

低分子量 AL 蛋白画分を含む反応は、ほぼ完全なλ鎖を含む高分子量 AL 蛋白画分に比べより容易に進行し、低分子量 AL 蛋白画分では、酸性 pH 域に明瞭なピークを認めた。症例 3、6、13 でも同様に、酸性 pH 域に明瞭なピークを認め、伸長反応は低分子量 AL 蛋白画分の方がより起こりやすかった。また、図 2 に示すように、症例 7 では、

AL 蛋白の等電点をはさんで二峰性のピークを示し、中性 pH 域により高い伸長のピークを認めた。(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。いずれの場合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(図 3: 症例 7)。

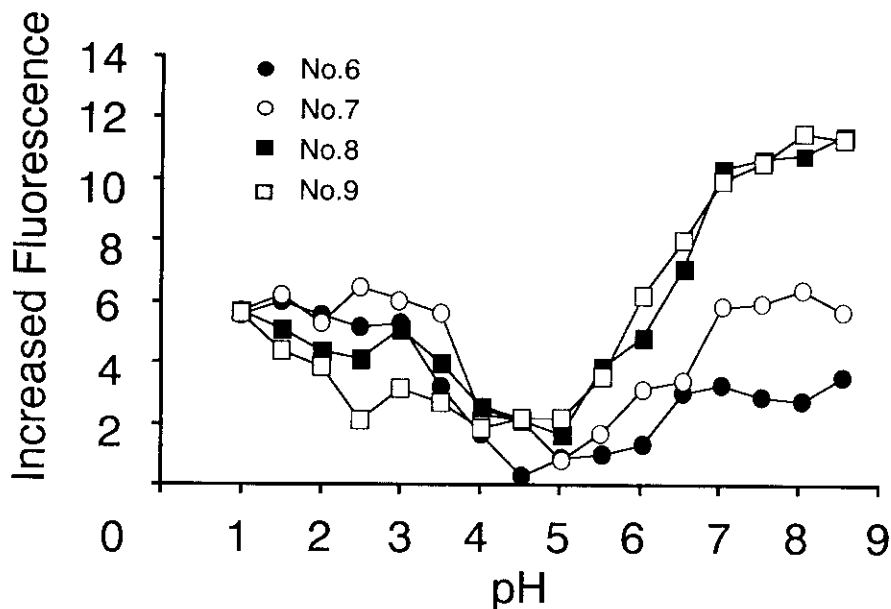


図2 異なる分子量のAL蛋白画分と断片化アミロイド線維による伸長反応のpH依存性（症例7）。反応は24時間行った。フラクション番号は通常の低圧ゲルろ過で得られた画分を示す。

