

- ke K, Yoshida N, Ishiguro K, Hoshino T and Imahori K (1997) Non-toxic amyloid- $\beta$  peptide-42 suppresses acetylcholine synthesis: Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 272: 2038-2041.
9. Hoshi M (1999) Neurotoxicity and Neuronal Dysfunction Induced by Amyloid- $\beta$ . *J. Clin. Exp. Med.* 189: 22-27.
10. Hoshi M, Ishiguro K, Yoshida N, Kobayashi NR, Sato K and Imahori K (1999) Possible involvement of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (TPKI/GSK-3 $\beta$ ) in neurotoxicity of Ab1-40 aged in a standard method. *Soc. for Neurosci. Abstr.* 25: 2125.
11. Hoshi M (2002) How to prevent deleterious oligomerization of misfolded proteins in aging? *Cell Technology* 21: 728-732.
12. Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N and Sato K (2003) Spherical aggregates of  $\beta$ -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6370-6375.
13. Imahori K, Hoshi M, Ishiguro K, Sato K, Takahashi M, Shiurba R, Yamaguchi H, Takashima A and Uchida T (1998) Possible involvement of tau protein kinases in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol of Aging* 19: s93-s98.
14. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y and Saido TC (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6: 143-150.
15. Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Ozawa K and Saido TC (2004) Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid- $\beta$  peptide in mouse brain. *J Neurosci* 24: 991-998.
16. Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P and Westaway D. (2000) A  $\beta$  peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 979-982.
17. Klein PS and Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8455-8459.
18. Klein WL, Krafft GA and Finch CE (2001) Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24: 219-224.
19. Kobayashi NR, Hirasawa T, Yoshida N, Kudo Y and Hoshi M (1999)  $\beta$ -amyloid1-40 disrupts calcium homeostasis of selective hippocampal neurons in organotypic slice culture. *Soc. for Neurosci. Abstr.* 25: 342.
20. Kuo Y-M, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, Kasunic TC, Kirkpatrick JB, Murdoch GH, Ball MJ and Roher AE (1996) Water-soluble Ab (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* 271: 4077-4081.
21. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA and Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6448-6453.
22. Lashuel HA, Hartley DM, Petre BM, Wall JS, Simon MN, Walz T and Lansbury PT (2003) Jr. Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of Abeta40 in vitro accumulate protofibrils, including amyloid pores. *J Mol Biol* 332: 795-808.
23. Lesort M, Jope RS and Johnson GV (1999) Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and Fyn tyrosine kinase. *J Neurochem* 72: 576-584.
24. Levine H (1995) 3rd. Soluble multimeric Alzheimer beta(1-40) pre-amyloid complexes in dilute solution. *Neurobiol Aging* 16: 755-764.
25. Lorenzo A and Yankner BA (1994)  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12243-12247.
26. Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE and Rogers J (1999) Soluble amyloid  $\beta$  peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155: 853-862.
27. Marr RA, Rockenstein E, Mukherjee A, Kindy MS, Hersh LB, Gage FH, Verma IM and Masliah E (2003) Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J Neurosci* 23: 1992-1996.
28. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M and Arendash GW (2000) A  $\beta$  peptide vaccination prevents memory loss in an

- animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 982-985.
29. Nicolis G and Prigogine I (1977) *Self-organization in non-equilibrium systems*. New York: Wiley.
  30. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenlund C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Naslund J and Lannfelt L (2001) The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation. *Nat Neurosci* 4: 887-893.
  31. Saido TC (2002) Overview-Ab metabolism: From Alzheimer Research to Brain Aging Control. In: *Ab metabolism and Alzheimer's disease*, edited by Saido TC. Georgetown, Texas, USA: Landes Bioscience, p. 1-26.
  32. Schenk D (2002) Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat Rev Neurosci* 3: 824-828.
  33. Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766.
  34. Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298: 789-791.
  35. Sherman MY and Goldberg AL (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29: 15-32.
  36. Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castano EM and Frangione B (1998) 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.
  37. Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T and Imahori K (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid  $\beta$ -protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7789-7793.
  38. Tjernberg LO, Naslund J, Lindqvist F, Johansson J, Karlstrom AR, Thyberg J, Terenius L and Nordstedt C (1996) Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J Biol Chem* 271: 8545-8548.
  39. Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ and Teplow DB (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274: 25945-25952.
  40. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ and Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416: 535-539.
  41. Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG and McGeer PL (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* 297: 97-100.
  42. Yates FE (1987) *Self-organizing systems. The emergence of order*. New York: Plenum.

