

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化とヒトアミロイドーシス：加齢依存性発症の分子機構解明

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柳澤勝彦

平成 13 (2001) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

- 老化とヒトアミロイドーシス：加齢依存性発症の分子機構解明 ————— 1
柳澤勝彦

II. 分担研究報告書

1. β アミロイド線維形成に関する細胞生物学的研究 ————— 8
柳澤勝彦
2. 透析アミロイドーシスに関する病態生化学的研究 ————— 12
下条文武
3. アミロイド線維形成に関する試験管内反応速度論的研究 ————— 16
内木宏延

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 20

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 22

総括研究報告書

老化とヒトアミロイドーシス：加齢依存性発症の分子機構解明

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部部长

研究要旨 老化に関連したヒトのアミロイドーシス（アルツハイマー病、透析アミロイドーシス、全身性 AL アミロイドーシス）に共通する分子機構を明らかにすることを通じて、これらの発症メカニズムを解明することを目的に研究活動を展開した。アルツハイマー病に関しては、GM1 ガングリオシドによるアミロイドβ蛋白（Aβ）凝集促進の分子機構を詳細に解析した。また Aβの線維伸長過程における重合・脱重合の均衡を与える Aβ濃度を初めて明らかにした。透析アミロイドーシスおよび全身性アミロイドーシスに関しては、これらのアミロイド原性蛋白が凝集し、線維が伸長する過程に複数の生体分子が作用することを明らかにした。特に透析アミロイドーシスにおける場合のプロテオグリカンの役割を解析した。

分担研究者

下条文武	新潟大学医学部 内科学第二講座
内木宏延	福井医科大学 医学部病理学第二講座

A. 研究目的

我が国をはじめとした先進諸国においては急速に人口の高齢化が進み、様々な社会的課題が生じている。医学面では老年人口の増加に伴い高齢者特有の疾患に対する予防法ならびに治療法の確立が求められている。本研究は老化関連疾患の中からアミロイドーシス（アルツハイマー病、透析アミロイドーシスおよび全身性 AL アミロイドーシス）に焦点を当て、その発症機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

（柳澤）

(1) liposome 作製：人工的に脂質二重膜小胞 (liposome) を作製するにあたり、コレステロール (CH)、スフィンゴミエリン (SM)、フォスファチジルコリン (PC)、さらには GM1 ガングリオシド (GM1) を有機溶媒（クロロフォルム：メタノール）に溶解し、窒素ガス気流にて完全に乾燥させた後、トリス生食緩衝液 (tris-buffered saline : TBS) 内で、凍結・融解を反復後、超音波破碎機を用いて球状の liposome を作製した。

(2) Aβ凝集、アミロイド線維化の評価：Aβ凝集によるアミロイド線維化を定量的ならびに定性的に評価するにあたり、アミロイド構造を特異的に認識し、蛍光を発する薬剤である thioflavin T

(ThT) を用いた。同時に、インキュベート液を遠心して得られた沈澱物の電子顕微鏡学的観察を行い、形態学的に A β 線維の構造を観察した。

(下条)

(1) 試験管内アミロイド線維伸長に及ぼす GAG、PG の効果の解析：反応溶液は、A β 2M 線維 (10mg/ml)、ヒトリコンビナント β 2m (r- β 2m) (25mM)、50mM citrate-100mM NaCl (pH 2.5) を含み、さらに各種の GAG あるいは PG を添加した。37°C、2 時間および 24 時間インキュベート後の線維伸長を、チオフラビン T (ThT) 蛍光値を指標として比較した。尚、GAG としてはコンドロイチン硫酸 A、B 及び C、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリンの 7 種類を、PG としてはアグレカン、バイグリカン、デコリン、ヘパラン硫酸 PG、デルマタン硫酸 PG、ケラタン硫酸 PG の 6 種類を用いた。

(2) 試験管内アミロイド線維形成反応に及ぼす GAG、PG の効果の解析：反応溶液は、r- β 2m (50 mM)、50mM citrate-100mM NaCl (pH 2.5)、を含み、さらにアグレカン、バイグリカン、デコリン、あるいはヘパリンをそれぞれ添加した。37°C でインキュベート後の A β 2M 線維形成を、ThT 蛍光値、及び電子顕微鏡観察により評価した。この反応では β 2m から、自発的に核を形成させ、その核に β 2m が結合し伸長することで線維を形成させる。

(内木)

(1) アルツハイマー病 β アミロイドーシス：測定には表面プラズモン共鳴法 (SPR, BIACORE1000) を用いた。最初に A β ₁₋₄₀ 蛋白より pH7.5 で fA β を形成させ、これを重合核とし

てセンサーチップ上に固定化した。次いで、リン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解した各種濃度 (0-30 μ M) の A β ₁₋₄₀ 蛋白溶液を連続的に添加し、37°C における fA β の伸長及び脱重合過程をリアルタイムで測定した。

(2) AL アミロイドーシス：①アミロイド線維、及び AL 蛋白の精製：AL アミロイド線維は、全身性 AL アミロイドーシスの病理解剖 4 症例 (いずれも入型) ならびに生体肝移植 1 症例 (κ 型) より得られた諸臓器から Pras 法で粗抽出後、10⁵ ×g 超遠心、及び 50-60%不連続シヨ糖密度勾配超遠心により精製した。単体 AL 蛋白は、精製線維の一部を 6M 尿素で可溶化し、ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephacryl S200) で分子量別に分画した。また、中性 pH 域でも十分な線維伸長を認めた症例 2、7 については、HPLC による高純度 AL 蛋白精製を行った。精製線維の一部を 8M グアニジン塩酸で可溶化し、6M 尿素への脱塩置換後、陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、Hitrap SP カラム素通り画分をゲルろ過クロマトグラフィー (Superose 12) で分子量別に分画した。得られた各画分に対し、還元条件で Tricine-SDS-PAGE、及びウエスタンブロッティングを行い、抗 κ 、抗 λ 、抗 apoE、及び抗 SAP の各抗体を用いて検出した。

②アミロイド線維形成の反応速度論的解析：精製 AL 蛋白画分を、単独で、あるいは超音波により断片化した精製 AL アミロイド線維と共に 37°C で反応させ、アミロイド線維形成・伸長を、電顕観察、及び ThT 法によりモニターした。また、伸長反応の至適 pH、及び伸長初速度に及ぼすアミロイド線維の数濃度、あるいは AL 蛋白濃度の影響の検討も行った。

