

出典：厚生省、国立社会保障・人口問題研究所

図1 日本における年齢別人口の推移

国立社会保障・人口問題研究所の調査に基づき、2050年のデータは中位推計による。高齢者人口の割合は2000年現在の17.4%から、2050年には35.7%の水準に達する。即ち、2.8人に1人が高齢者となる計算である。実線は男性、破線は女性を表す。

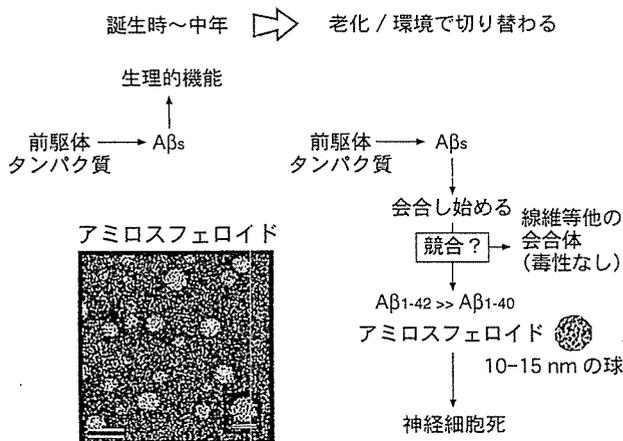


図2 アミロイド仮説

生理的Aβではマスクされていた毒性構造が、老化にともない会合するAβに切り替わり、特定の構造を取ることで顕在化し、神経細胞死を引き起こす。線維等には毒性がなく、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イドの電子顕微鏡観察像。スケールは左が20nm、右が10nm。

1. 神経変性疾患と異常構造タンパク質の蓄積

我々が、研究の対象としているアルツハイマー病は、主要な神経変性疾患である。神経変性疾患とは、「血管障害、感染、中毒などのような明らかな原因がつかめない一群の神経疾患」²⁾とあるように、その発症機構は未知のものが多く、神経変性疾患とは原因不明であるということと同義語である状況が続いていた。しかし、徐々にそれぞれ

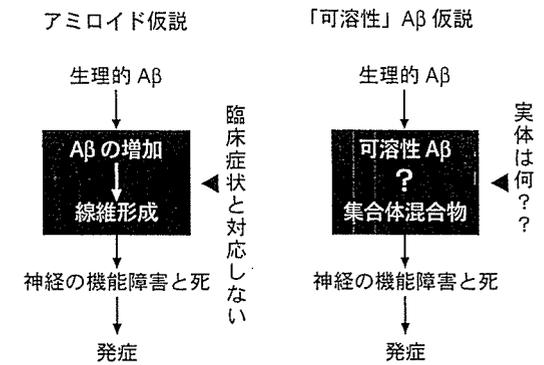


図3 アミロイド仮説(左)と可溶性Aβ仮説(右)

の疾患における発症の原因が明らかになり、さらに発症の原因となるタンパク質を物質レベルでも取り扱えるように変わりつつある。そして、この何年間かの医学研究の進歩から、「異常構造タンパク質の凝集」が共通の病態であり、かつ病因であることが明らかになってきた³⁾。しかしながら、それぞれの疾患において病因となるタンパク質が、なぜ生理的役割をはなれて病因となるのか、それはどのような構造変化を伴い、その結果神経の機能がなぜ阻害されるのかはまだ十分には理解出来ていないのが現状である。現時点で言えることは、いずれの場合もヒトが年を取ることと密接な関係にあるということである。従って、ヒトが老化する中で遺伝子(産物)がいかに変わるかが重要な課題となる。

アルツハイマー病の場合、2通りの異常構造タンパク質が脳に蓄積する。一つは脳のシミと呼ばれる「老人斑」を構成するAβ、もう一つは細胞内にたまる神経原線維変化を構成するリン酸化されたタウタンパク質である。1906年に学会で症例報告されて以来の初期の論争は、脳に残されたこの2通りの痕跡が、原因であるのか、結果であるのかという点に集中していた。そして、生化学・病理学・遺伝学・モデル動物実験などの各種の知見から、ようやくこの二つの特徴のうち、アルツハイマー病発症の上流は「Aβの蓄積」であり、神経原線維変化は比較的共通に認められる現象と考えられるに至った⁴⁾。当研究所においても、タウタンパク質リン酸化酵素I (tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3β⁵⁾: TPKI/GSK-3β)を同定し⁶⁾、AβによりTPKI/GSK-3βが活性化され、神経細胞死が起きることを明らかにしてきた⁷⁻¹⁰⁾。しかし、一方でAβとアルツハイマー病の関係はより複雑であった。老人の脳においてはアルツハイマー病の病因となるAβは、若い時から生理的ペプチドとして(その機能は未だ不明だが)アミロイド前駆体タンパク質(APP)から恒常的に切り出され、そして分解されている。このAβ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Aβ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¹¹⁾ (アミロイド仮説) (図3)。しかし、この「A β 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 β 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¹²⁻¹⁴⁾。最近発見されたArctic家系は、突然変異でA β 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 β 量は増加してはいない¹⁵⁾。さらに、多量のA β 線維を蓄えながら一見正常である老人達の存在もあり¹⁴⁾、A β 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3)。筆者も、前述のタウタンパク質リン酸化酵素Iによる神経細胞死シグナルカスケードの解明を目的に、初代培養神経にA β を投与してきたが、その過程で線維説には疑問を感じるようになった。そして、当時、東京都老人総合研究所の神経病部長であった水谷俊雄博士の下でアルツハイマー病患者の脳の神経病理学的解析に取り組んだ結果、脳における線維の蓄積場所と神経細胞脱落の部位が必ずしも相関しないことなどから、線維以外の構造体を探索する必要があると考えるに至った。また、40アミノ酸残基のA β_{1-40} と42残基のA β_{1-42} のどちらも老人斑を形成するにも関わらず、A β_{1-42} こそが発症の引き金を引くとされていたことも謎であった。これらの事実を統合して考えると、A β が神経細胞死活性を獲得するのは、線維以外の「特定の構造」を取った時であると考えられる。即ち、年と共に脳内にA β が蓄積するが、それが「特定の構造」を取らない限り痴呆にはならず、またA β_{1-42} はA β_{1-40} よりもこの「特定の構造」を圧倒的に作りやすいということになる。

実際に患者脳においては、不溶性の線維である老人斑よりもより穏やかな条件で抽出可能な「可溶性A β 」¹⁶⁾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がわかり、線維ではない構造体が注目されるようになった^{4,14,17)}。患者脳にある可溶性A β は、二〜数百量体の混合物で、40個のアミノ酸よりなるA β_{1-40} 、42個のアミノ酸よりなるA β_{1-42} の双方から出来る¹⁷⁾。一方で、試験管内で形成される非線維の構造体としては、APP発現細胞の培養上清に分泌される二/三量体 (二量体ないしは三量体)、化学合成A β から作られたプロトフィブリル^{18,19)}とA β_{1-42} 会合体混合物 (三〜六量体を中心に二十四量体まで) であるA β -derived diffusible ligands (ADDLs)²⁰⁾が同定された。二/三量体はラット海馬の長期増強を抑制する²¹⁾。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4-10 nm、長さ200 nm以下の様々なサイズのひもである^{18,19)}。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²²⁾。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²⁰⁾。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²⁰⁾。プロトフィブリル、ADDLs共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会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14 kDa以下の画分にはなく、ゲル濾過上で分子量50 kDa以上の画分にあるという。しかし、三量体 (= ~14 kDa) から二十四量体 (= ~108 kDa) 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のかも含めて、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3)。

2. アミロソフェロイドの同定

では、ここで改めてA β を中心にアルツハイマー病の発症機構を整理してみたい。現在でも、アルツハイマー病であるか否かの最終的な診断は、死後に行われる神経病理学的解析によっている。しかし、アルツハイマー病であろう、(probable Alzheimer's disease) ということは、神経細胞のシナプスの変異に始まる機能障害とそれに続く神経細胞死があるレベルに達することで起きる高次の脳機能障害により推測可能となる。従って、疾病の入り口はA β 、

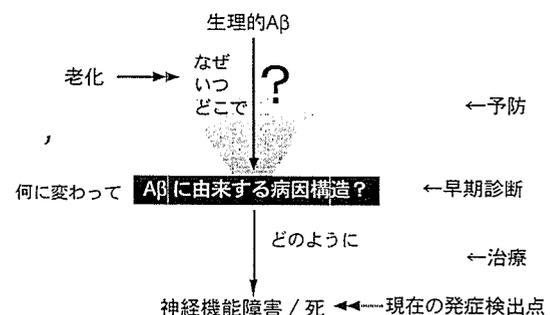


図4 A β を中心に考えたアルツハイマー病発症の5W1H アルツハイマー病の発症は、生理的タンパク質であるA β が老化の過程で病因となる構造体に変ったと考えることが出来る。従って、A β がなぜ (why)、いつ (when) どこで (where)、どのような病因となる構造体 (what) に変わること、どのように (how) 神経細胞の障害を引き起こすかという5W1Hが、全て分子レベルで解明されれば、発症機構は理解出来たと言えることとなる。