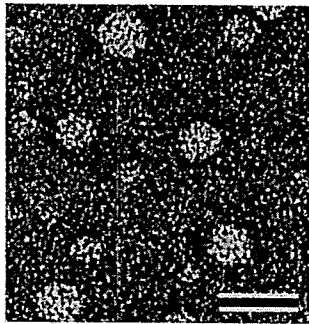
# β アミロイド自己組織化による神経毒性の発現

## —新規毒性物質「アミロスフェロイド」とアルツハイマー病

星 美奈子  
Minako M. HOSHI

### 解説

タンパク質は固有の三次構造を取ることで生理的機能を果たす。最近、神経変性疾患の原因が、異常構造タンパク質が集合体を形成し神経細胞を傷害する新たな機能を持つことである可能性が出てきた。しかし、個々の疾患において凝集体の構造もその作用機序もまだ十分解明されてはいない。我々は、アルツハイマー病の発症の原因であるβアミロイドに由来する病因となる構造を探索し、新たな球状構造体「アミロスフェロイド」を見いだした。その発見の経緯を紹介したい。



カット：アミロスフェロイドの透過型電子顕微鏡観察画像（撮影：三菱化学生命科学研究所 佐藤道夫）。回転攪拌することで溶液中のβアミロイドが自発的に集合しアミロスフェロイドを形成する。（bar=20 nm）

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<sup>4)</sup>。したがって、遺伝情報、すなわち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、タンパク質の三次構造は予想外に精妙で複雑な制御が必要であることがわかってきた<sup>5)</sup>。アルツハイマー病をはじ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、共通の病態でかつ発症にかかわるようである。しかし、それぞれの疾患で凝集がいかに起きるか、凝集体がなぜ神経細胞死を起こすか等、まだ多くは不明である。

#### はじめに

2050年には2.8人に1人が65歳以上になるという。したがって「痴呆の克服」、特に増え続ける「アルツハイマー病」の予防と治療が、臨床と基礎双方での重要課題である。アルツハイマー病の発症原因であるβアミロイド(Aβ)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」(カット)について紹介したい<sup>1)</sup>。

アルツハイマー病では2通りの異常構造タンパク質が蓄積する。1つは脳のシミと呼ばれる「老人斑」を構成するAβ、もう1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蛋白である。近年

#### アミロスフェロイド発見の経緯

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。「三次構造はアミ

PROFILE	
	星 美奈子、三菱化学生命科学研究所 チームリーダー、主任研究員、東工大生 命理工連携客員助教授 (経歴) 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、04年三菱化学生命 科学研究所特別研究員、01年より現職。 03年9月までJST-PRESTO リーダー兼 任。同年内閣記念科学奨励金受賞。(専門) 神経科学。(趣味) 庭仕事。 E-mail: mia@ljbri.is.m.kagaku.co.jp

の医学研究の進歩により、ようやくこの2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。当研究所においても、タウ蛋白リン酸化酵素Iを同定し、Aβによる神経細胞死との関係を解明してきた<sup>6-8)</sup>。しかし、生理的ペプチドとして若いときから恒常的に生産されているAβとアルツハイマー病の関係は複雑であった。なぜなら、老化に伴い脳内のAβ量が増え線維が形成されることが原因とされてきたが、Aβ量が増加せずに早期発症する例や<sup>9)</sup>、多量の老人斑を蓄えながら痴呆を全く発症しない例が数多く見られるからである<sup>10)</sup> (図1)。また、40アミノ酸残基のAβ<sub>1-40</sub>と42残基のAβ<sub>1-42</sub>のどちらも老人斑を形成するが、Aβ<sub>1-42</sub>こそが発症の引き金を引くとされていた。この一見矛盾する事実は、神経毒が線維以外の「特定の構造」にあるとすれば統合可能である。すなわち、年とともに脳内にAβ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Aβ<sub>1-42</sub>はAβ<sub>1-40</sub>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。昨今、線維以外の各種Aβ集合体が試験管内で同定された。その代表は化学合成Aβから作られた短い線維のプロトフィブリル<sup>11,12)</sup>とAβ<sub>1-42</sub>会合体混合物(3~6量体を中心に24量体まで)であるAβ-derived diffusible ligands (ADDLs)<sup>13)</sup>である。これらを線維の中間体とする見方が最近のトレンドだが、Aβの種類も集合の程度も不均一な混合物が、本当に線維の中間体なのか、その形成機構、物理化学的性質も不明であり、形態で区別せざるを得ない。