③線維伸長反応に及ぼす各種生体分子ならびに

有機化合物の影響解析: 中性 pH 域でも十分な線維伸長を認めた症例 2、7 の pH7.5 における伸長反応溶液に、種々のアミロイド共存物質 (apoE、SAP、fibronectin、 α_2 -macroglobulin、 α_1 -antichymotrypsin、aprotinin、decorin、heparan sulfate、及び dermatan sulfate)、血清蛋白 (α_1 -microglobulin)、及び有機化合物 (nordihydroguaiaretic acid (NDGA)、rifampicin、dexamethasone、doxorubicin、及び高濃度の DMSO) を加え、反応開始 6 ならびに 24 時間後の電顕像、及び ThT 蛍光量を評価した。

C. 研究結果

(柳澤)

(1) 脂質組成の異なる、SM/CH/GM1、SM/CH、PC の 3 種の liposome を用いて検討したところ、SM/CH/GM1 liposome においてのみ A β 溶液とのインキュベーションによって著しい ThT 活性の上昇を認めた。一方、GM1 ガングリオシドを含まない SM/CH liposome、PC liposome と A β とのインキュベーションによっては ThT の上昇は認められなかった。

(2) SM/CH/GM1 インキュベーション溶液を遠心し、得られた沈殿物を電子顕微鏡にて観察したところ、ヘリカル構造を示す、幅約 10nm の、典型的なアミロイド線維の形成を確認した。

(下条)

(1) 伸長過程に及ぼす GAG、PG の効果の解析: 7 種類の GAG および 6 種類の PG はいずれも、10 又は 30 μ g/ml 以上添加すると、線維伸長を濃度依存的に抑制した。

(2) 核形成過程に及ぼす GAG、PG の効果の解

析: β 2m 単独では 21 日間インキュベートしても、チオフラビン T 蛍光値が増加せず、電子顕微鏡でも線維が観察されなかった。これに対し、PG やヘパリンを添加した場合は、いずれも数日以内にチオフラビン T の蛍光が増加した。また、線維の増加速度は添加濃度依存的に増加した。さらに、電子顕微鏡により典型的なアミロイド線維像が観察された。

(3) 脱重合過程に及ぼす GAG、PG の効果の解析: β 2m だけから構成される線維は、pH7.5 の緩衝液中では脱重合するが、これに GAG、PG を添加した時の保護効果を検討した。ヘパリンは比較的強い脱重合抑制を、コンドロイチン硫酸 B、ヘパラン硫酸は、弱い脱重合抑制をいずれも濃度依存的に示した。また、6 種の PG は、いずれも脱重合抑制を示すが、バイグリカン、デコリン、ケラタン硫酸 PG が特に強い効果を示した。

(内木)

(1) アルツハイマー病 β アミロイドーシス: fA β 伸長反応の初速度は、添加した A β 蛋白の濃度に比例した。これは、開放反応系においても、fA β 伸長過程が上記一次反応速度論形式に従うことを示している。さらに、A β 蛋白を含まない緩衝液を添加すると、fA β が脱重合することを示した。次いで、重合速度と脱重合速度が均衡する濃度 (臨界モノマー濃度) を直接測定したところ、約 0.2 μ M であった。

(2) AL アミロイドーシス: ①精製線維ならびに AL 蛋白の解析: 上記精製法により、いずれの症例においても幅約 10nm の典型的アミロイド線維を得た。SDS-PAGE、及びウエスタンブロッティングの結果、5 種類のアミロイド線維のいずれも、ほぼ完全な λ/κ 鎖、及びそれが限定分解さ

れて出来たサイズの異なる数種の AL 蛋白から構成されていた。HPLC 精製蛋白は、上記の限定分解されて出来た数種の AL 蛋白の一部から構成されていた。ウェスタンブロットティングの結果、Sephacryl ゲルろ過クロマトグラフィー精製 AL 蛋白溶液に共存していた apoE は、HPLC 精製によりほぼ除去出来た。②線維伸長の反応速度論的解析：(i) 電顕観察により、伸長反応の至適 pH において断片化アミロイド線維の明らかな伸長を確認した。(ii) 線維伸長の至適 pH は、症例 2、3、6、及び 14 で、それぞれ pH2.5、3.5、2.0、2.5 と著しい酸性域にあったが、症例 7 では pH7.5 と中性域にあった。また症例 2 は、中性 pH 域において ThT 法により明らかな線維伸長を認めた。さらに電顕観察により、全ての症例で中性 pH 域における線維伸長を確認出来た。(iii) 反応速度論的解析は、いずれの症例も低分子量画分を用い至適 pH で行った。症例 2 は pH7.5 でも行った。いずれも反応開始後蛍光はラグタイム無く増加し、やがて平衡に達した。個々の症例により平衡に達するまでの時間は異なった。伸長速度は、アミロイド線維の重合速度と脱重合速度の和で表され、重合速度はアミロイド線維の数濃度、及び AL 蛋白濃度に比例して増加する事を確認した。③線維伸長反応に及ぼす各種生体分子の影響：(i) 伸長反応は症例 2、7 の HPLC 精製 AL 蛋白を用い、pH7.5 で行った。(ii) いずれの症例においても、上記生体分子の内 apoE、及び α_1 -microglobulin が 0~5 μ M の範囲で、fibronectin が 0~100 μ g/ml の範囲で濃度依存性に線維伸長を阻害した。(iii) いずれの症例においても、dermatan sulfate が、0~100 μ g/ml の範囲で濃度依存性に線維伸長を促進した。④線維伸長反応に及ぼす各種有機化合物の影響：(i) 伸長反応は症

例 2、7 の Sephacryl ゲルろ過クロマトグラフィー精製 AL 蛋白を用い、pH7.5 で行った。(ii) 上記有機化合物の内 NDGA が、0~100 μ M の範囲で濃度依存性に線維伸長を阻害した。

