

アミロスフェロイドタンパク質の 自己組織化と神経変性疾患

Amylopherooid-Self-Organization of Proteins and Neurodegenerative Diseases

星 美奈子*

「異常構造タンパク質」の凝集と蓄積は、アルツハイマー病を初めとする多くの神経変性疾患に共通の病態であるばかりか、病因である可能性も高くなっている。しかしながら、個々の疾患において凝集体の構造もその作用機序も未だ謎が多い。筆者らは、アルツハイマー病の発症の引き金を引くとされている β アミロイドに由来する新たな球状構造体を見出した。その発見の経緯、ならびに今後の展望を述べたい。

1. はじめに

アルツハイマー病・パーキンソン病・プリオン病・多系統萎縮症など多くの神経変性疾患に共通の病態が、「異常構造タンパク質」の凝集と蓄積であり、それが発症機序にも重要であることが近年明らかになりつつある。しかしながら、それぞれの疾患において、このようなタンパク質の凝集がいかにして起きるか、あるいは凝集体の形成がなぜ神経細胞の機能障害を起こすかに関しては、実はまだ十分に解明されてはいない。

筆者らは、代表的な老年病であるアルツハイマー病の発症原因と考えられている β アミロイド

($A\beta$) と呼ばれるタンパク質に着目し、その神経毒性発現機構に取り組んできた¹⁻³⁾。筆者らは最近、 $A\beta$ が自発的に自己集合した結果新たな球状構造体が形成され、それが非常に強力な神経毒性を持つことを見出した⁴⁾。さらに、その構造体を精製することに成功し、「アミロスフェロイド」(写真1)^{5,6)}と名付けたのでその経緯を今回ご紹介したい。

2. アミロスフェロイドの同定

アルツハイマー病は「進行性の痴呆」、即ち、記憶や知的機能などが徐々に失われていく病気であり、病気は神経細胞の死とともに進行する。患

*Minako Hoshi 三菱化学生命科学研究所 生命科学研究部 神経変性疾患ユニット ユニットリーダー/主任 研究員。筆者略歴：1991年東京大学大学院 理学系研究科 生物化学専攻 博士課程修了、同年日本学術振興会 特別研究員、新技術事業団 科学技術特別研究員(国立精神・神経センター)、94年三菱化学生命科学研究所 特別研究員、准研究員、副主任研究員を経て、2001年より現職、2003年9月まで科学技術振興機構 PRESTO リーダー兼任、同年第35回内藤記念科学奨励金受賞。連絡先：(E-mail) mie@libra.ls.m-kagaku.co.jp

者脳に残されたアルツハイマー病の痕跡は「神経細胞の消失」と $A\beta$ が集まり線維となって蓄積したシミのような「老人斑」,そして高度にリン酸化されたタウ蛋白が細胞内に蓄積した「神経原線維変化」である。発症の時系列としては、 $A\beta$ の蓄積→タウ蛋白の蓄積→神経細胞の機能低下とそれに続く細胞死→痴呆へと到る。この時系列の中で、最初にアルツハイマー病への引き金を引くのは何であろうか？

これに関しては、1906年のアロイス・アルツハイマー博士による症例報告以来蓄積された生化学・病理学・遺伝学・モデル動物実験などの各種の見解から、「 $A\beta$ の蓄積」が最も有力な候補と考えられている⁷⁾。老人の脳においてはアルツハイマー病の病因となる $A\beta$ は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) から元々は生理的ペプチドとして

(その機能は未だ不明だが) 恒常的に切り出され、そして分解されている。この $A\beta$ の生産と分解のバランスが、老化の過程で何らかの原因により崩れることで脳内の $A\beta$ 量が増加し、結果として線維形成が起きると従来は考えられてきた⁸⁾ (アミロイド仮説)。

しかし、この「 $A\beta$ 主犯説」を支持する実験データもある一方で、疑問視する声も根強くあった。なぜなら、脳内の $A\beta$ 量や線維量の増加は必ずしも痴呆の重症度とは対応しなかったためである⁹⁾。最近発見された Arctic 家系は、突然変異で $A\beta$ の 22 番目のアミノ酸に置換が起きることでアルツハイマー病を早期発症するが、 $A\beta$ 量は増加してはいない¹⁰⁾。さらに、多量の $A\beta$ 線維を蓄えながら一見正常である老人達の存在もあり¹¹⁾、 $A\beta$ 量の増加だけで発症を説明することは困難であり、また線維が発症原因ではない可能性も考えられた (図 1)。

上記の過程で、患者脳において不溶性の線維となっている老人斑よりもより穏和な条件で抽出可能な「可溶性 $A\beta$ 」が増えていること、その増加が神経細胞同士の情報交換の場であるシナプス減少とも良く対応することから注目されるようになった^{11, 12)}。患者脳にある可溶性 $A\beta$ は、2~数百量体の混合物で、40 アミノ酸の $A\beta_{1-40}$ 、42 アミノ酸の $A\beta_{1-42}$ の双方からできる¹²⁾。一方で、試験管内で形成される非線維構造体としては、APP

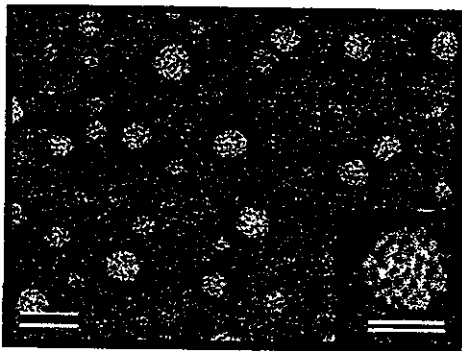


写真1 アミロイド前駆体の透過型電子顕微鏡による画像

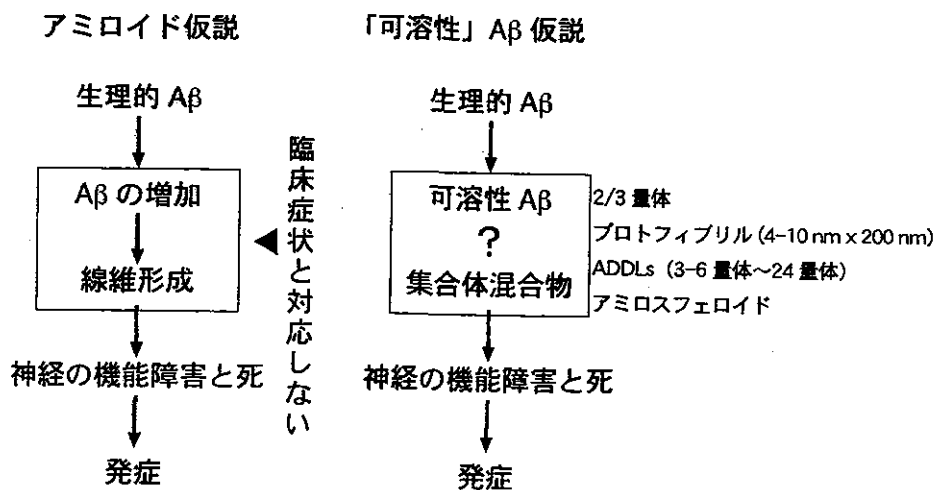


図1 アミロイド仮説 (左) と新たに注目されている可溶性 $A\beta$ 仮説 (右)

発現細胞の培養上清に分泌される 2/3 量体 (2 量体ないしは 3 量体), 化学合成 A β から作られたプロトフィブリルと A β 1-42 会合体混合物 (3~6 量体を中心に 24 量体まで) である A β -derived diffusible ligands (ADDLs) が同定された¹³⁾。2/3 量体はラット海馬の長期増強を抑制する¹⁴⁾。線維へ至る中間体であるプロトフィブリルは β シート構造を持つ幅 4~10nm, 長さ 200nm 以下の様々なサイズのひもである^{15, 16)}。

最近, 亜種として pore 状プロトフィブリルが同定され, Arctic 変異 (A β の 22 番目のグルタミン酸がグリシンに突然変異したもの, アルツハイマー病を早期発症する) を持つ A β では出現頻度が上がることが報告された¹⁷⁾。ADDLs は, 線維形成の抑制条件 (低温または Apo J 添加) で A β 1-42 より生じる会合体混合物で, A β 1-40 では形成されない¹³⁾。原子間力顕微鏡下では高さ 5 nm の様々なサイズの楕円球に見える¹³⁾。プロトフィブリル, ADDLs とともに神経細胞死活性を示すが, 何れも会合体混合物のまま扱われており, その中で神経細胞死活性を担う実体は不明である。ADDLs に関しては, 2003 年の北米神経科学の年會においてゲル濾過による精製が試みられており, 神経細胞死活性は <14kDa 以下の画分にはなく,