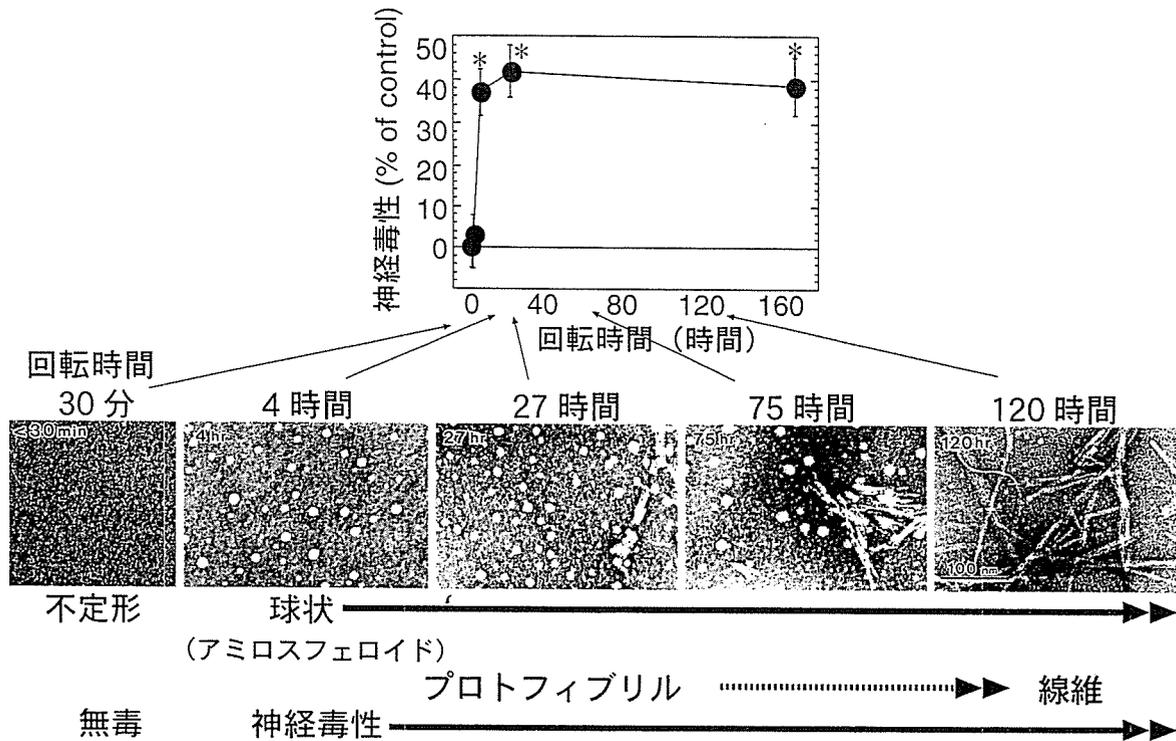


図5 回転によるアミロスフェロイド、プロトフィブリル、線維の形成と神経細胞死活性の関係

出口は神経機能障害/神経細胞死と設定出来るであろう。アルツハイマー病の発症の大部分は遺伝的変異を伴わないことから、本来は生理的タンパク質である $A\beta$ が老化の過程で病因となる構造体が変わったと考えることが出来る。従って、 $A\beta$ がなぜ (why)、いつ (when) どこで (where)、どのような病因となる構造に (what) 変わることで、どのように (how) 神経細胞の障害を引き起こすかという5W1Hが、全て分子レベルで解明されれば、発症機構は理解出来たと言えることとなる(図4)。従来は、病因となる構造 (what) は、脳内の $A\beta$ 量が増加しある閾値を越えたことで形成される線維であると考えられてきたわけであるが、前述してきたとおり脳内の $A\beta$ 量や線維量は必ずしも臨床症状と対応せず、病因となる構造体は他にあることが推測された。そこで、我々はまず病因となる構造体を試験管レベルで明らかにすることから開始することとした。

その当時、 $A\beta$ が「神経毒性を発揮する」ためには自己会合を起こさせることが必要²³⁾ ということは明らかになっていたが、各々の研究者が独自に異なる調製方法で会合させた $A\beta$ は時に異なる活性を示し、また同一の調製方法に基づ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。そこで、我々は、複雑かつ多様な $A\beta$ 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 $A\beta_{1-42}$ ではなく、生理的と見な

されている $A\beta_{1-40}$ を選び²⁴⁾、 $A\beta_{1-40}$ を大量に化学合成し、均一な原材料を確保した。次に、各種条件下での $A\beta$ 集合体形成を試みた。その結果、化学合成した $A\beta_{1-40}$ 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^{25,1,26)}。静置した場合、 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認められなかった^{1,26)}。回転攪拌した場合、最初に出現するのは微小な球状構造であり、線維はかなり遅れて形成される(図5)。線維への中媒体であるプロトフィブリルは、球状構造の後に認められるが、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。一方、微小球は長時間の回転攪拌後も存在していた(図5)。また、単離した微小球状構造は長時間においても、また引き続き回転攪拌しても線維に転換することはなく、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た¹⁾。そこで、線維形成に必要な分子間の β シート形成を阻害することが知られているペプタペプチド (KLVFF, LPFFD)^{27,28)} を予め大過剰に $A\beta_{1-40}$ 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¹⁾。

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

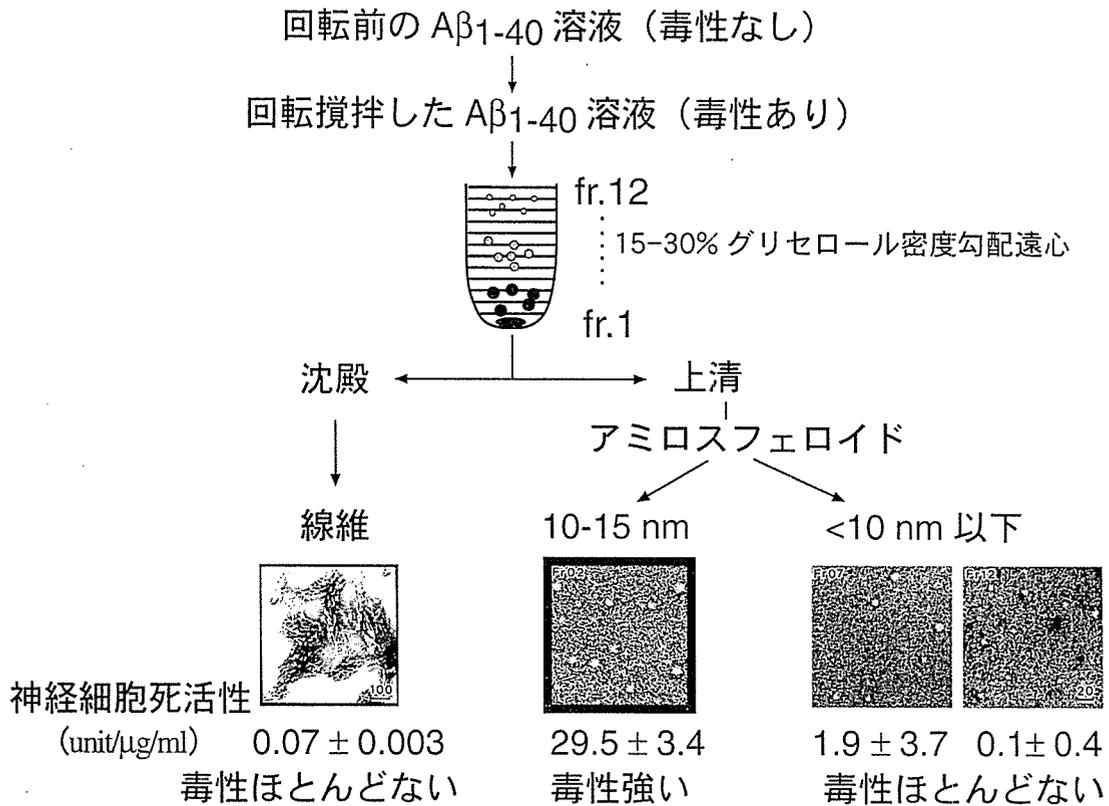


図 6 アミロスフェロイドの精製

「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用いた沈降係数による分離と構造活性相関から、直径 10-15 nm 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 6)^{1,26)}。アミロスフェロイドは、350 pM 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こした (図 7)。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 6)。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 6)。前述したとおり Aβ には、40 個のアミノ酸からなる 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。我々は、Aβ₁₋₄₂ が Aβ₁₋₄₀ と