D. 考察

本研究班による 2 年間の成果によって、アミロイドーシスにはそれらの個々のアミロイド原性蛋白の種類によらない共通した分子機構が存在することが明らかになってきた。即ち、アミロイド原性蛋白が生体内で凝集を開始し、線維が伸長する際には、アミロイド原性蛋白以外の生体分子が、アミロイドの成長に対して促進的ないしは抑制的に働いていることが明らかになった。特に、それらの「アミロイド形成調節分子」のなかで、GM1 ガングリオシドおよびプロテオグリカンの役割については多くの情報が集積してきた。また、生体内で長い時間のなかで成立するアミロイドーシスの病態を試験管内で定量的ならびに速度論的に解析する実験系が構築されたことも大きな成果であると考えられる。これまでの本研究班の成果からは、いずれのヒトのアミロイドーシスの場合においても、アミロイド原性蛋白の線維化の過程は、一次反応速度論形式に従っていることが明らかにされ、アミロイドーシスという複雑な成立過程が想定される病態を、単純化して議論することが可能であることが示唆された。これらの基礎的研究成果は将来の薬剤開発に有用な情報を提供し得るものとして期待される。

E. 結論

GM1 ガングリオシドによるアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) 凝集促進の分子機構を詳細に解析した。また $A\beta$ の線維伸長過程における重合・脱重合の

均衡を与える A β 濃度を明らかにした。透析アミロイドーシスおよび全身性アミロイドーシスに関しては、これらのアミロイド原性蛋白が凝集し、線維が伸長する過程にプロテオグリカン等の生体分子が作用することを明らかにした。

F.健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.

3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organellae in cultured rat astrocytes. J Neurochem (in press)

Sawamura N, Gong J-S, Garver W S, Heidenreich R A, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K and Michikawa M. Site-specific phosphorylation of tau by mitogenactivated protein kinase in brains of Niemann-Pick type C mice. J Biol Chem (in press)

Fan Q-W, Yu-W, Senda T, Yanagisawa K, and Michikawa M. Cholesterol-dependent microtubule stabiliation by modulating tau phosphorylation. J Neurochem 76:391-400,2001

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama Y, Komano H and Yanagisawa K.

Intracellular site of γ -secretase cleavage for A β 42 generation in Neuro 2a(N2a) cells harboring *presenilin 1* mutation. Eur J Biochem 267:2036-2045,2000

Fukuyama R, Mizuno T, Mizuno T, Mori S, Nakajima K, Fushiki S and Yanagisawa K. Age-dependent change in the levele of A β 40 and A β 42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of A β 42 to A β 40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. Eur Neurol 43:155-160,2000

Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Yanagisawa K, Nakajima K and Fushiki S. Age-dependent decline in the apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid from control subject, and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease.

Eur Neurol 43:161-169,2000

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C and Yanagisawa K.

Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains. Biochim Biophys Acta 1483:81-90,2000

Michikawa M, Fan Q-W, Isobe I and Yanagisawa K. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. J Neurochem 74:1008-1016,2000

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. A possible model of senile plaques using synthetic amyloid β -protein and rat glial culture. Exp Neurol 162:51-60,2000

Gejyo F.
 β 2-Microglobulin amyloid. Amyloid 7:17-18, 2000.

Yamaguchi I, Hasegawa K, Naiki H, Mitsu T, Matuo Y and Gejyo F.

Extension of A β 2M amyloid fibrils with recombinant human β 2-microglobulin. Amyloid (in press)

下条文武: アミロイドーシスの対策. 腎と透析 49:738-740,2000

下条文武、丸山弘樹、風間順一郎: アミロイド骨関節障害の病態と対策 日本透析医学会雑誌 33:329-330,2000

下条文武、高橋直生: 透析アミロイドーシス. 日本内科学会雑誌 39:96-102,2000

下条文武: 血液透析治療に伴うアミロイド症の病態解明と治療対策. 新潟医学会雑誌 114:264-269,2000

恵以盛、下条文武:アミロイド骨症の予防と治療透析骨病変— 新しい考え方(東京メディカルセンター、255-263,2000

丸山弘樹、下条文武: 透析アミロイドーシス. EBM 血液浄化療法 (金芳堂、京都):326-333,2000

丸山弘樹、樋口昇、下条文武: 透析アミロイドーシスによる関節症の治療. Annual Review 腎臓 240-246,2000

橋本義一、内木宏延、吉田治義、下条文武: 実験的アミロイド線維伸長とAGE化 β 2-m. 腎と骨代謝 14:31-36,2001

2.学会発表

柳澤勝彦 分子レベルからみた危険因子
第41回 日本神経学会総会シンポジウム アルツハイマー病研究の進歩 5月24-26日 松本

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠
合成 amyloid β 蛋白及び培養グリア細胞を用いた老人斑モデルの作成 第41回 日本神経学会総会 5月24-26日 松本

柳澤勝彦 神経細胞のコレステロール代謝からみたアルツハイマー病成立機構
第23回 日本神経科学会 9月4-6日 横浜

柳澤勝彦 アルツハイマー病の基礎的観点からみた最新の論点
第19回 日本痴呆学会 サテライトシンポジウム 9月28-29日 木更津

柳澤勝彦
Molecular antichaperone for A β aggregation
COE 国際シンポジウム「Alzheimer 病研究最新情報」 9月30日 木更津

道川 誠、キョウ 建生、范 企文、柳澤勝彦
Amyloid β -protein のコレステロール代謝に対する影響 -amyloid cascade に関するコレステロールの役割との関連- 第19回 日本痴呆学会 9月28-29日 木更津

柳澤勝彦
アミロイド β 蛋白凝集開始機構における GM1 ガングリオシドの役割
第73回 日本生化学大会 シンポジウム「神経機能発現における糖鎖の役割」 10月11-14日 横浜

川村勇樹、菊池 章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人
Wnt シグナル伝達系におけるプレセニン1の役割
第73回 日本生化学大会 10月11-14日 横浜

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)によるラットアストロサイトにおける Akt リン酸化の亢進とエンドゾームの形態変化
第73回 日本生化学大会 10月11-14日 横浜

キョウ建生、澤村直哉、范 企文、柳澤勝彦、道川 誠 凝集した Amyloid β -protein は神経細胞におけるコレステロール代謝に大きな影響を及ぼす 第43回 日本神経化学会 10月18-20日 金沢

道川 誠、Qi-Wen Fan、澤村直哉、Wei Yu、

千田隆夫、柳澤勝彦 細胞内コレステロール量依存的タウ蛋白リン酸化調節の検討
第43回 日本神経化学会 10月18-20日 金沢

澤村直哉、キョウ建生、W. Garver, R. Heidenreich、二宮治明、大野耕策、柳澤勝彦、道川 誠
ニーマンピック病 C 型マウスにおけるタウ蛋白のリン酸化の検討 第43回 日本神経化学会 10月18-20日 金沢

川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人
Wnt シグナル伝達系における変異プレセニン1の抑制作用
第43回 日本神経化学会 10月18-20日 金沢

Fan Q-W, Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation and microtubule stabilization in cultured neurons. 30th Society for Neuroscience Annual Meeting, November, 2000, New Orleans, USA.