ゲル濾過上で分子量 50kDa 以上の画分にあるとの報告があったが, 3 量体 (=~14kDa) から 24 量体 (=~108kDa) まで含まれる ADDLs のいずれが (それとも全てが) 神経細胞死を引き起こすのかどうかは今のところ不明である。これらの線維ではない A β 集合体を線維形成の中間体と捉える見方もあり, 最近の研究の一つのトレンドとなっているが, いずれにせよ, A β の種類においても, A β の集合の程度についても不均一な混合物であり, これらが線維形成の中間体であるかどうかも含めて, その形成機構, 物理化学的性質のほとんどは不明であり, 主に形態で互いが区別されているのが現状である (図 1)。

筆者らは, かくも複雑かつ多様な A β の自己集合過程を解明し, 神経毒性を担う分子の実体を明らかにすべく, あえて重合しやすい A β 1-42 ではなく, 生理的と見なされている A β 1-40 を選び, 各種条件下での A β 集合体形成を試みた。その結果, 化学合成した A β 1-40 は溶かした直後は毒性を持たないが, その水溶液をゆっくり回転攪拌することで, やがて神経毒性が現れることを発見した^{5, 6)}。回転攪拌しない場合, β シート構造を持つ線維が形成されるが, 神経細胞死活性はほとんど現れなかった^{5, 6)}。回転攪拌した場合, 微小な

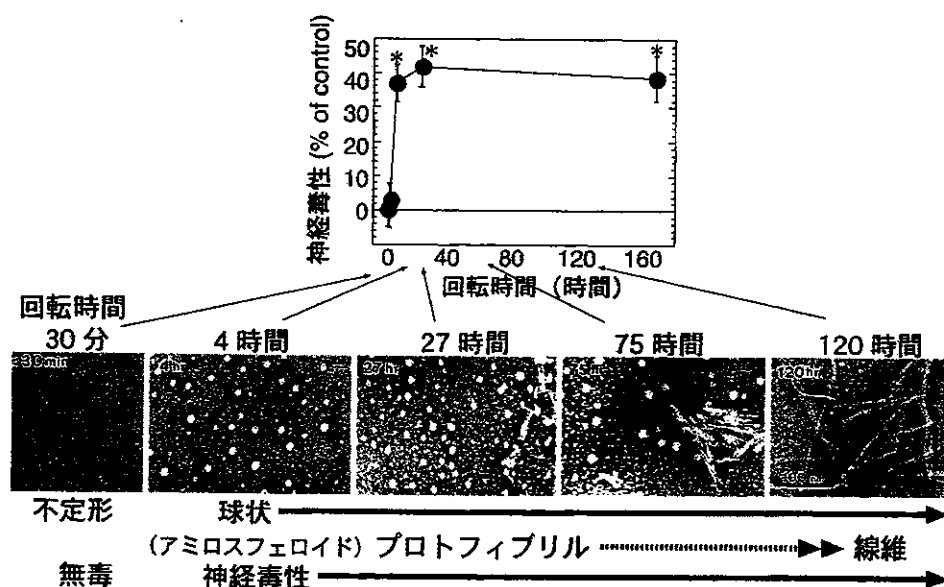


図 2 回転によるアミロスフェロイド, プロトフィブリル, 線維の形成と神経細胞死活性の関係 (文献 6)

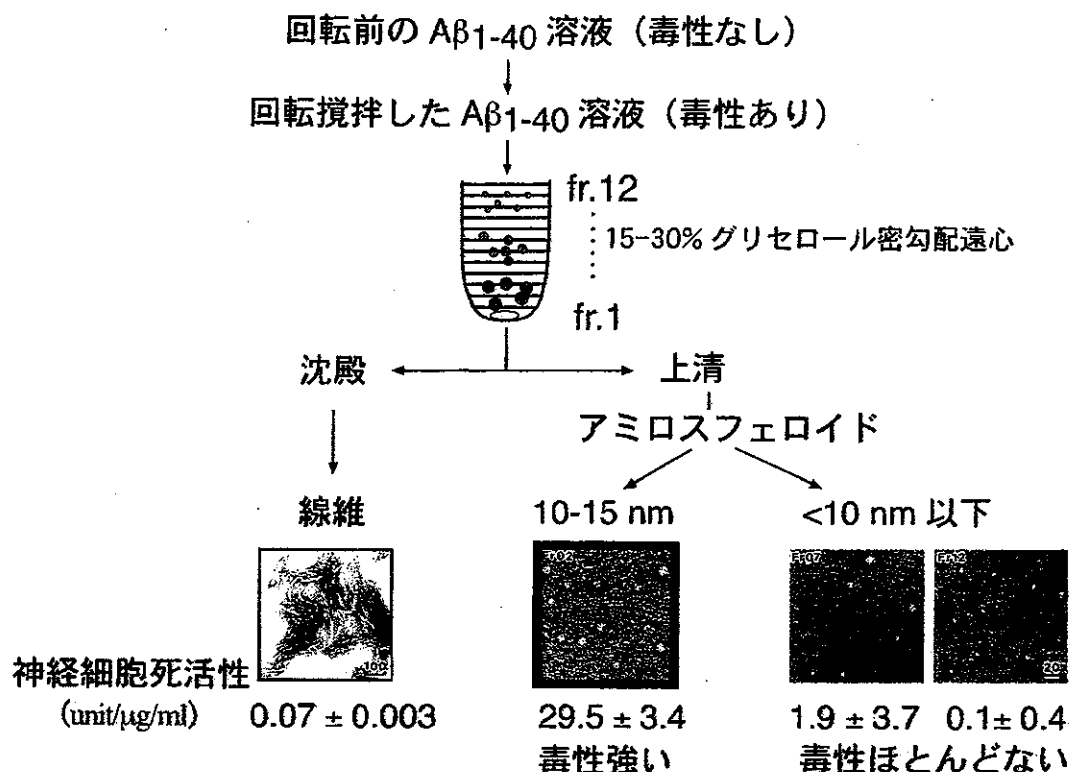


図3 アミロスフェロイドの精製 (文献6)

球状会合体が最初に形成され、かなり遅れて線維が形成される (図2)。

線維への中間体であるプロトフィブリルはある時間が経過すると全て線維になり観察されなくなるが、この微小球は長時間の回転攪拌後も存在している (図2)。また、単離した微小球状構造は長時間おいても、また引き続き回転攪拌しても線維に転換することはない。さらに、線維形成が起きない低濃度の条件下でも形成される⁶⁾。そこで、線維形成に必要な分子間相互作用を阻害することが知られているペプタペプチド (KLVFF, LPFFD)^{18, 19)} を予め大過剰に Aβ₁₋₄₀ 水溶液に加え、その上で回転攪拌を行ったところ、確かに線維形成は阻害されたが、微小球状構造には影響がなく、神経毒性も保たれていた⁶⁾。これらの結果は、この微小球状構造は線維とは少なくとも途中からは異なる形成過程を取る可能性があること、さらに線維ではなく微小球状構造が神経毒性の担い手であることを示唆している。

そこで、この微小球状構造体を「アミロスフェロイド」と名付け、グリセロール密度勾配遠心を

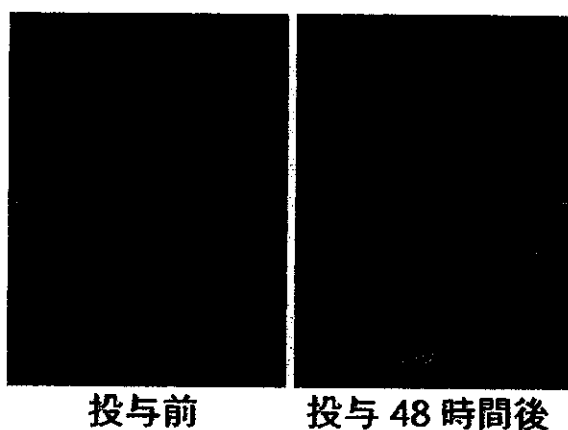


写真2 初代培養細胞に対するアミロスフェロイド毒性の検証

アミロスフェロイド (350pM) 投与後、48時間経過すると核の凝集と分断を伴うアポトーシス様の神経細胞死 (右図インセット) が起き、約4割の神経細胞が失われた。

