

抗体を用いたアミロイド β 高感度検出法の開発

日大生産工(院) ○ ZHANG BOHAN Kazuaki Yoshimune

1 緒言

アルツハイマー型認知症(Alzheimer's disease, AD)は、認知機能の低下やシナプス障害を特徴とする進行性の神経変性疾患である。その主な病理学的特徴の一つが、アミロイド β (A β) ペプチドの異常凝集による神経毒性である。特に可溶性オリゴマーは、最も神経毒性が高い形態とされ、疾患の初期段階から有害な影響を及ぼすことが知られている。A β は時間の経過とともに自己集合し、不溶性の線維を形成して、脳内に老人斑として沈着するようになる [?].

診断目的では、髄液中の A β 測定が広く行われているが、髄液検査は侵襲が高く患者の負担が大きい。その代替手段として、近年では血液中のバイオマーカー探索が注目されている。しかし、血中 A β は極めて低濃度で存在し、他のタンパク質との非特異的結合や構造多様性の影響により、検出が困難であるという課題が残されている [2].

A β は凝集過程において、モノマー、オリゴマー、プロトフィブリル、線維状へと構造変化を遂げて、単一の静的構造として存在するわけではない。中でもオリゴマーやプロトフィブリルの中間体は、構造的に不安定かつ動的であり、エピトープの露出が一過性であることから、従来の抗体では十分に認識できず、特に低濃度条件下では診断感度の低下につながることが報告されている [3].

このような背景を踏まえ、我々は初期中間体の再現性と凝集制御を目的に、アミノ酸 25 位と 26 位を人工的にアシル化結合させた iso-A β ₁₋₄₂ ペプチドを活用した解析系を用いた。iso 体は非凝集状態でも構造的に安定であり、長期保存が可能という利点を持つが、生理条件下で O-N アシル転移によりアシル結合を解除することで、*in situ* で凝集を開始させることができる [4]. これにより、実験間での凝集開始点の標準化が可能となり、中間体の形成過程を高い再現性で観察することが可能となった。

さらに本研究室では、この iso-A β を用いた実験系において、アモルファス凝集体に特異的に反応する構造特異的モノクローナル抗体群を開発してきた。これらの抗体は、モノマーや線維構造にはほとんど結合せず、凝集過程における中間状態で一過的に現

れる柔軟な構造エピトープに対して高い親和性を示すのが特徴である。中でも抗体 78-6 は、プロトフィブリル様構造に強い選択性を示し、モノマーや線維にはほとんど反応しないことが明らかとなっている [5, 6].

Figure1 に示すように、モノマー状態 (PDB: 1IYT) では、N 末端は α ヘリックス構造内に埋もれており、抗体による認識は困難である。これに対して、プロトフィブリル (PDB: 6RHY) では、N 末端は無秩序構造をとり、溶媒に対して大きく露出している。その結果、当研究室で開発した構造特異的抗体 (例: 78-6) はこの状態の A β に対して高い親和性を示す。一方で、線維状凝集体 (PDB: 2RNM) では N 末端は依然として無秩序構造であると予測されるが、密なパッキング構造によりアクセス性が低下し、抗体による認識は制限される。したがって、N 末端が自由に露出しているプロトフィブリルこそが、構造特異的抗体による高感度検出の鍵となる構造状態であると考えられる (Figure 1)。

A β の構造や凝集性は、特に両親媒性小分子との相互作用など、周囲の物理化学的環境の影響を強く受けることが知られている。ポリ不飽和脂肪酸 (PUFAs)、アデノシン三リン酸 (ATP)、ラウリン酸 (C12:0) などは、A β と非共有結合的に会合し、凝集経路を変化させる。これにより、中間体の安定化、線維化の抑制、あるいはアモルファス凝集体の形成が誘導され、抗原エピトープの露出状態も変化する [7, 8, 9].

本研究では、非イオン性界面活性剤が A β の構造状態および抗体認識性に与える影響を評価した。これらの界面活性剤は共通して親水性のポリオキシエチレン基を有するが、疎水性の脂肪酸鎖の長さや飽和度が異なるため、疎水鎖の違いによる A β の構造変化を評価するモデル系として適している。

非イオン性界面活性剤によって A β の構造動態を濃度依存的に制御可能であり、プロトフィブリルを誘導し、構造特異的抗体 78-6 を用いた免疫検出感度の向上に貢献する可能性が示された。本戦略は、A β を標的とする高感度診断法の新たなプラットフォームとなるだけでなく、構造標的型の治療設計にも応用可能な有望なアプローチである。

Development of a High-Sensitivity Detection Method for Amyloid- β Using Conformation-Specific Antibodies