下条文武
 β 2-microglobulin と透析アミロイドーシス. 第47回臨床病理学会総会シンポジウム 11月2-3日 郡山市

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、上田孝典、下条文武、内木宏延
試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索
厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成12年度研究報告会 2月1-2日 東京

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、下条文武、内木宏延
 β 2-ミクログロブリン関連アミロイドーシスにおけるグリコサミノグリカン及びプロテオグリカンの影響
厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成12年度研究報告会 2月1-2日 東京

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、内木宏延
 β 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維 (fA β 2M) の中性 pH 反応液における脱重合反応とアポリポ蛋白 E (ApoE) の fA β 2M 安定化作用
第89回日本病理学会総会 4月11-13日 大阪

内木宏延
アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析—透析アミロイドーシスを中心として—
第45回日本透析医学会学術集会・総会 シンポジウム 透析アミロイドーシス 6月16-18日

福岡

内木宏延、小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁
アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成及び分解機構の解明
文部省特定領域研究 C「先端脳」平成 12 年度班
会議 12 月 22-23 日 東京

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、上田孝典、下
条文武、内木宏延
試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度
論モデルの開発、および生理的重合阻害分子なら
びに非ペプチド性重合阻害剤の探索
厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシス
に関する研究班平成 12 年度研究報告会 2 月 1-
2 日 東京

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、下条文武、内
木宏延
 β 2-ミクログロブリン関連アミロイドーシスにお
けるグリコサミノグリカン及びプロテオグリカ
ンの影響
厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシス
に関する研究班平成 12 年度研究報告会 2 月 1-
2 日 東京

小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁、内木宏延
開放反応系を用いたアルツハイマー病 β アミロイ
ド線維形成及び分解機構の解明
厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシス
に関する研究班平成 12 年度研究報告会 2 月 1-
2 日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

βアミロイド線維形成に関する細胞生物学的研究

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部部長

研究要旨 アルツハイマー病（AD）におけるアミロイドβ蛋白（Aβ）の脳内沈着機構を解明することを目的に、可溶性 Aβの凝集を促進する特異な分子（seeding Aβ）の形成に焦点をあて検討した。Seeding Aβとしては本主任研究者らが、初期 AD 脳において見出した GM1 ガングリオシド結合型 Aβ（GM1-Aβ）を対象とし、人工的に作製した liposome 上での GM1-Aβ形成を定量的に解析する実験系を確立し、その Aβ凝集における役割を脂質組成の異なる種々の liposome との比較により検討した。その結果、seeding 作用は GM1 と Aβとの結合によって特異的に誘導されることが確認された。

A. 研究目的

AD の病態を理解するにあたって最も重要な研究課題の一つは、Aβがどのような分子機構によって脳内で凝集するかを解明することである。本主任研究者らは、AD 脳内における Aβ凝集、蓄積の分子機構を解明することを目的に検討した結果、細胞膜を構成する糖脂質分子である GM1 ガングリオシドと結合した Aβ（GM1-Aβ）を見出した。本研究は GM1-Aβの形成機構ならびにその seeding 作用獲得過程を分子レベルで解明することを目的とする。

B. 研究方法

(1) liposome 作製

人工的に脂質二重膜小胞（liposome）を作製するにあたり、コレステロール（CH）、スフィンゴミエリン（SM）、フォスファチジルコリン（PC）、さらには GM1 ガングリオシド（GM1）を有機溶

媒（クロロフォルム：メタノール）に溶解し、窒素ガス気流にて完全に乾燥させた後、トリス生食緩衝液（tris-buffered saline：TBS）内で、凍結・融解を反復後、超音波破碎機を用いて球状の liposome を作製した。

(2) Aβ凝集、アミロイド線維化の評価

Aβ凝集によるアミロイド線維化を定量的ならびに定性的に評価するにあたり、アミロイド構造を特異的に認識し、蛍光を発する薬剤である thioflavin T（ThT）を用いた。同時に、インキュベート液を遠心して得られた沈澱物の電子顕微鏡学的観察を行い、形態学的に Aβ線維の構造を観察した。

C. 研究結果

(1) 脂質組成の異なる、SM/CH/GM1、SM/CH、PCの3種の liposome を用いて検討したところ、SM/CH/GM1 liposome においてのみ Aβ溶液と

のインキュベーションによって著しい ThT 活性の上昇を認めた。一方、GM1 ガングリオシドを含まない SM/CH liposome、PC liposome と A β とのインキュベーションによっては ThT の上昇は認められなかった。

(2) SM/CH/GM1 インキュベーション溶液を遠心し、得られた沈殿物を電子顕微鏡にて観察したところ、ヘリカル構造を示す、幅約 10nm の、典型的なアミロイド線維の形成を確認した。

D. 考察

AD 脳内における A β 凝集の分子機構は依然不明であるが、その解明は AD 治療薬開発や、分子診断法開発等にとって重要である。細胞外 A β 濃度の上昇に A β 異常凝集の原因を求める研究者も少なくないが、試験管内での A β 凝集に要するペプチド濃度は、脳脊髄液や培養上清等の生物学的試料中の濃度の凡そ 10 万倍高いことから、AD 脳内においては可溶性 A β の凝集を促進させる病的な要因が存在すると考えられる。本主任研究者らは、これまで可溶性 A β の凝集を促進させる A β 分子 (seeding A β) を 2 種報告した。そのうちの一つである GM1-A β については、すでに国内外の研究者により、A β と GM1 との分子間結合、及びその結果としての A β の構造変化の詳細が報告されている。また GM1-A β による可溶性 A β の凝集促進についての *in vitro* 実験もすでに報告されているが、GM1 以外からなる liposome との比較検討や、GM1-A β の存在下で形成される A β 凝集線維の詳細な構造解析はこれまで報告されていない。本研究により、GM1 は特異的に A β と結合し、seeding 作用を有する特異な seeding A β を形成すること、また、その結果形成される A β 凝集線維は典型的なアミロイド線維構造を示すことが確

