の疎水性残基が必須であることを第一章の ITC 測定で示している。複合体構造からは、これらの残基との相互作用に Fab2r3 の CDRH3、CDRL3 ループが関与していることが観察されたことから、Fab2r3 の VQIINK 配列認識機構には CDRH3、CDRL3 ループが重要な働きを有していると考えられる。

第二節 Fab2r3 の Tau 認識機序の解明

第一節では、Fab2r3 と VQIINK ペプチドの複合体構造を解明し、Fab2r3 の CDRH3、CDRL3 ループが VQIINK 配列との結合に深く関与することが示唆された。本節では、VQIINK ペプチドとの結合に伴う Fab2r3 の構造変化を明らかにし、Fab2r3 のリガンド認識能についてより詳細に理解するため、Fab2r3 の apo 体と VQIINK ペプチド複合体構造の構造比較を行った。

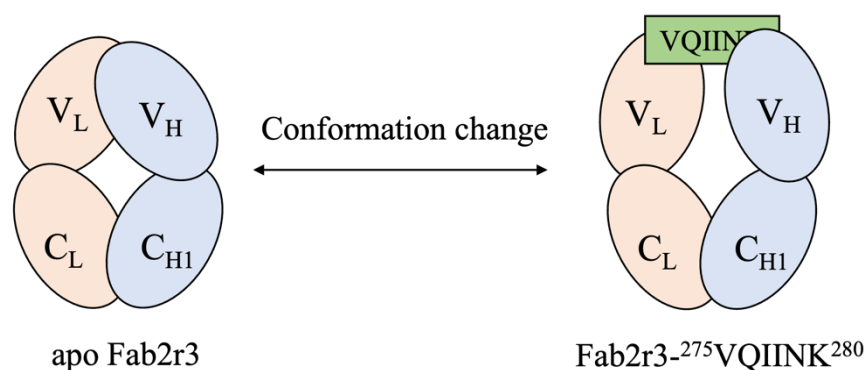
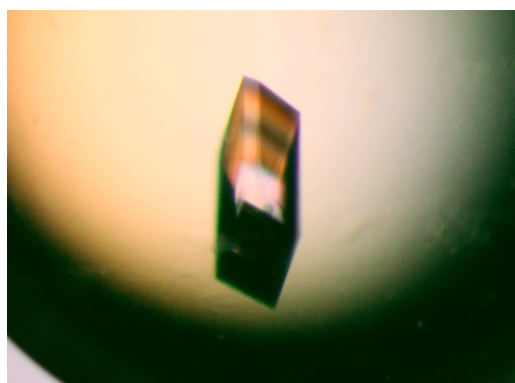


Fig. 25, Schematic image of the conformation change of Fab2r3 by binding the ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide.

第一項 apo Fab2r3 結晶の作製

Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体結晶析出条件を基に、apo Fab2r3 結晶析出条件を探索した。特に、Reservoir solution の pH 変化が、結晶の成長速度に影響していることを見出し、様々な pH で結晶析出条件を探索したところ、Fig. 26 の条件で十分な X 線回折強度を示すような良質な結晶を得ることに成功した。



<Condition of crystallization>

Reservoir	: 20% (w/v) PEG3350 15% (w/v) Glycerol 0.1M NH ₄ I
Buffer	: 10mM Tris-HCl pH7.6
Fab2r3 Conc.	: 9 mg/ml
Temperature	: 293K

Fig. 26. The single crystal of the apo Fab2r3.

第二項 apo Fab2r3 構造の解明

得られた apo Fab2r3 結晶を用いて X 線回折強度測定を行い、X 線回折データを収集した。このデータを基に分子置換法を用いて apo Fab2r3 の初期構造を決定し、Refmac5 と coot により R 因子が 20.06%になるまで精密化を行った。その結果、2.3 Å の分解能で apo Fab2r3 構造を決定した。Table 7 に、収集した X 線回折データと精密化データを示す。

Table 7, Summary of data collection and refinement statistics of apo Fab2r3.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Parameter	Value
Data collections	
Space group	<i>C2</i>
a, b, c (Å)	180.14, 70.78, 41.55
α, β, γ (°)	90.00, 93.55, 90.00
Resolution range (Å)	27.81 - 2.00 (2.07 - 2.00)
Total No. of reflections	127431
No. of unique reflections	35219
Completeness (%)	99.6 (98.0)
Redundancy	3.62 (3.29)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	10.1 (2.40)
Rmerge (%) ^a	6.30 (45.8)
Refinement	
Space group	<i>C2</i>
Resolution range (Å)	27.821 - 2.30
Completeness (%)	99.46
Final R_{cryst}	20.06
Final R_{free}	29.74
No. of non-H atoms	
Protein	3245
Ion	2
Other	12
Water	379
Total	3638
R. m. s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.0086
Angles (°)	1.6585

第三項 リガンド結合サイトの構造変化

apo Fab2r3 と VQIINK ペプチド複合体構造のリガンド結合領域を重ね合わせた図を Fig. 27 に示す。apo Fab2r3 構造と VQIINK ペプチド複合体構造を比較したところ、CDRH3、CDRL3 ループの形状が両構造間で大きく変化していることがわかった (Fig. 27)。これは Fab2r3 が VQIINK ペプチドとの結合に伴い CDRH3、CDRL3 ループ構造を変化させ、リガンド結合サイトの形状を変化させていることを示している。特に両ループは、第一節で VQIINK ペプチドと多くの相互作用を形成していることを示しており、Fab2r3 の VQIINK ペプチド認識機構に重要と考えられる領域である (Fig. 23, 24)。よって、両ループの構造変化は Fab2r3 のリガンド認識機構において重要な変化であると考えられる。Fab2r3 の構造比較により観察された構造変化は、一般的な抗体見られる抗原結合に伴う構造変化より、大きな変化である^[85-87]。従って、Fab2r3 は他の抗体にはあまり見られないユニークなリガンド認識機構を有していると推測できる。

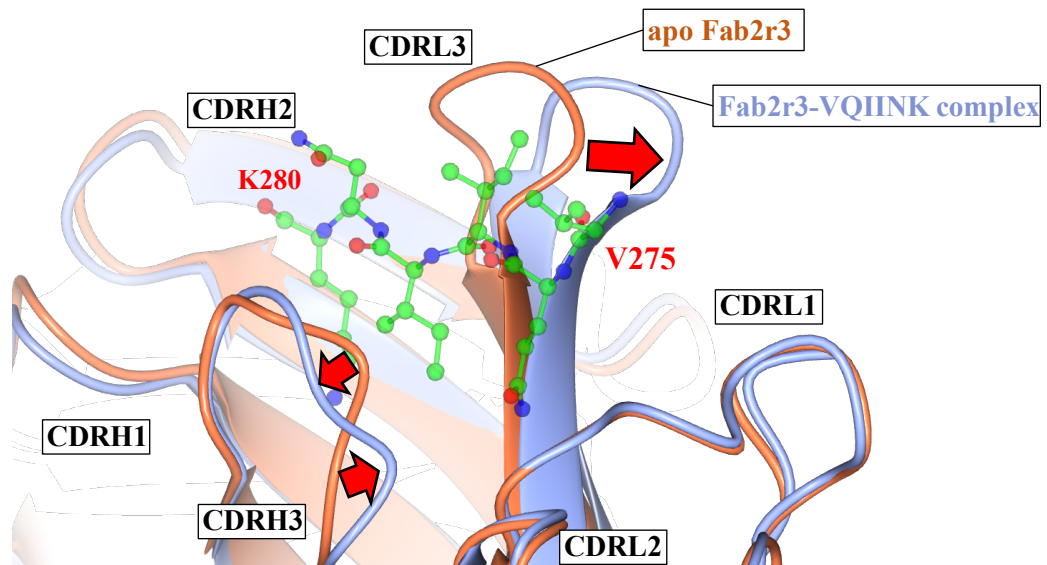


Fig. 27. Superimposed image of apo Fab2r3 and Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide complex.

The ribbon models are showed the apo Fab2r3 (coral) and Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide complex (ice blue). The ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide is depicted as a ball-and-stick model. Red arrows represent the conformation change from apo Fab2r3 to Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide complex.

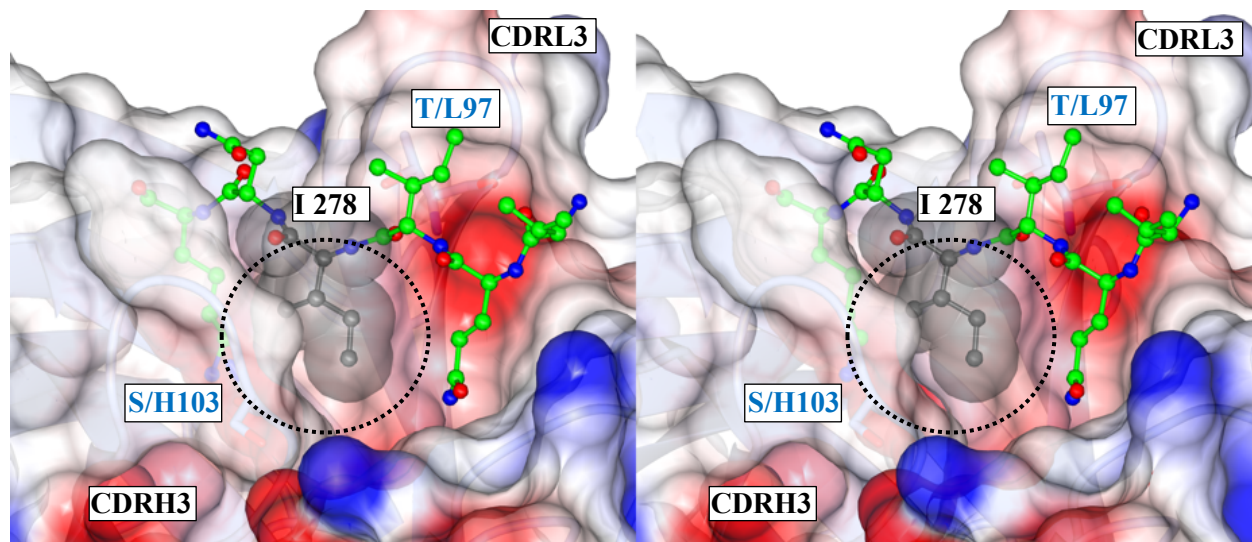
第四項 VQIINK ペプチドとの結合に伴う疎水ポケットの形成

Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造と apo Fab2r3 構造の表面電位図を比較した。まず、Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造の表面電位図では、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ 側鎖が Fab2r3 の疎水ポケット内に構造相補的に当てはまっており、疎水性相互作用を形成していることが示されている (Fig. 28a)。これに対し、apo Fab2r3 構造の表面電位図では、CDRH3 ループの Ser^{H103} 側鎖と CDRL3 ループの Thr^{L97} 側鎖の位置が大きく変化しているため、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ 側鎖が入り込めるような疎水ポケットは見られなかった (Fig. 28b)。この結果は、Ile²⁷⁸ 側鎖を認識する疎水ポケットが VQIINK ペプチドとの結合に伴って形成されることを示している。

また、Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造では、疎水ポケットの構成残基である Gly^{H104} と Gly^{L95} 間に水二分子を介した水架橋構造が形成されていることに対し、apo Fab2r3 構造では、これが形成されていないことがわかった (Fig. 29)。この結果より、Gly^{H104} と Gly^{L95} 間の水架橋構造は、疎水ポケットと同様に、VQIINK ペプチドとの結合に伴い形成されることがわかった。従って、この水架橋構造は、VQIINK ペプチドとの結合によりダイナミックに変化する CDRH3、CDRL3 ループの構造を安定化させ、疎水ポケットの形状形成やポケット構造の安定化に寄与していることが推察された。

Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体と apo Fab2r3 体の構造比較結果で見られた構造変化は、明らかに疎水ポケットの形成に関連する変化であり、Fab2r3 の疎水ポケットによる ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチド中 Ile²⁷⁸ 側鎖認識機構が Tau 認識機構において非常に重要な機構であると推測できる。従って、Fab2r3 と Tau の結合反応は、まず CDRH3、CDRL3 ループの構造変化を伴う疎水ポケットの形成から始まり、疎水ポケットと ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ 側鎖間の疎水性相互作用が形成、次いで、Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ 側鎖との水素結合が形成されるという機序で進むことを推測するに至った。

(a) Fab2r3-VQIINK complex



(b) apo Fab2r3

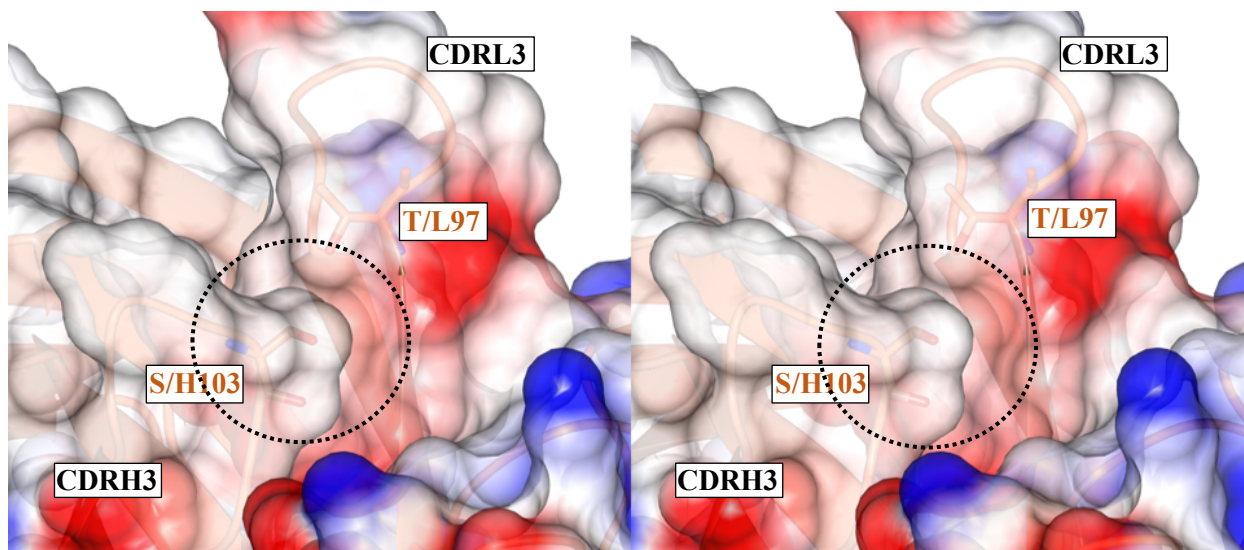


Fig. 28. Surface electron map of Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide complex (a) and apo Fab2r3 (b).