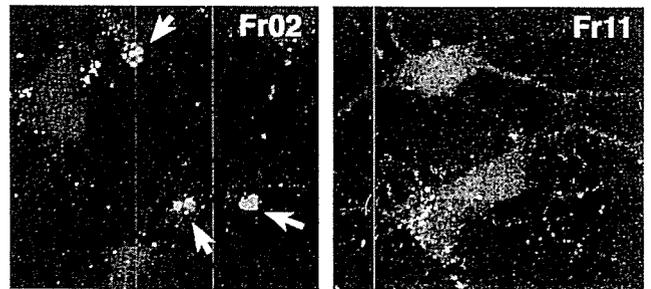
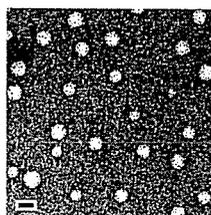


図 7 初代培養細胞に対するアミロスフェロイド毒性の検証

精製した各画分を投与後 48 時間経過すると、Fr.2 は核の凝集と分断を伴うアポトーシス様の神経細胞死 (左図→) が起きるが、Fr.11 では起きない。

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 (1-0.01 μM)	30 時間以上 (50 μM)

図 8 Aβ₁₋₄₂ に由来するアミロスフェロイド

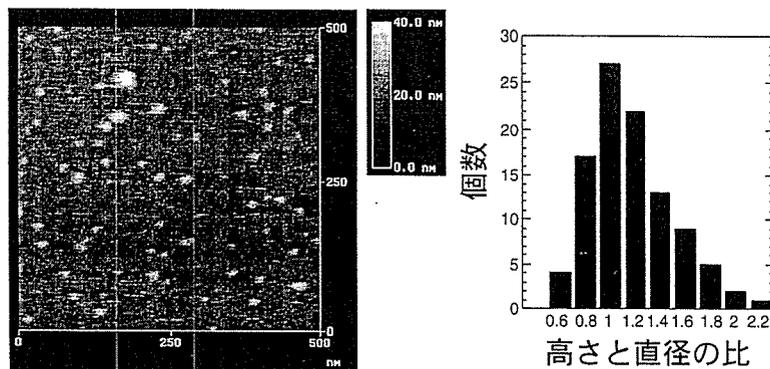


図9 溶液中におけるアミロスフェロイドの原子間力顕微鏡観察画像

同様に直径10-15 nmのアミロスフェロイドを形成するが、 $A\beta_{1-42}$ は $A\beta_{1-40}$ 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(図8)¹⁾。

3. アミロスフェロイドの形態

前述のとおり、現在、各種の会合体は混合物であり、互いに形態で区別がつけられている。従って、これらとアミロスフェロイドを比較するには「見る」しかない。通常の観察には透過型電子顕微鏡を用いている。これは注意すれば非常に優れた検出法だが、真空中で観察するため試料が乾燥してしまい、また試料の高さを定量出来ないという欠点があった。そこで、三菱化学科学技術研究センターの協力を仰ぎ、まだあまり行われていない溶液下での原子間力顕微鏡観察を試みた。当初は、まるで冬の日本海さながらの画像しか撮れず、その後ようやく、どうやら探査針がアミロスフェロイドを引きずることがわかった。そこで、神経の培養から着想を得て探査針をコートすることを思いつき、また試料を乗せるマイカをシラン処理した結果、見事にアミロスフェロイドの姿が浮かび上がってきた(図9)¹⁾(Shibata-Seki, T. *et al.* 未発表データ)。そして、一つ一つのアミロスフェロイドについて正確な高さと直径を求めた結果、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が示され、プロトフィブリルやADDLsとは異なる形態を持つ新たな構造体であることが証明されたのである。

4. アミロスフェロイドの神経細胞死機構

精製したアミロスフェロイドは、数百 pM で神経細胞死を誘導するが、投与直後から細胞内カルシウムの上昇が起こり、自発的カルシウムスパイクの亢進が認められる²⁹⁾。それに伴い、神経突起の変形が認められ、投与後6時間には神経突起が切断され、細胞間をつなぐ線維連絡が減少するのが観察される³⁰⁾。アルツハイマー病の場合、神経細胞死に先行してシナプスが変性すると考えられているが³¹⁾、

アミロスフェロイド投与の初期反応もそれを示唆している。そして、2時間後をピークに一過的にタウタンパク質リン酸化酵素 TPKI/GSK-3 β の活性化が起こり、48時間後には神経細胞そのものが失われていた¹⁾。前述のとおり TPKI/GSK-3 β は、アルツハイマー病の病理学的特徴である神経原線維変化 NFT (neurofibrillary tangle) を構成する「過剰にリン酸化されたタウ」のリン酸化に関与する細胞質の酵素として当研究所で見いだされ、海馬初代培養細胞では $A\beta$ の急性毒性による神経細胞死にも関与していることが示されている⁷⁻¹⁰⁾。確かに、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 2 mM³²⁾ 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 TPKI/GSK-3 β が活性化した後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 TPKI/GSK-3 β 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¹⁾。この場合はタウの機能阻害が神経細胞死の鍵になっていると推定され、最近明らかになった FTDP-17 におけるタウの突然変異による神経細胞死と比較検討することで、その機構がより一層明らかになると考えられる。しかし、同時に筆者らは他の神経細胞死機構が動いていることも見いだしており、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、それともそれぞれの現象がリンクしているのか、現在検討中である。また、インスリン応答のごく初期に Fyn による Tyr216 のリン酸化によって TPKI/GSK-3 β が活性化されることが報告されているが³³⁾ (その後 MAP キナーゼのカスケードによって Ser9 がリン酸化されることで不活性化される)、 $A\beta$ による神経細胞死においても Fyn が関与するという報告があり²⁰⁾、Fyn が TPKI/GSK-3 β の活性化に寄与している可能性が考えられる³⁴⁾。アミロスフェロイドによる神経毒性は細胞選択性、領域選択性があり、今後、下流の神経細胞死機構を分子レベルで解明していきたいと考えている。従

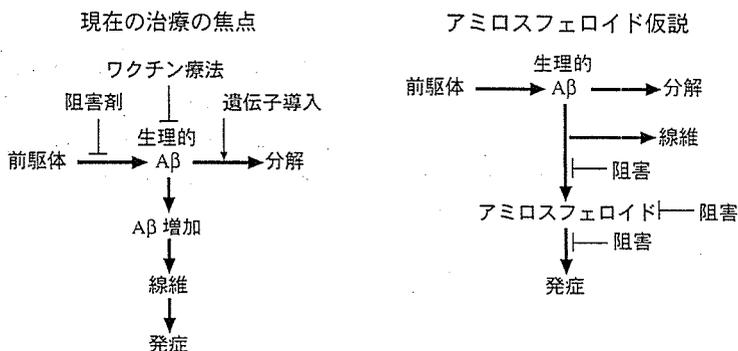


図 10 現在の治療の焦点 (左図) とアミロスフェロイド仮説による展望 (右図)

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 蓄積の間に残る矛盾を解き、過去の TPKI/GSK-3 の研究も踏まえ⁷⁻¹⁰⁾、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いう一連の流れを提案することが可能となる。

5. アミロスフェロイド仮説の提唱

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 10)。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³⁵⁾。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、発症全体の数%を占める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。しかし、副作用の問題が起きている。また、近年、理化学研究所の西道博士らにより分解酵素ネプリライシンが同定され³⁶⁾、二つのグループから遺伝子導入の結果が報告された^{37,38)}。岩田らの報告によると、ウイルスベクターにより発現されたネプリライシンは、シナプスにおいて Aβ を分解する効果があることが示され³⁸⁾、今後の臨床応用への展開が望まれるところである。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出来ない。一時期、最も有望に思われたのは、Schenk らが世界に先駆けて示し³⁹⁾、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」^{40,41)}、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。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。しかし、副作用がなかったマウスとは異なり、ヒトでは髄膜脳炎様症状が 5% に生じ、一部はステロイド投与等でも回復せず治験は中止された⁴²⁾。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⁴¹⁾。

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、一見遠回りのように効果的な療法への道を開くのではないだろうか。我々は、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。アミロスフェロイドの形成経路は線維と分岐している可能性があるため、もし我々の仮説が正しければ、生理的 Aβ を阻害しない治療戦略が可能となる (図 10)。仮説の検証は今後の課題だが、アミロスフェロイド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。今後、特異的抗体を作製し、生体での実証を行うつもりである。我々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⁴³⁾。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。