用いた沈降係数による分離と構造活性相関から、直径10~15nmのアミロスフェロイドが神経細胞死活性を担う実体であることを明らかにした (図3)^{5, 6)}。アミロスフェロイドは、350pMで毒性を示し、初代培養神経では全体の約4割の神経細胞に核の凝集と分断を伴う典型的アポトーシスを起

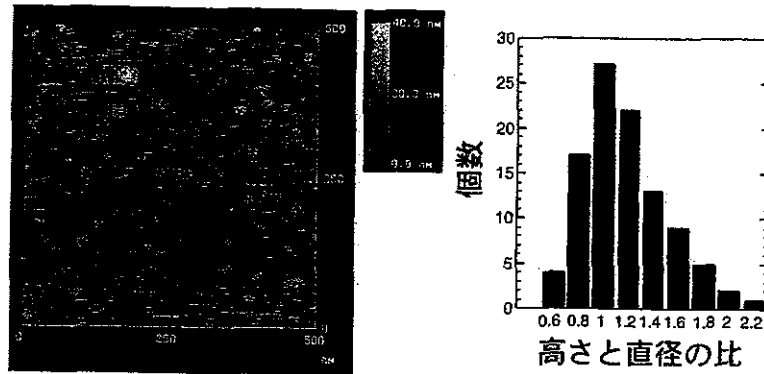
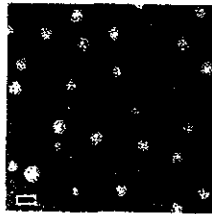


図4 溶液中におけるアミロスフェロイドの原子間力顕微鏡観察画像 (文献 6)

Aβ₁₋₄₂ 由来のアミロスフェロイド



	Aβ ₁₋₄₂ 由来	Aβ ₁₋₄₀ 由来
比活性	100 倍以上	
形成濃度	1-0.01 μM	>0.1 μM
形成時間	8 時間以内	30 時間以上
	(1-0.01 μM)	(50 μM)

写真3 Aβ₁₋₄₂ に由来するアミロスフェロイド (文献 6)

こした (写真2)。一方、同様に精製したアミロイド線維は μM でもほとんど毒性がなかった (図3)。アミロスフェロイドはアミロイド線維の約450倍という強い神経細胞死活性を持つ (図3)。

筆者らは、従来の溶液下における原子間力顕微鏡の観察手法を改良し、ナノスケールでの柔らかいタンパク質観察を可能にすることに成功し (Shibata-Seki, T. *et al.* 未発表データ), 溶液中でのアミロスフェロイドが直径と高さが等しい真球であることを示した (図4)⁶⁾。このように、アミロスフェロイドはプロトフィブリルや ADDLs とは異なる形態を持ち、ADDLs とは構成 Aβ の種類も異なる新たな構造体であることが判明した。前述したとおり Aβ には、40 アミノ酸からなる Aβ₁₋₄₀ と、それに Ile と Ala が付いた Aβ₁₋₄₂ が存在する。そのいずれも線維や可溶性 Aβ を形成するが、アルツハイマー病の発症と相関するのはなぜか Aβ₁₋₄₂ であった。

筆者らは、Aβ₁₋₄₂ が Aβ₁₋₄₀ と同様に直径 10~15nm のアミロスフェロイドを形成するが、Aβ₁₋₄₂

は Aβ₁₋₄₀ よりもアミロスフェロイド形成能力が高く、神経毒性も強いことを証明し、この差が発症との相関の差になっている可能性を示した (写真3)⁶⁾。上記のアミロスフェロイドによる毒性は、前述した神経原線維変化に認められるようなタウ蛋白のリン酸化を行うタウ蛋白リン酸化酵素 I (tau protein kinase I / glycogen synthase kinase-3β) の活性化を伴う^{6, 20)}。アミロスフェロイド投与の初期にこのリン酸化酵素の阻害剤である LiCl を IC₅₀ 濃度である 2mM 投与することでアミロスフェロイド毒性は効果的に抑制可能であるが、アミロスフェロイド投与から遅れて4時間以降の既にタウ蛋白リン酸化酵素 I が活性化した後に阻害剤を投与しても何の影響も認められなかった。従って、アミロスフェロイドの毒性はその神経細胞死シグナル伝達の初期においてタウ蛋白リン酸化酵素 I を活性化し、神経細胞を死に至らしめている可能性が極めて高いことが証明された⁶⁾。従って、今後、アミロスフェロイド (類縁分子) の存在が実証されれば、アルツハイマー病発症と Aβ 蓄積の間に

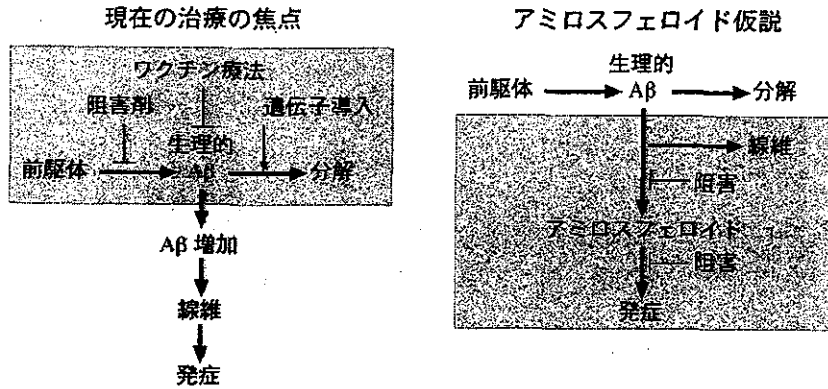


図5 現在の治療の焦点（左図）とアミロスフェロイド仮説による展望（右図）

残る矛盾を解き、過去のタウリン酸化酵素 I の研究も踏まえ^{2, 3)}、アミロスフェロイド形成から神経細胞死、そしてアルツハイマー病発症へと言う一連の流れを提案することが可能となる。

現在の発症阻止の方向性は、生理的 Aβ と病因となる Aβ を区別せずに一網打尽に脳内の Aβ を全て絶つことにある（図 5）。前述したとおり Aβ は APP より恒常的に切り出され、分解されている²⁰⁾。複雑な切り出しの制御もその酵素の全貌も未だ不明であるが、発症全体では非常に少ない割合ではあるが遺伝性のアルツハイマー病では Aβ の切り出しが亢進するため阻害剤が各種開発されているが、副作用の問題が残っている。また、近年、理化学研究所の西道博士らにより分解酵素が同定され²²⁾、遺伝子導入が試みられており、今後の成果が期待される。しかし、Aβ 切り出し/分解はフィードバック制御が働くため、制御機構が不明な現状での長期代謝抑制はリスクを伴うことは否定できない。

アルツハイマー病阻止の救世主に思えたのは、Schenk らが世界に先駆けて示し、その後複数のグループにより追試がされた「ワクチン療法」、即ち合成 Aβ または抗 Aβ 抗体の免疫によるモデルマウス脳のアミロイド線維沈着の消失と記憶学習行動異常の改善である²³⁻²⁵⁾。この療法はマウスでは当初目立った副作用が認められなかったため、作用機序が不明のまま 300 人以上の患者へ Aβ 除去を目的に Aβ が投与されたが、副作用がなかったマウスとは異なり、ヒトでは回復不能な脳炎様

症状が 5% に生じ治験は中止された。Aβ 除去に成功した例も甚大な組織破壊を伴う結果となった。Morgan らのワクチン療法では学習行動の改善はアミロイド線維の減少と相関せずには起きないため、ごく微量に存在する線維以外の Aβ 集合体が標的となったと推測される²⁴⁾。

以上を踏まえると、かくも多様に存在する Aβ 集合体の中で神経毒性を担う構造体を明らかにすることは、一見遠回りのようで効果的な療法への道を開くのではないだろうか。筆者らは、Aβ の様々な集合体から神経毒性を担う特定の構造（アミロスフェロイド）の分離同定に試験管レベルだが世界で初めて成功し、線維には毒性がないことを示した。この結果、生理的 Aβ を阻害しない治療戦略が可能となった（図 5）。アミロスフェロイドがアルツハイマー病の真の要因かどうかは今後の課題だが、これによって起こる神経細胞死の様子はアルツハイマー病で報告されるものと良く対応しており、神経細胞死へ至るカスケードの一翼を担っている可能性は高い。現在、特異的抗体を作製しつつあり、生体での実証を行おうとしている。筆者らの報告と相前後して、Glabe 博士らが金コロイド表面に Aβ を人工的に並べた疑似 Aβ 集合体を抗原として抗体を作り、これが Aβ 集合体混合物の毒性を抑制し、患者脳において老人斑とは異なる部位を染色することを示した²⁶⁾。この抗体が実際に何を認識しているのか今後の解析が待たれる。