この状況を打破すべく、我々はあえて集合しやすいAβ<sub>1-42</sub>ではなくAβ<sub>1-40</sub>を用い、溶かした直後は毒性を持たないAβ<sub>1-40</sub>の水溶液が、回転攪拌により毒性を持つことを見いだした<sup>1)</sup>。回転しない場合、線維は形成されるが神経毒性はなかった<sup>1)</sup>。そこで、回転を加えた溶液から神経毒性を示す成分の分離を試み、ついにアミロスフェロイドと名付けた微小球状構造がその実体であることを証明した(図2)<sup>3)</sup>。さらに、Aβ<sub>1-42</sub>は形成時間と濃度の両面においてアミロスフェロイド形成能力がAβ<sub>1-40</sub>よりもはるかに高く、形成されたアミロスフェロイドの毒性も強いことを証明し、これが発症との相関の差である可能性を示した<sup>3)</sup>。

前述のとおり、混合物である他の集合体とアミロスフェロイドを比較するには「見る」しかない。我々は通常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できない。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原子間力顕微鏡観察を試みた。しかし、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付き、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3)<sup>3)</sup>。そして、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、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

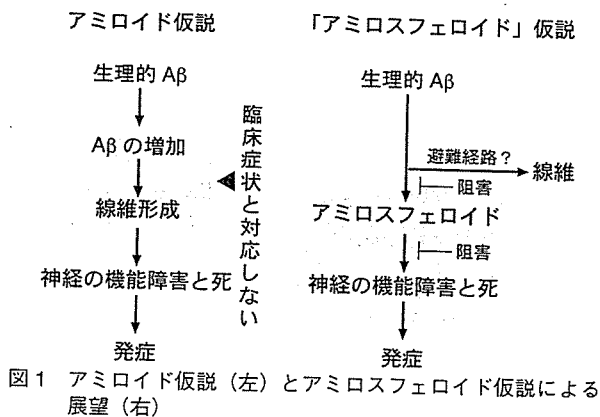


図1 アミロイド仮説(左)とアミロスフェロイド仮説による展望(右)

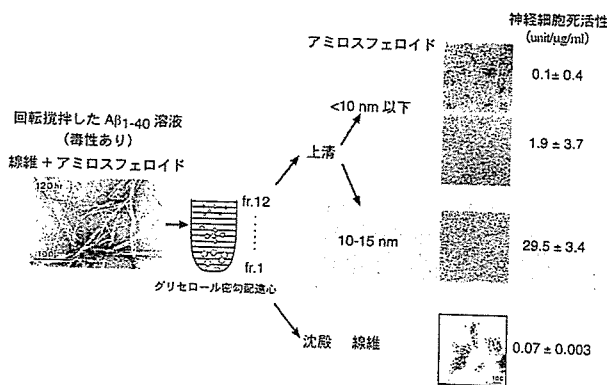


図2 アミロスフェロイドの精製

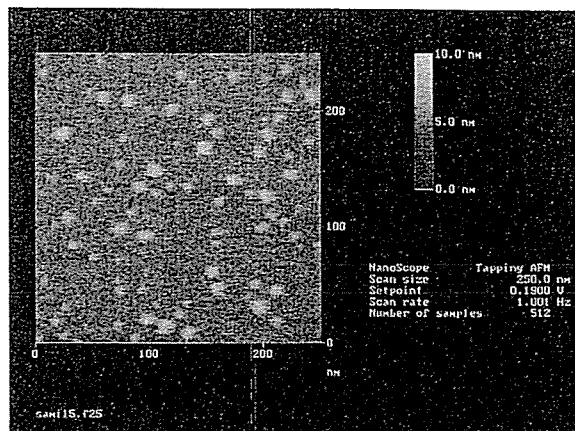


図3 アミロスフェロイドの液中原子間力顕微鏡観察画像 (測定: 三菱化学科学技術研究センター 関 禎子・松本紳一郎)

