

カイコ無細胞タンパク質合成系によるアミロイド β の生産

日大生産工(院) ○伊藤瑞斗、沖縄工業高等専門学校 伊東昌章、日大生産工(院) 吉宗一晃

1. 緒論

高齢者(65歳以上)人口の割合が現在世界一位の日本では、高齢者を支える若い世代の負担は徐々に大きくなっている。したがって、高齢者の健康を維持することが若い世代の負担軽減になり、社会問題の一部解決につながる。日本での65歳以上の認知症割合は、2022年の資料では12.3%、その中でもアルツハイマー型認知症(Alzheimer's Disease; AD)の割合は、2019年の資料では、67.6%と過半数を占めているが、未だにADの完全な予防・治療薬は存在しない。そのためADの予防・治療薬の開発は急務である。

ADの初期過程は、アミロイド β 前駆体タンパク質(APP)の切断バランスの乱れにより、アミロイド β (A β)、特に42残基のA β ₄₂の产生と除去の不均衡が生じることに特徴づけられる。過剰に残存したA β は可溶性のオリゴマーへと凝集し、受容体ネットワークやシナプス可塑性を搅乱してシナプス機能低下を引き起す。凝集が進行すると線維化し、老人斑として細胞外に沈着する(Fig. 1)。

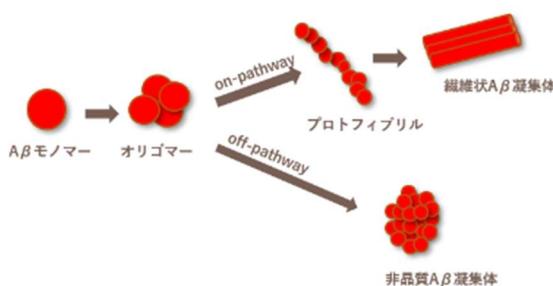


Fig. 1 A β の凝集過程

これら一連のA β の蓄積を起点とし、タウタンパク質を異常リン酸化し神経原線維変化(Neurofibrillary Tangles; NFT)を形成し神経細胞死を引き起こす一連の流れをアミロイドカスケード仮説という。以上より、A β は病態の早期段階に深く関与していることがわかる。

現在までにAD治療薬は多数研究及び開発されている。その中でもA β の除去に着目している。この中で抗A β モノクローナル抗体医薬は、抗原を標的にして体内の免疫機構で除去させ

る医薬である。A β オリゴマー、プロトフィブリル、凝集体に結合する抗体を設計したアデュカヌマブ¹⁾は臨床試験で有効性を議論の末、証明したが、高額な上、他のAD治療薬に経営資源を再分配するため、販売終了した。その後、同会社がレカネマブを発表した。レカネマブはオリゴマーとプロトフィブリルを認識し、特にプロトフィブリルを優先的に認識する²⁾。そのためアデュカヌマブより選択性が強く、臨床症状の出現前後に関与している可溶性のA β プロトフィブリルを狙う点が異なる。次に、ドマネマブは、老人斑内に多いN末端ピログルタミン化A β といった改変A β を直接狙う抗体³⁾となっている。これら医薬品の開発からも、A β の抗体についての研究はADの予防・治療に大きく貢献できることがわかる。本研究では、A β モノマーの凝集開始後に結合する10種類の抗体を用いて、抗体の評価を行った。

ADの抗体に関する研究には抗原であるA β モノマーが必要である。そのため、A β の抗体研究では、本研究では、O-acyl化したA β を用いている。このA β はA β ₁₋₄₂のアミノ酸25位のグリシンと26位のセリンの間にO-acyl isopeptide構造を持つA β ₁₋₄₂の水溶性前駆体ペプチドを言う。酸性条件でモノマー状態を保持し、中性pHでは、OからNへの分子内アシル移動により不可逆変化が起き、ランダムコイル構造を有するA β モノマーがその場で生産される。⁴⁾この溶液を保存する際、Dimethyl Sulfoxide(DMSO)という有機溶媒で保存されている。目的は高濃度保存ができ、溶解性を上げ、自己凝集を抑えることにある。しかし、有機溶媒であるDMSOは生体内に自然に存在していないため、本研究ではDMSOを必要としない実験系であるカイコ無細胞タンパク質合成系でA β を生産し、DMSOが存在しない実験系の構築を目的としている。

カイコ無細胞タンパク質合成系は、カイコ由来の細胞抽出液を用いて、生細胞を介さずに*in vitro*でタンパク質を翻訳させる系である。抽出液にはリボソーム、tRNA、翻訳因子、分子シャペロン、エネルギー再生系の補助因子、さらに小胞体由来の膜小胞が含まれており、これにア