The stereo image of the surface electron map at the ligand-binding site at both structures. The molecular surface is colored based on charge; negative (red), positive (blue), and neutral (white). The hydrophobic pocket is shown in the dotted circle, and the surface of Ile²⁷⁸ in ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide is represented gray color.

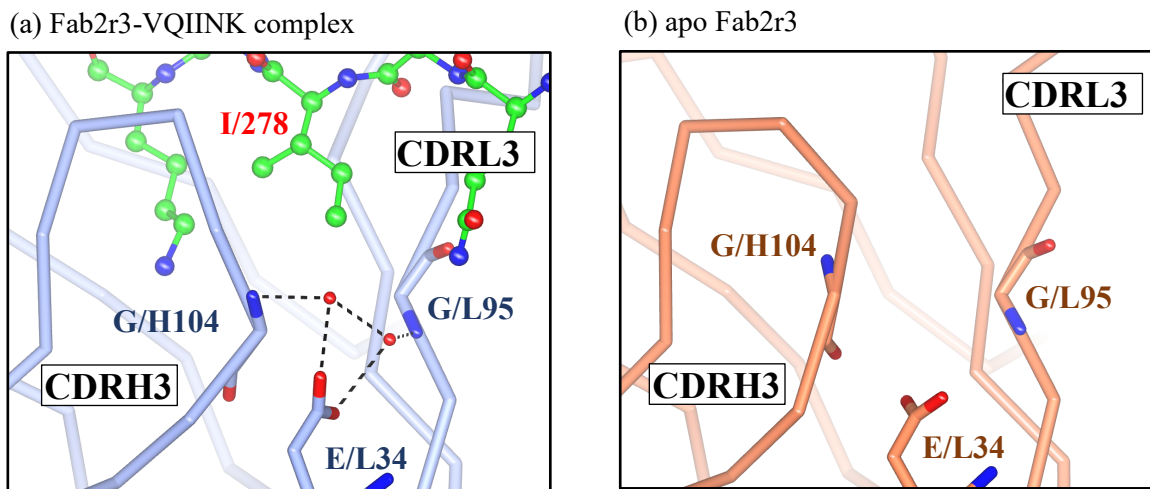


Fig. 29. Formation of the water crosslink structure between Gly^{H104} and Gly^{L95}.

The image showed the ligand-binding domain of the Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide complex (a) and apo Fab2r3 (b). The Fab2r3 is showed the cylinder model and the dotted lines represent the hydrogen bonds.

第五項 Tau との結合に伴う Fab2r3 全体構造の変化

Fab 抗体の可変部は抗原と結合する CDR 領域と、可変部の構造を支える Frame work 領域 (FR 領域) で構成されている^[84]。Fab2r3 の apo 体と VQIINK 複合体の可変部領域を比較したところ、Heavy 鎖の FR2 領域 (CDRH1 と CDRH2 間の FR 領域; H-FR2 ループ) が、大きく構造変化している事がわかった (Fig. 30a)。この領域は、apo Fab2r3 構造では Light 鎖の Ser^{L8}、Gly^{L109} と水素結合を形成し可変部構造を安定化させている領域であるが、Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造では両残基との水素結合が見られなかった (Fig. 30b, 30c)。この結果は、VQIINK ペプチドとの結合に伴い、可変部領域の安定化に寄与する H-FR2 ループと Light 鎖間の水素結合が解離することを示している。よって、Fab2r3 が VQIINK ペプチドと結合する事により、リガンド結合領域の構造が安定化し、可変部領域全体の構造が安定化するため、構造安定化に寄与していた H-FR2 ループと Light 鎖間の水素結合が解離すると推測できる。

また、Fab2r3 の全体構造を比較したところ、エルボー領域を中心に大きく変化していることがわかった。このエルボー領域が創出する角度はエルボー角と呼ばれる^[88]。Fab2r3 のエルボー角は、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドとの結合に伴い 30°以上の大きな変化を起こしており (Fig. 29d)、Stanfield^[89] や Elsen^[90] が報告した角度変化より大きな変化であった。この変化には、Fab2r3 のリガンド結合に伴う可変部領域の構造変化が影響していると考えられ、Fab2r3 と ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの結合によるリガンド結合サイト安定化は、Fab2r3 全体構造に影響を与えている可能性を推測するに至った。

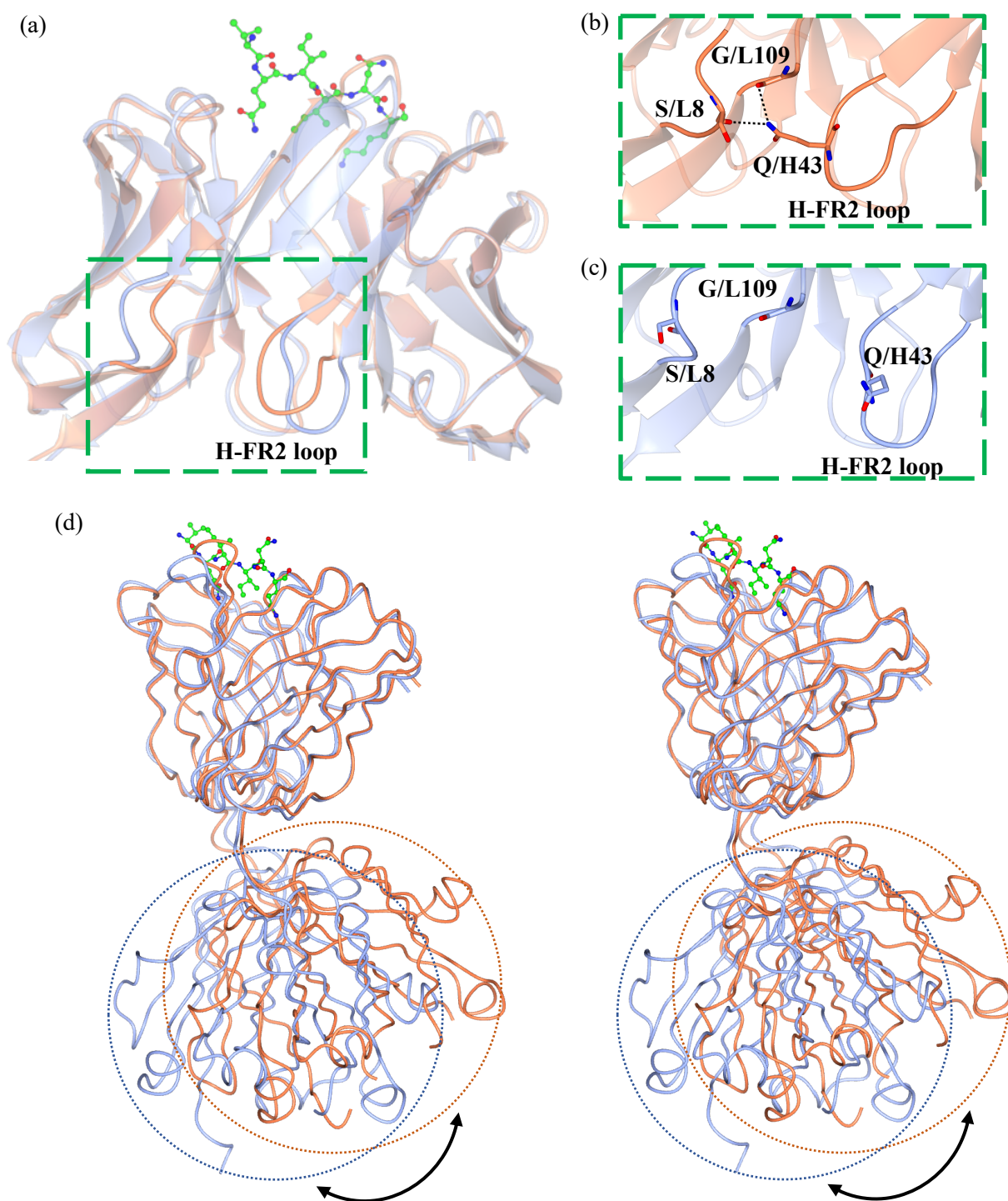


Fig. 30. Comparing the variable domain and overall structure of apo Fab2r3 and VQIINK peptide complex.

(a) Superimposition of the variable domain of apo Fab2r3 (coral) and Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ peptide complex (ice blue). (b, c) These images are shown the heavy chain FR2 loop of apo Fab2r3 (b) and Fab2r3-VQIINK complex (c). Hydrogen bonds represent the dotted lines. (d) The stereo drawing of the superimposed structure of apo Fab2r3 and Fab2r3-VQIINK complex. The variable domains of both structures are superimposed. The elbow angles of apo Fab2r3 (139.4°) and Fab2r3-VQIINK complex (171.6°) were calculated using Elbow Angle Calculation system developed by Stanfield et al. ^[91].

第六項 小括

本節では、apo Fab2r3 と Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチド複合体の構造比較を行い、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、Fab2r3 の CDRH3、CDRL3 ループは顕著に構造変化していた。第一節の結果から、両ループは ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドとの結合に重要な Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ と水素結合を形成するだけでなく、Ile²⁷⁸ 側鎖と相互作用する疎水ポケットも形成していることから、Fab2r3 のリガンド認識に重要な構造である (Fig. 23, 24)。特に、両構造の表面電位図の比較結果から、Fab2r3 の疎水ポケットが VQIINK ペプチドとの結合に伴って形成されることがわかり (Fig. 28)、疎水ポケットと Ile²⁷⁸ 側鎖間の疎水性相互作用形成は、Fab2r3 のリガンド認識機構において重要であると考えられる。

更に、VQIINK ペプチドとの結合に伴い、CDRH3 ループの Gly^{H104} と CDRL3 ループの Gly^{L95} 間に、水二分子を介した水架橋構造が形成されていることを発見した (Fig. 29)。この水架橋構造は、疎水ポケットの構成残基である Gly^{H104} と Gly^{L95} 間の架橋構造であり、疎水ポケットと同様に、VQIINK ペプチドとの結合に伴って形成されていることから、疎水ポケットの形成と構造安定化に寄与していると推測できる。これらの結果から、Fab2r3 と VQIINK ペプチドの結合反応は、CDRH3、CDRL3 ループの構造変化に伴う疎水ポケットの形成から始まり、疎水ポケットと ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ 側鎖間に疎水性相互作用が形成され、次いでペプチド中 Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ 側鎖との水素結合形成が生じるという機序を推測するに至った。

本節の結果から、Fab2r3 はリガンド結合領域をリガンド構造に適する形状に変化させる「誘導適合モデル」で、VQIINK ペプチドを認識している事がわかった。一般的に抗体は、構造変化をほとんど伴わない「鍵と鍵穴モデル」で抗原を認識する事が多いことから^[85-87]、Fab2r3 による VQIINK ペプチド認識機構は、特殊な機構であると推測される。

第三節 Fab2r3 の Ile²⁷⁸ 側鎖特異的認識機構の解明

ここまでの結果で、Fab2r3 の疎水ポケットによる ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ 側鎖認識機構が結合反応において重要な機構であることが示唆された。第一章の ITC 測定では、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ を他の疎水性残基 (Val、Leu、Phe) に変異させたペプチド (VQIVYK、VQIVNK、VQILNK、VQIFNK) と Fab2r3 の結合強度が大きく低下していることがわかっており、Fab2r3 が Ile²⁷⁸ 側鎖構造を正確に認識することを示している。これらの結果から、Fab2r3 の疎水ポケットが Ile²⁷⁸ 側鎖構造を正確に認識しており、これによって Fab2r3 が VQIINK 配列に対して高い特異性を示すことが推察できる。

このような背景から、本節では Fab2r3 の VQIINK 配列特異性に関わると推察された、疎水ポケットによる Ile²⁷⁸ 側鎖認識機構について原子レベルで解明するため、Fab2r3 と Ile²⁷⁸ 変異型 VQIINK ペプチド (VQIVYK、VQILNK、VQIFNK) の複合体構造解析を行った。

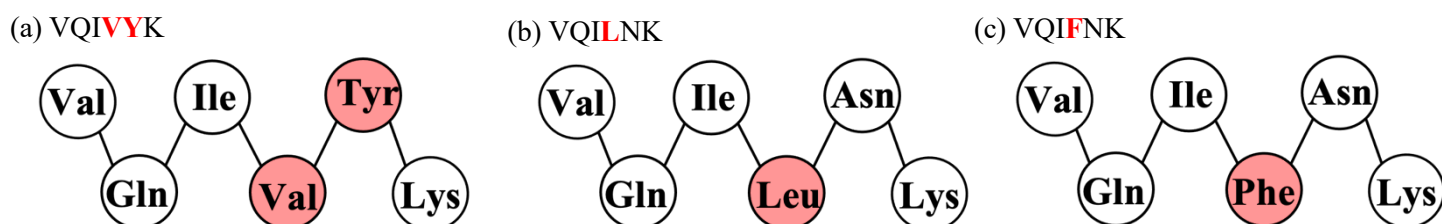


Fig. 31. Schematic images of the ligand peptides used at the structural analysis.