3. おわりに

我が国においては社会の急速な高齢化に伴い、痴呆の有病者の比率が年々上昇しており、その中で、予防可能である脳血管性痴呆が減少傾向にある一方で、アルツハイマー病はむしろ増加傾向にあり、将来は逆転する可能性も考えられる。従って、アルツハイマー病の治療法開発は急務であるが、もともと生理的にも存在しているA β の生理作用を阻害することなく疾病を抑えるためには、A β に由来する病因となる分子を同定し、その形成機構を解明することが欠かせない。その基礎的知見は、病気の診断や新たな治療法の開発にもつながる可能性が高い。

前述してきたように可溶性A β の実体は解明されつつあり、病因となるA β の構造体を物理化学的に解析することも夢ではなくなりつつある。しかし、もし仮にアミロスフェロイドないしはその類縁分子が生体内に存在したとしても、発症機構の解明には、生理的A β が「どのような分子機構で毒性を持つ集合体になるのか」、それを「制御する機構は何か」と言う問題を解かなくてはならない。アミロスフェロイドを初めとする複数の異なるA β 集合体が、試験管内で他のタンパク質等の助けを借りることなく形成されること、そしてその内の少なくとも1つである線維は実際にヒト脳で形成されることから、A β は自発的に集合し組織だった構造を形成する「自己組織化能力」を持つと推測される。老化の過程で生理的A β が、集合体へと変わるにあたっては、A β を取り巻く水とイオン環境、そしてシャペロンの作用等が考えられるが、これらは今後の課題である。

筆者らは、今後、アミロスフェロイド形成において「回転攪拌」がどのような物理化学的変化をA β に引き起こしているかを解明するところからこの問題にアクセスしていきたいと考えている。A β に認められるような、老化に伴い集合体が形成されるという現象は、他の神経変性疾患の原因となるタンパク質においても共通に認められる病態である。もしかすると、タンパク質は、自己組

織化能力によって、元々のタンパク質を構成要素としつつもコンフォメーションと連鎖様式が変わることで新たな機能を獲得する動的代謝とでも言うような能力を潜在的には持っているのかもしれない。筆者らの研究はまだ一步を踏み出したところだが、アミロスフェロイドを入り口として病態と老化という生命現象を物理化学的に解き明かしていきたいと思っている。

本稿で述べた研究は、福岡女子大学・佐藤一紀博士との共同研究によるものです。また、ここに記載した成果は科学技術振興機構PRESTO並びに内藤財団の助成により実現したものです。ここに感謝いたします。

文 献

- 1) K. Imahori *et al.*, *Neurobiol of Aging*, **19**, s93-s98 (1998)
- 2) M. Hoshi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2719-2723 (1996)
- 3) M. Hoshi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **272**, 2038-2041 (1997)
- 4) M. Hoshi *et al.*, *Soc. for Neurosci. Abstr.*, **26**, 1283 (2000)
- 5) M. Hoshi, *Cell Technology*, **21**, 728-732 (2002)
- 6) M. Hoshi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6370-6375 (2003)
- 7) D. J. Selkoe, *Physiol. Rev.*, **81** (2), 741-766 (2001)
- 8) J. A. Hardy *et al.*, *Science*, **256**, 184-185 (1992)
- 9) R. D. Terry *et al.*, *Ann. Neurol.*, **30**, 572-580 (1991)
- 10) C. Nilsberth *et al.*, *Nat. Neurosci.*, **4** (9), 887-893 (2001)
- 11) L. F. Lue *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **155** (3), 853-862 (1999)
- 12) Y.-M. Kuo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **271** (8), 4077-4081 (1996)
- 13) M. P. Lambert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** (11), 6448-6453 (1998)

- 14) D. M. Walsh *et al.*, *Nature*, **416** (6880), 535-539 (2002)
- 15) D. M. Walsh *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **274** (36), 25945-25952 (1999)
- 16) D. M. Hartley *et al.*, *J. Neurosci.*, **19** (20), 8876-8884 (1999)
- 17) H. A. Lashuel *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **332** (4), 795-808 (2003)
- 18) L. O. Tjernberg *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **271** (15), 8545-8548 (1996)
- 19) C. Soto *et al.*, *Nat. Med.*, **4** (7), 822-826 (1998)
- 20) M. Hoshi *et al.*, *Soc. for Neurosci. Abstr.*, **25**, 2125 (1999)
- 21) T. C. Saido, in *A β metabolism and Alzheimer's disease*, edited by T. C. Saido (Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA, 2002), pp.1-26
- 22) N. Iwata *et al.*, *Nat. Med.*, **6** (2), 143-150 (2000)
- 23) D. Schenk *et al.*, *Nature*, **400** (6740), 173-177 (1999)
- 24) C. Janus *et al.*, *Nature*, **408** (6815), 979-982 (2000)
- 25) D. Morgan *et al.*, *Nature*, **408** (6815), 982-985 (2000)
- 26) R. Kaye *et al.*, *Science*, **300** (5618), 486-489 (2003)

治験薬・新薬市場年報2002 aiReport 2002

Annual Investigational-Drug Report

星・詳細パンフレット

構成および内容

〈中枢神経用薬〉

全身麻酔剤・麻酔補助剤、睡眠障害治療剤、横日リズム障害治療剤・★、過眠症治療剤・★、抗てんかん剤、非ステロイド性抗炎症剤、コキシブ系選択的COX-2阻害剤、抗リウマチ剤、新免疫調節型抗リウマチ剤、生物学的製剤、変形性関節症治療剤、鎮痛剤、片頭痛治療剤、抗不安剤、5-HT1Aゴニスト、抗うつ剤、精神分裂病(統合失調症)治療剤、MARTA系抗精神病剤・★、アルツハイマー病治療剤、神経変性疾患治療剤、抗パーキンソン病剤、禁煙補助剤

〈末梢神経系・感覚器官用薬〉

局所麻酔剤、末梢性筋弛緩剤、ボツリヌス毒素製剤・★、中枢性筋弛緩剤、鎮けい剤・★、線内障治療剤、PG関連線内障治療剤・★、抗炎症点眼剤、眼科用抗アレルギー剤、眼科用抗感染症剤、眼科手術補助剤・角膜上皮障害・ドライアイ治療剤

〈呼吸器疾患治療薬〉

アレルギー・喘息治療剤、化学伝達物質遊離抑制剤・★、Th2サイトカイン阻害剤・★、ステロイド・気管支拡張剤、喘息治療用ステロイド剤・★、吸入用ブタイス・★、鎮咳去痰剤、呼吸器障害治療剤・★、呼吸器感染症群(RDS)治療剤・★、急性呼吸器感染症群(ARDS)治療剤・★、全身性炎症反応性疾患に伴う急性肺障害治療剤・★

〈循環器用薬〉

抗心不全剤、抗不整脈剤、利尿剤、高血圧症治療剤、ACE阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、カ

ルシウム拮抗剤、 β 受容体拮抗剤、 α 1受容体遮断剤、血管拡張剤、肺高血圧症(PAH)治療剤・★、狭心症治療剤、脳血管障害治療剤、急性期脳血管障害治療剤・★、高脂血症治療剤

〈消化器官用薬〉

シェーグレン症候群治療剤、抗潰瘍剤、制吐剤、消化器官機能改善剤、過敏性腸症候群治療剤、炎症性腸疾患(IBD)治療剤

〈ホルモン系用薬〉

ヒト成長ホルモン製剤、ホルモン製剤、排卵誘発剤・★、子宮内膜症・筋腫治療剤、更年期障害治療剤

〈泌尿器・生殖器用薬〉

低用量ピル、切迫早・流産治療剤、泌尿器科用剤、泌尿器系障害治療剤・★、腸管性膀胱炎治療剤・★、尿路結石症治療剤・★、性機能障害治療剤、前立腺肥大症治療剤、頻尿・尿失禁治療剤、腎臓病治療剤

