

2023年8月31日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

## ハブ毒から得た酵素によりアミロイド $\beta$ を分解

～アルツハイマー病治療法開発への貢献に期待～

### 【発表のポイント】

- ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の粗毒から、金属イオンアフィニティ法<sup>(注1)</sup>を用いて蛇毒メタロプロテアーゼ (SVMPs)<sup>(注2)</sup>を精製しました。
- SVMPs は、アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ )<sup>(注3)</sup>を無害なペプチド断片へと分解し、ヒト培養細胞からの  $A\beta$  産生量を大幅に減少させることを発見しました。
- ハブが独自に進化させたアミロイド  $\beta$  分解プロテアーゼである SVMPs を用いたアルツハイマー病治療法<sup>(注4)</sup>の開発に結びつくことが期待されます。

### 【概要】

ハブが進化の過程で獲得した多様な毒成分の主要な成分は、蛇毒メタロプロテアーゼ (snake venom metalloproteinases, SVMPs) というタンパク質分解酵素です。SVMPs は、ヒトに存在する ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) ファミリータンパク質と共通の祖先に由来します。

東北大学大学院農学研究科の二井勇人准教授と小川智久教授のグループは、ADAMs がアルツハイマー病の原因となるアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の生成を抑制するプロテアーゼとして知られていることから、SVMPs の医療応用の可能性を探りました。

本研究グループは東北大学学際科学フロンティア研究所佐藤伸一助教、東京大学大学院薬学研究科富田泰輔教授との共同研究により、SVMPs がヒト細胞からの  $A\beta$  産生を大幅に減少させることを明らかにし、有毒な  $A\beta$  を短いペプチド (p3) に変換する切断部位を特定しました。さらに、試験管内で  $A\beta$  のアミロイド線維を生成させる実験から、SVMPs はアミロイド線維を分解しないものの、アミロイド線維の生成を抑制することも明らかにしました。今後の研究によって、 $A\beta$  分解プロテアーゼを用いた治療法の実用化に役立つことが期待されます。

本研究成果は、日本時間 2023 年 8 月 12 日に科学雑誌 *Toxins* に掲載されました。

## 【詳細な説明】

### 研究の背景

ヒトの ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリータンパク質は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) を分解して代謝するプロテアーゼです。ADAMs による分解は、APP からアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ;  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  など) ができる反応とは“競合”しており、アミロイドを生成しない“非アミロイド生成経路”です (図 1(c))。ADAMs による分解を促進する化合物などが、アルツハイマー病治療薬としての可能性が探られてきました。私達は、ハブ毒が持つ分泌性の毒タンパク質、蛇毒メタロプロテアーゼ (snake venom metalloproteinases, SVMPs) に着目しました。ADAMs と共通の祖先から進化したと考えられる SVMP は、ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) には 11 種類存在し、ハブの出血毒性を引き起こす成分も含まれます。粗毒から生成した SVMPs を解析し、 $A\beta$  の生成に与える影響を解析しました。

### 今回の取り組み

SVMPs の持つ金属イオン ( $Zn^{2+}$ ) を利用した金属アフィニティー法を用いて、粗毒から SVMPs を精製しました。液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) により、ハブのゲノムに存在する 11 種類の SVMP のうち 9 種類の SVMP を同定しました。この SVMPs のカクテル (混合物) を、 $A\beta$  を分泌する細胞の培養液に添加したところ、培地中の  $A\beta$  の量が大幅に減少 (無添加の約 10%) しました。一方、APP の分解断片 ( $APP_{C83}$  もしくは  $APP_{C99}$ , 図 1(c)) の量は変わりませんでした。

さらに、試験管内で SVMPs と合成  $A\beta$  ペプチドを混合したところ、SVMPs は  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  を直接切断することが明らかとなりました。LC-MS/MS を用いて切断される部位を特定したところ、ADAMs が APP を切断する部位 ( $\alpha$  切断部位) と同一の部位であることを同定し、 $A\beta$  の分解により無毒なペプチド p3 が生成していることが明らかとなりました。さらに試験管内でのアッセイを進め、 $A\beta$  ペプチドが凝集して“アミロイド構造”を取った  $A\beta$  線維をチオフラビン T (ThT) (注<sup>5</sup>) を用いて検出することで、SVMP が  $A\beta$  線維を切断できるかどうかを解析しました。SVMPs は Th T 陽性の  $A\beta$  線維を分解しませんでした。が、 $A\beta$  線維を生成させる反応中に添加することで、 $A\beta$  線維の量を大幅に低下させました。SVMPs は単量体  $A\beta$  を分解する一方、 $A\beta$  線維は分解しないという結果です。