おわりに

アミノ酸が直鎖状に連結したタンパク質は、理論的には無数のコンフォメーションを取りうるが、多くは特定の三次構造に固定されている⁴⁴⁾。「三次構造はアミノ酸配列が決まれば周囲の溶媒 (主に水) との効果で一意的に決まる」とされてきた⁴⁵⁾。従って、遺伝情報、即ち DNA 上の塩基配列から自ずと三次構造も決まるはずである。しかし、Aβ という、たかだか 40-42 個のアミノ酸からなるペプチド一つを取ってみても、その構造の多様性は驚くばかりであり、タンパク質の三次構造は予想外に精妙で複雑な制御を受けていることを示している³⁾。アルツハイマー病の治療法開発は確かに急務ではあるが、もともと生理的に

も存在している $A\beta$ の生理作用を阻害することなく疾病を抑えるためには、 $A\beta$ 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 $A\beta$ の実体は解明されつつあり、病因となる $A\beta$ 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 $A\beta$ が「どのような分子機構で毒性を持つ集合体に変わるのか」、それを「制御する機構は何か」とい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 $A\beta$ 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一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」⁴⁶⁻⁴⁸⁾ を持つと推測される。老化の過程で生理的 $A\beta$ が、集合体へと変わるにあたっては、 $A\beta$ 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。我々は、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 $A\beta$ 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。 $A\beta$ 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タンパク質においても共通に認められる病態である。原因タンパク質同士はアミノ酸配列にも本来の機能にも一見共通性はないが、類縁の凝集体を形成し神経細胞死を起こす。本来疾患とは関係のないタンパク質も実験的環境においては凝集することが報告されている⁴⁹⁾。これらのタンパク質は、自己組織化しある構造を取ることで、本来の機能にはない毒性を獲得している。このように元々のタンパク質のコンフォメーションと連鎖様式を変えることで新たな機能を獲得する自己組織化能は潜在的に全てのタンパク質に備わっているのかもしれない。多くの神経変性疾患の発症が老化と密接な関係にあることを考えると、タンパク質の自己組織化能によるダイナミックな構造代謝は老化の基本原則と深く関わるのかもしれない。近年のゲノムプロジェクトの成果により、人類は35億年という進化の過程で培われてきた「生命の設計図」の解読に成功し、次に生命の部品に当たるタンパク質の機能動態の解明が急ピッチで進められ、新たな局面が開けつつある。しかし、生命の営み全体を説明し、それが誤動作している疾患を克服するためには、まだまだ解決すべきことは多い。我々の研究はまだ一歩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いずれは老化という現象を物理化学的に解明出来たら本望である。

ここで述べた研究は、福岡女子大学佐藤一紀博士との共同研究によるものであり、佐藤道夫博士、野口彰彦氏、伊藤茜氏、坂本弓子氏、松本紳一郎氏、関禎子氏らの協力により成し遂げたものであります。この場を借りて感謝の意を表します。常に温かい励ましと助言を下された永井克孝所長とアミロスフェロイドの構造について議論いただいた若林健之博士には心から感謝いたします。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。最後になりましたが、私がアルツハイマー病の研究を始めるに当たっていろいろとご指導賜り、また本稿執筆の機会を与えてくださった、今堀和友先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N., & Sato, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6370-6375
- 2) 金澤一郎 (1987) 神経内科学 (豊島康夫編), pp. 569, 朝倉書店, 東京
- 3) Sherman, M.Y. & Goldberg, A.L. (2001) *Neuron* 29, 15-32
- 4) Selkoe, D.J. (2001) *Physiol. Rev.* 81, 741-766
- 5) Woodgett, J.R. (1990) *EMBO J.* 9, 2431-2438
- 6) Ishiguro, K., Takamatsu, M., Tomizawa, K., Omori, A., Takahashi, M., Arioka, M., Uchida, T., & Imahori, K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 10897-10901
- 7) Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T., & Imahori, K. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7789-7793
- 8) Imahori, K., Hoshi, M., Ishiguro, K., Sato, K., Takahashi, M., Shiurba, R., Yamaguchi, H., Takashima, A., & Uchida, T. (1998) *Neurobiol. Aging* 19, s 93-s 98
- 9) Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., Saitoh, Y., Ishiguro, K., Hoshino, T., & Imahori, K. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2719-2723
- 10) Hoshi, M., Takashima, A., Murayama, M., Yasutake, K., Yoshida, N., Ishiguro, K., Hoshino, T., & Imahori, K. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 2038-2041
- 11) Hardy, J.A. & Higgins, G.A. (1992) *Science* 256, 184-185
- 12) Dickson, D.W. & Yen, S.H. (1989) *Neurobiol. Aging* 10, 402-404; discussion 412-414
- 13) Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., & Katzman, R. (1991) *Ann. Neurol.* 30, 572-580
- 14) Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., & Rogers, J. (1999) *Am. J. Pathol.* 155, 853-862
- 15) Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condron, M.M., Axelman, K., Forsell, C., Stenh, C., Luthman, J., Teplow, D.B., Younkin, S.G., Naslund, J., & Lannfelt, L. (2001) *Nat. Neurosci.* 4, 887-893
- 16) Klein, W.L., Krafft, G.A., & Finch, C.E. (2001) *Trends Neurosci.* 24, 219-224
- 17) Kuo, Y.-M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., & Roher, A.E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 4077-4081

- 18) Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D. J., & Teplow, D.B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25945-25952
- 19) Hartley, D.M., Walsh, D.M., Ye, C.P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P.M., Teplow, D.B., & Selkoe, D.J. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 8876-8884
- 20) Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G.A., & Klein, W.L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6448-6453
- 21) Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., & Selkoe, D.J. (2002) *Nature* **416**, 535-539
- 22) Lashuel, H.A., Hartley, D.M., Petre, B.M., Wall, J.S., Simon, M.N., Walz, T., & Lansbury, P.T., Jr. (2003) *J. Mol. Biol.* **332**, 795-808
- 23) Lorenzo, A. & Yankner, B.A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12243-12247
- 24) Levine, H., 3rd. (1995) *Neurobiol. Aging* **16**, 755-764
- 25) Hoshi, M., Sato, M., Yoshida, N., Kobayashi, N.R., Okuda, A., & Sato, K. (2000) *Soc. Neurosci. Abstr.* **26**, 1283
- 26) 星 美奈子 (2002) *細胞工学* **21**, 728-732
- 27) Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., & Nordstedt, C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8545-8548
- 28) Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castano, E.M., & Frangione, B. (1998) *Nat. Med.* **4**, 822-826
- 29) Kobayashi, N.R., Hirasawa, T., Yoshida, N., Kudo, Y., & Hoshi, M. (1999) *Soc. Neurosci. Abstr.* **25**, 342
- 30) Hoshi, M. (1999) *J. Clin. Exp. Med.* **189**, 22-27
- 31) Selkoe, D.J. (2002) *Science* **298**, 789-791
- 32) Klein, P.S. & Melton, D.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8455-8459
- 33) Lesort, M., Jope, R.S., & Johnson, G.V. (1999) *J. Neurochem.* **72**, 576-584
- 34) Hoshi, M., Ishiguro, K., Yoshida, N., Kobayashi, N.R., Sato, K., & Imahori, K. (1999) *Soc. Neurosci. Abstr.* **25**, 2125
- 35) Saido, T.C. (2002) in *A β Metabolism and Alzheimer's Disease* (Saido, T.C. ed.) pp.1-26, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA
- 36) Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., & Saido, T. C. (2000) *Nat. Med.* **6**, 143-150
- 37) Marr, R.A., Rockenstein, E., Mukherjee, A., Kindy, M.S., Hersh, L.B., Gage, F.H., Verma, I.M., & Masliah, E. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 1992-1996
- 38) Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K., & Saido, T.C. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 991-998
- 39) Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., & Seubert, P. (1999) *Nature* **400**, 173-177
- 40) Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P., & Westaway, D. (2000) *Nature* **408**, 979-982
- 41) Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., & Arendash, G.W. (2000) *Nature* **408**, 982-985
- 42) Schenk, D. (2002) *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 824-828
- 43) Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., & Glabe, C.G. (2003) *Science* **300**, 486-489
- 44) Finkelstein, A. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 60-71
- 45) Anfinsen, C.B. (1973) *Science* **181**, 223-230
- 46) Yates, F.E. (1987) *Self-organizing Systems. The Emergence of Order*, Plenum, New York
- 47) Bushev, M. (1994) *Synergetics, Chaos, Order, Self-organization*, World Scientific, London
- 48) Nicolis, G. & Prigogine, I. (1977) *Self-organization in Non-equilibrium Systems*, Wiley, New York
- 49) Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., & Stefani, M. (2002) *Nature* **416**, 507-511