Bohan ZHANG, Kazuaki YOSHIMUNE

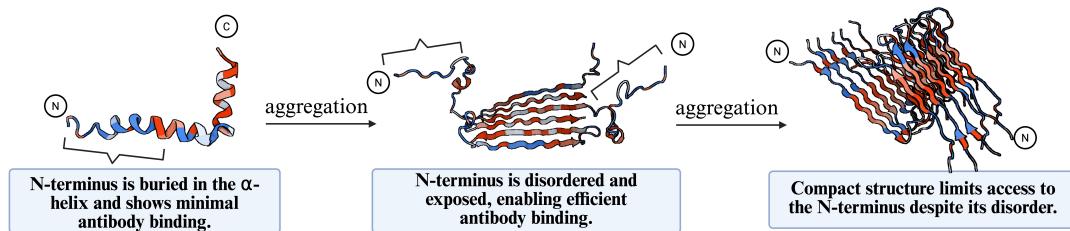


Figure 1 N末端構造の露出と抗体認識性の違い 左：モノマー（PDB: 1IYT）ではN末端が折りたたまれており、抗体が結合しにくい。中央：プロトフィブリル（テトラマー）（PDB: 6RHY）ではN末端が露出し、抗体との結合が促進される。右：線維状（PDB: 2RNM）ではN末端が遮蔽され、認識されにくい。

2 実験方法

直接酵素結合免疫吸着測定法は、以前報告された方法[5]に従い実施した。市販の標識キット（Dojindo, LK11）を用いて調製したホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体を用いた。iso-A β ₁₋₄₂（ペプチド研究所）をジメチルスルホキシドに溶解し、PBS（pH 7.4）で最終使用濃度 1.0 nM に希釈した[4]。

3 結果

非イオン性界面活性剤を添加した条件では、対照群と比較して抗体の結合特異性が顕著に上昇した。特に抗体 78-6 による反応性が高まり、界面活性剤が A β 中のエピトープ構造の誘導、安定化に寄与している可能性が示唆された。また、A β ₁₋₁₆ および A β ₂₅₋₃₅ を用いたエピトープを調べた結果から、抗体 78-6 は N 末端領域を主に認識していることが明らかとなった。

4 まとめ

本研究では、非イオン性界面活性剤の存在下における A β の構造変化および、それに伴う構造特異的抗体の認識性の変化を評価した。その結果、界面活性剤の添加により抗体 78-6 の結合特異性が顕著に向上升し、A β 中に一時的に形成される中間体様コンフォメーションが安定化することが示唆された。特に、プロトフィブリル（PDB: 6RHY）では N 末端が溶媒に露出しており、抗体 78-6 による高親和性な認識が可能となる構造状態であると考えられる。これらの結果は、界面活性剤の存在がプロトフィブリルの誘導を通じてエピトープの暴露を促進し、構造特異的抗体の認識性および免疫検出感度の向上に寄与することを示している。

参考文献

- [1] G.B.D.D.F. Collaborators *et al.* Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050. *Lancet Public Health* **7** (2022), e105–e125.
- [2] A. Nakamura *et al.* High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* **554** (2018), pp. 249–254.
- [3] S. A. Gargari and A. Barzegar. Simulations on the dual effects of flavonoids as suppressors of Abeta42 fibrillogenesis and destabilizers of mature fibrils. *Scientific Reports* **10** (2020), p. 16636.
- [4] Y. Sohma *et al.* Design and synthesis of a novel water-soluble A β ₁₋₄₂ isopeptide. *Tetrahedron Letters* **45** (2004), pp. 5965–5968.
- [5] T. Shimizu *et al.* Combination of specific monoclonal antibodies allow identification of soluble aggregates of A β by sandwich ELISA. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **4** (2013), pp. 63–66.
- [6] A. Hatami *et al.* Monoclonal antibodies against Abeta42 fibrils distinguish multiple aggregation state polymorphisms. *Journal of Biological Chemistry* **289** (2014), pp. 32131–32143.
- [7] A. Abelein *et al.* Formation of dynamic soluble surfactant-induced amyloid beta peptide aggregation intermediates. *Journal of Biological Chemistry* **288** (2013), pp. 23518–23528.
- [8] M. Kuramochi *et al.* Adenosine triphosphate induces amorphous aggregation of amyloid beta. *Scientific Reports* **14** (2024), p. 8134.
- [9] J. Pallbo, U. Olsson, and E. Sparr. Strong inhibition of peptide amyloid formation by a fatty acid. *Biophysical Journal* **120** (2021), pp. 4536–4546.