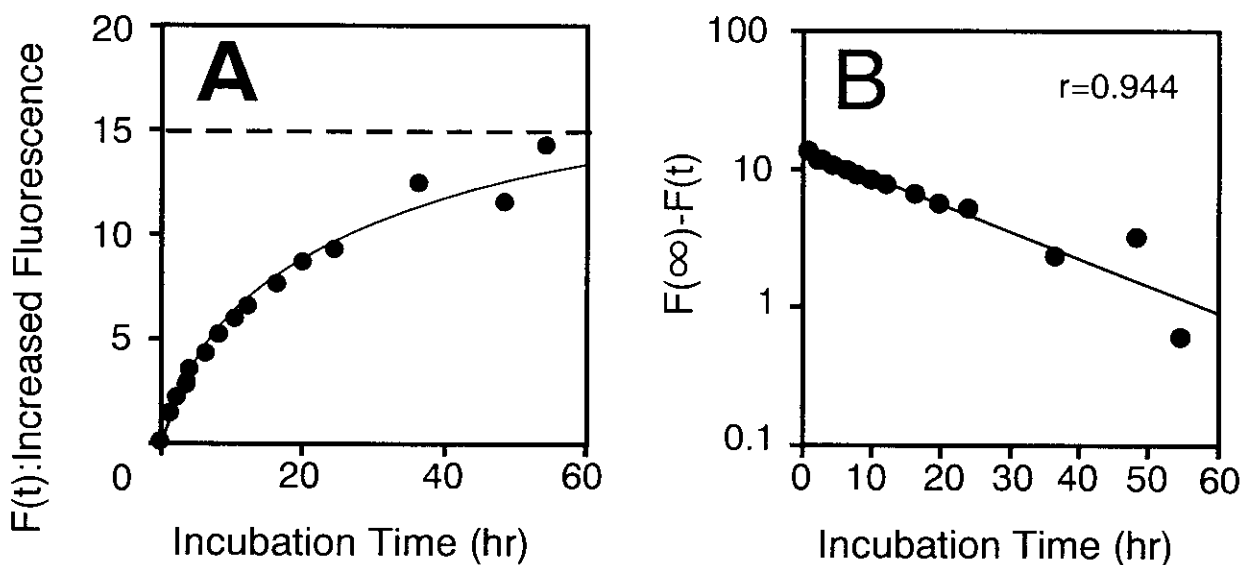


図3 症例7から得た低分子量AL蛋白画分、及びALアミロイド線維による線維伸長反応の時間経過

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した。以上より、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蛋白が立体構造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。

#### AL蛋白からのアミロイド線維形成：

電顕観察により、症例2、7の低分子AL蛋白は、それぞれの至適pHでアミロイド線維を形成した。症例3、14では、それぞれの至適pHで反応させてもいわゆるプロトフィブリル様の線維しか形成しなかった。

#### 線維伸長反応に及ぼす各種有機化合物の影響の検討：

- (i) 伸長反応は症例2、7のSephacrylゲルろ過精製AL蛋白を用い、pH7.5で行った。
- (ii) 図4に示すように、いずれの症例にお

いても、NDGAが0~100  $\mu\text{M}$ の範囲で濃度依存性に線維伸長を阻害した。(iii) 電顕観察においても線維伸長阻害効果を確認した。

#### 線維伸長反応に及ぼす種々の生体分子の影響：

- (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、アポEおよび $\alpha_1$ -ミクログロブリンが0~5  $\mu\text{M}$ の範囲で、フィブロネクチンが0~100  $\mu\text{g/ml}$ の範囲で有意に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、デルマタン硫酸が0~100  $\mu\text{g/ml}$ の範囲で有意に濃度依存性に線維伸長を促進した。(iv) 電顕でもアポE、 $\alpha_1$ -ミクログロブリン、及びフィブロネクチンで線維伸長阻害効果を確認した。また、デルマタン硫酸により、コントロールに比べさらに伸びやかな線維伸長を確認した。以上の結果は、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。