蛋白質核酸酵素

PNE
*PROTEIN,
NUCLEIC ACID
AND ENZYME*

別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

「かたち」が制御する神経の死

アミロスフェロイドから病態・老化の暗号を解く

星 美奈子

ヒトゲノム全塩基配列決定により、35億年の進化が培った「生命の設計図」は解読され、設計図からつくられ、機能を担う蛋白質の機能動態の解明が求められている(図1縦軸)。しかし、生物の最大の特徴は、誕生から死へと「不可逆な過程」をたどることであり、蛋白質も設計図は同一ながら、不可逆な時間のなかで「かたち」とその機能を変えていくことが予想される。このいわば「かたち」による老化アルゴリズムともよぶべきものが、アルツハイマー病の発症に深く関与している可能性が考えられる。なぜなら、発症の大部分が遺伝的変異によらないアルツハイマー病では、生理的蛋白質が不可逆な時間(=個体老化)のなかで病因へと変化したと考えられるからである(図1横軸)。アルツハイマー病発症の引き金を引くのは β アミロイド($A\beta$)と考えられている。では、生理的蛋白質である $A\beta$ は、何に、どのような分子機構で変わることで病因となるのであろうか。

アルツハイマー病は、記憶や認知機能が徐々に失われる進行性の痴呆症であり、神経細胞の変性/機能不全と死により症状が進行する。老人の脳においてアルツハイマー病の病因となる $A\beta$ は、もともとは生理的ペプチドとして(その機能はいまだ不明であるが)われわれの中でつくられている。その生理的 $A\beta$ が老化の過程で何に変わることによって発症の引き金を引くかについては、当初、患者脳に残された2つの痕跡の1つ、 $A\beta$ が線維状に蓄積したシミのような「老人斑」が有力視され、 $A\beta$ の生産と分解のバランスが崩れることで $A\beta$ 量が増加し、結果として線維形成が起こると考えられてきた¹⁾。しかし、量の増加や線維形成

は必ずしも臨床症状と対応せず²⁾、多量の $A\beta$ 線維を蓄えながら一見健康である老人たちの存在もあり³⁾、量や線維以外の要因も考えられた。

次に、患者脳で増え、シナプス減少ともよく対応する、より穏和な条件で抽出可能な可溶性 $A\beta$ が注目された^{3,4)}。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⁴⁾。*in vitro*にある非線維構造体としては、前駆体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 $A\beta$ からつくられたプロトフィブリルと $A\beta_{1-42}$ 会合体混合物(3~6量体を中心に24量体まで)である $A\beta$ -derived diffusible ligands (ADDLs)が同定された⁵⁾。2/3量体はラット海馬の長期増強を抑制する⁶⁾。線維へ至る中間体であるプロトフィブリルは β シート構造をもつ幅4~10 nm、長さ200 nm以下のさまざまなサイズのひもである⁵⁾。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($A\beta$ 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)をもつ $A\beta$ では出現頻度が上がることが報告された⁷⁾。ADDLsは、線維形成の抑制条件(低温またはApoJ添加)で $A\beta_{1-42}$ より生じる会合体混合物で、 $A\beta_{1-40}$ では形成されない⁵⁾。原子間力顕微鏡下では高さ5 nmのさまざまなサイズの楕円球に見える⁵⁾。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、そのなかで神経細胞死活性を担う実体は不明である。また、形成過程、物理化学的性質も未解明のまま、おもに形態で区別されていた。

筆者らは、化学合成 $A\beta_{1-40}$ を溶かした直後のまだ毒性のない水溶液を、ゆっくり回転攪拌することで球状構造体が形成され、神経毒性が現れることを発見した(図2)^{8,9)}。沈降係数による分離と構造活性相関から、直径10~15 nmの球状 $A\beta$ が神経細胞死活性を担う実体と判明し、「アミロスフェロイド」と名づけた(図2)^{8,9)}。線維の400倍の毒性をもつアミロスフェロイドは、液中原子間力顕微鏡下で直径=高さの真球であり、数百pMでアポトーシス様の死をひき起こす⁹⁾。前述したように $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ はともに可溶性 $A\beta$ をつくるが、発症と相関するのは $A\beta_{1-42}$ とされてきた。筆者らは、 $A\beta_{1-42}$ が $A\beta_{1-40}$ 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

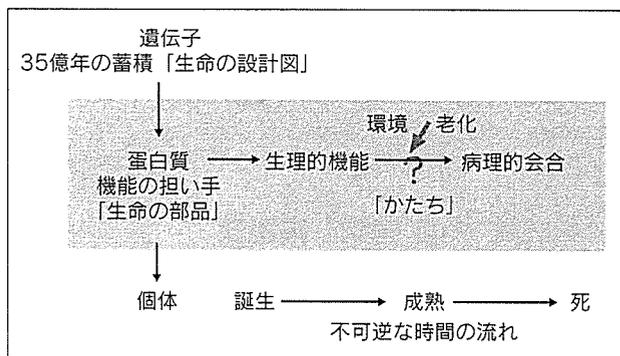


図1 「かたち」による蛋白質の老化アルゴリズム

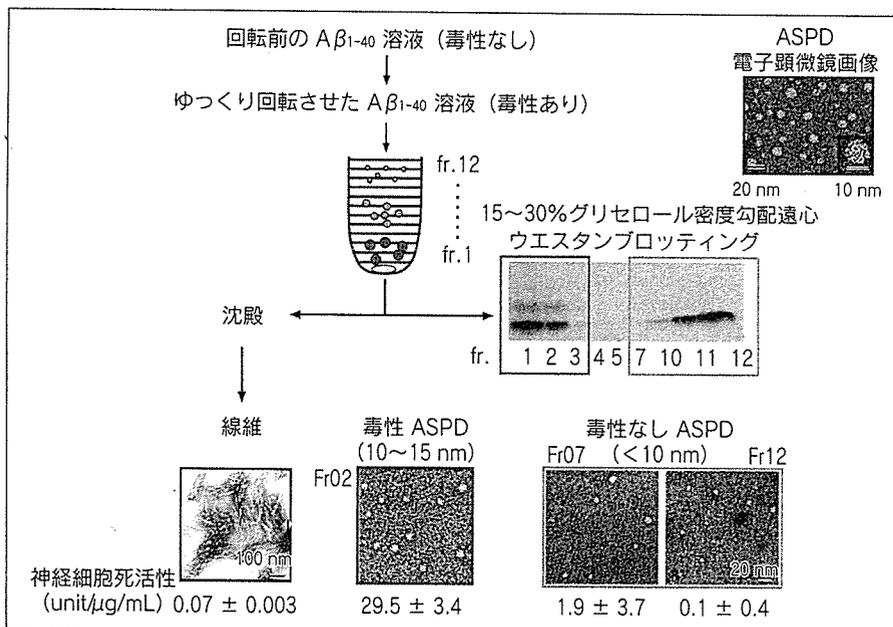


図2 アミロスフェロイド (ASPD) の同定

グリセロール密度勾配遠心により、毒性の強いアミロスフェロイド分画を精製することができた。それが従来、注目されていた線維の約400倍もの神経毒性をもつ。さらに、毒性と構造の相関から、毒性の強いアミロスフェロイドは直径が10~15 nmのサイズをもつことも明らかになった。

の差が発症との相関の差になっている可能性を示した⁹⁾。さらに、線維をはじめとしてそれ以外の「かたち」の会合体には毒性がないことを示すことにより、Aβが特定の「かたち」を取ることが重要であるという可能性を示した。すなわち、生理的Aβがその配列上にもつ潜在的「毒性ドメイン」は、特定の構造を取ることではじめて顕在化すると考えられる。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であるが、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よく対応しており、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らが金コロイドにAβを貼り付けた人工物への抗体をつくり、これがAβ会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¹⁰⁾。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。

上記のように、アミロスフェロイドの同定をはじめとして可溶性Aβの実体が解明されつつあるなかで、「生理的Aβが何に変わることで」という問題は解明されようとしている。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Aβが「どのような分子機構で毒性をもつ会合体に変わるのか」、それを「制御する機構は何か」という問題を解かなくてはならない。アミロスフェロイドをはじめとする複数の異なるAβ会合体が、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

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、Aβは複数の会合体を形成する自己組織化能力をもつと推測される。複数ある可能性のどれが選ばれるかを左右するのはAβを取り巻く水とイオン環境、そしてシャペロンが考えられるが、アルツハイマー病の最大の発症因子である老化とこれらの関係はまだ今後の課題である。アミロスフェロイドの場合、回転がどのような物理化学的変化をAβに引き起こしているかを明らかにすることが、制御機構を解明する最初の一步となるであろう。生理的Aβと各種Aβ会合体はすべてAβからなり、コンホメーションと連鎖様式のみが異なる。会合体が本来の機能を喪失するのではなく、新たな機能を発現することから、蛋白質はこの構造代謝とでもいべき動的な構造変化により、生体の各段階に応じた機能を発揮し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であるが、アミロスフェロイドを手掛かりに、現在存在する技術的問題を打破し、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。