ミノ酸、ATP・GTP、緩衝液、還元・酸化環境調整剤などを加え、プラスミドDNAやPCR産物を投入することで合成が進行する。

また、本研究ではTwin strep tag (TS) というtagを付与したA β も生産する。tagとは、目的タンパク質に短いアミノ酸配列を人工的に融合させるラベルのことを指す。今回用いるTSは小型で高特異性・高親和性の精製タグである。特異性が極めて高く、抗Strep抗体を使用したWestern blotなどの検出にも利用できる。現在、シルクルネットサンス社のカイコ無細胞タンパク質合成試薬キットを用い、TSの有無を条件として、同一系におけるA β の生産を比較した。

生産を確認する方法として、直接酵素結合免疫吸着測定法（直接ELISA）と、Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)を行った。直接ELISAの基本原理は、プレートに固定した抗原に、酵素標識済みの一次抗体を直接結合させて発色で測る方法である。抗体の非特異吸着を抑えるため、固定後にブロッキング剤で表面を埋める。洗浄で余分な抗体を除き、基質を加えて生じた発色させ、その吸光度を比較する。そのため吸光度が高ければA β と抗体の結合が高いと言える。SDS-PAGEの基本原理は、タンパク質を分子質量の違いで分ける方法である。SDSでタンパク質すべてにほぼ同じ比率のマイナス電荷を与える、Dithiothreitol (DTT) でタンパク質中のジスルフィド結合を切ることにより、直鎖状にする。直鎖状に変性したポリアクリルアミドゲルの中を電気で泳動させると、小さい分子ほど速く遠くへ進む。分離後はバンドを可視化し、標準マーカーと比べて分子質量を計算する。

2. 実験方法

高コピーかつAmpicillin (Amp) 耐性を有するpMAベクターにA β の遺伝子を挿入して作製したプラスミドを用いて、*Escherichia coli* TOP10を形質転換した。その時、プラスミドはTSを付与したものと、付与していないものに分けて実験を行った。形質転換した大腸菌を終濃度0.1 mg/mLのAmpを含む5 mLのLB液体培地が入った試験管に植菌し、37°C、約110 rpmで18時間振盪培養を行った。振盪培養を行った後、ISOSPIN Plasmidキットでプラスミドを抽出した。最後にプラスミドを溶出する際、RNaseの混入を防ぐため、Nuclease free waterを用いて溶出した。また、溶液は冷凍庫で保存した。

DNAの線状化を行うために、制限酵素 *Pvu*II 处理を行った。その後、1%アガロースゲルで制限酵素処理を確認した。確認後、ISOSPIN PCR ProductキットにてDNAを精製し、mRNAの合成を Promega 社 P1300, RiboMAX Large Scale RNA Production Systems T7キットを用いて作製した。転写後のmRNA反応液に等量の5 mM EDTAを加えた。次に、mRNAを用いてシルクルネットサンス社のカイコ無細胞タンパク質合成試薬キットを用いてA β タンパク質の翻訳を行った。A β タンパク質生産を確認するため、同時にネガティブコントロール試料の作製も行った。そのネガティブコントロール試料と、カイコ無細胞タンパク質合成系で生産した試料と、A β モノマー、10種類の抗体を用いて直接ELISAによる評価を行った。次に、反応性が高い抗体を用いてカイコ無細胞タンパク質合成系により生産した、TSを付与していない試料に対する抗体の結合を測定した。また、SDS-PAGEを用いて、目的タンパク質の生産を確認した。

3. 実験結果と考察

抗体10種類とTSを付与した試料を用いて直接ELISAを行った結果では、抗体78-6が最も高い吸光度を示した。そのため、TSを付与していない試料と抗体78-6を用いて直接ELISAを行ったところ、高い反応性を示したため、その生産を確認できた。

SDS-PAGEの結果では、TSを付与していない試料で、現状ネガティブコントロール試料とのバンドの差異は見られなかった。しかし、TSを付与した試料では、4500 Da 部分にバンドが見られ、A β タンパク質が確認できた。TSが付与していないものが生産されなかった原因として、A β の親水性残基がN末端側に偏在しているのに対し、C末端は疎水性のため、リボソームで作られたペプチドが凝集、変形し、上手く生産されなかったことが考えられる。しかし、TSを付与した方では、C末端側にTSの親水性タグが付与し、安定して生産ができたのだと考えた。

参考文献

- 1) Sevigny, J. *et al.*, *Nature*, **2016**, 537, 50-56.
- 2) Swanson, C. J. *et al.*, *Alzheimers. Res. Ther.*, **2021**, 13, 80.
- 3) Mintun, M. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **2021**, 384, 1691-1704.
- 4) Taniguchi, A. *et al.*, *ChemBioChem.*, **2009**, 10, 710-715.