〈外用薬〉

殺菌消毒剤、褥瘡・皮膚潰瘍治療剤、経皮吸収消炎鎮痛剤・皮膚疾患治療剤、アレルギー性皮膚炎治療剤・★、乾燥性皮膚疾患治療剤・★、経皮吸収性疼痛治療剤・★、外用ステロイド剤、ご瘻治療剤、尋常性ざ瘡治療剤・★、乾癬治療剤、皮膚真菌症用抗真菌剤、育毛剤・発毛剤

〈ビタミン・栄養強壮薬〉

経管・経腸液分泌薬剤、臓器不全用アミノ酸製剤・★

〈血液・体液用薬〉

輸液剤・★、電解質輸液・★、TPN用基本液・★、

アミノ酸製剤・★、微量元素製剤・★、脂肪乳剤・★、栄養輸液用キット製剤・★、血液凝固阻害剤、静脈血栓症治療剤、血栓溶解剤・★、抗血栓剤、血小板凝集蛋白阻害剤・★、造血因子製剤、赤血球増殖因子製剤・★、貧血治療剤・★、白血球増殖因子製剤・★、人工腎臓透析液、腹膜透析液

〈代謝性医薬品〉

肝臓病用剤、ペグインターフェロン・★、経口糖尿病用剤、インスリン抵抗性改善剤、糖尿病合併症治療剤、抗肥満剤、インスリン製剤、骨粗鬆症治療剤、降圧治療剤・★

〈腫瘍用薬〉

抗癌剤(総合分析)、アルキル化系抗癌剤、白金錯体系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、BRM・サイトカイン類、抗体医薬・★、分子標的薬治療剤、ホルモン系抗癌剤、抗癌性抗体医薬、光線力学的療法用光増感剤、癌治療補助剤

〈抗生物質・化学療法剤〉

マクロライド系抗生物質、経口セフェム系抗生物質、注射用セフェム系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、その他の抗生物質、MRSA・VRE・PRSF感染症治療剤、カルバペネム系抗生物質、ベネム系抗生物質、全身性抗真菌剤、ニューキノロン系合成抗菌剤、抗ウイルス剤、インフルエンザ治療剤、抗エイズ薬

〈検査用薬〉

造影剤、X線造影剤、MRI用造影剤、超音波用造影剤

(★は2002年版の新規テーマ)

■体裁/A4判・1221頁 ■発行/2002年12月 ■定価/本体58,000円+税

〈発行〉 シーマ・サイエンスジャーナル

〈販売〉 **シーエムシー出版**

〈申込〉 TEL 03-3293-2061 FAX 03-3293-2069

http://www.cmcbooks.co.jp/

球状 β アミロイド凝集体アミロスフェロイド —蛋白質の自己組織化と神経細胞死

Spherical aggregates of β amyloid, 'amylospheroid'; Self-organization of proteins and neurodegeneration

三菱化学生命科学研究所
アルツハイマー病発症機序解明チームリーダー

Minako Hoshi 星美奈子

Summary

蛋白質は特定の三次構造をとることで生理的機能を果たす。「異常構造蛋白質」の凝集と蓄積は、アルツハイマー病(AD)をはじめとする多くの神経変性疾患に共通の病態であるのみならず、病因である可能性も高くなっている。しかし、個々の疾患における凝集体の構造も作用機序もまだ十分解明されてはいない。 β アミロイド($A\beta$)は、AD発症への引き金を引くと考えられているが、若年時から生理的ペプチドとして存在する $A\beta$ が、老人の脳で神経毒性をもつに至る物理化学的機構はまだまだ謎である。われわれは、 $A\beta$ が神経細胞死活性を獲得するに至る機構の解明に取り組み、化学合成した $A\beta$ の水溶液を回転攪拌させることで、球状の凝集体が形成されることを見出した。10~15 nmのこの球状 $A\beta$ 凝集体の毒性は線維の約450倍も強く、これを「アミロスフェロイド」と名づけた。今回、発見の経緯と今後の展望を報告したい。

Key words

- 蛋白質の自己組織化
- タウ蛋白質リン酸化酵素
- カルシウム
- in situ* 原子間力顕微鏡観察

1 はじめに—アルツハイマー病発症に残された4W1H

老人斑の主要成分である β アミロイド($A\beta$)が、アルツハイマー病(AD)発症の鍵であることは間違いがない¹⁾。しかしながら、若年時から恒常的に生産されている $A\beta$ が、その生理的意義の是非は脇におくとして、老人の脳において神経毒性をもつに至るその分子メカニズムはまだまだ謎である。もし、 $A\beta$ が真にADの発症のトリガーであるとするならば、残された課題は図1に示したとおりである。すなわち、 $A\beta$ に由来する神経毒性の構造は何か(what)、その毒性構造体によって何が引き起こされ神経の機能不全と脱落が起きるのか(how)、若年時より生産されている $A\beta$ がいつ(when)、どこで(where)、なぜ(why)毒性構造体になるのか、この4W1Hが生物の言葉で説明できたときにはじめてAD発症の分子メカニズムが明らかになったといえるであろう。われわれは、最初の手がかりを求め、 $A\beta$ の構造と毒性の問題に取り組んだ結果、非常に強力な毒性をもつ新たな球状 $A\beta$ 凝集体「アミロスフェロイド」を同定した(図1)²⁾。今回、その経緯を紹介するとともに、われわれが現在取り組んでいる新たな試みにも少しだけ触れたい。

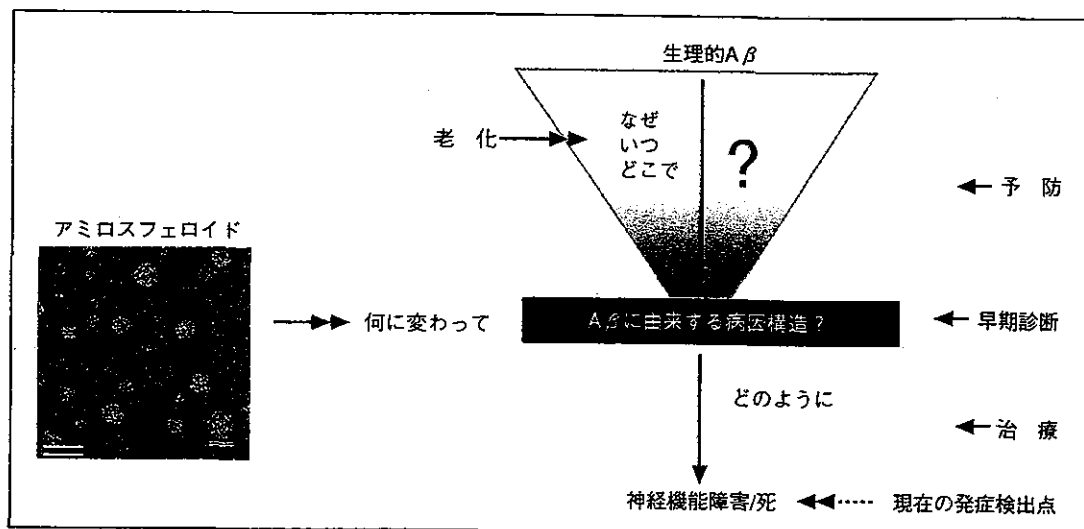


図1 アルツハイマー病発症に残された4W1H
 生理的Aβではマスクされていた毒性構造が、老化に伴い会合するAβに切り替わり、「特定の構造」をとることで顕在化し、神経細胞死を引き起こす。線維などには毒性がなく、一種の生体防御反応である可能性も考えられる。インセットはアミロスフェロイドの電子顕微鏡観察像。スケールは左が20nm、右が10nm。

II 4W1Hのwhatの探索 —アミロスフェロイドの同定

蛋白質は「かたち」をもつことで機能を果たす。理論的には、アミノ酸が直鎖状に連結した蛋白質のコンフォメーションは無数にあるが³⁾(たとえばAβ₁₋₄₀であれば10⁴⁰通り)、現実にはある特定の三次構造によく固定されていることが多い。したがって、遺伝情報(DNAの塩基配列)が決まれば、構造そして機能が決まると考えられていた⁴⁾。しかしながら、生体で新たに合成された蛋白質が折り畳まれるフォールディングの過程は必ずしも自動的ではなく、さらには翻訳後修飾や、最近見出されたプロテインスプライシングなど、蛋白質の構造と機能の問題は予想外に複雑で精密な制御を受けているようである。さらに、ADをはじめとする複数の神経変性疾患において、異常構造蛋白質の凝集と蓄積が共通の病態として認められることも⁵⁾、現在の遺伝情報の理解では説明できない構造と機能の問題がまだ存在することを示唆している。