ヒトの内在性の  $A\beta$  分解プロテアーゼは多く見つっていますが、別の生物から別種のプロテアーゼを発見した点で本研究は新しいものです。ヘビ毒の成分は長い進化の歴史によりアミノ酸配列を変化させています。ヒトのプロテアーゼは内在性のプロテアーゼ阻害剤 (注<sup>6</sup>) で抑制されることが多いですが、外来の SVMP はその阻害を受けずに作用すると考えられ、効率的に  $A\beta$  を除去でき

る可能性があります。今後は、本研究で可能性が示された 9 種類の SVMP について、 $A\beta$  分解活性とヒトへの毒性を詳しく解析し、さらにはマウスなど生体を用いた実験で効果を証明する必要があります。毒素から生理活性ペプチドを発見して新しい治療法の開発に役立つ研究として、 $A\beta$  分解プロテアーゼ、SVMPs を用いた新たな治療法の開発が期待されます。

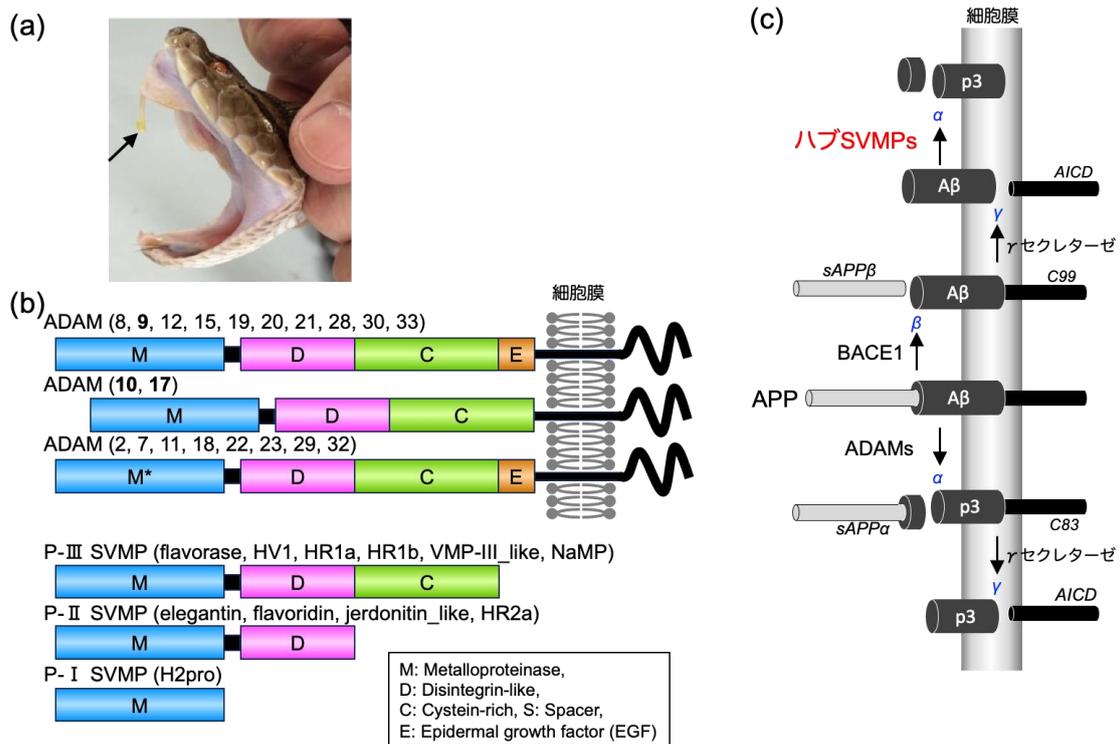


図 1.

- (a) 牙からたれるハブ (*P. flavoviridis*) の毒液 (Shibata *et al.*, *Sci. Rep.* 2018, 8, 11300.)。
- (b) ヒトの ADAMs ファミリータンパク質と、ハブ SVMPs のタンパク質構造の模式図。それぞれ、メタロプロテアーゼ (M), ディスインテグリン (D), シス테인リッチ (C), 上皮細胞成長因子 (E) のドメインから構成されます。ADAMs は、膜貫通領域を持つ膜タンパク質なのですが、SVMP は分泌される可溶性タンパク質という違いがあります。
- (c) アミロイド前駆体タンパク質 (APP) の分解経路と SVMP の作用点：APP は細胞体領域を切断する ADAMs や BACE1 と、切断後の断片をさらに切断する  $\gamma$  セクレターゼによって 2 段階に切断され、バラバラに分解されます。それぞれの切断部位は、歴史的に、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  部位と呼ばれます。最初のプロテアーゼの違いで、アミロイド  $A\beta$  を作り出すアミロイド生成経路と無害なペプチド  $p3$  を作り出す非アミロイド生成経路の二つの分解経路に分かれます。本研究では、ハブの SVMP が  $A\beta$  を  $\alpha$  部