Q アミロスフェロイドは実際に生体の中にあるのですか？

A 現在、特異的抗体を作製を含め、検討中です。アミロスフェロイドによる神経細胞死の機構は（詳細は省きますが）、アルツハイマー病脳における神経細胞死機構と非常によく合致する面があり、そのものではなくとも類縁の構造体が存在するのではないかと考えています。ただ、もし仮に存在したとして、なぜ生理的には存在してはいけ

ないものに、ある特定の神経細胞が反応し、選択的に殺されてしまうのかなど、まだまだ明らかにしなくてはならないことが沢山残されていると考えています。

Q 細胞内でのアミロスフェロイドの形成あるいは解体に分子シャペロンが関与するという可能性についてはどうでしょうか？

A 最終段落に簡単に触れましたが(より詳細には文献8を参照)、アミロスフェロイドあるいは類縁構造体の形成・解体に分子シャペロンが関与しているということは十分考えられると思います。分子シャペロンとユビキチン-プロテアソーム系による監視機構の劣化が発症の要因となるのか、より積極的に発症にかかわる分子シャペロンが存在するのか、今後の課題だと考えます。

●文献

1) Hardy, J. A., Higgins, G. A. : *Science*, 256, 184-185(1992)

2) Nilsberth, C. *et al.* : *Nat. Neurosci.*, 4, 887-893(2001)

3) Lue, L. F. *et al.* : *Am. J. Pathol.*, 155, 853-862(1999)

4) Kuo, Y.-M. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 271, 4077-4081(1996)

5) Klein, W. L., Kraft, G. A., Finch, C. E. : *Trends Neurosci.*, 24, 219-224(2001)

6) Walsh, D. M. *et al.* : *Nature*, 416, 535-539(2002)

7) Lashuel, H. A. *et al.* : *Nature*, 418, 291(2002)

8) 星 美奈子 : 細胞工学, 21, 728-732(2002)

9) Hoshi, M. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6370-6375(2003)

10) Kaye, R. *et al.* : *Science*, 300, 486-489(2003)

Minako Hoshi, 三菱化学生命科学研究所 神経変性疾患ユニット,
科学技術振興事業団 戦略的創造科学研究推進事業 PRESTO
E-mail : mie@libra.lsm-kagaku.co.jp
Amylospheroid and the 'morphometabolism' disease (conformational disease)



「かたち」が制御する神経細胞死：アミロ スフェロイドとアルツハイマー病

星 美奈子

はじめに

ヒトゲノムの全塩基配列の決定により、人類は35億年の進化が培った「生命の設計図」を手に入れた。そして現在、設計図に基づき作られ、生体内での機能を担うタンパク質の機能動態の解明が精力的に進められ、過去には想像もつかなかった新たな局面が開けてきた。しかし、生命の営み全体を説明し、それが誤動作している疾患を克服するためには未だ大きな「？」が残されている。アルツハイマー病を例に取れば、主要な発症促進因子は老化であるが、「生涯同一の遺伝子型を持ちながらなぜある症状が老化と伴に顕れるのか」という遺伝子型と表現形間の

Dysregulation of proteins morphometabolism induced neurodegeneration: amylopheroïd and Alzheimer's disease

Minako Hoshi

三菱化学生命科学研究所 アルツハイマー病研究グループ発症機序解明チーム

東京工業大学 生命理工学部 生命情報科学専攻 [〒194-8511 東京都町田市南大谷11号]

Pathogenesis and Basic Research Lab., Alzheimers Disease Research Group, Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS) (11 Minamiooya, Machida, Tokyo 194-8511, Japan)

Faculty of Bioscience and Biotechnology, Department of Bioinformatics, Tokyo Institute of Technology

ギャップが問題となる。より具体的には、生理的にも存在する β アミロイド(A β)の脳への蓄積が発症のトリガーと考えられているが、それでは「A β はどのような分子機構で何に変わることによって病因となるのか？」については未だ謎である。我々はその手がかりを求め研究を行ってきたが、最近、A β の自発的な自己集合で形成され、非常に強力な神経毒性を持つ、新たな球状構造体「アミロスフェロイド」を同定・精製することに成功した(図1)(Hoshi et al., 2003)。A β は自己組織化により様々な「かたち」を取るが、神経細胞死活性を発揮するのは特定の「かたち」に限られているようである。今回、アミロスフェロイド発見の経緯を述べつつ、「かたち」という観点からタンパク質の機能を考えてみたい。

アミロスフェロイド同定の経緯

理論的には無数のコンフォメーションを取りうる自由度を持つタンパク質だが(例えば40アミノ酸残基のA β ならば約 10^{40} 通り)、現実には特定の三次構造に良く固定されており(Finkelstein 1997)、「アミノ酸配列が決まれば溶媒

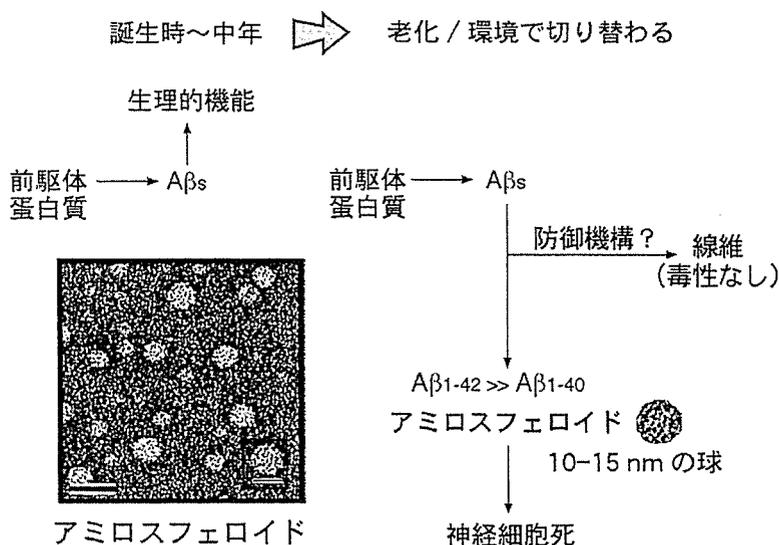


図1. アミロスフェロイド仮説

生理的Aβではマスクされていた毒性構造が、老化にともない会合するAβに切り替わり、特定の構造を取ることで顕在化し、神経細胞死を引き起こす。線維等には毒性がなく、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20 nm、右が10 nm。

(主に水) 効果で一意的に三次構造は決まる」(Anfinsen 1973)と考えられた。従って、三次構造は遺伝情報、即ちDNA上の塩基配列により決定されることになる。しかし近年、予想以上に複雑かつ精密な制御がそこには働いていることが明らかになりつつある(Sherman and Goldberg 2001)。アルツハイマー病を初めとする神経変性疾患においても、「異常構造タンパク質」の凝集と蓄積が、共通の病態であり発症にも関わることもわかってきた。但し、それぞれの疾患で原因となるタンパク質がなぜ生理的役割を離れ病因となるのか、それはどのような構造変化を伴い、その結果なぜ神経の機能障害が起きるのか等、まだ多くは不明である。

アルツハイマー病においては、Aβを主成分とする老人斑とリン酸化されたタウからなる神経原線維変化の2種の異常構造タンパク質が脳に蓄積する。近年の医学研究の進歩から、痴呆へと至る発症の引き金となるのは「Aβの蓄積」であることが明らかになった(Selkoe 2001)。

Aβは生理的にも低レベルながら存在しており、前駆体から恒常的に切り出され、分解されている(Saido 2002)。従って、蓄積が起きる背景としては、前駆体からの切り出しの亢進、あるいは分解の低下が考えられ、その両面から研究が進められている。特に、多くの遺伝性アルツハイマー病では前駆体からの切り出し、中でも42アミノ酸残基のAβ分子種が亢進している。当初の予想以上に切り出しは複雑に制御されており、現在もγ-secretaseの分子実体の全容を明らかにすべく、熾烈な競争が行われている。しかし、遺伝性アルツハイマー病の場合、出生時からAβ産生量は亢進しているが発症は早くて30歳以降であり、そのタイムラグがなぜ生じるかはまだ説明出来てはいない。一方、Aβの分解経路については、ネプリライシンが生体ではAβ1-42分解酵素であることが、理化学研究所の西道博士らにより示された(Iwata et al., 2000)。その後、発症初期の孤発性アルツハイマー病脳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 (Yasojima et al., 2001), 今後ネプリライシンの制御機構, 特に孤発性アルツハイマー病との関係解明が待ち望まれる。

