

C. 研究結果

(1) 開放反応系の構築: 表面プラズマ共鳴法 (ピアコア) を駆使し、fA β 形成・分解をリアルタイムで解析できる開放反応系を確立した。この実験系を駆使し、fA β が試験管内でゆっくりと脱重合を起こすこと、及び線維伸長過程と共に脱重合過程も一次反応速度論モデルで説明できることを証明した。

(2) 種々の有機化合物およびペプチドの fA β 分解作用: 50 μ M の NDGA は、fA β 濃度を示す ThT の蛍光量を、4 時間後に初期値の 5% まで低下させ、同濃度の RIF、TC は、72 時間後の蛍光量を初期値の約 20% まで低下させた。一方 iA β 5 は、50 μ M では明らかな分解作用を示さず、1 mM の高濃度で、72 時間後の蛍光量を初期値の約 50% まで低下させた。電顕観察においても、反応時間に依存した fA β の分解を確認した。以上のデータより、fA β に及ぼす分解作用の強さは、50 μ M の濃度で NDGA >> RIF \approx TC > PVS \approx 1,3-PDS > iA β 5 の順であった。

(3) AL アミロイドーシス: (a) 線維伸長の至適 pH は、症例 1、2、3、及び 5 で、それぞれ pH 2.5、3.5、2.0、2.5 と著しい酸性域にあったが、症例 4 では pH 7.5 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。(b) 反応速度論的解析は、いずれの症例も至適 pH で行った。症例 1 は pH 7.5 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。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。(c) 症例 1、4

のいずれにおいても、apoE、 α_1 -ミクログロブリン、フィブロンectin、及び NDGA が濃度依存性に線維伸長を阻害した。一方、デルマタン硫酸は濃度依存性に線維伸長を促進した。

D. 考察

われわれは、NDGA に代表される種々の有機化合物が、fA β および fAL の形成を阻害するのみならず、fA β を分解することを明らかにした。興味深いことに、NDGA、RIF、TC はいずれも、分子構造の中にフリーラジカルスカベンジャーのモチーフを持っている。NDGA を始めとするこれら分子の線維形成抑制、あるいは分解機構の詳細は不明だが、上記モチーフを介して A β 蛋白、あるいは fA β に結合し、A β 蛋白の立体構造や安定性に影響を与えていると考えられる。また、NDGA に代表される一群の抗酸化剤は、アルツハイマー病、AL アミロイドーシスをはじめとする種々のヒトアミロイドーシスの治療薬開発に向け、有力な基本分子となる可能性がある。

次にわれわれは、fAL の試験管内伸長が、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。これまでわれわれは、マウス老化アミロイド線維、fA β 、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、fAL の試験管内伸長過程が種々の生体分子により影響を受けることは、生体における AL アミロイドの沈着が、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阻害・促進効果の総和として起こることを示唆している。さらに上記生体分子の

血中濃度、あるいは間質における濃度が、加齢により変化していることが多くの研究者により示唆されており、そのような変化の集積がヒトアミロイドーシスの発症を惹起していると考えられる。

E. 結論

SPR を用いた開放反応系を構築し、fA β の伸長過程と共に脱重合過程も一次反応速度論モデルで説明できることを証明した。また、fALの伸長過程が一次反応速度論モデルで説明できることを明らかにした。さらに、fA β およびfAL形成・分解の各段階が、様々な生体分子や有機化合物により抑制的あるいは促進的に修飾を受けることを明らかにした。これらの知見は、生体内アミロイド沈着の分子機構解明、及び治療薬開発に重要な示唆を与える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohhashi Y, Hagihara Y, Kozhukh GV, Hoshino M, Hasegawa K, Yamaguchi I, Naiki H and Goto Y.

The intrachain disulfide bond of β_2 -microglobulin is inessential for the immunoglobulin fold at neutral pH but essential for amyloid fibril formation at acidic pH. *J Biochem (Tokyo)*. 131(1): 45-52, 2002

Kozhukh GV, Hagihara Y, Kawakami T, Hasegawa K, Naiki H and Goto Y. Investigation of a peptide responsible for amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin by *Acromobacter* protease I. *J Biol Chem* 277(2): 1310-1315, 2002

Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F and Naiki H. Apolipoprotein E inhibits the

depolymerization of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry* 40:8499-8507, 2001

Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y, Takashima A, Yamada M and Naiki H. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down preformed Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *J Neurochem* (in press)

Martsev SP, Dubnovitsky AP, Vlasov AP, Hoshino M, Hasegawa K, Naiki H and Goto Y. Amyloid fibril formation of mouse VL domain under acidic pH. *Biochemistry* (in press)

2. 学会発表

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、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的解析 第 90 回日本病理学会総会 2001 年 4 月 5-7 日 東京

小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁、内木宏延
Alzheimer 病 β アミロイド線維の試験管内伸長及び脱重合機構の解析 第 42 回日本神経学会総会 2001 年 5 月 11-13 日 東京

Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F and Naiki H. Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of β_2 -microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. IXth International Symposium on Amyloidosis. July 15-21, 2001, Budapest

Takahashi N, Hasegawa K, Yamaguchi I, Gejyo F and Naiki H. Establishment of a first-order kinetic model of AL amyloid fibril extension in vitro. IXth International Symposium on Amyloidosis. July 15-21, 2001, Budapest

小野賢二郎、長谷川一浩、山田正仁、内木宏延
アルツハイマー病 β アミロイド線維に及ぼす抗酸化剤 NDGA の強力な分解作用
第 20 回日本痴呆学会学術集会 2001 年 10 月 4-5 日 津

内木宏延
アミロイド線維形成・分解機構の反応速度論的解析
第 74 回日本生化学会大会シンポジウム アミロイド線維形成の分子機構 2001 年 10 月 25-28 日 京都