されたのである。さらに、前述のタウ蛋白リン酸化酵素Iがアミロスフェロイドの毒性にかかわることもわかった。今後、生体での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、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という一連の流れを提案できることになる。

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Aβまたは抗Aβ抗体の免疫によるAβ蓄積の除去)<sup>14)</sup>等は、生理的Aβを含む全Aβの除去を目指している。しかし、この療法はヒトでは5%に回復不能な脳炎様症状が生じ、Aβ除去に成功した例も甚大な組織破壊を伴った。Morganらの研究では線維以外のAβ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<sup>15)</sup>。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避難経路である可能性も考えられた。もしそうであれば、生理的Aβや線維形成を阻害しない治療戦略が開けるかもしれない(図1)。今後、「回転攪拌」がどのような物理化学的変化をAβに引き起

こしているかを解明していきたい。

おわりに

神経変性疾患の発症は加齢と密接な関係にある。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。凝集体の形成は他のタンパク質との相互作用がなくとも自発的に起こる。本来疾患とは関係のないタンパク質も凝集することが報告されており<sup>16)</sup>、タンパク質は単体として生理的機能を果たす以外に、自己組織化による集合体形成により新たな機能を発揮する潜在的可能性を持ち、老化がこの潜在能力を放つ(または抑止力が解かれる)のかもしれない。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できれば本望である。

ここに記載した成果の一部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。

- 1) M. Hoshi et al., *Soc. for Neurosci. Abstr.*, 26, 1283 (2000).
- 2) M. Hoshi, *Cell Technology*, 21, 728-732 (2002).
- 3) M. Hoshi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6370-6375 (2003).
- 4) C. B. Anfinsen, *Science*, 181, 223-230 (1973).
- 5) M. Y. Sherman et al., *Neuron*, 29 (1), 15-32 (2001).
- 6) K. Imahori et al., *Neurobiol. of Aging*, 19, s93-s98 (1998).
- 7) M. Hoshi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2719-2723 (1996).
- 8) M. Hoshi et al., *J. Biol. Chem.*, 272, 2038-2041 (1997).
- 9) C. Nilsberth et al., *Nat. Neurosci.*, 4 (9), 887-893 (2001).
- 10) L. F. Lue et al., *Am. J. Pathol.*, 155 (3), 853-862 (1999).
- 11) D. M. Hartley et al., *J. Neurosci.*, 19 (20), 8876-8884 (1999).
- 12) D. M. Walsh et al., *J. Biol. Chem.*, 274 (36), 25945-25952 (1999).
- 13) M. P. Lambert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (11), 6448-6453 (1998).
- 14) D. Schenk et al., *Nature*, 400 (6740), 173-177 (1999).
- 15) D. Morgan et al., *Nature*, 408 (6815), 982-985 (2000).
- 16) M. Bucciantini et al., *Nature*, 416 (6880), 507-511 (2002).

## 特集にあたって

星 美奈子\*

本特集号を、アルツハイマー病研究への門戸を開いてくださった今堀和友先生に感謝の気持ちを込めてささげる。

「高次な生命現象を物質（タンパク質）の物理化学的な変化で説明する」という視点から研究に取り組み、この何年間かは、未だ謎が多いβアミロイドの神経細胞死機構の問題に取り組んでいる。そして先頃、研究の過程で見出した新たな球状の構造体がとても強い神経毒性を持つことから「アミロスフェロイド」と名付け論文にまとめる機会を得た。その論文が思いもかけないことに、一般の方からも反響をいただき、先日はアナリストの方々に自らの研究を語るという、後にも先にもない貴重な経験することとなった。