認され、A β 凝集における GM1 の重要性があらためて示唆された。本研究はさらに、GM1-A β の形成及びその seeding 作用を定量的に解析する実験系をも提供したといえる。京都大学のグループによる最近の研究によると、GM1 と A β との結合は、GM1 が存在する膜 (host membrane) の脂質組成、とりわけコレステロール濃度により大きく影響されることが明らかにされている (Matsuzaki and Horikiri, *Biochemistry*, 1999; Kakiko et al., submitted)。一方、興味深いことに、シナプスを構成する脂質二重膜のうちの外膜中のコレステロール濃度が、脳の老化やアポリポ蛋白 E 欠損により上昇することが報告されている (Igbavboa et al., *J. Neurochem.*, 1996; Igbavboa et al., *J. Neurochem.* 1997)。今後、脳の老化やアポリポ蛋白 E 等の AD 発症危険因子と A β 凝集との関係を分子レベルで議論し、A β の異常凝集を抑止する薬剤開発を議論する上で、本研究は有用なモデルを提供するものと期待される。

E. 結論

人工的に作製した liposome を用いて、GM1-A β の seeding 作用を確認した。

F.健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* (in press)

Sawamura N, Gong J-S, Garver W S, Heidenreich R A, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K and Michikawa M. Site-specific phosphorylation of tau

by mitogenactivated protein kinase in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* (in press)

Fan Q-W, Yu-W, Senda T, Yanagisawa K, and Michikawa M. Cholesterol-dependent microtubule stabilisation by modulating tau phosphorylation. *J Neurochem* 76:391-400,2001

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama Y, Komano H and Yanagisawa K.

Intracellular site of γ -secretase cleavage for A β 42 generation in Neuro 2a(N2a) cells harboring *presenilin 1* mutation. *Eur J Biochem* 267:2036-2045,2000

Fukuyama R, Mizuno T, Mizuno T, Mori S, Nakajima K, Fushiki S and Yanagisawa K. Age-dependent change in the level of A β 40 and A β 42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of A β 42 to A β 40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. *Eur Neurol* 43:155-160,2000

Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Yanagisawa K, Nakajima K and Fushiki S. Age-dependent decline in the apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid from control subject, and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Eur Neurol* 43:161-169,2000

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C and Yanagisawa K.

Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains. *Biochim Biophys Acta* 1483:81-90,2000

Michikawa M, Fan Q-W, Isobe I and Yanagisawa K. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem* 74:1008-1016,2000

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. A possible model of senile plaques using synthetic amyloid β -protein and rat glial culture. *Exp Neurol* 162:51-60,2000

2.学会発表

柳澤勝彦 分子レベルからみた危険因子
第 41 回 日本神経学会総会シンポジウム アルツハイマー病研究の進歩 5月 24-26日 松本

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠
合成 amyloid β 蛋白及び培養グリア細胞を用いた老人斑モデルの作成 第 41 回 日本神経学会総

会 5月 24-26日 松本

柳澤勝彦 神経細胞のコレステロール代謝からみたアルツハイマー病成立機構
第 23 回 日本神経科学会 9月 4-6日 横浜

柳澤勝彦 アルツハイマー病の基礎的観点からみた最新の論点
第 19 回 日本痴呆学会 サテライトシンポジウム 9月 28-29日 木更津

柳澤勝彦
Molecular antichaperone for A β aggregation
COE 国際シンポジウム「Alzheimer 病研究最新情報」 9月 30日 木更津

道川 誠、キョウ 建生、范 企文、柳澤勝彦
Amyloid β -protein のコレステロール代謝に対する影響 -amyloid cascade に関するコレステロールの役割との関連- 第 19 回 日本痴呆学会 9月 28-29日 木更津

柳澤勝彦
アミロイド β 蛋白凝集開始機構における GM1 ガングリオシドの役割
第 73 回 日本生化学大会 シンポジウム「神経機能発現における糖鎖の役割」 10月 11-14日 横浜

川村勇樹、菊池 章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人
Wnt シグナル伝達系におけるプレセニン 1 の役割
第 73 回 日本生化学大会 10月 11-14日 横浜

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)によるラットアストロサイトにおける Akt リン酸化の亢進とエンドゾームの形態変化
第 73 回 日本生化学大会 10月 11-14日 横浜

キョウ建生、澤村直哉、范 企文、柳澤勝彦、道川 誠 凝集した Amyloid β -protein は神経細胞におけるコレステロール代謝に大きな影響を及ぼす 第 43 回 日本神経化学会 10月 18-20日 金沢

道川 誠、Qi-Wen Fan、澤村直哉、Wei Yu、千田隆夫、柳澤勝彦 細胞内コレステロール量依存的タウ蛋白リン酸化調節の検討
第 43 回 日本神経化学会 10月 18-20日 金沢

澤村直哉、キョウ建生、W. Garver, R. Heidenreich、二宮治明、大野耕策、柳澤勝彦、道川 誠
ニーマンピック病 C 型マウスにおけるタウ蛋白のリン酸化の検討 第 43 回 日本神経化学会

10月18-20日 金沢

川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、
芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人
Wnt シグナル伝達系における変異プレセニン
1の抑制作用
第43回 日本神経化学会 10月18-20日 金沢

Fan Q-W, Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa
M. Cholesterol-dependent modulation of tau
phosphorylation and microtubule stabilization in
cultured neurons. 30th Society for Neuroscience
Annual Meeting, November, 2000, New Orleans,
USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

透析アミロイドーシスに関する病態生化学的研究

分担研究者 下条文武 新潟大学内科第二講座 教授

研究要旨 昨年度に引き続き、透析アミロイドーシスにおける β 2-ミクログロブリンアミロイド線維形成・分解の機構を試験管内解析を用いて解析した。本年度は、透析アミロイドーシスの好発部位である、関節軟骨あるいは滑膜組織の重要な成分であるプロテオグリカンおよびグリコサミノグリカンが線維形成・分解に及ぼす効果を評価した。その結果、これに対し促進的に作用していることが示唆された。

A. 研究目的

本分担研究は、透析アミロイドーシスの発症および進展に関与する分子機構、特にアミロイド前駆蛋白の代謝環境の加齢変化の実体を、試験管内アミロイド線維形成反応系を駆使し明らかにすることを旨とするものである。