The images show the VQIVYK (a), VQILNK (b), and VQIFNK peptides (c). The red circles show the different residues from the VQIINK peptide.

第一項 Fab2r3-VQIINK 変異ペプチド複合体の結晶析出条件の探索

Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体結晶析出条件を基に、Fab2r3-VQIINK 変異ペプチドの複合体結晶析出条件を探索した結果、Fig. 32 に示す条件において、VQIVYK、VQILNK、VQIFNK ペプチドとの複合体結晶の作製に成功した。

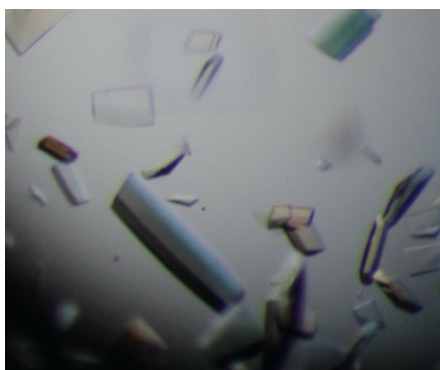
(a) Fab2r3-VQI**V**YK complex crystal



<Condition of crystallization >

Reservoir	: 19% (w/v) PEG3350 20% (w/v) Glycerol 0.2M NH ₄ I
Buffer	: 10mM Tris-HCl pH8.0
Fab2r3 Conc.	: 15 mg/ml
Fab2r3 : peptide	: 1 : 3 (molar ratio)
Temperature	: 293K

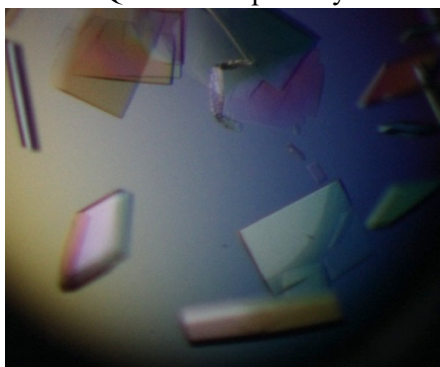
(b) Fab2r3-VQI**L**NK complex crystal



<Condition of crystallization >

Reservoir	: 20% (w/v) PEG3350 15% (w/v) Glycerol 0.2M NH ₄ I
Buffer	: 10mM Tris-HCl pH8.0
Fab2r3 Conc.	: 10 mg/ml
Fab2r3 : peptide	: 1 : 2 (molar ratio)
Temperature	: 293K

(c) Fab2r3-VQI**F**NK complex crystal



<Condition of crystallization >

Reservoir	: 18% (w/v) PEG3350 20% (w/v) Glycerol 0.2M NH ₄ I
Buffer	: 10mM Tris-HCl pH8.0
Fab2r3 Conc.	: 11 mg/ml
Fab2r3 : peptide	: 1 : 2.5 (molar ratio)
Temperature	: 293K

Fig. 32. The crystals of the Fab2r3-VQIVYK (a), Fab2r3-VQILNK (b), Fab2r3-VQIFNK complexes (c).

第二項 各複合体構造の解明

得られた結晶を用いて X 線回折強度測定を行い、X 線回折データを収集した。このデータを基に分子置換法を用いて初期構造を決定し、Refmac5 と coot により R 因子が 20%程度以下になるまで精密化を行った。その結果、分解能 2.10Å (Fab2r3-VQIVYK)、1.89Å (Fab2r3-VQILNK)、2.20Å (Fab2r3-VQIFNK) で構造の決定に成功した。X 線回折データと精密化データを Table 8 に示す。

Table 8, Summary of data collection and refinement statistics of Fab2r3 and ligand peptide complexes.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

	Fab2r3-VQIVYK	Fab2r3-VQILNK	Fab2r3-VQIFNK
Data collections			
Space group	$P222_1$	$P2_12_12$	$C2$
a, b, c (Å)	59.98, 70.78, 118.03	69.93, 179.70, 41.43	179.05, 70.14, 41.26
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 93.15, 90.00
Resolution range (Å)	59.02 - 1.90 (1.97 - 1.90)	33.13 - 1.89 (1.96 - 1.89)	32.65 - 1.90 (1.97 - 1.90)
Total No. of reflections	139354	265204	140335
No. of unique reflections	40106	39868	38541
Completeness (%)	99.4 (98.5)	93.1 (86.8)	95.7 (92.7)
Redundancy	3.47 (3.35)	6.65 (6.91)	3.64 (3.60)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	10.6 (3.30)	10.9 (3.80)	6.20 (2.60)
Rmerge (%) ^a	6.00 (36.4)	7.80 (40.1)	12.0 (42.8)
Refinement			
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12$	$C2$
Resolution range (Å)	59.085 - 2.10	35.155 - 1.89	32.669 - 2.20
Completeness (%)	99.44	93.06	96.65
Final R_{cryst}	19.99	19.50	20.02
Final R_{free}	26.95	26.04	27.18
No. of non-H atoms			
Protein	3344	3305	3299
Ion	1	12	6
Other ligands	18	54	30
Water	422	446	328
Total	3785	3817	3663
R. m. s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.0074	0.0096	0.0085
Angles (°)	1.5456	1.6010	1.6443

第三項 各複合体構造のリガンドペプチド構造

各複合体構造のリガンドペプチド構造を比較したところ、VQIVYK ペプチドは、VQIINK ペプチドと類似した伸長構造を取っており、VQILNK、VQIFNK ペプチドは変異残基を中心に折れた構造をとっていた (Fig. 33)。当研究室の以前の研究成果で、Tau 分子中の $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 配列と $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 配列が水溶液中で伸長構造を取ることを示しており、この伸長構造が Tau 自己重合開始に必須であることを報告している [73, 93-94]。今回明らかにした VQIINK、VQIVYK ペプチド構造は、水溶液中で観察された結果と同様の伸長構造を取っていることから、Fab2r3 は水溶液中のリガンド構造を保持したまま結合していると考えられる。

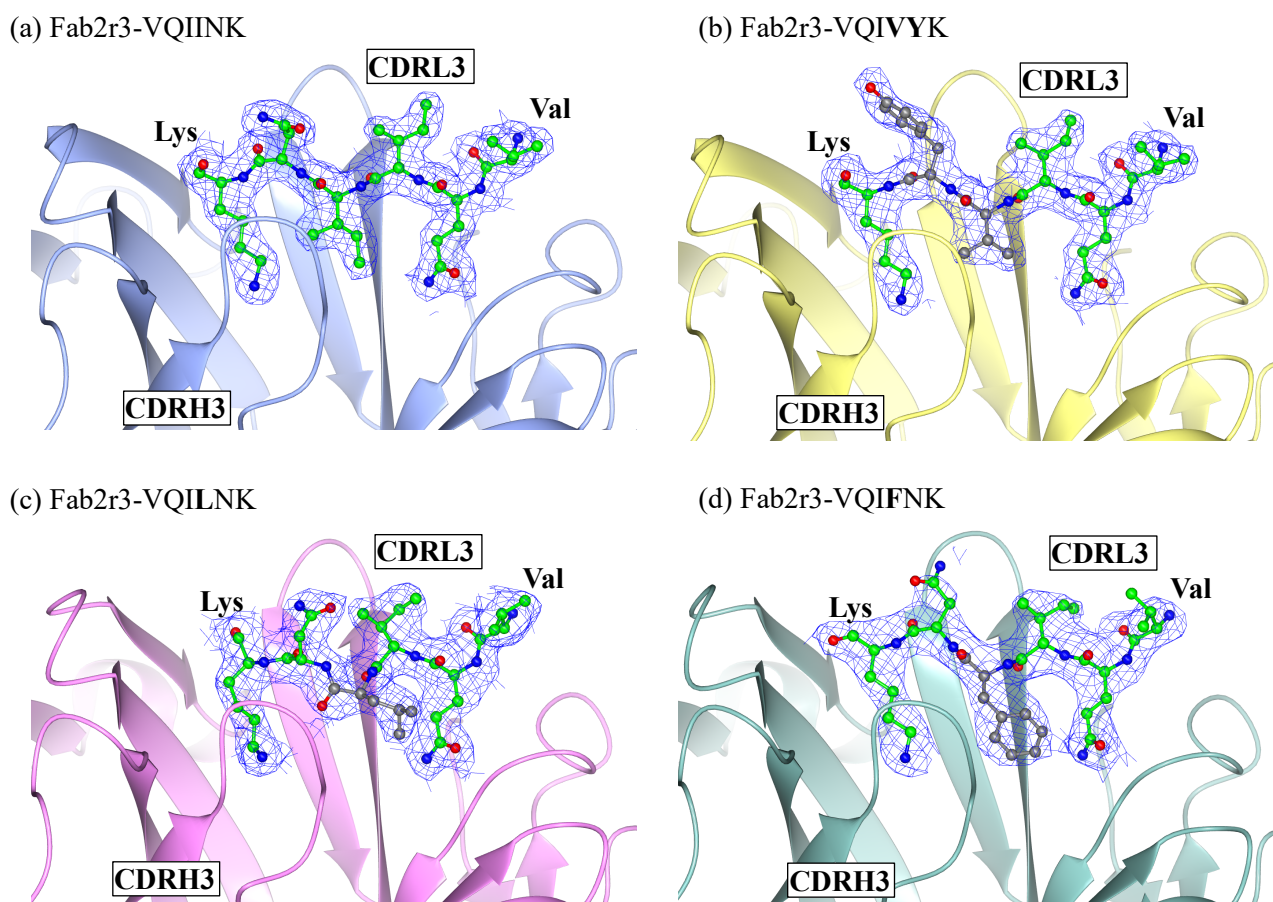


Fig. 33. Binding site structures of Fab2r3-VQIINK (a), Fab2r3-VQIVYK (b), Fab2r3-VQILNK (c), and Fab2r3-VQIFNK peptide complex (d).

The ribbon models represent Fab2r3, and the ball-and-stick models show the ligand peptide. The different residues from the VQIINK peptide are shown in the gray color. The blue meshes present the peptide electron maps.

第四項 Fab2r3 の VQIINK 配列特異性に重要な Ile 側鎖相補的な疎水ポケット

Fab2r3 とリガンド結合サイトの構造比較

Fab2r3-VQIINK 複合体構造と、VQIINK 変異ペプチド複合体構造のリガンド結合サイトを重ね合わせた図を Fig. 33 に示す。各複合体構造を比較した結果、結合するリガンドの種類や構造が異なっているにも関わらず、Fab2r3 の CDR 領域によって形成されるリガンド結合サイトの形状はほとんど変化していないことがわかった (Fig. 34)。興味深いことに、第二節の apo Fab2r3 構造と Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造の比較では、CDRH3、CDRL3 ループの構造が柔軟に変化していることを示している (Fig. 27)。つまり、Fab2r3 の CDRH3、CDRL3 ループは、リガンドとの結合に伴って柔軟に構造を変化させるが、この変化によって形成される両ループの形状は、リガンドの変異残基や構造の違いには関係なく一定に維持されることがわかった。