その際に、アルツハイマー病を初めとする神経変性疾患への一般の方、そして産業界の関心の深さを文字通り肌身で経験することとなった訳である。それは、1つは高齢化社会から急速に超高齢化社会へと移行しつつある我が国において、神経変性疾患の克服は社会として取り組む必要がある命題であり、従ってマーケットになるという面と、もう1つは誰も寝たきりで老後を過ごしたくは

ない（人ごとではない）という面の双方から来ると思われる。その時以来、現実に治療や予防ということ考えた時、基礎研究としては具体的にはどこまでを明らかにすれば「わかった」と言えるのか、そして自分の研究はどこに位置しているのか、ということをしばしば思い巡らすようになった。

そのような折り、シーエムシー出版発行の月刊『BIO INDUSTRY』誌において「神経変性疾患」の特集号を監修して欲しいとの依頼を受けた訳である。当初は、自分は神経内科の医者でもなく、また、多くの方が既に素晴らしい特集を組まれているこのテーマに、何を今更付け加えることができるのだろうか？ と戸惑ったのが正直なところである。しかし、ここ最近の経験は自分の研究から少し距離を置き、広い視点で見直すことの重要性を教えてくれており、今回もその良い機会と考え、あえて筆者には過分なこの依頼を受けることにした所存である。従って、なるべく専門的になりす

\*Minako Hoshi 三菱化学生命科学研究所 生命科学研究所 神経変性疾患ユニット ユニットリーダー/主任  
研究員

ぎないよう全体の構成を考えた。また、既に確立した研究ばかりではなく、今後の発展が期待されるような研究を選ぶこととした。

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、かつては続いていた。しかし、徐々にそれぞれ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。その新たな展開をもたらした一つの要因はゲノムプロジェクトによってヒトゲノムの全塩基配列が決定されたことである。これにより人類は35億年という進化の過程で培われてきた「生命の設計図」の解読に成功したこととなる。

しかし、これで人体における生命の営み、その営みが異常になった疾患というものを全て説明できるようになった訳ではない(図1)。次の標的として、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ている。タンパク3,000などの巨大プロジェクトによる構造ゲノム科学は、生命の営みを司る主なタンパク質の立体構造を全て明らかにすることでこれに迫らんとしており、それはいわば、設計図から部品を組み立てる段階に相当する。この流れを受け、遺伝性疾患の研究においても、原因遺伝子を明らかにする相関関係の解明から、遺伝子が作るタンパク質がどのように働き(あるいは働かないことで)疾患を起すかを、具体的に明らかにする分子機構への発展が望まれている。これは、将来的にX線結晶構造解析が新規タンパク質の特許要件になることにも明確に表れており、学術研究においても、企業研究としても、疾病研

究は物質科学としての新たな局面を迎えたとと言える。

それでは、アルツハイマー病を初めとする、遺伝性が明らかではなく、頻度の高い神経変性疾患の発症機序はどのようにして解明されていくのであろうか? これに関しては、この何年間かの医学研究、特に分子遺伝学・生化学・神経病理学のクロストークから、「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りつつある。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でき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)がいかに関わるかが重要な課題となる。

このように、生命の設計図、生命の部品は過去には想像もつかなかった勢いで解明されており、新たな局面が開けつつあるが、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。本特集においては、その“?”を克服するための新たな挑戦を行っている研究者に特集をお願いすることとした。それぞれ独自の系を持ち、独自の観点から神経変性疾患の謎に挑もうとしている方々である。そして、神経変性疾患の中でも最も多いアルツハイマー病については、井原康夫先生に全体を俯瞰しつつ現在の治療戦略がどこまで進んでいる

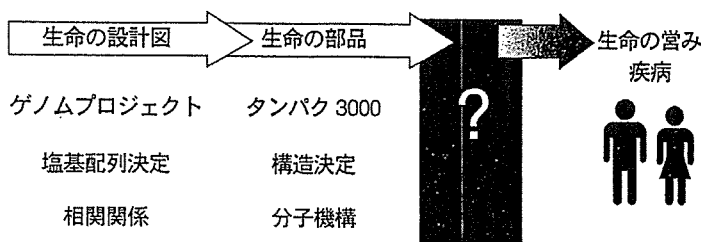


図1 遺伝子と生命の営み・疾病の間をつなぐ

のか、どのような展望が期待されるのかを執筆していただいた。この特集号が、読者の方の知的好奇心をかきたて、新たな挑戦への糸口となれば望外の喜びである。

筆者自身は、元々は細胞増殖、即ち「生きる」という情報がいかに遺伝子に伝わるかに着目しMAPキナーゼの発見に関わり、そして今は、奇しくも神経変性疾患という「死」の研究に携わっている。この方向転換は、ひとえにその当時三菱化学生命科学研究所の所長でいらした今堀和友先