老人の脳においてADの病因となるAβは、若年時から生理的にも低レベルながら存在しており、アミロイド前駆体蛋白質(APP)から恒常的に切り出され、そして分解されている⁶⁾。この生理的Aβについては、代謝産物の副生成物(つまりゴミ)であるとの考えと、神経細胞の維持に関わるとの報告があり、その機能は不明である。老人の脳ではなんらかの原因でAβの生産と分解のバランスが崩れたと考えられ、前駆体からの切り出しの亢進、あるいは分解の低下の両面から研究が進められている。特に遺伝性ADでは、多くの場合42アミノ酸残基のAβ₁₋₄₂の切り出しが亢進しており、γセクレターゼの分子実体をめぐって現在も熾烈な競争が行われている。一方、Aβの分解経路については、ネプリライシンが生体におけるAβ₁₋₄₂分解酵素であることが示され⁷⁾、孤発性AD脳の発症初期においてネプリライシンレベルが正常よりも有意に低下していることが報告された⁸⁾。今後ネプリライシンの制御機構、特に孤発性ADとの関係解明が待ち望まれる。

しかし、脳内Aβの蓄積だけで発症が引き起こされるのであろうか? Aβ生産と分解のバランスだけでは、あ

る種の遺伝性 AD で $A\beta$ 量や線維形成の促進が認められないにもかかわらず、なぜ早期発症するのか⁹⁾、そして多量の老人斑を蓄えながら生前に痴呆を全く発症しない老人たちがなぜ存在するのか¹⁰⁾、などを説明することは困難である。筆者は、MAP (mitogen-activated protein) キナーゼの同定に関わった関係から、AD 脳においてタウ蛋白質のリン酸化に関わるタウ蛋白質リン酸化酵素 I (tau protein kinase I / glycogen synthase kinase-3 β ; TPKI / GSK-3 β) による神経細胞死機構の解明を $A\beta$ を用いて行っていた。その過程で、 $A\beta$ 線維が神経細胞死を担うという当時の主流仮説に疑問を感じ、当時東京都老人総合研究所の神経病理部長であった水谷俊雄氏のご厚意により、AD 患者脳の病理学的解析に取り組む機会を得た。そして、線維の蓄積部位と神経細胞脱落の部位が必ずしも一致しないことから、真の神経毒性の担い手はまだ同定されていないのではないかと思うに至った。

その当時、 $A\beta$ が「神経毒性を発揮する」ためには自己会合が必要ということは明らかになっていたが¹¹⁾、研究者により独自の方法で会合させた $A\beta$ は時に異なる活性を示し、また同じ調製方法を用いても原材料となる化学合成した $A\beta$ の供給先やロットによっては毒性すら発揮されないということが知られていた。さらに、42アミノ酸残基の $A\beta_{1-42}$ と 40アミノ酸残基の $A\beta_{1-40}$ の問題も残されていた。そのどちらも脳内で線維を形成しており、*in vitro* では神経細胞死活性をもつにもかかわらず、AD の発症と相関するのは $A\beta_{1-42}$ であった。これらを総合すると、 $A\beta$ が神経細胞死活性をもつのは、ある特定の「かたち」をとったときであり、それは線維ではないと考えられる。そして、老人の脳において $A\beta$ が蓄積しても、その特定の「かたち」をとらないかぎり痴呆にはならず、 $A\beta_{1-42}$ は $A\beta_{1-40}$ よりもこの特定の「かたち」をとりやすいのではないかと考えた。そこで、あえて会合しにくいとされている $A\beta_{1-40}$ を選び、化学合成により同一のロットを大量に確保し、各種条件下での $A\beta$ 会合体形成と神経毒性の関係を検証した(野口・佐藤・星、未発表データ)。その結果、溶かした直後は毒性をもたない $A\beta_{1-40}$ の溶液が、ゆっくり回転攪拌することで神経毒性をもつように変わることを発見した¹²⁾。この系を用いて構造

と毒性の関係を調べると、回転攪拌の初期に形成される球状 $A\beta$ 会合体と毒性が相関することを見出した(図 2)。線維の中間体であるプロトフィブリル(protofibril)や線維は回転攪拌の中期から後期にかけて形成されるが、それによって神経毒性が強くなるということはなかった。さらに、線維形成の中間体であるプロトフィブリルは最終的にはすべて線維に変換され観察されなくなるが、球状 $A\beta$ 会合体は線維に変換されることなく長時間の回転攪拌後も存在していた(図 2)。そこで、この球状 $A\beta$ 会合体をアミロスフェロイドと名づけ、アミロスフェロイドと線維形成の関係をさまざまな条件下で調べた。その結果を箇条書きにまとめる。

①回転により線維とアミロスフェロイドが、回転なしでは線維のみが形成される。

② β シート阻害ペプチド¹³⁾¹⁴⁾は、線維形成を阻害するが、アミロスフェロイド形成も毒性も阻害しない。

③単離したアミロスフェロイドは 1 年以上安定に構造を保ち、引き続き回転を加えても線維には変わらない。

④アミロスフェロイド形成は線維形成が起きない 100 μ M 以下でより形成されやすい。

⑤もしアミロスフェロイドが線維形成の中間体であるならば、最終的に線維しか形成されない条件下でも必ず一度はアミロスフェロイド形成が起きるはずである。しかしながら線維しかできない各種条件下で途中経過を調べてもそのような事実は認められない。

⑥線維形成の至適条件とアミロスフェロイド形成の至適条件は明らかに異なる(野口・佐藤・星、未発表データ)。

以上から、アミロスフェロイドは線維形成の中間体ではなく、どこかで形成経路が分岐していると考えられた。そして、神経毒性の担い手は線維ではなく、アミロスフェロイドであることが示唆された。そこでさらに精製を進め、グリセロール密度勾配遠心を用いた沈降係数による分離と構造活性相関から、直径 10~15nm のアミロスフェロイドが神経細胞死活性を担う実体であることを明らかにした(図 2B)¹²⁾。アミロスフェロイドは、線維の約 450 倍の強い神経毒性をもち、350pM の濃度で初代培養神経では全体の約 4 割の神経細胞に核の凝集と分断を