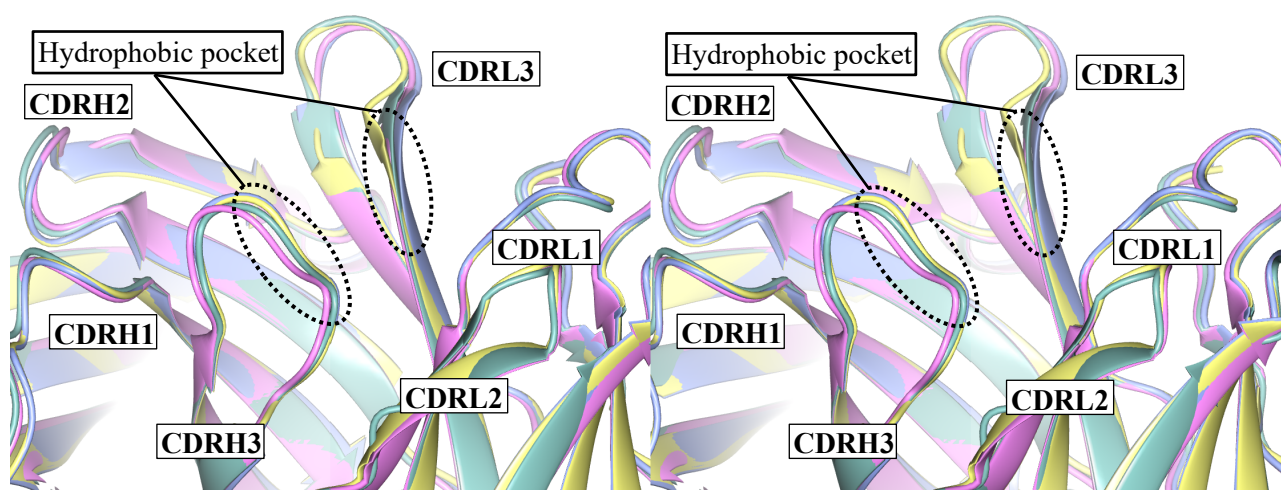


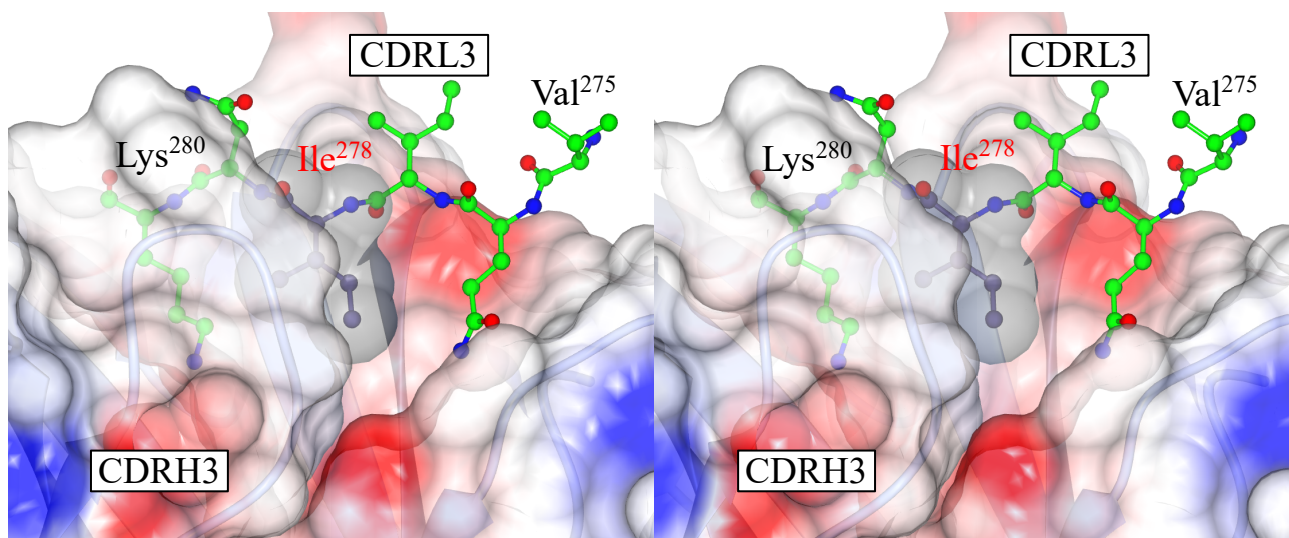
Fig. 34. Superimposed image of the ligand binding site of the Fab2r3-ligand complexes.

The stereo image of superimposing the ligand-binding site of all Fab2r3-ligand complexes. The ribbons are colored in the Fab2r3-VQIINK (ice blue), Fab2r3-VQIVYK (yellow), Fab2r3-VQILNK (pink), and Fab2r3-VQIFNK (sea green). The black dotted circles are the hydrophobic pocket of Fab2r3.

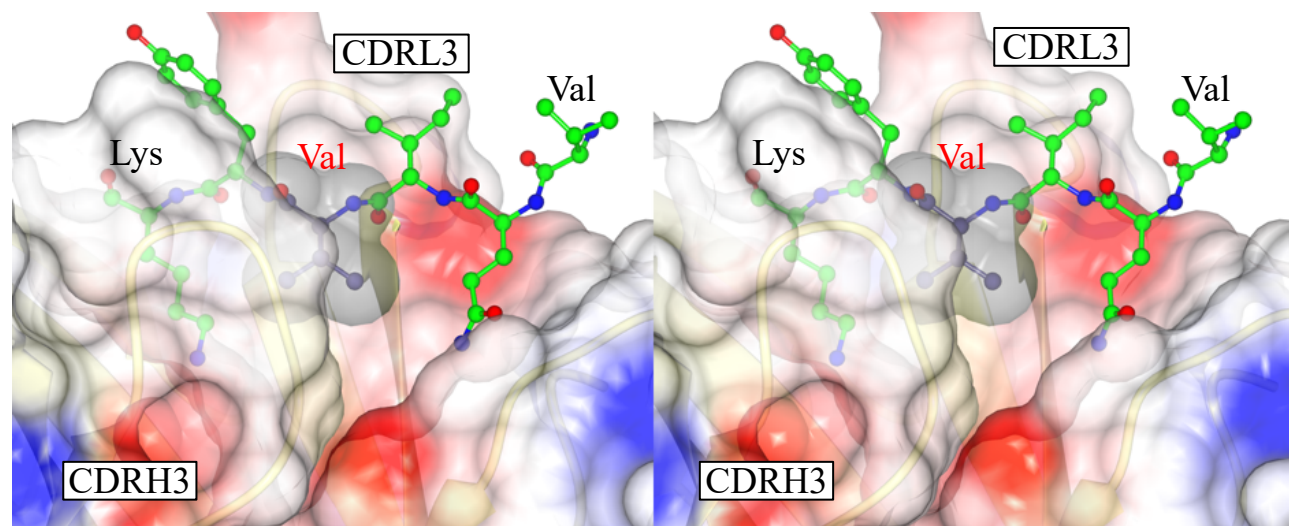
Fab2r3 の疎水ポケットによる Ile 側鎖選択性

Fab2r3 と各ペプチドの結合様式を比較するため、各構造の表面電位図の比較を行った。Fig. 35 に各複合体構造のリガンド結合サイトの表面電位図を示す。Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチド複合体構造では、Fab2r3 の疎水ポケット内に Ile²⁷⁸ 側鎖が構造相補的に当てはまっており、両者間で疎水性相互作用を形成している (Fig. 35a)。これに対し、Fab2r3-VQIVYK ペプチド複合体構造では、4 残基目 Val 側鎖が疎水ポケット内に位置しているが、Ile 側鎖より小さい側鎖構造であるため、疎水ポケット内に空間があり、構造相補性が不十分であることがわかった (Fig. 35b)。また、Fab2r3-VQLNK ペプチド複合体構造では、Leu 側鎖が疎水ポケット内に入り込んでおらず、ポケットの外側に位置していた (Fig. 35c)。Fab2r3-VQIFNK ペプチド複合体構造においても、VQILNK ペプチドと同様に Phe 側鎖が疎水ポケット内に入り込んでおらず、ポケットの外側に位置していた (Fig. 35d)。これらの結果より、Fab2r3 の疎水ポケットは Ile 側鎖構造にのみ相補的な形状であり、Ile 残基以外の残基とは構造相補性が不十分な形状で保たれていることがわかった。従って、Fab2r3 の VQIINK 配列特異的認識機構には、Ile²⁷⁸ 側鎖に相補的な形状の疎水ポケットを形成し、更にその形状を維持する機構が重要であることが明らかとなった。

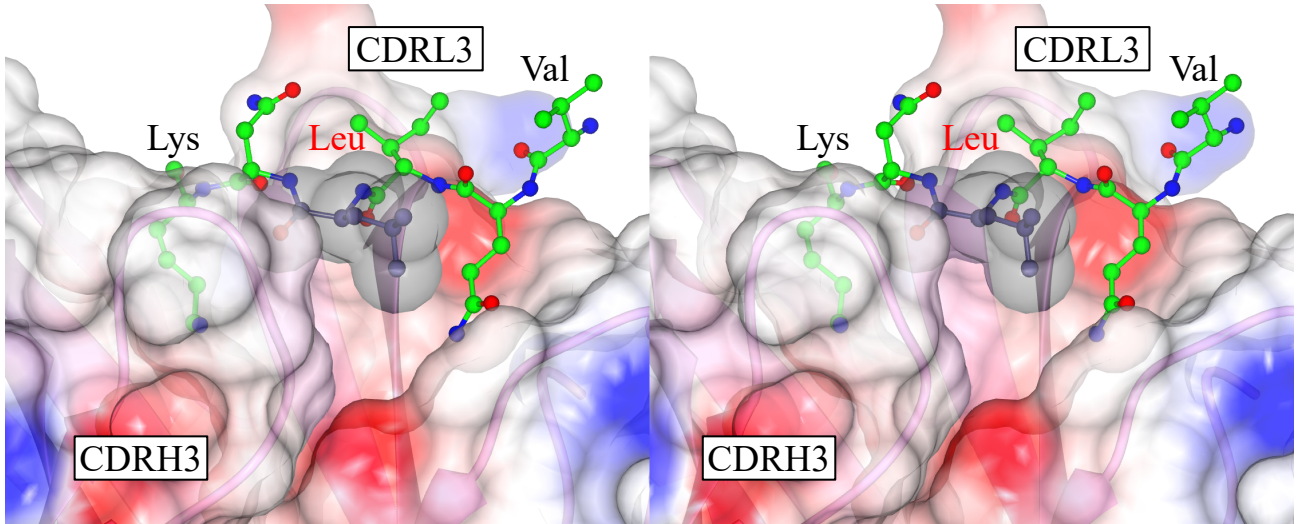
(a) Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰



(b) Fab2r3-VQI**IVYK**



(c) Fab2r3-VQILNK



(d) Fab2r3-VQIFNK

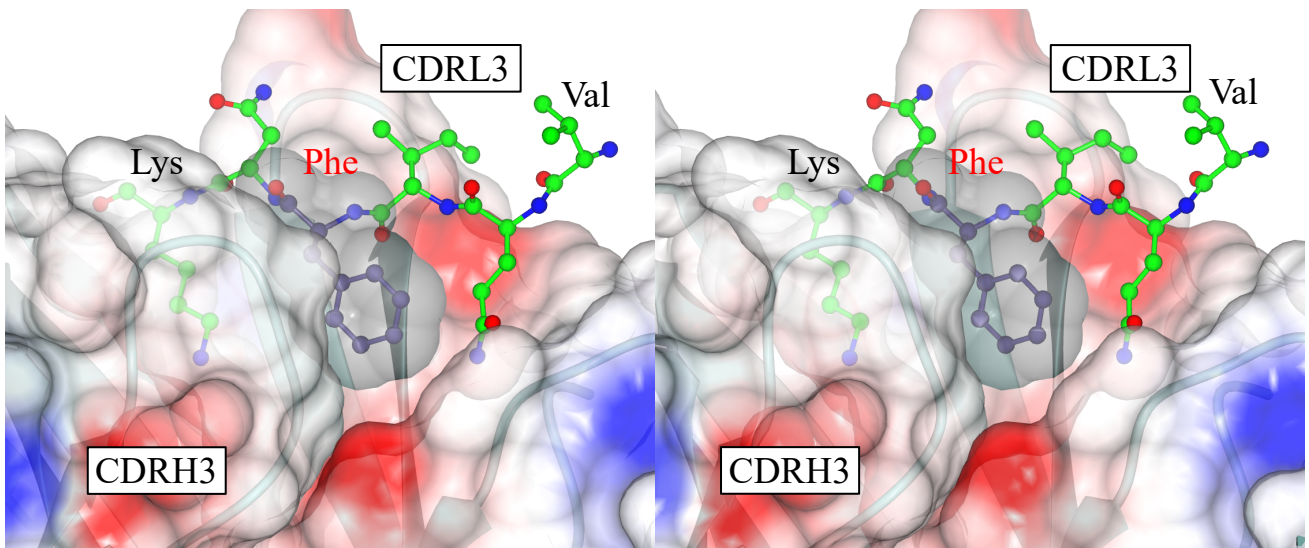


Fig. 35. Surface electron map of the Fab2r3-VQIINK (a), Fab2r3-VQIVYK (b), Fab2r3-VQILNK (c), and Fab2r3-VQIFNK peptide complexes (d).

The stereo image of the surface electron map at the ligand-binding site in Fab2r3, showing Fab2r3 (ribbon model) and the ligand peptide (ball and stick model). The surface is colored based on charge: negative (red), positive (blue), and neutral (white). The surface of 4th hydrophobic residue in the ligand peptide is colored gray.