生との出会いによるものである。先生は筆者より40歳以上も年を重ねていらっしゃるが、一緒に研究をさせていただいた数年間で、「年を取るとは衰えること」という筆者の誤った思いこみを粉碎された。そして、自分が研究の対象とするものにひたすらにコミットした時に、初めて新たな道が開けることを身をもって示して下さい。先生への深い感謝を込めて、本特集号を先生に捧げたい。(2004.1.23)



---

## BIO INFORMATION

---

### KAST 平成 15 年度終了プロジェクト報告会

幹細胞制御 (宮島)・極限表面反応 (大西) プロジェクト

（財）神奈川県科学技術アカデミー (KAST) では、平成 15 年度に宮島「幹細胞制御」プロジェクトと大西「極限表面反応」プロジェクトの 2 つのプロジェクトが 5 年間の研究を終えるのに伴い、その研究結果を下記の要領で発表する。

日時 2004 年 3 月 22 日 (月) 10:00, 16:45

会場 KSP ホール

(川崎市高津区坂戸 3-2-1 かながわサイエンスパーク 3F)

定員 250 名

参加費 無料

プログラム

(第 1 部) 肝臓の再生医療および肝癌の診断・治療への応用 (宮島プロジェクト報告会)

研究の総括 (プロジェクトリーダー・宮島 篤)

胎児肝細胞抗原 Dlk の同定と肝幹細胞の分離 (谷水直樹)

胎児幹細胞の *in vitro* における分化機構の解析 (小島伸彦)

Jumonji マウスを用いた胎生肝細胞の分化機構の解析 (安西弘子)

オンコスタチン M 受容体遺伝子欠損マウスの作成と造血機能の解析 (田中 稔)

肝障害/肝再生過程におけるオンコスタチンの役割 (中村康司)

今後の展望—バイオベンチャーへの展開を中心に (中村康司)

(第 2 部) 界面反応現場検証をめざして (大西プロジェクト報告会)

顕微鏡研究の概要 (プロジェクトリーダー・大西 洋)

トンネル顕微鏡による酸化チタン光触媒反応の単一分子観察 (上塚 洋)

原子間力顕微鏡による単一分子の化学分析 (笹原 亮)

分光研究の概要 (大西 洋)

酸化チタン光触媒ダイナミクスの赤外分光計測 (山方 啓)

マルチプレックス和周波分光法の開発 (石橋孝章)

新しい界面ラマン分光法の開発 (藤芳 暁)

終わりに (大西 洋)

申込締切日 3 月 21 日

問合せ先 (財)神奈川県科学技術アカデミー研究調整課 林・橋田

TEL044-819-2034, FAX044-819-2026

e-mail: hayashi@kast.or.jp

(URL) <http://www.kast.or.jp/>



## 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

Amylospheroid-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が、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 $\beta$ 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 $\beta$ 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<sup>1-3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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)<sup>5,6)</sup>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Aβ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、Aβ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知見から、「Aβの蓄積」が最も有力な候補と考えられている<sup>7)</sup>。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、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

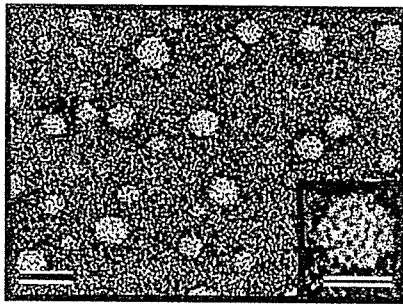


写真1 アミロイドの透過型電子顕微鏡による画像

(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<sup>8)</sup> (アミロイド仮説)。

しかし、この「Aβ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Aβ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<sup>9)</sup>。最近発見されたArctic家系は、突然変異でAβ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、Aβ量は増加してはいない<sup>10)</sup>。さらに、多量のAβ線維を蓄えながら一見正常である老人達の存在もあり<sup>11)</sup>、Aβ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Aβ」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<sup>11, 12)</sup>。患者脳にある可溶性Aβは、2~数百量体の混合物で、40アミノ酸のAβ<sub>1-40}</sub>、42アミノ酸のAβ<sub>1-42}</sub>の双方からできる<sup>12)</sup>。一方で、試験管内で形成される非線維構造体としては、APP