長谷川一浩、小野賢二郎、山田正仁、内木宏延
開放反応系によるアルツハイマー病 β アミロイド

線維の分解機構の解析 第74回日本生化学会大会
2001年10月25-28日 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
柳澤勝彦	コレステロール代謝からみたアルツハイマー病	杉田秀夫 他	神経・筋疾患の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2001	103-108
Yanagisawa K	Molecular mechanism underlying initiation of amyloid fibril formation.	Tanaka C, Ihara Y and McGeer PI	Neuroscientific Basis of Dementia	Birkhauser Verlag	Germany	2001	241-247
下条文武	透析アミロイドーシス	荒川正昭 小磯謙吉 浅野 泰	腎臓病の最新医療	先端医療技術研究所	東京	(in press)	
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	伊藤克己 浅野 泰 遠藤 仁 御手洗哲也 東原英二	Annual Review 腎臓	中外医学社	東京	2001	240-246
下条文武	アミロイドーシス	透析療法合同専門委員会	血液浄化療法ハンドブック	共同医書出版社	東京	2001	388-394

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hayashi H, Igbavoa U, Hamanaka H, Kobayashi M, Fujita S C, Wood W G, Yanagisawa K.	Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice.	Neuroreport	(in press)		
Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K, Komano H.	Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid β -protein.	J Biol Chem	(in press)		
Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M.	Amyloid β -protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade.	J Neurosci Res	(in press)		
Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M.	Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons.	J Neurochem	80	178-190	2002
Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K.	Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid.	J Biol Chem	276	24985-24990	2001
Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Sudoh S, Shibamoto S, Yanagisawa K, Komano H.	Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of β -catenin phosphorylation.	Eur J Biochem	268	3036-3041	2001

Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K.	A novel action of Alzheimer's amyloid β -protein (A β): oligomeric A β promotes lipid release.	J Neurosci	21	7226-7235	2001
Isobe I, Yanagisawa K, Michikawa M.	3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes.	J Neurochem	77	274-280	2001
Sawamura N, Gong J-S, Garver WS, Heidenreich R A, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K, Michikawa M.	Site-specific phosphorylation of tau by mitogen activated protein kinase in brains of Niemann-Pick type C mice.	J Biol Chem	276	10314-10319	2001
Fan Q-W, Yu-W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M.	Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons.	J Neurochem	76	391-400	2001
Fan Q.W., Isobe I, Asou H, Yanagisawa K, Michikawa M.	Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture:A review	J Amer Aigng Assoc	24	1-10	2001
Kazama J, Maruyama H, Gejyo F	Osteoclastogenesis and osteoclast activation in dialysis-related amyloid osteopathy.	AM J Kidney Dis	38	156-160	2001
Yamaguchi I, Hasegawa K, Takahashi N, Gejyo F, Naiki H	Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of β 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH.	Biochemistry	40	8499-8507	2001
Kazama J, Maruyama H, Gejyo F.	Reduction of circulating β 2-microglobulin level for the treatment of dialysis-related amyloidosis.	Nephrol Dial Transp	16	31-35	2001
Yamaguchi I, Hasegawa K, Naiki H, Mitsu T, Matuo Y, Gejyo F.	Extension of A β 2M amyloid fibrils with recombinant human β 2-microglobulin.	Amyloid	8	30-40	2001
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
下条文武	透析アミロイドーシス(1)ー手根管症候群ー	透析ケア	7	48-51	2001
下条文武	β 2-microglobulinと透析アミロイドーシス	臨床病理	49	244-248	2001
大林弘明 丸山弘樹 下条文武	透析アミロイドーシスへの対策	腎と透析	50	685-689	2001
齋藤徳子、 下条文武	透析アミロイドーシス	内科	87	1242-1247	2001
下条文武	透析アミロイドーシス	Medical Technology	29	1161	2001
Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y, Takashima A, Yamada M, Naiki H.	Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down preformed Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro.	J Neurochem	(in press)		
Martsev S P, Dubnovitsky A P, Vlasov A P, Hoshino M, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y.	Amyloid fibril formation of mouse VL domain under acidic pH.	Biochemistry	(in press)		
Ohhashi Y, Hagihara Y, Kozhukh G V, Hoshino M, Hasegawa	The Intrachain Disulfide Bond of β (2)-Microglobulin Is Not Essential for the Immunoglobulin Fold at Neutral pH, but	J Biochem (Tokyo)	131	45-52	2002

K, Yamaguchi I, <u>Naiiki H</u> Goto Y.	Is Essential for Amyloid Fibril Formation at Acidic pH.				
Kozhukh G V, Hagihara Y, Kawakami T, Hasegawa K, <u>Naiiki H</u> , Goto Y.	Investigation of a peptide responsible for amyloid fibril formation of β_2 - microglobulin by <i>Acromobacter</i> protease I.	J Biol Chem	277	1310- 1315	2002
Mori M, Toyokuni S, Kondo S, Kasai H, <u>Naiiki H</u> , Toichi E, Hosokawa M, <u>Higuchi K</u> .	Spontaneous loss-of-function mutations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase gene in mice and exploration of the possible implication of the gene in senescence.	Free Radic Biol Med	30	1130- 1136	2001
Taniguchi T, Azuma H, Okada Y, <u>Naiiki H</u> , Hollenberg M D, Muramatsu I.	Endothelin-1-endothelin receptor type A mediates closure of rat ductus arteriosus at birth.	J Physiol	537	579-585	2001
長谷川一浩 山口 格 内木宏延	アミロイド線維形成の分子機構と細胞 毒性	細胞工学	20	1495- 1501	2001

研究成果の刊行物・別刷

20010187

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。