第五項 Ile 側鎖相補的な疎水ポケットの形成、及び固定化に関わる水架橋構造

各複合体構造の表面電位図を比較した結果から、Fab2r3 の VQIINK 配列特異的認識機構には、疎水ポケットの形状を Ile 側鎖構造に相補的な形状に固定化する機構が重要であることがわかった。本項では、Ile 側鎖構造相補的な疎水ポケットの形成、及び固定化に関わる機構について解析を行った。

Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体構造では、疎水ポケットの構成残基である Gly^{H104} と Gly^{L95} 間に水架橋構造が形成されている (Fig. 36a)。この水架橋構造は、apo Fab2r3 構造では見られなかったことから、VQIINK ペプチドとの結合に伴って形成される架橋構造である (Fig. 29)。更に言えば、VQIINK ペプチドとの結合に伴う Fab2r3 の構造変化は疎水ポケットの形成に関わる変化であったことから (Fig. 28)、この水架橋構造は疎水ポケットの形成に関与していると推察できる。また、Fab2r3-VQIVYK ペプチド複合体構造、Fab2r3-VQILNK ペプチド複合体構造においてもこの水架橋構造は形成されていた (Fig. 36b, 36c)。このことから、Gly^{H104} と Gly^{L95} 間の水架橋構造は、疎水ポケットの形状を Ile 側鎖相補的な形状に固定化することで、Val、Leu 側鎖との相補性を不十分に保つ機構としても働いていると考えられる。従って、Gly^{H104} と Gly^{L95} 間の水架橋構造は、リガンドペプチドとの結合に伴う疎水ポケットの形成に寄与するだけでなく、疎水ポケットの形状を Ile 側鎖構造相補的な形状に維持する機構としても関与していることが推察され、Fab2r3 の VQIINK 配列特異性に重要な機構の一つであると考えられる。

Fab2r3 の疎水ポケットを構成する Gly^{H104} は、Gly^{L95} との間の水架橋構造の他に、CDRH1 ループの Glu^{H35} との間にも水架橋構造を形成している (Fig. 36)。この水架橋構造は、Gly^{H104} と Gly^{L95} 間の水架橋構造と同様に、Fab2r3 の疎水ポケット形状固定に寄与していると考えられる。従って、Gly^{H104} を中心とした二つの水架橋構造が、Ile 側鎖構造に相補的な疎水ポケットの形成と、その形状固定化に寄与していると推測でき、これによって Fab2r3 は VQIINK 配列に特異性を発揮すると考えられる。

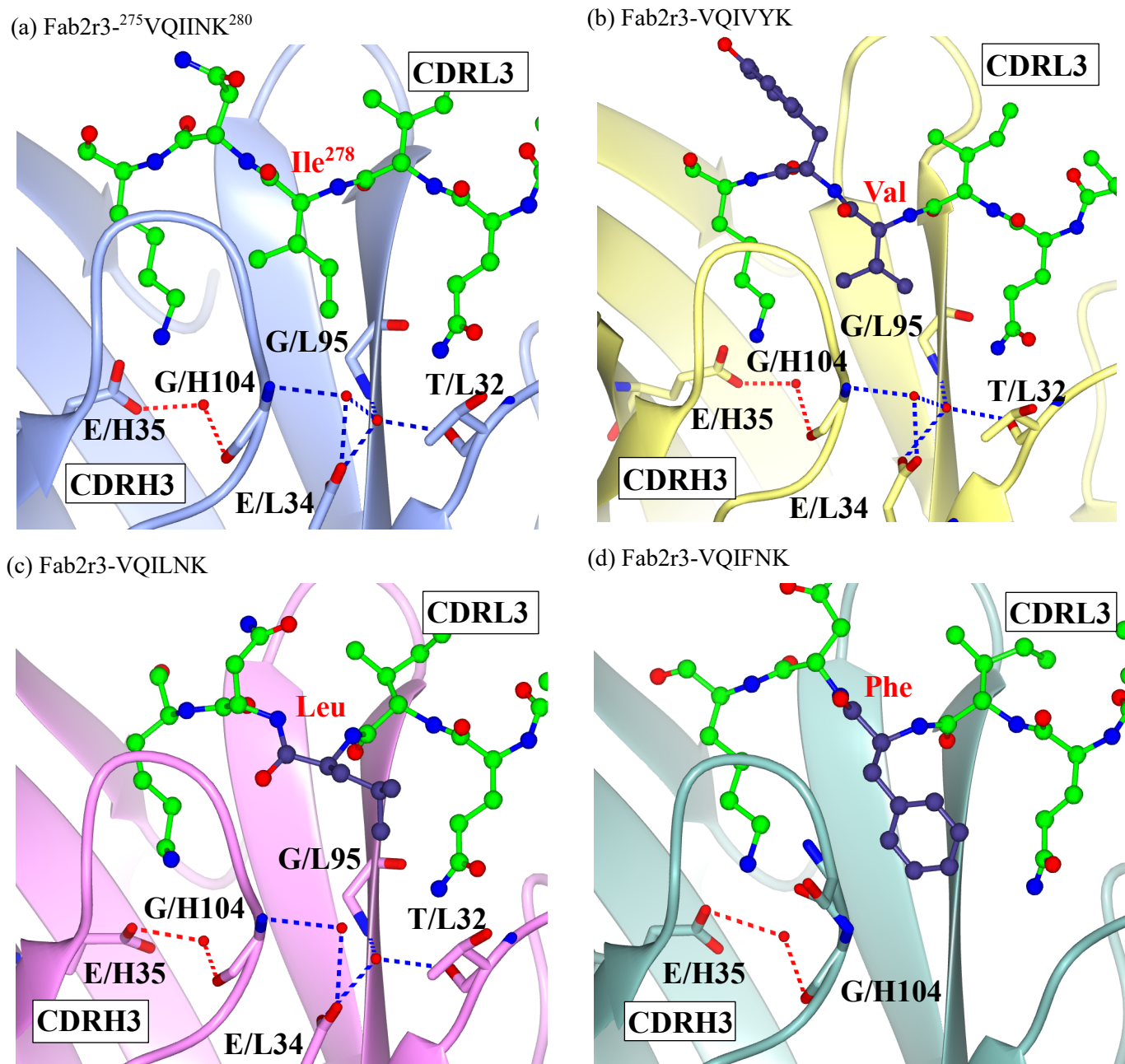


Fig. 36. The fixation mechanism of the hydrophobic pocket in Fab2r3.

Showing the hydrophobic pocket of Fab2r3-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ (a), Fab2r3-VQIVYK (b), Fab2r3-VQILNK (c), and Fab2r3-VQIFNK peptide complex structures (d). Fab2r3 is shown the ribbon model and the ligand peptide shows the ball-and-stick model. The mutated residues in the peptide are colored deep blue in the VQIVYK, VQILNK, and VQIFNK peptides. The water crosslink structures of the Glu^{H35}-Gly^{H104} and Gly^{H104}-Glu^{L34}-Gly^{L95} represent the red and blue dotted lines, respectively.

第六項 小活

本節では、様々な変異型 VQIINK ペプチド (VQIVYK、VQILNK、VQIFNK) と Fab2r3 の複合体構造解析を行い、Fab2r3 の VQIINK 配列に対する高い特異性について原子レベルで解析を行った。各類似ペプチドとの複合体構造を解明し、それぞれ比較したところ、VQIVYK ペプチドは VQIINK ペプチドと同様の伸長構造をとっており、VQILNK、VQIFNK ペプチドは変異残基を中心に折れ曲がった構造をとっていることがわかった (Fig. 33)。興味深いことに、リガンドペプチドの構造が大きく変化しているにもかかわらず、Fab2r3 のリガンド結合サイトの形状は一定の形状で維持されており、リガンド認識にも関与する疎水ポケットの形状も一定に保たれていることがわかった (Fig. 34)。そこで、疎水ポケットにおける各リガンドの認識様式を比較するため、全ての複合体構造の表面電位図を比較した。その結果、Fab2r3 の疎水ポケットは Ile 側鎖構造にのみ相補的な形状であり、Val、Leu、Phe 側鎖とは相補性を不十分に保っていることが明らかとなった (Fig. 35)。この結果は、疎水ポケットを Ile 側鎖構造にのみ相補的な形状に維持する機構によって、Fab2r3 は VQIINK 配列に対する特異性を示していることを示唆している。より詳細に、Fab2r3 の疎水ポケットの形状維持機構について解析したところ、Fab2r3 の疎水ポケットを構成する Gly^{H104}を中心とした二つの水架橋構造 (Gly^{H104}-Gly^{L95} 間、Glu^{H35}-Gly^{H104} 間) が疎水ポケットの形状維持に寄与していることが推察された (Fig. 36)。この中でも、Gly^{H104}-Gly^{L95} 間の水架橋構造は、疎水ポケットと同様に VQIINK ペプチドとの結合に伴い形成される構造である (Fig. 28, 29)。よって、Fab2r3 は Gly^{H104}-Gly^{L95} 間の水架橋構造を形成することにより、Ile 側鎖相補的な疎水ポケットを形成し、更にその形状を固定化していると推測した。

本節の結果から、Tau 分子中 VQIINK 配列との結合に伴い形成される Gly^{H104}-Gly^{L95} 間の水架橋構造が、Ile 側鎖構造相補的な形状の疎水ポケットを形成し、更にその形状を固定化することが推察され、これによって形成された疎水ポケットが、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ 配列中の Ile²⁷⁸ 側鎖とのみ安定な疎水性相互作用を形成するため、Fab2r3 が VQIINK 配列に対し高い特異性を示すという、Fab2r3 の VQIINK 配列特異的認識機構を推測するに至った。

総括

微小管結合型タンパク質 Tau の異常自己重合体による神経原線維変化は、アルツハイマー病患者に見られる代表的な病理学的所見の一つであり、神経原線維変化の進行は、アルツハイマー病の病状進行と正の相関性を示すことが知られている^[17]。Tau の自己重合反応には、Tau 分子中の微小管結合領域に存在する²⁷⁵VQIINK²⁸⁰、³⁰⁶VQIVYK³¹¹領域が必須であり、両配列を認識し Tau の自己重合を阻害する物質は、新規アルツハイマー病治療薬として有効である。本論文では、Tau に対して非常に高い特異性を示すマウスモノクローナル抗体 (Tau2r3) の Fab 領域 (Fab2r3) が有する、Tau 重合阻害作用、及び Tau 特異的認識機構を分光学的手法、熱力学的手法、及び構造化学的手法により、原子レベルで解明した。

第一章では、蛍光色素 Thioflavin S を用いた蛍光強度測定と、動的光散乱法による経時的な粒子径測定、及び電子顕微鏡を用いた Tau 線維の形態観察により、Fab2r3 が有する Tau 自己重合阻害作用を評価した。その結果、Fab2r3 が Full-Tau (0N4R) 及び 4RMBD が示す自己重合反応を阻害し、Tau 重合に伴う不溶性線維の形成及び線維成長が抑制する結果が示された。次に、熱力学的手法を用いて、Fab2r3 の Tau 重合阻害作用が、Tau 分子中²⁷⁵VQIINK²⁸⁰配列との結合により生じることを示した。この配列は、Tau の重合反応に必要な配列であるため、Fab2r3 が有する VQIINK 配列認識機構についてより詳細な解析を行った。まず、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰配列の全ての残基をそれぞれ Ala に変異させたペプチドと Fab2r3 の結合強度解析を行い、Fab2r3 と相互作用を形成する残基を探索したところ、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰配列の親水性残基 Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰と、疎水性残基 Ile²⁷⁸が Fab2r3 と相互作用を形成していることが示された。また、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰配列中の疎水性残基 Ile²⁷⁸を他の疎水性残基に変異させたペプチドと Fab2r3 の結合強度解析を行ったところ、全ての変異残基で 10 倍以上の結合強度の低下が見られたことから、Fab2r3 が²⁷⁵VQIINK²⁸⁰配列の Ile²⁷⁸を高い特異性で認識していることが示唆された。

第二章一節では、第一章で明らかにした Fab2r3 の Tau 認識機構について原子レベルで明らかにするため、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、Fab2r3 と²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ペプチドの複合体構造を解明し、結合様式について解析したところ、Fab2r3 の CDRH3、CDRL1、CDRL3 領域が²⁷⁵VQIINK²⁸⁰配列中 Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰側鎖と多くの水素結合を形成していることがわかった。更に、Fab2r3 の CDRH3、CDRL3 領域の無電荷領域が形成する疎水ポケット内に、Ile²⁷⁸側鎖が構造相補的に当てはまっており、Ile²⁷⁸側鎖と疎水ポケット間で疎水性相互作用が形成されていることがわかった。

第二章二節では、apo Fab2r3 構造を解明し、Fab2r3-VQIINK 複合体と構造比較を行い、VQIINK ペプチドとの結合に伴う構造変化について解析した。その結果、Fab2r3 の CDRH3、CDRL3 領域が、VQIINK ペプチドとの結合に伴い、リガンド結合サイトを広げるように大きく構造変化していることが観察された。更に、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ペプチドの Ile²⁷⁸側鎖と相互作用を形成する疎水ポケ

ットは、apo Fab2r3 構造では形成されていなかったことから、VQIINK ペプチドとの結合に伴う Fab2r3 の構造変化により疎水ポケットが形成されることがわかった。これらの結果は、Ile²⁷⁸ 認識に関わる疎水ポケット形成が、Fab2r3 の Tau 結合反応初期に生じることを示唆している。従って、Fab2r3 と VQIINK 配列の結合反応は、Fab2r3 の構造変化による疎水ポケットの形成から始まり、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ 配列中 Ile²⁷⁸ 側鎖との疎水性相互作用が形成され、次いで Gln²⁷⁶、Lys²⁸⁰ 側鎖との水素結合が形成されるという機序で進むことが推察された。

第二章三節では、Fab2r3 の VQIINK 配列特異性について解析を行った。第一章の ITC 測定の結果で、Fab2r3 の Ile²⁷⁸ 認識機構は正確であったことから、VQIINK 配列特異的認識機構において重要な機構であることが示唆されている。そこで、Fab2r3 の Ile²⁷⁸ 特異的認識機構についてより詳細な解析を行うため、Ile²⁷⁸ 変異型ペプチド (VQIVYK、VQINK、VQIFNK) と Fab2r3 の複合体構造解析を行った。構造解析の結果、VQIVYK ペプチドは VQIINK ペプチドが伸長構造をとっていることに対し、VQILNK ペプチド、VQIFNK ペプチドは変異残基を中心に折れ曲がった構造を取ることが示された。興味深いことに、Fab2r3 のリガンド結合領域は、リガンドペプチドの種類や構造に差異があるにも関わらず、一定の形状に保持されており、²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ ペプチドの Ile²⁷⁸ 側鎖と相互作用する疎水ポケットも一定の形状を維持されていることがわかった。一定の形状を保つ疎水ポケットと、各リガンドペプチドの結合様式について、各複合体構造の表面電位図を比較したところ、Fab2r3 の疎水ポケットの形状は Ile 側鎖構造にのみ相補性を示し、他の残基とは構造相補性が不十分に保たれていることがわかった。従って、Fab2r3 の Ile²⁷⁸ 特異的認識機構は、Fab2r3 が疎水ポケットの形状を Ile 側鎖構造相補的な形状に維持することに起因していることが示唆された。この疎水ポケット形状維持機構について詳細な解析を行ったところ、疎水ポケットの構成残基である Gly^{H104} を中心とした二本の水架橋構造が見つかった。これらの水架橋構造のうち、CDRL3 ループの Gly^{L95} との間で形成される水架橋構造は、apo Fab2r3 構造では形成されていなかったことから、疎水ポケットと同様に VQIINK ペプチドとの結合に伴って形成されることが明らかとなり、疎水ポケットの形成にも寄与していることが推察された。また、この水架橋構造は Fab2r3-VQIVYK 複合体、Fab2r3-VQILNK 複合体構造でも形成されていたことから、両構造で観察された Ile 側鎖相補的な疎水ポケットの形状固定にも関与していると考えられる。従って、Gly^{H104} を中心とする水架橋構造が、Ile 側鎖構造に対してのみ高い構造相補性を持つ疎水ポケット形状を創出し、更にその形状を固定化することにより、Fab2r3 が Tau 分子中 VQIINK 配列に対して高い特異性を示すことが推測された。