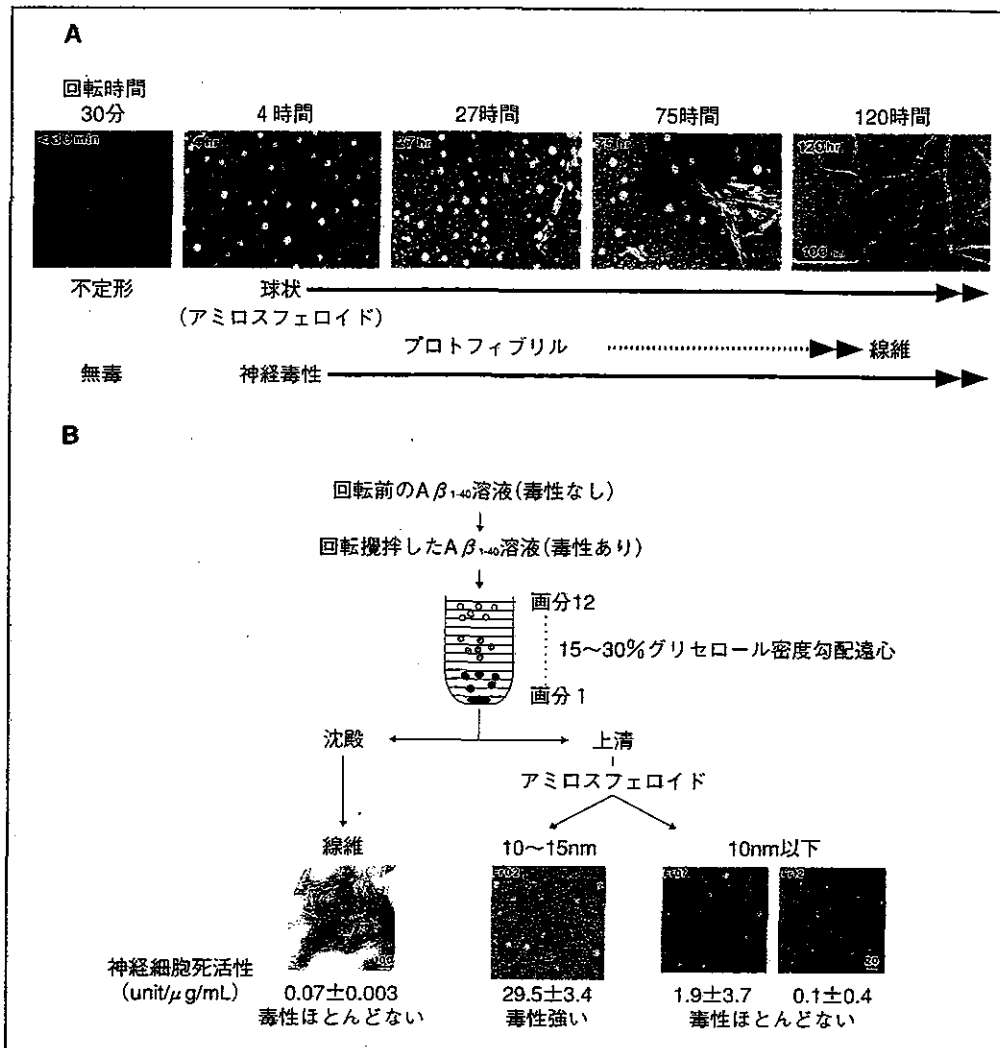


図2 アミロスフェロイド形成と精製

伴う TUNEL で染色されるアポトーシスを起こした。一方、同様に精製した線維は μ M でもほとんど毒性がなかった(図2B)。これと同様の手法を用いて、われわれは $A\beta_{1-42}$ もアミロスフェロイドを形成することを見出したが、 $A\beta_{1-40}$ と同様に直径10~15nm のアミロスフェロイドを形成するものの、 $A\beta_{1-42}$ はアミロスフェロイド形成能力が非常に高く、かつ形成されたアミロスフェロイドの神経毒性も強く(図3)、この差が発症との相関の差になっている可能性を示した²¹⁵⁾。

アミロスフェロイド 神経細胞死機構

上記のアミロスフェロイドによる毒性は、前述した神経原線維変化に認められるようなタウ蛋白質のリン酸化を行う TPKI の活性化を伴う¹²⁾¹⁵⁾。アミロスフェロイド投与の初期にこのリン酸化酵素の阻害剤である LiCl を IC_{50} (50%抑制濃度)である 2 mM 投与することで、アミ

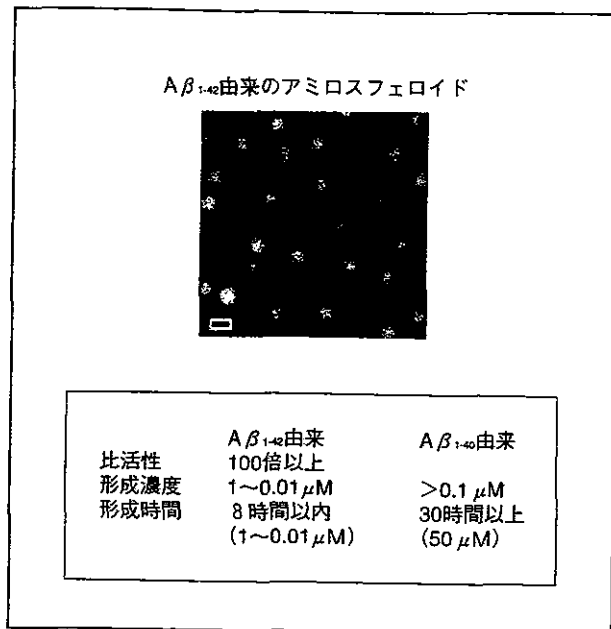


図3 A β_{1-42} はアミロスフェロイド形成能力が高い

ロスフェロイド毒性は効果的に抑制可能であるが、アミロスフェロイド投与から遅れて4時間以降のすでにTPKIが活性化しただけに阻害剤を投与しても何の影響も認められなかった。したがって、アミロスフェロイドは、その神経細胞死シグナル伝達の初期においてTPKIを活性化し、神経細胞を死に至らしめている可能性がきわめて高い¹²⁾。今後、アミロスフェロイド(類縁分子)の存在が実証されれば、過去のTPKIの研究も踏まえ¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、AD発症とA β 蓄積の間に残る矛盾を解き、アミロスフェロイド形成から神経細胞死、AD発症へという一連の流れを提案することが可能となる。しかし一方で、アミロスフェロイドは、投与直後から細胞外からのカルシウム流入と自発的カルシウムスパイクの亢進を誘起し、カルシウムシグナルによる細胞死が作用している可能性が示唆された¹⁹⁾。これらがそれぞれ加算的に神経細胞死を引き起こしているのかどうか、現在検討中である。

ヒト脳では、AD発症初期に一過性に細胞内A β 、特にA β_{1-42} の細胞内蓄積が細胞外の沈着に先行して認められている。細胞内A β は β シートをもたないことから

線維ではないが、それではどのような構造であるかは今のところ不明である。この細胞内A β の重要性は、培養細胞の細胞質にA β_{1-42} をマイクロインジェクションすることで細胞死が引き起こされるという報告²⁰⁾からも注目されている(詳細は本特集 武田らの「細胞内外のアミロイド β 蛋白質と細胞毒性」参照)。しかし、それでは細胞質とは膜で隔てられている分泌経路で切り出されるA β が、いかにして細胞質に入るのか? という新たな疑問が生じる。われわれの予備的知見では、細胞外から投与したアミロスフェロイドは細胞内に取り込まれること、毒性の強さと取り込みにある程度相関があることがわかってきた(星, 未発表データ)。現在、この取り込みの機構に迫りつつあり、細胞内と細胞外A β の謎を解明する糸口となるのではないかと期待している。

Ⅳ アミロスフェロイドの「かたち」の可視化

上記研究に取り組んでいる過程で、患者脳から老人斑よりもより穏和な条件で抽出可能な「可溶性A β ²¹⁾」(2~数百量体の混合物で、40アミノ酸残基のA β_{1-40} 、42アミノ酸残基のA β_{1-42} の双方からなる)の増加が、シナプス減少とよく対応することがわかり、線維ではない構造体が注目されるようになっていた¹⁰⁾²²⁾。その結果、各種の非線維のA β 集合体が同定されるに至った(詳細は本特集他項参照)。最も主要なものは、線維へ至る中間体であるプロトフィブリル(β シート構造をもつ幅4~10nm、長さ200nm以下のさまざまなサイズの「ひも」である)²³⁾²⁴⁾とA β_{1-42} 会合体混合物(3~6量体を中心に24量体まで)であるA β -derived diffusible ligands(ADDLs)²⁵⁾である。プロトフィブリル、ADDLsともに神経細胞死活性を示すが、いずれも会合体混合物のまま扱われており、その中で神経細胞死活性を担う実体は不明である。ADDLsに関しては、2003年の北米神経科学会の年會においてゲル濾過による精製が報告された。神経細胞死活性は14kDa以下の画分にはなく、ゲル濾過上で分子量50kDa以上の画分にあるという。しかし、3量体(~14kDa)から24量体(~108kDa)まで含まれるADDLsのいずれ

が(それともすべてが)神経細胞死を引き起こすのかどうかは今のところ不明である。これらの線維ではないA β 集合体を線維形成の中間体と捉える見方もあり、最近の研究の1つのトレンドとなっているが、いずれにせよ、A β の種類においても、A β の集合の程度においても不均一な混合物であり、これらが線維形成の中間体であるかどうかも含めて、その形成機構、物理化学的性質のほとんどは不明である。

したがって、これらの混合物である集合体とアミロスフェロイドを比較するには、現状では「見る」しかない。そこで、技術的には困難であるがゆえにまだあまり行われていない溶液下でのnmスケールの蛋白質の*in situ*原子間力顕微鏡観察に挑戦することとした。そして、各種の改善を行った結果、忽然とある日アミロスフェロイドの姿が浮かび上がり、直径と高さの定量から確かにアミロスフェロイドは溶液中で直径=高さの真球であることを示した(図4)²⁾。現在、この手法をさらに改善し定量の精度を上げているところである。この結果から、アミロスフェロイドはプロトフィブリルやADDLsとは異なる形態をもつ新たな構造体であることが証明されたのである。