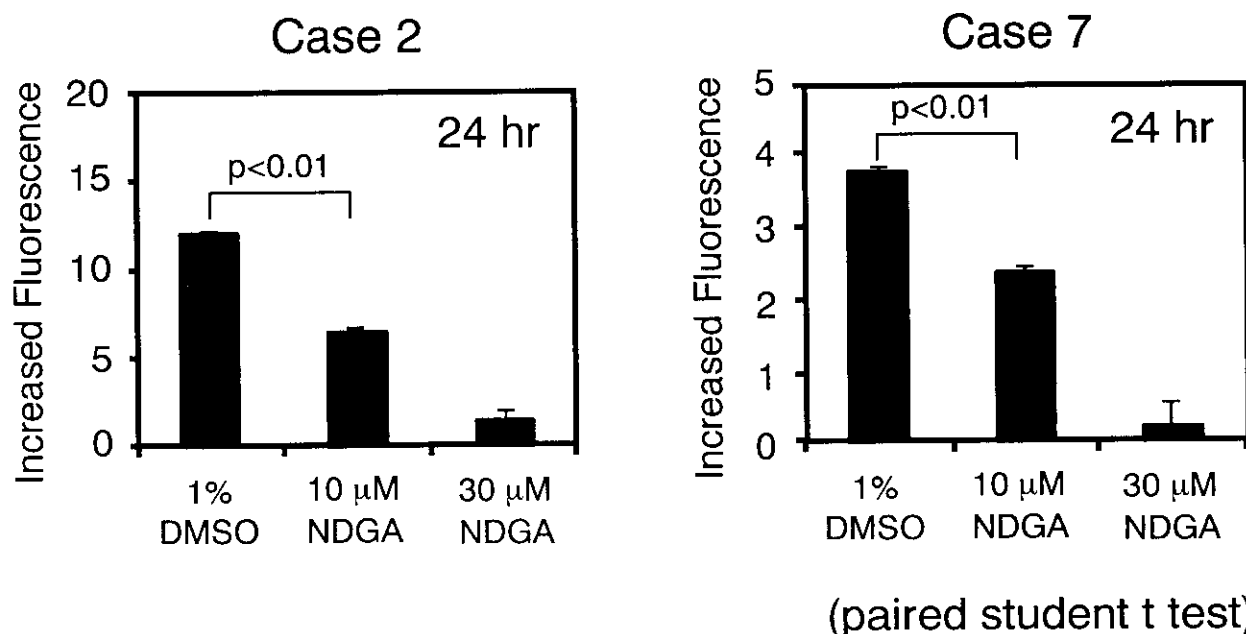


図4 症例2、7の線維伸長反応に及ぼすNDGAの影響

#### D. 考察

線維伸長反応は、ほとんどの症例で酸性 pH 域にそのピークを認めたが、症例 7 では中性域にピークを認めた。症例 2 の高純度 AL 蛋白は、中性 pH 域で既にかなりランダムな構造を取っており、pH を変化させても明らかな構造変化を認めなかった（下条文武ら、新鮮凍結臓器からの AL アミロイド線維ならびに AL 蛋白の精製、及び電顕的・生化学的解析、本研究報告書）。これは、プロテアーゼによるフラグメント化により、免疫グロブリン軽鎖のコンパクトな立体構造がほぐれたためと考えられ、このことが、いずれの症例においても、程度の差こそあれ酸性・中性の両方で線維伸長を認める要因なのではないかと考えている。

反応速度論的解析の詳細は省略するが (Naiki & Gejyo. *Methods Enzymol* 309:305-317, 1999)、 $\lambda \cdot \kappa$ タイプを問わず、解析した全症例において AL アミロイド線維伸長が、種々のヒト・マウスアミロイド線維同様、普遍的に一次反応速度論モデルに従う事を証明した。

結果に示すように抗酸化剤 NDGA が線維伸長を阻害した。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でき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できる。さらに、AL アミロイド線維伸長過程が種々の生体分子により修飾を受けていることが明らかになった。現在作業仮説として、生体におけるアミロイドの沈着は、前駆蛋白からの線維形成・沈着の各段階における様々な生体分子の促進・阻害効果の総和として起こると考えている。

#### E. 結論

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. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

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 2001 年 2 月 1-2 日 東京、同プログラム・抄録集 重点研究事業 1

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Naiki H, Hasegawa K, Yamaguchi I, Nakamura H, Gejyo F and Nakakuki K	Apolipoprotein E and antioxidants have different mechanisms of inhibiting Alzheimer's $\beta$ -amyloid fibril formation in vitro	Biochemistry	37	17882-17889	1998
Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K	Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid $\beta$ -protein in cell culture	J. Biol. Chem.	274	15110-15114	1999
Naiki H and Gejyo F	Kinetic analysis of amyloid fibril formation	Methods Enzymol.	309	305-318	1999
Hashimoto N, Naiki H and Gejyo F	Modification of $\beta$ 2-microglobulin with D-glucose or 3-deoxyglucosone inhibits A $\beta$ 2M amyloid fibril extension in vitro	Amyloid	6	256-264	1999
Hasegawa K, Yamaguchi I, Omata S, Gejyo F and Naiki H	Interaction between A $\beta$ (1-42) and A $\beta$ (1-40) in Alzheimer's $\beta$ -amyloid fibril formation in vitro	Biochemistry	38	15514-15521	1999
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	2001