アルツハイマー病は、急激な高齢化が進む我が国だけでなく世界的な社会問題であり、その根本治療薬の開発・実用化は強く期待されている。2021 年に Cummings らは、臨床試験が行われている 11 種の Tau 標的型医薬品のうち、6 種が抗体医薬品であることを報告しており^[55]、新規アルツハイマー病治療薬の候補として、Tau を認識する抗体は期待されている。本論文で用いた Tau2r3 は、Tau 重合反応に深く関わる ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ 領域を特異的に認識する抗体であり、高い有効性が期待できる。更に本論文では、VQIINK 配列に対する結合様式、及び特異的認識機構につ

いての構造化学的知見が得られたことから、アルツハイマー病根本的治療薬開発研究において有効なリード化合物としても期待できる。当研究室では現在、Tau2r3 をベースとした新規 Tau 自己重合阻害物質開発のため、Tau2r3 の可変部領域をペプチドリンカーで結合した人工抗体 (single-chain Fragment variable: scFv) 遺伝子の作製し、大腸菌での発現系構築に取り組んでおり、これを発展させ新規 Tau 自己重合阻害物質の開発に繋げることを目指している。本研究で明らかにした Fab2r3 の Tau 認識機構に関する構造化学的知見は、Tau2r3 の scFv に対する変異導入等に有効な知見であり、VQIINK 配列に対する親和性がより高い人工抗体や、Tau 分子中の異なる配列 (³⁰⁶VQIVYK³¹¹ 等) に対する認識能を有する人工抗体の作製に役立つと考えている。更に言えば、最終的により強力な Tau 重合阻害作用を有する人工抗体、延いては新規アルツハイマー病根本的治療薬の開発に大きく貢献するものであると確信している。

謝辞

本研究の遂行、並びに本稿を纏めるにあたり、終始懇切なる御指導御鞭撻を賜りました大阪医科薬科大学薬学部 薬品物理化学研究室 友尾 幸司 准教授に深甚なる謝意と敬意を表します。

本研究の遂行、及び本稿を纏めるにあたり、有益な御助言と御討論を賜りました 大阪医科薬科大学薬学部 薬品物理化学研究室 尹 康子 准教授に心より感謝申し上げます。

本稿を纏めるにあたり、御助言と御討論を賜りました 福森 亮雄 教授、戸塚 裕一 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の対象物質 Tau2r3 を産生するマウスハイブリドーマ細胞と Tau 遺伝子を御提供いただきました株式会社 Pharmacia 神戸 谷口 泰造 博士に心より感謝申し上げます。

Fab2r3 が有する Tau 重合阻害機構についての御助言と御指導を賜りました 大阪医科薬科大学薬学部 共同機器センターNMR 室 箕浦 克彦 准教授に心より感謝申し上げます。

Tau 遺伝子の扱いについて御指導いただきました大阪医科薬科大学薬学部 感染制御学研究室 宮本 勝城 准教授に深く感謝いたします

ハイブリドーマ細胞の培養方法、及び抗体の扱い方について御指導いただきました大阪医科薬科大学薬学部 感染制御学研究室 土屋 孝弘 講師に深く感謝申し上げます。

本研究の電子顕微鏡による Tau 線維撮影について御助力いただきました大阪医科薬科大学医学部創薬医学研究室 高井 真司 教授、大阪医科薬科大学 研究支援センター 研究機器部門 上野 照生 技術員、藤岡 良彦 技術員に深く感謝申し上げます。

博士課程における研究活動を御支援いただきました、日本薬学会長井記念薬学研究奨励支援事業に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり御協力いただきました大阪医科薬科大学薬学部 薬品物理化学研究室員の皆様に心から感謝申し上げます。

実験の部

Tau2r3 / Fab2r3 大量発現・高純度精製

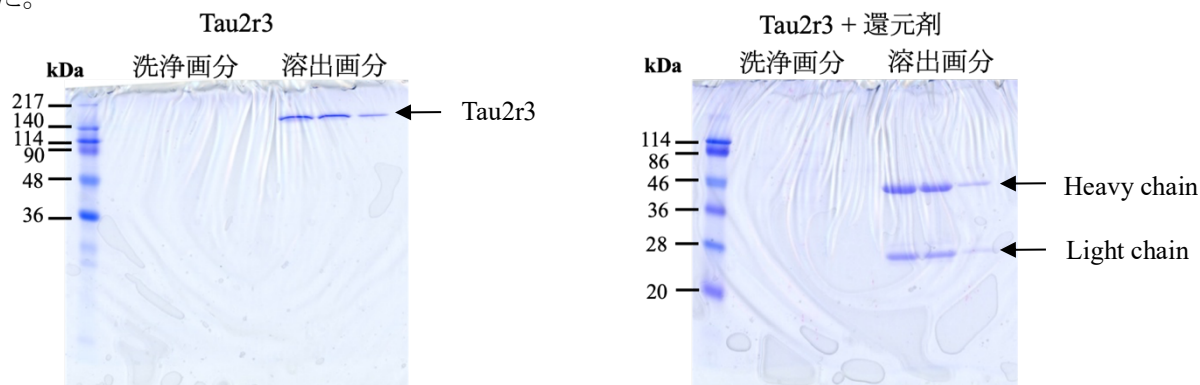
Tau2r3 の発現には、株式会社 PharmaCrea 神戸、代表取締役 谷口泰造博士より提供された Tau2r3 産生ハイブリドーマ細胞を用いた。使用したマウスミエローマ細胞は P3U1、免疫に用いたマウスは Balb/c である。

・ Tau2r3 の発現・精製

血清培地を用いて、Tau2r3 産生細胞の継代培養を行い、十分な細胞数が得られるまで培養した。その後、無血清培地にハイブリドーマ細胞を移し、10 日間培養し上清を回収した。

血清培地	：	RPMI 1640 (nacalai tesque)
		10% FBS (SIGMA Aldrich)
		0.1mM 2-Mercaptoethanol (nacalai tesque)
		1000units penicillin / 1mg · ml ⁻¹ streptomycin (Thermo Fisher)
無血清培地	：	CD Hybridoma (Gibco)
		10% Glutamax (Gibco)
		1000units penicillin / 1mg · ml ⁻¹ streptomycin (Thermo Fisher)

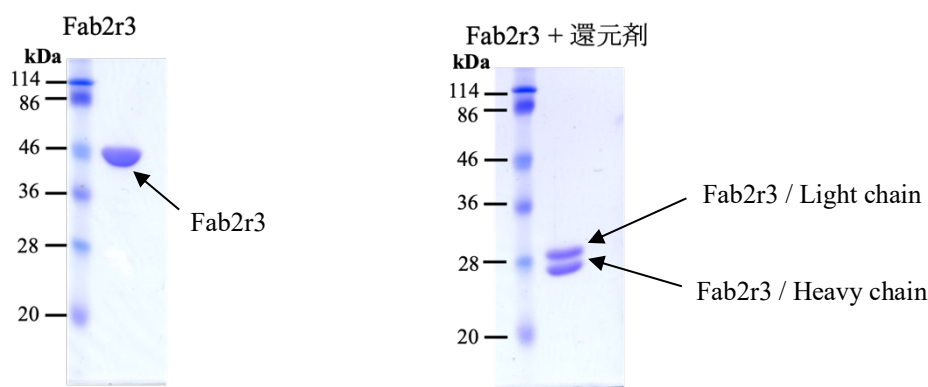
回収した上清に飽和硫酸アンモニウム溶液を当量添加し、4℃、1hr 攪拌し塩析を行った。塩析溶液を 10000g、4℃、30min で遠心分離し、沈殿を 20mM Sodium Phosphate pH7.0 で懸濁させた後、同 Buffer を外液として用いた。また、透析開始後 3hr、6hr 時点で 2 回外液交換を行った後、overnight で透析した。透析後溶液から Tau2r3 を、Protein G アフィニティークロマトグラフィーにより精製した (Binding Buffer: 20mM Sodium Phosphate pH7.0、Elution Buffer: 0.1M Glycine-HCl pH3.0、Neutralization Buffer: 1.0M Tris-HCl pH9.0)。精製した Tau2r3 の純度を、15% SDS-PAGE により確認した。



・ Fab2r3 の作製・精製

0.25mg/ml papain (Thermo Fisher) を Tau2r3 溶液と混和し、37℃、11hr 反応させ、Fab2r3 を作製した (Digestion Buffer: 20mM cysteine-HCl, 30mM Sodium phosphate pH7.0)。papain 消化後溶液から Fab2r3 を、Protein A カラムクロマトグラフィーにより精製した (Binding Buffer: 20mM Sodium Phosphate pH7.0、Elution Buffer: 20mM Sodium citrate pH4.0、Neutralization Buffer: 1.0M Tris-HCl pH9.0)。更に、AKTA purifier システムによる NaCl グラジエント法を用いて、強陰イオン交換カラム (Capto Q column; GE Healthcare) により、変性した Fab2r3 を除去した (Binding Buffer: 50mM Tris-HCl pH9.0、Elution Buffer: 50mM Tris-HCl pH9.0, 1.0M NaCl)。

精製した Fab2r3 の純度を、15%SDS-PAGE により確認した。



0N4R / 4RMBD 発現・精製

・ 0N4R / 4RMBD の大量発現

pET23d-0N4R、pET23d-4RMBD 遺伝子を BL21 (DE3) pLysS 株に形質転換したグリセリンストックを用いて、0N4R、4RMBD の大量発現を行った。

50μg/ml ampicillin を含む 2×YT 培地 1L で震盪培養し、OD₆₀₀=0.5 に達したところで IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; nacalai tesque) を添加し (終濃度 1.0mM)、更に 4 時間培養した。培養液を 8000rpm、15min 遠心分離し、菌体を回収した。

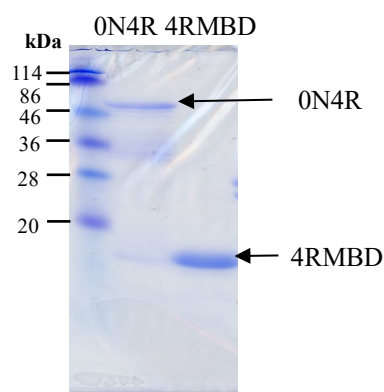
・ 0N4R の精製

回収した菌体を、破碎 Buffer (50mM Tris-HCl pH7.6, 150mM NaCl) 10ml で懸濁し、超音波破碎を行った。その後 18000rpm、90min、4℃で遠心分離し、上清を回収、70℃の湯浴で 15min ヒートショックし、不純物を沈殿させた。遠心分離により、沈殿物を除去した後、Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いたステップワイズ法により、0N4R を精製した (Binding Buffer: 50mM Tris-HCl pH7.6, 150mM NaCl、Elution Buffer: 50mM Tris-HCl pH7.6, 150mM NaCl, 500mM imidazole)。

・ 4RMBD の精製

回収した菌体を、破碎 Buffer (50mM Tris-HCl pH7.6) 10ml で懸濁し、超音波破碎を行った後、18000rpm、90min、4℃で遠心分離し、上清を回収した。得られた上清から 4RMBD を、AKTAprime plus システムによる NaCl グラジエント法を用いて、陽イオン交換カラム (Hitrap SP FF 10/16; Cytiva) により粗精製した (Binding Buffer: 50mM Tris-HCl pH7.6、Elution Buffer: 50mM Tris-HCl pH7.6, 1.0M NaCl)。続いて、Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いたステップワイズ法により、4RMBD を精製した (Binding Buffer: 50mM Tris-HCl pH7.6、Elution Buffer: 50mM Tris-HCl pH7.6, 500mM imidazole)。

精製した 0N4R、4RMBD 溶液の純度を 15%SDS-PAGE により確認した。



Thioflavin S 蛍光強度測定

精製した Fab2r3、0N4R、4RMBD 溶液を 3L の測定 Buffer (50mM Tris-HCl pH7.6) で透析し、限外濾過法で濃縮した後、下表の条件で測定サンプルを調製し、蛍光強度測定を行った。用いた分光蛍光高度計は FP-6500 (JASCO) である。

【サンプル調製】		【蛍光強度測定条件】			
Tau 終濃度	25μM	励起波長	440nm	感度	Medium
Fab2r3 終濃度	25μM	蛍光波長	500nm	レスポンス	1sec
ThS 終濃度	10μM	励起バンド	3nm	測定回数	10times
Heparin 終濃度	6.25μM	蛍光バンド	10nm	測定温度	297K

動的光散乱法による粒子径測定

右表に従ってサンプル溶液を調製し、Zetasizer Nano-S (Malvern) を用いて、1 分に 1 回、合計 180 回粒子径測定を行った。用いたセルは小容量石英バッチセルであり、これに 100 μ l のサンプル溶液を注入し測定した。