位で分解することで、無毒な p3 ペプチドへ変換することが明らかになりました。((c,d)は、Futai et al., Toxins 2023, 15(8), 500.より改変。)

#### 【謝辞】

本研究は JSPS KAKENHI Grant Number JP22K06121, JP23H00394, JP22K19097 の助成を受けたものです。

#### 【用語説明】

注 1. 金属イオンアフィニティー法：タンパク質の精製に用いられる手法であり、金属イオンとタンパク質の相互作用を利用しています。本研究では、SVMPs の触媒中心にある金属イオンを利用して、SVMPs を金属アフィニティーゲルに捕捉させることで他の成分と分離しました。

注 2. 蛇毒メタロプロテアーゼ (SVMPs)：ヘビの毒液に含まれるタンパク質分解酵素で、メタロプロテアーゼ (金属プロテアーゼ) と呼ばれる酵素ファミリーに属します。特に、クサリヘビ科では、主要な毒成分であり、出血毒や炎症などを引き起こすことがあります。

注 3. アミロイド $\beta$ ：アルツハイマー病の原因となるタンパク質断片であり、アミロイド前駆体タンパク質が分解されるときに生じます。異常な折りたたみにより、本来の構造から変化してアミロイド構造となります。A $\beta$  は $\beta$ シート構造に変化して折り重なり、強固なアミロイド線維となって脳に沈着し、神経細胞の機能異常や細胞死を引き起こすと考えられています。

注 4. アルツハイマー病治療法：現在、日本でアルツハイマー病治療薬として承認されているのは、神経伝達の異常に働きかけるアセチルコリンエステラーゼ阻害剤と NMDA-受容体拮抗薬です。これらは認知症症状や行動異常の改善を目指す症状緩和薬です。根本的な治療を目指す薬剤として、抗 A $\beta$  抗体を用いた抗体薬 (アデュカヌマブ、レカネマブ) が米国で承認されていますが、有効性や副作用、高額な治療費についての議論が残っています。

注 5. チオフラビン T (ThT)：アミロイド線維の形成を検出するための蛍光プローブとして広く使用される分子です。アミロイド線維と結合すると分子蛍光が増加する性質を持っています。

注 6. プロテアーゼ阻害剤：タンパク質の分解を制御するための薬剤として、病気の治療や研究に広く利用されています。また、ヒトが持つ内在性のプロテアーゼ阻害剤とは、ヒトが体内で作り出すタンパク質で、体内でプロテアーゼの

活性を抑制する役割をしています。これにより、生体内で過剰なタンパク質分解が起こらないように防いでいます。

**【論文情報】**

タイトル : A metalloproteinase cocktail from the venom of *Protobothrops flavoviridis* cleaves amyloid beta peptides at the  $\alpha$ -cleavage site.

著者 : Eugene Futai<sup>1\*</sup>, Hajime Kawasaki<sup>1</sup>, Shinichi Sato<sup>2</sup>, Khadija Daoudi<sup>1</sup>, Masafumi Hidaka<sup>1</sup>, Taisuke Tomita<sup>3</sup>, and Tomohisa Ogawa<sup>1</sup>

\*責任著者 : 東北大学大学院農学研究科 准教授 二井 勇人

掲載誌 : Toxins

著者所属:

1 Laboratory of Enzymology, Graduate School of Agricultural Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8572, Japan

2 Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan

3 Laboratory of Neuropathology and Neuroscience, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

DOI : 10.3390/toxins15080500

Website: <https://www.mdpi.com/2072-6651/15/8/500>

**【問い合わせ先】**

(研究に関すること)

東北大学大学院農学研究科

准教授 二井 勇人

教授 小川 智久

TEL:022-757-4347

022-757-4341

Email: [eugene.futai.e1@tohoku.ac.jp](mailto:eugene.futai.e1@tohoku.ac.jp)

(報道に関すること)

東北大学大学院農学研究科

総務係

TEL: 022-757-4003

Email: [agr-syom@grp.tohoku.ac.jp](mailto:agr-syom@grp.tohoku.ac.jp)