透析アミロイドーシスの好発部位である関節軟骨マトリクスには、主成分のタイプ 2 コラーゲンの他、各種のプロテオグリカン (PG) や、ヒアルロン酸および、プロテオグリカンの成分である各種のグリコサミノグリカン (GAG) が多量に存在している。PG や GAG が β 2-ミクログロブリン (β 2m) アミロイド線維 ($A\beta$ 2M 線維) 形成に関与し、透析アミロイドーシスの病態の進展に影響を及ぼしていると考えられる。

一方われわれは、試験管内アミロイド線維の形成反応を説明するモデルとして、重合核形成過程と線維伸長過程から構成される重合核依存性重合モデルを構築しており、 $A\beta$ 2M 線維に関

してもこのモデルに一致することを確認してきた。

重合核形成過程はアミロイド線維形成全体の律速段階であるが、 $A\beta$ 2M 線維の場合、非常に起こりにくく、試験管内実験系では確認されていなかった。また、線維の伸長過程は一次反応形式に従い速やかに進行する。伸長反応の速度は酸性環境下で最も早い。一方、 $A\beta$ 2M 線維は、pH7.5 では、伸長反応が進まないばかりか、線維が脱重合し、消失する。また、アミロイド共存物質である apoE により脱重合が抑制されることを昨年度報告した。また、昨年度は、加齢環境効果である advanced glycation end products 修飾現象が、アミロイド線維伸長に与える効果を明らかにした。

今年度は以上の結果を基にして、伸長過程、核形成過程及び脱重合過程の 3 過程の各々に対する、各種 GAG 及び PG の効果を検討した。

B. 研究方法

(1) 試験管内アミロイド線維伸長に及ぼす GAG、PG の効果の解析：反応溶液は、A β 2M 線維 (10mg/ml)、ヒトリコンビナント β 2m (r- β 2m) (25mM)、50mM citrate-100mM NaCl (pH 2.5) を含み、さらに各種の GAG あるいは PG を添加した。37°C、2 時間および 24 時間インキュベート後の線維伸長を、チオフラビン T (ThT) 蛍光値を指標として比較した。尚、GAG としてはコンドロイチン硫酸 A、B 及び C、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリンの 7 種類を、PG としてはアグレカン、パイグリカン、デコリン、ヘパラン硫酸 PG、デルマタン硫酸 PG、ケラタン硫酸 PG の 6 種類を用いた。

(2) 試験管内アミロイド線維形成反応に及ぼす GAG、PG の効果の解析：反応溶液は、r- β 2m (50 mM)、50mM citrate-100mM NaCl (pH 2.5)、を含み、さらにアグレカン、パイグリカン、デコリン、あるいはヘパリンをそれぞれ添加した。37°C でインキュベート後の A β 2M 線維形成を、ThT 蛍光値、及び電子顕微鏡観察により評価した。この反応では β 2m から、自発的に核を形成させ、その核に β 2m が結合し伸長することで線維を形成させる。

(3) 試験管内アミロイド線維脱重合反応に及ぼす GAG、PG の効果の解析：反応溶液は、A β 2M 線維 (150mg/ml)、50mM phosphate-100mM NaCl (pH 7.5) を含み、さらに 7 種の GAG あるいは 6 種の PG をそれぞれ添加した。37°C、24 時間インキュベート後の A β 2M 線維の残存率を、ThT 蛍光値を指標として比較した。

C. 研究結果

(1) 伸長過程に及ぼす GAG、PG の効果の解析：

7 種類の GAG および 6 種類の PG はいずれも、10 又は 30ug/ml 以上添加すると、線維伸長を濃度依存的に抑制した。

(2) 核形成過程に及ぼす GAG、PG の効果の解析： β 2m 単独では 21 日間インキュベートしても、チオフラビン T 蛍光値が増加せず、電子顕微鏡でも線維が観察されなかった。これに対し、PG やヘパリンを添加した場合は、いずれも数日以内にチオフラビン T の蛍光が増加した。また、線維の増加速度は添加濃度依存的に増加した。さらに、電子顕微鏡により典型的なアミロイド線維像が観察された。

(3) 脱重合過程に及ぼす GAG、PG の効果の解析： β 2m だけから構成される線維は、pH7.5 の緩衝液中では脱重合するが、これに GAG、PG を添加した時の保護効果を検討した。ヘパリンは比較的強い脱重合抑制を、コンドロイチン硫酸 B、ヘパラン硫酸は、弱い脱重合抑制をいずれも濃度依存的に示した。また、6 種の PG は、いずれも脱重合抑制を示すが、パイグリカン、デコリン、ケラタン硫酸 PG が特に強い効果を示した。

D. 考察

GAG、PG は A β 2M の形成の段階において、核形成過程では促進的、線維伸長段階では抑制的、また線維脱重合を抑制するという、多面的な効果が認められた。A β 2M 線維が蓄積する部位は関節軟骨あるいは滑膜組織など、GAG および PG が豊富に含まれている場所である。これらの部位に存在するある種の PG が β 2m から重合核形成を促進させることは、蓄積との因果関係として重要と考えられる。これに対して、線維伸長過程においては GAG、PG は、 β 2m 分子

に作用して伸長を抑制する。しかし、生体内では試験管内の閉鎖系と異なり、常に $\beta 2m$ は供給され続ける。従って、これらのGAG、PGが存在しても伸長速度は抑制されるものの、完全に止まってしまうのではないと考えられる。線維が形成される反応は、重合核形成が律速段階になっていると推定される為、速度は遅いものの全体としては線維が伸びる方向に反応が進むと考えられる。さらにGAG、PGは一端形成された $A\beta 2M$ 線維を安定化させ分解を抑制する。以上のことから、GAG、PGは全体としては $A\beta 2M$ 線維形成・沈着に対し促進的に作用していると考えられる。

我々は現在、ここに示した様に多様な分子との相互作用をアミロイド線維形成の様々な過程において、別々に評価する手法を駆使し、 $A\beta 2M$ アミロイド沈着の分子機構を総合的に解明することを目指して研究を継続している。

E. 結論

GAG、PGは $A\beta 2M$ 線維形成の各段階において、線維伸長段階では抑制的に作用するが、線維形成の律速段階である核形成過程では促進的に作用し、また線維脱重合を抑制するという、多面的な効果が認められた。GAG、PGは全体としては $A\beta 2M$ 線維形成・沈着に対し促進的に作用していると考えられる。

F.健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Gejyo F.