【サンプル調製】

Tau 終濃度	10 μ M
Fab2r3 終濃度	10 μ M
Heparin 終濃度	2.5 μ M

Negative-staining 電子顕微鏡撮影

右表に従ってサンプル溶液を調製し、2 日間室温で静置し、十分に重合反応を進行させた。その後、各サンプル 10 μ l を銅グリッドに滴下し、2%酢酸ウランを等量混和させ、グリッド表面の余分なサンプルを取り除いたものを観察サンプルとした。用いた電子顕微鏡は、HT7800 (Hitachi High Tech.) であり、加速電圧は 80kV に設定し観察した。

【サンプル調製】

Tau 終濃度	25 μ M
Fab2r3 終濃度	25 μ M
Heparin 終濃度	6.25 μ M

等温滴定型熱量測定法 (Isothermal Titration Calorimetry: ITC)

Fab2r3 溶液を 3L の ITC Buffer (10mM Tris-HCl pH7.6) で透析し、限外濾過法を用いて 20 μ M ままで濃縮したものをサンプル溶液とした。また、同 Buffer を用いてリガンド溶液を調製した。各リガンドの濃度は、200 μ M で調製し ITC 測定を行い、解離定数が 10^{-6} M オーダー以上のリガンドに関しては、濃度を変更して測定し直した。本論に掲載した ITC 測定結果は、VQIVYK、VQIVNK ペプチドは 500 μ M、VQILNK、VQIFNK ペプチドは 350 μ M、4RMBD 及びその他のペプチドは 200 μ M に調製し測定した結果である。得られた ITC 測定データは ORIGIN software (ORIGIN) により解析し、各種の熱力学的パラメーターを算出した。また、用いた各種ペプチドは、固相法により合成した後、逆相 HPLC にて 95%以上の純度に精製し、凍結乾燥を行い粉末状態にしたものを GenScript から購入した。

結晶析出条件の探索

Fab2r3 溶液を 3L の結晶化 Buffer (10mM Tris-HCl pH7.6) で透析し、限外濾過法を用いて 10mg/ml まで濃縮し結晶化サンプルとした。結晶化条件スクリーニングは MCSG-1 ~ 4 kit (Hampton Research)、及び PEG/Ion screening kit (Hampton Research) を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法により行った。その結果、PEG3350、NH₄I 等を用いた析出条件で微結晶を得ることに成功した。明らかとなった微結晶析出条件を基に、さらに詳細な結晶析出条件の探索を、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行った (下表)。

【結晶析出条件探索】	
PEG3350	16 % - 26%
Glycerol	15% or 20%
NH ₄ I	0.1M or 0.2M
Buffer	10mM Tris-HCl pH7.6 or pH8.0
Fab2r3 conc.	9 mg/ml -15mg/ml
Fab2r3 : peptide	1:1 - 1:3

X 線回折強度測定と構造精密化

・ X 線回折強度測定

X 線回折強度測定は、IP 単結晶 X 線構造解析装置 (Rigaku R-Axis VII imaging-plate system) を用い、窒素ガス吹き付けにより 100K 下で行った。X 線は、45kV、55mA で Cu をターゲットとして発生させ、X 線集光人工多層膜ミラー (CMF-monochromated CuK α) で回折データを収集した。また、結晶-プレート間距離を 135mm、180°の回転範囲を 1 フレームあたり 0.5°、露光時間を 180sec に設定し、合計 360 枚撮影した。得られた X 線回折データは、Crystal Clear Program を用いて解析した。

・ 初期構造の決定法

Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体

BLAST 検索により、Fab2r3 のアミノ酸配列と相同性の高いタンパク質を検索し、MOLREP を用いた分子置換法により Fab2r3-VQIINK 複合体の初期構造を決定した。その結果、Fab2r3 の定常部はエボラウイルスの糖タンパク質を認識する抗体 “13F6-1-2” (PDB code 2QHR) の構造を^[95]、可変部は Huntington 病に関与する polyQ タンパク質を認識する抗体 “MW1” (PDB code 2GSG) の構造^[96]を用いて、初期構造を決定することに成功した。その後、REFMAC5 と coot を用いて複合体構造の精密化を行った (PDB code: 6LRA)。

apo Fab2r3

BLAST 検索により、Fab2r3 のアミノ酸配列と相同性の高いタンパク質を検索し、MOLREP を用いた分子置換法により apo Fab2r3 の初期構造を決定した。その結果、Fab2r3 の Heavy 鎖はインフルエンザウイルスの中和抗体 “I-2” (PDB code 4HK3) の構造^[97] を、Light 鎖の定常部はワクシニアウイルスの A27 ペプチドを認識する Fab 抗体 “Fab 8E3” (PDB code 5EOR) の構造^[98] を、Light 鎖の可変部は、Huntington 病に関与する polyQ タンパク質を認識する抗体 “MW1” (PDB code 2GSG) の構造^[96] を用いて、初期構造を決定することに成功した。その後、REFMAC5 と coot を用いて複合体構造の精密化を行った (PDB code: 7FGK)。

Fab2r3-VQIVYK 複合体

Fab2r3-VQIVYK 複合体の初期構造は、Fab2r3-VQIINK 複合体構造を用い、CCP4i の MOLREP による分子置換法により決定した。その後、REFMAC5 と coot を用いて複合体構造の修正及び水分子の追加により、構造の精密化を行った (PDB code: 7FGL)。

Fab2r3-VQILNK 複合体、Fab2r3-VQIFNK 複合体

Fab2r3-VQILNK 複合体、Fab2r3-VQIFNK 複合体の初期構造は、apo Fab2r3 構造を用い、CCP4i の MOLREP5 による分子置換法により決定した。その後、REFMAC5 と coot を用いて複合体構造の修正及び水分子の追加により、構造の精密化を行った (PDB code: 7FGJ, 7FGR)。

・タンパク質構造の描画

本論文中に掲載した全てのタンパク質構造は、CCP4 Molecular Graphics を用いて描画した。本文中の水素結合は、原子間距離が 3.2 Å 以下のものを示している。表面電位図においては、負電荷領域を赤色で、正電荷領域を青色で、無電荷領域を白色で示した。また、Fig. 28 と Fig. 35 の黒色の原子表面は、リガンドペプチド中 4 残基目の疎水性残基の原子表面であり、無電荷領域を示している。

参考文献

1. Jacoby J. and Levy R., (1980) Computed tomography in the elderly. 2. Senile dementia: diagnosis and functional impairment, *Br. J. Psychiatry*, 136, 256-269
2. Andrews K. A., Modat M., Macdonald K. E., Yeatman T., Cardoso M. J., Leung K. K., Barnes J., Villemagne V. L., Rowe C. C., Fox N. C., Ourselin S., and Schott J. M., (1981) Atrophy rates in asymptomatic amyloidosis: Implications for Alzheimer prevention trials, *PLoS One*, 8(3), e58816 (2013)
3. Sengoku R., (2020) Aging and Alzheimer's disease pathology, *Neuropathology*, 40, 22-29
4. Crous-Bou M., Minguillon C., Gramunt N., and Molinuevo J. L., (2017) Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention, *Alzheimer's Research & Therapy*, 9(71)
5. World Health Organization, (2017) Global Action Plan on the Public Health Response to Dementia, <https://apps.who.int/bookorders/>
6. Alzheimer's Disease International, (2021) World Alzheimer Report 2021, <https://www.alzint.org/u/World-Alzheimer-Report-2021.pdf>
7. 厚生労働省老健局, (2019) 認知症施策の総合的な推進について (参考資料), <https://www.mhlw.go.jp/content/12300000/000519620.pdf>
8. Zhang X. X., Tian Y., Wang Z. T., Ma Y. H., Tan L., and Yu J. T., (2021) The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention, *J. Prev. Alz. Dis.*, 3(8), 313-321
9. McDade E., and Bateman R. J., (2017) Stop Alzheimer's before it starts, *Nature*, 547, 157-155
10. 二宮 利治, (2015) 厚生労働科学研究費補助金 厚生労働科学特別研究事業 日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究 平成 26 年度総括・分担研究報告書, <https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/2014/141031/201405037A/201405037A0001.pdf>
11. Lane C. A., Hardy J., and Schott J. M., (2017) Alzheimer's disease, *European Journal of Neurology*, 25(1), 59-70
12. Brien R. J., and Wong P. C., (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease, *Annu. Rev. Neurosci.*, 34, 185-204
13. Gulisano W., Maugeri D., Baltrons M. A., Fà M., Amato A., Palmeri A., D'Adamio L., Grassi C., Devanand D. P., Honig L. S., Puzzo D., and Arancio O., (2018) Role of Amyloid- β and Tau protein in Alzheimer's disease: Confuting the Amyloid cascade, *J. Alzheimer's Dis.*, 64, 611-631
14. Guo T., Zhang D., Zeng Y., Huang T. Y., Xu H., and Zhao Y., (2020) Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Molecular Neurodegeneration*, 15(40)
15. Braak H., Braak E., (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol.*, 82, 239-259

16. Braak H., Braak E., (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections, *Brain Pathol.*, 1, 213-216
17. Jack Jr. C. R., Knopman D. S., Jagust W. J., Shaw L. M., Aisen P. S., Weiner M. W., Petersen R. C., and Trojanowski J. Q., (2010) Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade, *lancet Neurol.*, 9(1)
18. Hardy J. A., and Higgs G. A., (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science*, 256, 184-185
19. Uddin M. S., Kabir M. T. Rahman M. S., Behl T., Jeandet P., Ashraf G. M., Najda A., Bin-Jumah M. N., El-Seedi H. R., and Abdel-Daim M. M., (2020) Revisiting the amyloid cascade hypothesis: From anti-A β therapeutics to auspicious new ways for Alzheimer's disease, *Int. J. Mol. Sci.*, 21(16)
20. Weitz T. M. and Town T., (2016) Amyloid cascade into clarity, *Immunity*, 45(4), 717-718
21. Ricciarelli R. and Fedele E., (2017) The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: It's time to change our mind, *Current Neuropharmacology*, 15, 926-935
22. Hung S. Y. and Fu W. M., (2017) Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease, *Journal of Biomedical Science*, 24(47)
23. Huang L. K., Chao S. P., and Hu C. J., (2020) Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease, *Journal of Biomedical Science*, 27(18)
24. Brion J. P., Guilleminot J., Cowhie D., Flament-Durand J., and Nlnw J., (1984) Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum, *Neuroscience*, 25, 139-146
25. Trojanowski J. Q., Schuck T., Luise S. M., and Lee M. V., (1989) Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system, *Histochem Cytochem*, 37, 209-215
26. Brandt R. and Lee G., (1993) Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, 268, 3414-3419
27. Barbier P., Zejneli O., Martinho M., Lasorsa A., Belle V., Smet-Nocca C., Tsvetkov P. O., Devred F., and Landrieu I., (2019) Role of tau as a microtubule-associated protein: structural and functional aspects, *Front Aging Neurosci.*, 11, 204
28. Šimic G., Leko M. B., Wray S., Harrington C., Delalle I., Jovanov-Milošević I., Bažadona D., Buée L., Silva R., Giovanni G. D., Wischik C., and Hof P. R., (2016) Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies, *Biomolecules*, 6(6)
29. Johnson G. V. W. and Stoothoff W. H., (2004) Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction, *Journal of Cell Science*, 117, 5721-5729

30. Andorfer C., Kress Y., Espinoza M., Silva R., Tucker K. L., Barde Y. A., Duff K., and Davies P., (2003) Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms, *Journal of Neurochemistry*, 86, 582-590
31. Hasegawa M., Jakes R., Crowther R. A., Lee V. M. -Y., Ihara Y., and Goedert M., (1996) Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein, *FEBS letters*, 384, 25-30
32. Goedert M. and Spillantini M. G., (2000) Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease, *Biochem. Biophys. acta*, 1502, 110-121
33. Takeda S., (2019) Tau propagation as a diagnostic and therapeutic target for dementia: potentials and unanswered questions, *Frontiers in Neuroscience*, 13
34. Fuster-Matanzo A., Hernadez F., and Avila J., (2018) Tau spreading mechanism implications for dysfunctional tauopathies, *Mol Sci*, 19(645),
35. Demaegd K., Schymkowitz J., and Rousseau F., (2018) Transcellular spreading of tau in tauopathies, *Chembiochem.*, 19(23), 2424-2432
36. Ayers J., Giasson B. I., and Borchelt D. R., (2018) Prion-like spreading in tauopathies, *Biol. Psychiatry*, 83(4), 337-346
37. Arendt T., Stieler J. T., and Holzer M., (2016) Tau and tauopathies, *Brain Research Bulletin*, 126, 238-292
38. Wang Y. and Mandelkow E., (2016) Tau in physiology and pathology, *Nature Review Neuroscience*, 17, 22-35
39. Goedert M., Spillantini M. G., Potier M. C., Ulrich J., and Crowther R. A., (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain, *EMBO J*, 8, 393-399
40. Goedert M., Wischik C. M., Crowther R. A., Walker J. E., and Klug A., (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 4051-4055
41. Rani L., Mittal J., and Mallajosyula S. S., (2020) Effect of phosphorylation and O-GlcNAcylation on Proline-Rich Domain of tau, *J. Phys. Chem. B.*, 124(10), 1909-1918
42. Tapia-Rojas C., Cabezas-Opazo F., Deaton C. A., Vergara E. H., Johnson G. V. W., and Quintanilla R. A., (2019) It's all about tau, *Progress in Neurobiology*, 175, 54-76
43. Xia Y., Prokop S., Gorion K. -M. M., Kim J. D., Sorrentino Z. A., Bell B. M., Manaois A. N., Chakrabarty P., Davies P., and Giasson B. I., (2020) Tau Ser208 phosphorylation promotes aggregation and reveals neuropathologic diversity in Alzheimer's disease and other tauopathies, *Acta Neuropathologica Communications*, 8(88)