蛋白質の自己組織化から老化へ

わが国においては社会の急速な高齢化に伴い、痴呆の有病者の比率が年々上昇しており、その中で予防可能である脳血管性痴呆が減少傾向にある一方で、ADはむしろ増加傾向にあり、将来は逆転する可能性も考えられる。したがって、ADの治療法開発は急務であるが、もともと生理的にも存在しているA β の生理作用を阻害することなく疾病を抑えるためには、A β に由来する病因となる分子を同定し、その形成機構を解明することが欠かせない。その基礎的知見は、疾患の診断や新たな治療法の開発にもつながる可能性が高い。前述してきたように可溶性A β の実体は解明されつつあり、病因となるA β の構造体を物理化学的に解析することも夢ではなくなりつつある。しかし、もし仮にアミロスフェロイドないしはその類縁分子が生体内に存在したとしても、発症機構の解明には、生理的A β が「どのような分子機構で毒性をもつ集合体になるのか」、それを「制御する機構は何か」という問題を解かなければならない。毒性構造体が線維の中間体ではなく、線維がむしろ毒性構造体への生体防御反応であるならば、生理的A β や線維形成を阻害

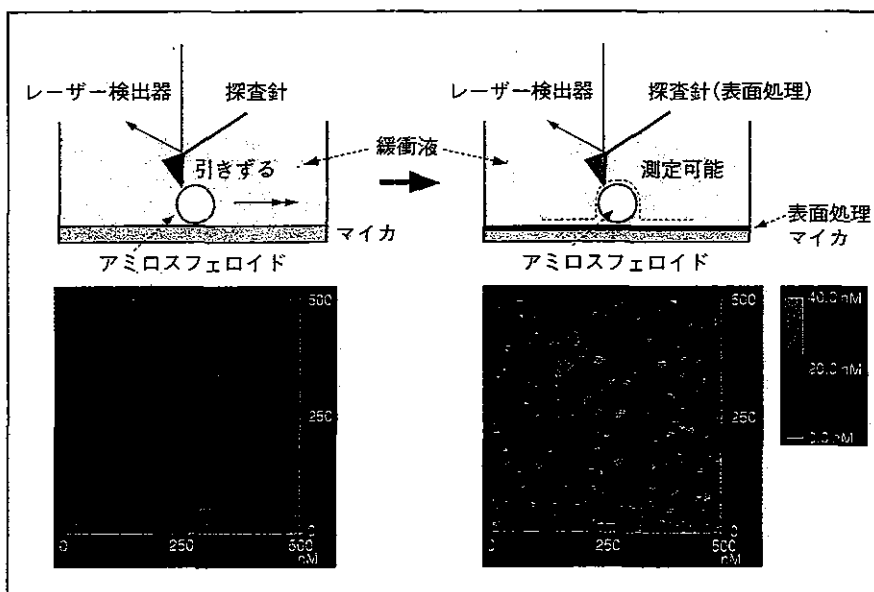


図4 溶液中におけるアミロスフェロイドの原子間力顕微鏡観察画像

しない治療戦略が可能かもしれない。アミロスフェロイドをはじめとする複数の異なる $A\beta$ 集合体が、試験管内で他の蛋白質などの助けを借りることなく形成されること、そしてそのうちの少なくとも1つである線維は実際にヒト脳で形成されることから、 $A\beta$ は自発的に集合し組織だった構造を形成する「自己組織化能力」^[20-22]をもつと推測される。われわれの実験結果が示すように、もしアミロスフェロイド形成経路と線維形成の経路が分岐するのであるとすれば、 $A\beta$ には少なくとも2通りの自己組織化プログラムが内在しており、外的環境に応じて切り替えている可能性が考えられる。生体においては、老化の過程で生理的 $A\beta$ が会合するようになり、さらにどの会合経路をとるかという、少なくとも2段階の制御が働いている可能性が考えられる。その制御には、 $A\beta$ をとりまく環境、すなわち細胞内の水とそこに含まれるイオン、そしてシャペロンの作用などが考えられるが、これらは今後の課題である。したがって、アミロスフェロイドならびに線維形成に至る分子機構の解明は、病態の解明のみならず、その背景にある老化を分子レベルで理解する手がかりとなるであろう。われわれは、アミロスフェロイド形成において「回転攪拌」がどのような物理化学的变化を $A\beta$ に引き起こしているかを解明するところからこの問題にアクセスしていきたいと考えている。

VI おわりに

癌・糖尿病・高血圧・アレルギー性疾患・痴呆の五大疾患のうち4つまでもが老化と密接な関係がある。すなわち、遺伝子は同一ながら、老化によってさまざまな疾患にかかりやすくなるわけである。生物の最大の特徴は、誕生から死へと「不可逆な過程」をたどることであることを考えると、今後、老化によって遺伝子産物がいかに変わるのかという課題が遺伝子型と表現形の間を埋めるために必要であろう。 $A\beta$ に認められるような、老化に伴い集合体が形成されるという現象は、他の神経変性疾患の原因となる蛋白質においても共通して認められる病態である。これらの集合体は、もともとの蛋白質を構

成要素としつつもコンフォメーションと連鎖様式が変わることで新たな機能を獲得している。もしかすると、蛋白質には同じ遺伝子に基づきながらも、生体が誕生から成熟、そしてその個体の死へと向かう時間の流れに応じて、この構造代謝とでもいべき動的な自己組織化能力を発揮する能力が組み込まれているのかもしれない。われわれの研究はまだ一步を踏み出したところだが、アミロスフェロイドを入り口に、今後必要とされる技術革新を行い「視えない」ものを視えるようにしつつ、病態と老化という生命現象を物理化学的に解き明かしていきたいと思っている。

文献

- 1) Selkoe DJ : Alzheimer's disease ; Genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81 : 741-766, 2001
- 2) Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, et al : Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I / glycogen synthase kinase-3 β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 6370-6375, 2003
- 3) Finkelstein AV : Protein structure ; What is it possible to predict now? *Curr Opin Struct Biol* 7 : 60-71, 1997
- 4) Anfinsen CB : Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181 : 223-230, 1973
- 5) Sherman MY, Goldberg AL : Cellular defenses against unfolded proteins ; A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29 : 15-32, 2001
- 6) Saido TC : Overview- $A\beta$ metabolism ; From Alzheimer research to brain aging control. in *$A\beta$ metabolism and Alzheimer's disease*, ed by Saido TC. Texas, Landes Bioscience, 1-26, 2002
- 7) Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, et al : Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma ; Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6 : 143-150, 2000
- 8) Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, et al : Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain ; A possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* 297 : 97-100, 2001
- 9) Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, et al : The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 4 : 887-893, 2001
- 10) Lue LF, Kuo YM, Roher AE, et al : Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic

- change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155 : 853-862, 1999
- 11) Lorenzo A, Yankner BA : β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 12243-12247, 1994
 - 12) Hoshi M : How to prevent deleterious oligomerization of misfolded proteins in aging? *Cell Technology* 21 : 728-732, 2002
 - 13) Tjernberg LO, Naslund J, Lindqvist F, et al : Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J Biol Chem* 271 : 8545-8548, 1996
 - 14) Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, et al : Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis ; Implications for Alzheimer's therapy [see comments]. *Nat Med* 4 : 822-826, 1998
 - 15) Hoshi M : Neurotoxicity and neuronal dysfunction induced by amyloid- β . *J Clin Exp Med* 189 : 22-27, 1999
 - 16) Imahori K, Hoshi M, Ishiguro K, et al : Possible role of tau protein kinases in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19 : S93-S98, 1998
 - 17) Takashima A, Noguchi K, Sato K, et al : Tau protein kinase I is essential for amyloid β -protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 : 7789-7793, 1993
 - 18) Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, et al : Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 2719-2723, 1996
 - 19) Kobayashi NR, Hirasawa T, Yoshida N, et al : β -amyloid 1-40 disrupts calcium homeostasis of selective hippocampal neurons in organotypic slice culture. *Abstr Soc Neurosci* 25 : 342, 1999
 - 20) Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, et al : Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol* 156 : 519-529, 2002
 - 21) Klein WL, Krafft GA, Finch CE : Targeting small A β oligomers ; The solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24 : 219-224, 2001
 - 22) Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, et al : Water-soluble A β (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 271 : 4077-4081, 1996
 - 23) Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, et al : Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 19 : 8876-8884, 1999
 - 24) Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, et al : Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274 : 25945-25952, 1999
 - 25) Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, et al : Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 6448-6453, 1998
 - 26) Bushev M : Synergetics, chaos, order, self-organization. London, World Scientific, 1994
 - 27) Nicolis G, Prigogine I : Self-organization in non-equilibrium systems. New York, Wiley, 1977
 - 28) Yates FE : Self-organizing systems ; The emergence of order. New York, Plenum, 1987