上記2つの研究においては, 脳内 $A\beta$ の蓄積が発症の引き金として十分と考えられている。しかし, 本当にそうであろうか? 切り出しと分解のバランスだけでは, ある種の遺伝性アルツハイマー病で $A\beta$ 量や線維形成の促進が認められないにも関わらずなぜ早期発症するのか (Nilsberth et al., 2001), 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達がなぜ存在するのか (Lue et al., 1999) 等を説明することは困難であり, 他にも制御機構があることが伺われた。

三菱化学生命科学研究所では当時の所長今堀和友先生を中心に, 神経細胞死という出口により近い「タウのリン酸化」を司る酵素が同定精製されていた (Imahori et al., 1998)。筆者はそのうち, タウリン酸化酵素 I (tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β ; TPKI/GSK-3 β) による神経細胞死シグナルカスケードの解明を目的に, 初代培養神経に $A\beta$ を投与していたが, その過程で「脳内 $A\beta$ 量が増え線維となって神経細胞死が起きる」というアミロイド仮説 (Hardy and Higgins 1992) に疑問を感じるようになった。そこで, 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博士にお願いして, アルツハイマー病患者の脳の神経病理学的解析に取り組んだ結果, 脳における線維の蓄積場所と神経細胞脱落の部位が必ずしも相関しないことなどから, 線維以外の $A\beta$ 集合体を探索する必要があると考えるに至った。また, 筆者に取っては, 40 アミノ酸残基の $A\beta$ 1-40 と 42 残基の $A\beta$ 1-42 のどちらも老人斑を形成するにも関わらず, $A\beta$ 1-42 が発症の引き金を引くとされていたことも謎であった。これらの事実を統合して考えると, $A\beta$ が神経細胞死活性を獲得するのは, 特定の「かたち」に集合した時だが, それは線維ではな

いと考えられる。即ち, 年と共に脳内に $A\beta$ が蓄積するが, それがある特定の「かたち」を取らない限り痴呆にはならず, また $A\beta$ 1-42 は $A\beta$ 1-40 よりもこの特定の「かたち」を作りやすいと仮定すれば説明が付くと考えた。

その当時, $A\beta$ が「神経毒性を発揮する」ためには自己集合を起こさせることが必要と言うことは明らかになっていたが (Lorenzo and Yankner 1994), 各々の研究者が独自に集合させた $A\beta$ は時に異なる活性を示し, また同一の調整方法に基づ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。そこで, 我々は, 複雑かつ多様な $A\beta$ 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 $A\beta$ 1-42 ではなく, 生理的と見なされている $A\beta$ 1-40 を選び (Levine 1995), $A\beta$ 1-40 を大量に化学合成し, 均一な原材料を確保するところから開始した。そして, 各種条件下での $A\beta$ 集合体形成を試みた。その結果, 化学合成した $A\beta$ 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 (Hoshi 2002; Hoshi et al., 2003)。静置した場合, 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認められなかった (Hoshi 2002; Hoshi et al., 2003)。回転攪拌した場合, 最初に出現するのは微小な球状構造であり, 線維はかなり遅れて形成される (図 2)。線維への中間体であるプロトフィブリルは, 球状構造の後に認められるが, 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。一方, 微小球は長時間の回転攪拌後も存在していた (図 2)。また, 単離した微小球状構造は長時間においても, また引き続き回転攪拌しても線維に転換することはなく, 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た (Hoshi et al., 2003)。そこで, 線維形成に必要な分子間の β シート形成を阻害するペプタペプチド (KLVFF, LPFFD) (Soto et

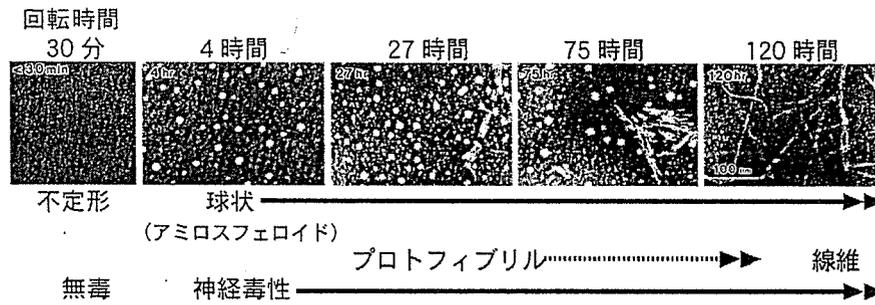


図2 回転によるアミロスフェロイド，プロトフィブリル，線維の形成と神経細胞死活性の関係

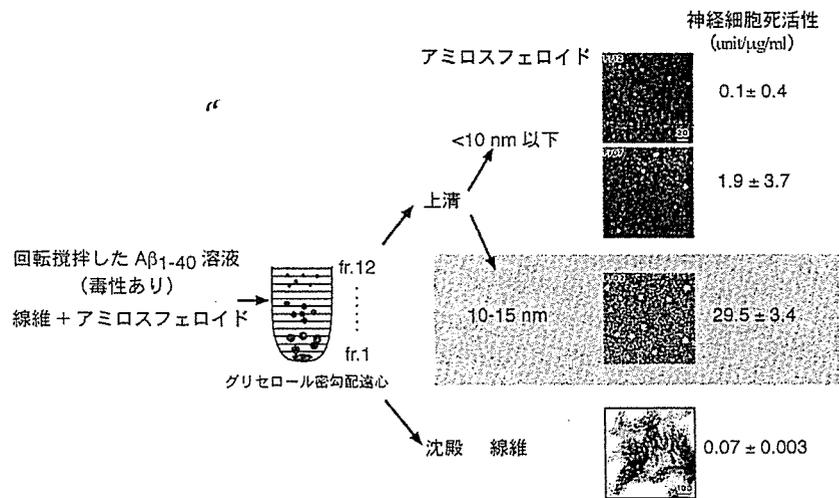


図3. アミロスフェロイドの精製

al., 1998; Tjernberg et al., 1996) 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．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 (Hoshi et al., 2003)．これらの結果は，この微小球状構造は，線維と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用いた沈降係数による分離と構造活性相関から，直径 10-15 nm のアミロスフェロイドが神経細胞死活性を担う分子実体であることを証明した (図3) (Hoshi 2002;

Hoshi et al., 2003)．アミロスフェロイドは，350 pM 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こした．一方，同様に精製したアミロイド線維は mM 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)．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．我々は，Aβ1-42 が Aβ1-40 と同様に直径 10-15 nm のアミロスフェロイドを形成するが，

A β 1-42 は A β 1-40 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 (Hoshi et al., 2003).

アミロスフェロイド神経細胞死機構

精製したアミロスフェロイドは、数百 pM で神経細胞死を誘導するが、投与直後から細胞内カルシウムの上昇と自発的カルシウムスパイクの亢進が認められる (Kobayashi et al., 1999). やがて神経突起の変形が起り、投与後 6 時間には神経突起が切断され、細胞間をつなぐ繊維連絡が減少するのが観察される⁶ (Hoshi 1999). アルツハイマー病の場合、神経細胞死に先行してシナプスが変性すると考えられているが (Selkoe 2002), アミロスフェロイド投与の初期反応もそれを示唆している. そして、2 時間後をピークに一過的にタウリン酸化酵素 TPKI/GSK-3 β の活性化が起り、48 時間後には神経細胞そのものが失われていた (Hoshi et al., 2003). 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 2 mM (Klein and Melton 1996) 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、既に TPKI/GSK-3 β が活性化した後の阻害剤投与は効果がなかった. 従って、アミロスフェロイド毒性はその神経細胞死シグナル伝達の初期において TPKI/GSK-3 β 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 (Hoshi et al., 2003). この場合はタウの機能阻害が神経細胞死の鍵になっていると推定され、FTDP-17 におけるタウの突然変異による神経細胞死と比較検討することで、その機構がより一層明らかになると考えられる. しかし、同時に筆者らは他の神経細胞死機構が動いていることも見出しており、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、それともリンクしている

のか、現在検討中である. また、インスリン応答のごく初期に Fyn による Tyr216 のリン酸化により TPKI/GSK-3 β が活性化されることが報告されているが (Lesort et al., 1999), A β による神経細胞死においても Fyn が関与すると言う報告があり (Lambert et al., 1998), Fyn が TPKI/GSK-3 β の活性化に寄与している可能性が考えられる (Hoshi et al., 1999). アミロスフェロイドによる神経毒性は細胞選択性、領域選択性があり、下流の神経細胞死機構を分子レベルで解明していきたい. 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 A β 蓄積の間に残る矛盾を解き、過去の TPKI/GSK-3 β の研究も踏まえ (Hoshi et al., 1996; Hoshi et al., 1997; Imahori et al., 1998; Takashima et al., 1993), 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.