$\beta 2$ -Microglobulin amyloid. *Amyloid* 7: 17-18, 2000.

Yamaguchi I, Hasegawa K, Naiki H, Mitsu T, Matuo Y and Gejyo F.

Extension of $A\beta 2M$ amyloid fibrils with recombinant human $\beta 2$ -microglobulin.

Amyloid (in press)

下条文武: アミロイドーシスの対策. 腎と透析 49:738-740,2000

下条文武、丸山弘樹、風間順一郎: アミロイド骨関節障害の病態と対策 日本透析医学会雑誌 33:329-330,2000

下条文武、高橋直生: 透析アミロイドーシス. 日本内科学会雑誌 39:96-102,2000

下条文武: 血液透析治療に伴うアミロイド症の病態解明と治療対策. 新潟医学会雑誌 114:264-269,2000

恵以盛、下条文武:アミロイド骨症の予防と治療透析骨病変—新しい考え方(東京メディカルセンター):255-263,2000

丸山弘樹、下条文武: 透析アミロイドーシス. *EBM 血液浄化療法* 326-333,2000

丸山弘樹、樋口昇、下条文武: 透析アミロイドーシスによる関節症の治療. *Annual Review 腎臓* 240-246,2000

橋本義一、内木宏延、吉田治義、下条文武: 実験的アミロイド線維伸長とAGE化 $\beta 2$ -m. 腎と骨代謝 14:31-36,2001

2. 学会発表

下条文武

$\beta 2$ -microglobulin と透析アミロイドーシス. 第47回臨床病理学会総会シンポジウム 11月2-3日 郡山市

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、上田孝典、下条文武、内木宏延

試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索

厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成12年度研究報告会 2月1-2日 東京

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、下条文武、内木宏延

$\beta 2$ -ミクログロブリン関連アミロイドーシスにおけるグリコサミノグリカン及びプロテオグリカンの影響

厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成12年度研究報告会 2月1-

2日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

分担研究報告書

アミロイド線維形成に関する試験管内反応速度論的研究

分担研究者 内木宏延 福井医科大学病理学第二講座 教授

研究要旨 昨年度に引き続き、アルツハイマー病、全身性 AL アミロイドーシス、及び透析アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形成・分解の反応速度論的解析を並行して遂行し、ヒトアミロイドーシス全般に共通する発症機構・因子を明らかにすることを旨とした。(1) アルツハイマー病では、系外から A β 蛋白が供給され続ける開放反応系を表面プラズモン共鳴法を用いて構築し、 β アミロイド線維伸長、及び脱重合機構を解析した。その結果、線維伸長が一次反応速度論形式に従うことを明らかにし、重合速度と脱重合速度が均衡する臨界モノマー濃度（約 0.2 μ M）を直接測定した。(2) 全身性 AL アミロイドーシスでは、5 例の剖検例を基に線維伸長の一次反応速度論モデルを普遍化し、中性 pH 域における線維伸長反応を重点的に解析した。また、この反応に種々の生体分子が抑制的、あるいは促進的に作用すること、及び抗酸化剤 NDGA がこの反応を抑制することを明らかにした。

A. 研究目的

本分担研究は、ヒトアミロイドーシスの中から β アミロイドーシス（アルツハイマー病）と透析アミロイドーシスを取り上げ、これらの発症に共通する分子機構、特にアミロイド前駆蛋白の代謝環境の加齢変化の実体を、試験管内反応速度論的解析系を駆使し明らかにすることを旨とする。

一方われわれは、試験管内アミロイド線維の形成反応を説明するモデルとして、核形成過程と線維伸長過程から構成される重合核依存性重合モデルを構築している。このモデルに基づき、透析アミロイドーシス、アルツハイマー病、及び AL アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形成の反応速度論的解析を並行して遂行し、各々の成果を他のアミロイドーシス研究にフィードバックすることにより、個々

のアミロイドーシスの特殊性と共に、ヒトアミロイドーシス全般に共通する発症機構・因子を明らかにすることをグループの主要な研究目標としている。

まずアルツハイマー病 β アミロイド線維(fA β)に関して、従来のチオフラビン T (ThT)を用いた分光蛍光定量法に基づく閉鎖反応系に比べより生体に近いモデルとして、系外から A β 蛋白が供給され続ける開放反応系を構築し、fA β の伸長、及び脱重合機構を解析した。次に全身性 AL アミロイドーシスにおいては、線維伸長の一次反応速度論モデルを普遍化し、中性 pH 域における線維伸長反応を重点的に解析した。さらに、この反応に及ぼす種々の生体分子、及び有機化合物の影響を検討した。

B. 研究方法

アルツハイマー病βアミロイドーシス：測定には表面プラズモン共鳴法 (SPR, BIACORE1000) を用いた。最初に Aβ₁₋₄₀ 蛋白より pH7.5 で fAβを形成させ、これを重合核としてセンサーチップ上に固定化した。次いで、リン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解した各種濃度 (0-30μM) の Aβ₁₋₄₀ 蛋白溶液を連続的に添加し、37°Cにおける fAβの伸長及び脱重合過程をリアルタイムで測定した。

ALアミロイドーシス：(1)アミロイド線維、及びAL蛋白の精製：ALアミロイド線維は、全身性ALアミロイドーシスの病理解剖4症例 (いずれも入型) ならびに生体肝移植1症例 (κ型) より得られた諸臓器から Pras 法で粗抽出後、10⁵×g 超遠心、及び50-60%不連続ショ糖密度勾配超遠心により精製した。単体AL蛋白は、精製線維の一部を6M尿素で可溶化し、ゲルろ過クロマトグラフィー(Sephacryl S200)で分子量別に分画した。また、中性pH域でも十分な線維伸長を認めた症例2,7については、HPLCによる高純度AL蛋白精製を行った。精製線維の一部を8Mグアニジン塩酸で可溶化し、6M尿素への脱塩置換後、陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、Hitrap SP カラム素通り画分をゲルろ過クロマトグラフィー(Superose 12)で分子量別に分画した。得られた各画分に対し、還元条件で Tricine-SDS-PAGE、及びウエスタンブロッティングを行い、抗κ、抗入、抗 apoE、及び抗 SAP の各抗体を用いて検出した。(2)アミロイド線維形成の反応速度論的解析：精製AL蛋白画分を、単独で、あるいは超音波により断片化した精製ALアミロイド線維と共に37°Cで反応させ、アミロイド線維形成・伸長を、電顕観察、及びThT法によりモニターした。また、伸長反応の至適pH、及び伸長初速度に及ぼすアミロイド線維の数濃度、あるいはAL蛋白濃度の影響の検討も行った。(3)線維伸長反応に及ぼす各種生体分子ならびに有機化合物の影響解析：中性pH域でも