44. Martin L., Latypova X., Wilson C. M., Magnaudeix A., Perrin M. -L., Yardin C., and Terro F., (2013) Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease, *Ageing Research Review*, 12(1), 289-309
45. Yao T. M., Tomoo K., Ishida T., Hasegawa H., Sasaki M., Taniguchi T., (2003) Aggregation analysis of the microtubule binding domain in tau protein by spectroscopic methods, *J. Biochem.*, 134, 91-99
46. Mizushima F., Minoura K., Tomoo K., Sumida M., Taniguchi T., and Ishida T., (2006) Fluorescence-coupled CD conformational monitoring of filament formation of tau microtubule-binding repeat domain, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343, 712-718
47. Crowther R. A., Olesen O. F., Jakes R., and Goedert M., (1992) The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease, *FEBS Letters*, 309, 199-202.
48. Fitzpatrick A. W. P., Falcon B., He S., Murzin A. G., Murshudov G., Garringer H. J., Crowther R. A., Ghetti B., Goedert M., Scheres S. H. W., (2017) Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease, *Nature*, 547, 185-190.
49. Barghorn S. and Mandelkow E., (2002) Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments, *Biochemistry*, 41(50), 14885-14896
50. Barghorn S., Davies P., and Mandelkow E., (2004) Tau paired helical filaments from Alzheimer's disease brain and assembled in vitro are based on β -structure in the core domain, *Biochemistry*, 43, 1694-1703
51. Friedhoff P., Von Bergen M., Mandelkow E. -M., Davies P., and Mandelkow E., (1998) A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 15712-15717
52. Wille H., Drewes G., Biernat J., Mandelkow E. -M. and Mandelkow E., (1992) Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau *in vitro*, *J. Cell. Biol.*, 118, 573-584
53. Jouanne M., Rault S., and Voisin-Chiret A. S., (2017) Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139(20), 153-167
54. Hattori M., Sugino E., Minoura K., In Y., Sumida M., Taniguchi T., Tomoo K. and Ishida T., (2008) Different inhibitory response of cyanidin and methylene blue for filament formation of tau microtubule-binding domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374(1), 158-163
55. Cummings J., Lee G., Zhong K., Fonseca J. and Taghava K., (2021) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021, *Alzheimer's Dement*, 7, e12179
56. Crowe A., James M. J., Lee V. M. Y., Smith A. B., Trojanowski J. Q., Ballatore C. and Brunden K. R., (2013) Aminoethienopyridazines and methylene blue affect tau fibrillization via cysteine oxidation, *The Journal of Biological Chemistry*, 288(16), 11024-11037

57. Minoura K., Yao T. -M., Tomoo K., Sumida M., Sasaki M., Taniguchi T., and Ishida T., (2004) Different associational and conformational behaviors between the second and third repeat fragments in the tau microtubule-binding domain, *Eur. J. Biochem.*, 271, 545-552
58. Nergen M. V., Friedhoff P., Biernat J., Heberle J., Mandelkow E. -M., and Mandelkow E., (2000) Assembly of τ protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (³⁰⁶VQIVYK³¹¹) forming β structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(10), 5129-5134
59. Li W. and Lee M. -Y., (2006) Characterization of Two VQIXXK Motifs for Tau Fibrillization *in Vitro*, *Biochemistry*, 45, 15692-15701
60. Seidler P. M., Boyer D. R., Murray K. A., yang T. P., Bentzel M., Sawaya M. R., Rosenberg G., Cascio D., Williams C. K., Newell K. L., Ghetti B., Deture M. A., Dickson D. W., Vinters H. V., and Eisenberg D. S., (2019) Structure-based inhibitors halt prion-like seeding by Alzheimer's disease-and tauopathy- derived brain tissue samples, *Journal of Biological Chemistry*, 294(44), 16451-16464
61. Seidler P. M., Boyer D. R., Rodriguez J. A., Sawaya M. R., Cascio D., Murray K., Gonen T., and Eisenberg D. S., (2018) Structure-based inhibitors of tau aggregation, *Nature Chemistry*, 10, 170–176
62. Arrasate M., Perez M., Armas-Portela R., Avila J., (1999) Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. the effect of FTDP-17 mutations, *FEBS Letters*, 446, 199-202.
63. Goedert M., Jakes R., and Crowther R. A., (1999) Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments, *FEBS Letters*, 450, 306–311.
64. Giannerri A. M., Lindwall G., Chau M. F., Radeke M. J., Feinstein S. C., and Kohlstaedt L. A. (2000) Fibers of tau fragments, but not full length tau, exhibit a cross β -structure: implication for the formation of paired helical filaments, *Protein Sci*, 9, 2427-2435
65. Von Bergen M., Biernat, J. B., Mandelkow E. -M., and Mandelkow E., (2005) Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1739, 158-166
66. Sharp A., Crabb S. J., Johnson P. W. M., Hague A., Cutress R., Townsend P. A., Ganesan A. and Packham G., (2009) Thioflavin S (NSC71948) interferes with Bc₂-associated athanogene (BAG-1)-mediated protein-protein interactions, *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(2), 680-689
67. 杉本真也 (2016)、チオフラビン T による RNA 代謝の高感度モニター法、*環境バイオテクノロジー学会誌*, 16(1)、45-50
68. Alali S., Riazi G., Ashrafi-Kooshk M. R., Meknatkhah S., Ahmadian S., Ardakani M. H., and Hosseinkhani B., (2021) Cannabidiol inhibits tau aggregation in vitro, *Cells*, 10(12), 3521
69. Chaudhary N., Singh S., and Nagaraj R., (2009) Morphology of self-assembled structures formed by short peptides from the amyloidogenic protein tau depends on the solvent in which the peptides are dissolved, *Journal of peptide science*, 15(10), 675-684

70. Larbig G., Pickhardt M., Lloid D. G., Schmidt B. and Mandelkow E., (2007) Screening for inhibitors of tau protein aggregation into Alzheimer paired helical filaments: A ligand based approach results in successful scaffold hopping, *Current Alzheimer Research*, 4, 315-323
71. KrishnaKumar V. G., paul A., Gazit E., and Segal D., (2018) Mechanistic insights into remodeled Tau-derived PHF6 peptide fibrils by Naphthoquinone-Tryptophan hydrides, *Nature Scientific Reports*, 8(71)
72. Inoue M., Kaida S., Nakano S., Annoni C., Nakata E., Konno T., and Morii T., (2014) Phosphorylation regulates fibrillation of an aggregation core peptide in the second repeat of microtubule-binding domain of human tau, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22, 6471-6480
73. Tomoo K., Yao T. -Y., Minoura K., Hiraoka S., Sumida M., Taniguchi T., and Ishida T., (2005) Possible Role of Each Repeat Structure of the Microtubule- Binding Domain of the Tau Protein in *In Vitro* Aggregation, *J. Biochem.*, 138, 413-423
74. Zang W., Falcon B., Murzin A. G., Fan J., Crowther R. A., Goedert M. and Scheres S. HW., (2019) Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer's and Pick's diseases, *eLife*, 8, e43584
75. Sheres S. HW., Zhang W., Falcon B. and Goedert M., (2020) Cryo-EM structures of tau filaments, *Current Opinion in Structural Biology*, 64, 1-9
76. Pierce M. M., Raman C. S. and Mall B. T., (1999) Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions, *Methods*, 19, 213-221
77. Tsumoto K., Ogasawara K., Ueda Y., Watanabe K., Yutani K. and Kamagai I., (1995) Role of Tyr residues in the content region of anti-lysozyme monoclonal antibody HyHEL10 for antigen binding, *The Journal of Biological Chemistry*, 270(31), 18551-18557
78. Ge C., Xu B., Liang B., Lönnblom E., Landström S. L., Zubarev R. A., Ayoglu B., Nilsson P., Skogh T., Kastbom A., Malström V., Klareskog L., Toes R.E. M., Rispen T., Dobritzsch D. and Holmdahl R., (2019) Structural basis of cross-reactivity of anti-citrullinated protein antibodies, *American College of Rheumatology*, 71(2), 210-221
79. Ghassemi O. H., Loennies S. M., Brooks C. L., MacKenzie R., Caveney N., Petegem F. V., Brade L., Kosma P., Brade H. and Evans S. V., (2019) Subtle change in the combining site of the chlamydiaeae specific mAb S25-23 increase the antibody - Carbohydrate binding affinity by an order of magnitude, *Biochemistry*, 58, 714-726
80. 抗体ガイドブック, Sigma-Aldrich
81. Gale Rhodes, (2018) Crystallography made crystal clear - third edition, ACADEMIC PRESS
82. 平山 令明, (1996) 生命科学のための結晶解析入門, 丸善株式会社
83. Lesk A. M. and Chothia C., (1988) Elbow motion in the immunoglobulins involves a molecular ball-and-socket joint, *Nature*, 335(8), 188-190

84. Murphy K., Travers P. and Walport M., (2008) Janeway's Immunobiology - Seventh edition, Garland Science, (笹月 健彦 (監修), (2010) Janeway's 免疫生物学 原書第 7 版, 南江堂)
85. Skrabana R., Dvorsky R., Sevcik J., Novak M., (2010) Monoclonal antibody MN423 as a stable mold facilitates structure determination of disordered tau protein, *J. Struct. Biol.*, 171(1), 74-81
86. Narayana Bhat T., Bentley G. A., Boulot G., Greene M. I., Tello D., Dall W., Souchon H., Schwarz F. P., Mariuzza R. A., Poljak R. J., (1994) Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1089-1093
87. Sevcik J., Skrabana R., Dvorsky R., Csokov N., Iqbal K. and Novak M., (2007) X-ray structure of the PHF core C-terminus: Insight into the folding of the intrinsically disordered protein tau in Alzheimer's disease, *FEBS letters*, 581, 5872-5878
88. 佐藤 能雅, (1999) 抗体 Fab と Fv の三次元構造と分子認識, *RADIOISOTOPES*, 48, 421-428
89. Stanfield R. L., Fieser T. M., Lerner R. A., Wilson I. A., (1990) Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å, *Science*, 248, 712-719.
90. Elsen J., Vandeputte-Rutten L., Kroon J., Gros P., (1999) Bactericidal antibody recognition of Meningococcal PorA by induced fit, *J. Biol. Chem.*, 274(3), 1495-1501.
91. Stanfield R. L., Zemla A., Wilson I. A., Rupp B., (2006) Antibody elbow angles are influenced by their light chain class, *J. Mol. Biol.*, 357, 1566-1574
92. Ladbury J. E., (1996) Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design, *Chemistry & Biology*, 3, 973-980
93. Sogawa K., Okuda R., In Y., Ishida T., Taniguchi T., Minoura K., and Tomoo K., (2012) C-H... π interplay between Ile308 and Tyr310 residues in the third repeat of microtubule binding domain is indispensable for self-assembly of three- and four-repeat tau, *J. Biochem.*, 152(3), 221-229
94. Sogawa K., Minoura K., In Y., Ishida T., Taniguchi T., and Tomoo K., (2014) CH- π Interaction in VQIVYK Sequence Elucidated by NMR Spectroscopy is Essential for PHF Formation of Tau, *Peptide Science*, 102(3), 288-295
95. Lee J. E., Kuehne A., Abelson D. M., Fusco M. L., Hart M. K., and Saphire E. O., (2008) Complex of a protective antibody with its Ebola virus GP peptide epitope: unusual features of a V λ x light chain. *J. Mol. Biol.*, 375, 202-216
96. Li P., Huey-Tubman K. E., Gao T., Li X., West A. P., Bennett M. J., and Bjorkman P. J., (2007) The structure of a poly Q-anti-poly Q complex reveals binding according to a linear lattice model. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14, 1-7

97. Schmidt A. G., Xu H., Khan A. R., O'Donnell T., Khurana S., King L. R., Manischewitz J., Golding H., Suphaphiphat P., Carfi A., Settembre E. C., Dormitzer P. R., Kepler T. B., Zhang R., Moody M. A., Haynes B. F., Liao H. -X., Shaw D. E., and Harrison S. C., (2012) Preconfiguration of the antigen-binding site during affinity maturation of a broadly neutralizing influenza virus antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(1), 264-269
98. Kaever T., Matho M. H., Meng X., Crickard L., Schlossman A., Xiang Y., Crotty S., Peters B., and Zajonc D. M., (2016) Linear Epitopes in Vaccinia Virus A27 Are Targets of Protective Antibodies Induced by Vaccination against Smallpox, *J. Virol.*, 90, 4334-4345

論文目録

本論文の内容は、次の雑誌に公表した。

1. Tsuchida T., Susa K., Kibiki T., Tsuchiya T., Miyamoto K., In Y., Minoura K., Taniguchi T., Ishida T., and Tomoo K., (2020) Crystal structure of the human tau PHF core domain VQIINK complexes with the Fab domain of monoclonal antibody Tau2r3, *FEBS Letters*, 594(13), 2140-2149
2. Tsuchida T., Susa K., Kibiki T., Tsuchiya T., Miyamoto K., In Y., Minoura K., Taniguchi T., Ishida T., and Tomoo K., (2021) Structural study of the recognition mechanism of tau antibody Tau2r3 with the key sequence (VQIINK) in tau aggregation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 585, 36-41