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 」(Klein et al., 2001) (2~数 100 量体の混合物で、40 アミノ酸の A β 1-40, 42 アミノ酸の A β 1-42 の双方からなる) 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 (Kuo et al., 1996; Lue et al., 1999). その結果、非線維の A β 集合体が注目を集め、APP 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 (Hartley et al., 1999; Walsh et al., 1999) 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) (Lambert et al., 1998) が同定されるに至った. 2/3 量体はラット海馬の長期増強を抑制す

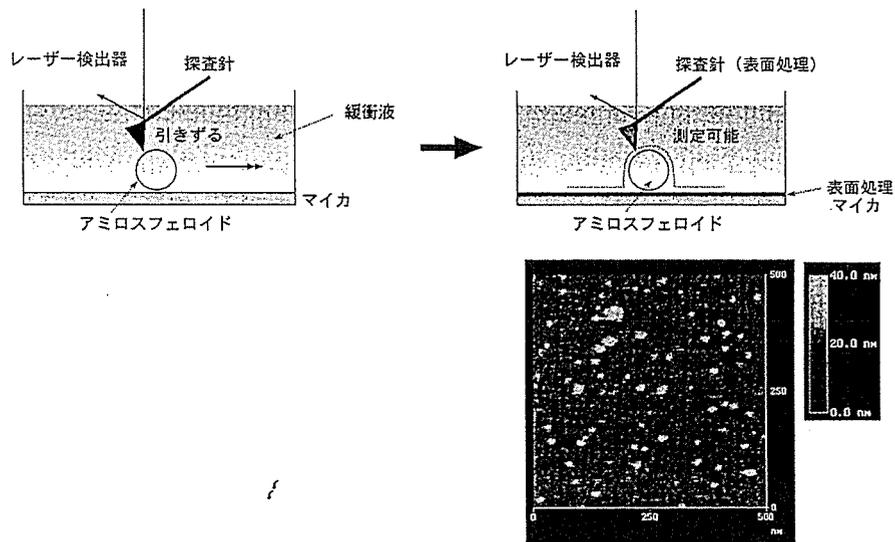


図4. 溶液中におけるアミロスフェロイドの原子間力顕微鏡観察画像

る (Walsh et al., 2002). 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 4-10 nm, 長さ 200 nm 以下の様々なサイズのみである (Hartley et al., 1999; Walsh et al., 1999). 亜種として pore 状プロトフィブリルも同定されている (Lashuel et al., 2003). 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 (Lambert et al., 1998). 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 (Lambert et al., 1998). プロトフィブリル, ADDLs 伴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会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 < 14 kDa 以下の画分にはなく, ゲル濾過上で分子量 50 kDa 以上の画分にあるという. しかし, 3 量体 (= ~14 kDa) から 24 量体 (= ~108 kDa) 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のかも含めて, その形成機構, 物理化学的性質のほとんどは不明である.

従って, 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. 我々は通常の観察には透過型電子顕微鏡を用いている. これは注意すれば非常に優れた検出法だが, 真空中で観察するため試料を乾かす必要があり, また試料の高さを定量出来ない. そこで, 三菱化学科学技術研究センターの協力を仰ぎ, まだあまり行われていない溶液下での nm スケールのタンパク質の原子間力顕微鏡観察に挑戦することとした. しかし, 最初の半年間は何度試みてもまるで冬の日本海さながらの画像しか撮れず, その後ようやく, どうか探査針がアミロスフェロイドを引きずっていることがわかってきた (図 4). そこで, まず探査針のばね定数を非常に弱いものに変え, さらに神経の培養から着想を得て探査針をコートす

ることを思いつき、さらに試料を乗せるマイカをシラン処理を行う等の改良を試みた。その結果、忽然とある日突然アミロスフェロイドの姿が浮かび上がってきたのであった(図4)(Hoshi et al., 2003) (Matsumoto & Hoshi, et al., 未発表データ)。そして、探査針の定量を行い、それを基にアミロスフェロイドの精密な直径を割り出し、高さの測定値との比較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。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 とは異なる形態を持つ新たな構造体であることが証明されたのである。

アミロスフェロイド仮説の提唱

アルツハイマー病の救世主に思われた「ワクチン療法」(合成 A β または抗 A β 抗体の免疫による A β 蓄積の除去) (Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000) は、生理的 A β を含む全 A β の除去を目指している。しかし、この療法の最初の試みはヒトでは 5% に回復不能な脳炎様症状が生じ、A β 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 (Schenk 2002)。今後の改良が待ち望まれる。ごく最近、2つのグループからネプリライシン遺伝子導入の結果が報告された (Iwata et al., 2004; Marr et al., 2003)。岩田らの報告によると、ウィルスベクターにより発現されたネプリライシンは、シナプスにおいて A β を分解する効果があることが示された (Iwata et al., 2004)。A β 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出来ないが、A β の除去に関して新たな方向性を示しており、今後の臨床応用への展開が望まれるところである。一方、Morganらのワクチン療法の研究では線維以外の A β 集合体がワクチン療法の標的である可能性も指摘されている (Morgan et al., 2000)。我々の結果からアミロスフェロイドは、従来考えられてい

た線維の中間体ではないと思われ、毒性がほとんどない線維はむしろ毒性構造体に対する生体防御である可能性も考えられた。もしそうであれば、生理的 A β や線維形成を阻害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」(Bushev 1994; Nicolis and Prigogine 1977; Yates 1987) 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。我々は、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。

おわりに

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。原因タンパク質同士はアミノ酸配列にも本来の機能にも一見共通性はないが、類縁の凝集体を形成し神経細胞死を起こす。本来疾患とは関係のないタンパク質も実験的環境においては凝集することが報告されている (Bucciantini et al., 2002)。これらのタンパク質は、自己組織化しある構造を取ることで、本来の機能にはない毒性を獲得している。このように元々のタンパク質のコンフォメーションと連鎖様式を変えることで新たな機能を獲得する自己組織化能は潜在的に全てのタンパク質に備わっているのかもしれない。多くの神経変性疾患の発症が老化と密接な関係にあることを考えると、タンパク質の自己組織化能によるダイナ

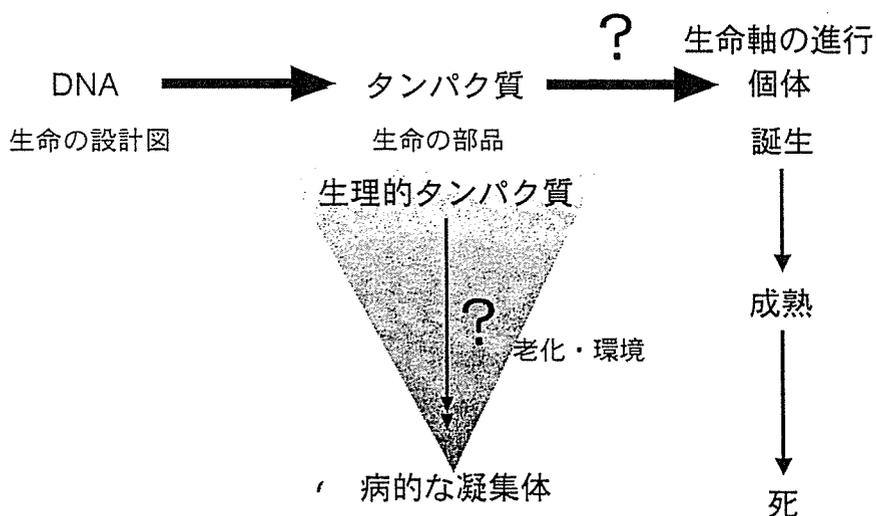


図5. 「かたち」によるタンパク質の老化アルゴリズム

ミックな構造代謝は老化の基本原則と深く関わるのかもしれない(図5)。まだまだ解明すべきことは多いが、アミロスフェロイドからいずれは老化という現象を物理化学的に解明出来たら本望である。

謝 辞

ここで述べた研究は、福岡女子大学佐藤一紀博士との共同研究によるものであり、佐藤道夫博士、野口彰彦氏、伊藤茜氏、坂本弓子氏らの協力により成し遂げたものであります。この場を借りて感謝の意を表します。常に温かい励ましと助言を下された永井克孝所長とアミロスフェロイドの構造について議論いただいた若林健之博士には心から感謝いたします。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。最後になりましたが、私がアルツハイマー病の研究を始めるに当たっていろいろとご指導賜った今堀和友先生に深謝いたします。

文 献

1. Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230.
2. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM and Stefani M (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416: 507-511.
3. Bushev M (1994) Synergetics, chaos, order, self-organization. London: World Scientific.
4. Finkelstein A (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.*: 60-71.
5. Hardy JA and Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184-185.
6. Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB and Selkoe DJ (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 19: 8876-8884.
7. Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T and Imahori K (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3b in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2719-2723.
8. Hoshi M, Takashima A, Murayama M, Yasuta-