十分な線維伸長を認めた症例2,7のpH7.5における伸長反応溶液に、種々のアミロイド共存物質 (apoE, SAP, fibronectin, α₂-macroglobulin, α₁-antichymotrypsin, aprotinin, decorin, heparan sulfate、及び dermatan sulfate)、血清蛋白 (α₁-microglobulin)、及び有機化合物 (nordihydroguaiaretic acid (NDGA)、rifampicin、dexamethasone、doxorubicin、及び高濃度のDMSO)を加え、反応開始6ならびに24時間後の電顕像、及びThT蛍光量を評価した。

C. 研究結果

アルツハイマー病βアミロイドーシス：fAβ伸長反応の初速度は、添加したAβ蛋白の濃度に比例した。これは、開放反応系においても、fAβ伸長過程が上記一次反応速度論形式に従うことを示している。さらに、Aβ蛋白を含まない緩衝液を添加すると、fAβが脱重合することを示した。次いで、重合速度と脱重合速度が均衡する濃度 (臨界モノマー濃度) を直接測定したところ、約0.2μMであった。

ALアミロイドーシス：(1)精製線維ならびにAL蛋白の解析：上記精製法により、いずれの症例においても幅約10nmの典型的アミロイド線維を得た。SDS-PAGE、及びウエスタンブロッティングの結果、5種類のアミロイド線維のいずれも、ほぼ完全な入/κ鎖、及びそれが限定分解されて出来たサイズの異なる数種のAL蛋白から構成されていた。HPLC精製蛋白は、上記の限定分解されて出来た数種のAL蛋白の一部から構成されていた。ウエスタンブロッティングの結果、Sephacrylゲルろ過クロマトグラフィー精製AL蛋白溶液に共存していたapoEは、HPLC精製によりほぼ除去出来た。(2)線維伸長の反応速度論的解析：

(i) 電顕観察により、伸長反応の至適pHにおいて断片化アミロイド線維の明らかな伸長を確認した。

(ii) 線維伸長の至適 pH は、症例 2、3、6、及び 14 で、それぞれ pH2.5、3.5、2.0、2.5 と著しい酸性域にあったが、症例 7 では pH7.5 と中性域にあった。また症例 2 は、中性 pH 域において ThT 法により明らかな線維伸長を認めた。さらに電顕観察により、全ての症例で中性 pH 域における線維伸長を確認出来た。(iii) 反応速度論的解析は、いずれの症例も低分子量画分を用い至適 pH で行った。症例 2 は pH7.5 でも行った。いずれも反応開始後蛍光はラグタイム無く増加し、やがて平衡に達した。個々の症例により平衡に達するまでの時間は異なった。伸長速度は、アミロイド線維の重合速度と脱重合速度の和で表され、重合速度はアミロイド線維の数濃度、及び AL 蛋白濃度に比例して増加する事を確認した。(3)線維伸長反応に及ぼす各種生体分子の影響：(i) 伸長反応は症例 2、7 の HPLC 精製 AL 蛋白を用い、pH7.5 で行った。(ii) いずれの症例においても、上記生体分子の内 apoE、及び α_1 -microglobulin が 0~5 μ M の範囲で、fibronectin が 0~100 μ g/ml の範囲で濃度依存性に線維伸長を阻害した。(iii) いずれの症例においても、dermatan sulfate が、0~100 μ g/ml の範囲で濃度依存性に線維伸長を促進した。(4)線維伸長反応に及ぼす各種有機化合物の影響：(i) 伸長反応は症例 2、7 の Sephacryl ゲルろ過クロマトグラフィ精製 AL 蛋白を用い、pH7.5 で行った。(ii) 上記有機化合物の内 NDGA が、0~100 μ M の範囲で濃度依存性に線維伸長を阻害した。

D. 考察

アルツハイマー病 β アミロイドーシス：今回の実験により、 β アミロイド線維伸長が、 β アミロイド線維—A β 蛋白間における重合・脱重合反応の動的平衡の総和として起こることが明らかとなった。現在、apoE 等の生体分子や種々の有機化合物が上記過程に及ぼす影響を検討している。

AL アミロイドーシス：AL アミロイド線維伸長が、一次反応速度論モデル、すなわち既に存在する線維断端に、前駆蛋白である AL 蛋白がコンフォーメーションを変化させながら次々に重合することにより起こる事を証明した。これまでわれわれは、マウス老化アミロイド線維、アルツハイマー病 β アミロイド線維、及び透析アミロイド線維伸長も同じモデルで説明出来ることを証明しており、このモデルがアミロイド線維形成の普遍的機構であることを示唆している。また、試験管内 AL アミロイド線維伸長が種々の生体分子により阻害・促進されたことは、生体内 AL アミロイド線維形成・沈着が、種々の生体分子のこれらの過程に及ぼす促進・抑制効果の総和として起こることを示唆している。さらに、抗酸化剤のモチーフを持つ有機化合物がアミロイド線維形成を阻害することが知られているが、上記結果は、このモチーフを基に合成展開を行い、AL アミロイド線維形成阻害剤を開発出来る可能性を示唆している。また今回開発した実験系は、これらの阻害剤をスクリーニングする際の基本的分析手段として利用出来る。

E. 結論

SPR を用いた開放反応系によって、fA β の伸長、および脱重合機構を解析することが出来た。

AL アミロイド線維伸長が、普遍的に一次反応速度論モデルに従う事を証明した。また、多くの場合伸長の至適 pH が酸性域にあるものの、中性 pH 域でも線維伸長が起こりうることを明らかにした。さらに、線維伸長が種々の生体分子による修飾を受け、有機化合物により阻害されうることを明らかにした。

F.健康危険情報

該当なし