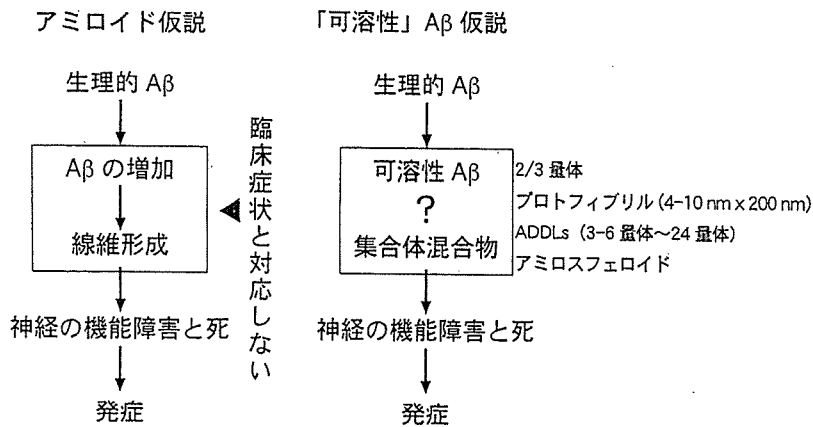


図1 アミロイド仮説 (左) と新たに注目されている可溶性Aβ仮説 (右)

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 $\beta$  から作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<sup>13)</sup>。2/3 量体はラット海馬の長期増強を抑制する<sup>14)</sup>。線維へ至る中間体であるプロトフィブリルは $\beta$ 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<sup>15, 16)</sup>。

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) を持つ A $\beta$  では出現頻度が上がることが報告された<sup>17)</sup>。ADDLs は, 線維形成の抑制条件 (低温または Apo J 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<sup>13)</sup>。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<sup>13)</sup>。プロトフィブリル, ADDLs 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 $\beta$  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 $\beta$  の種類においても, A $\beta$  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 $\beta$  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, 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<sup>5, 6)</sup>。回転攪拌しない場合,  $\beta$ 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<sup>5, 6)</sup>。回転攪拌した場合, 微小な

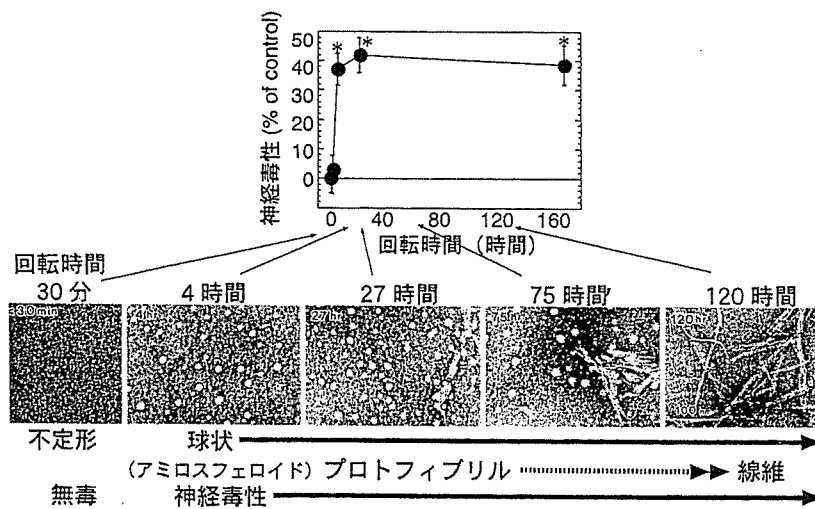


図2 回転によるアミロイド, プロトフィブリル, 線維の形成と神経細胞死活性の関係 (文献 6)

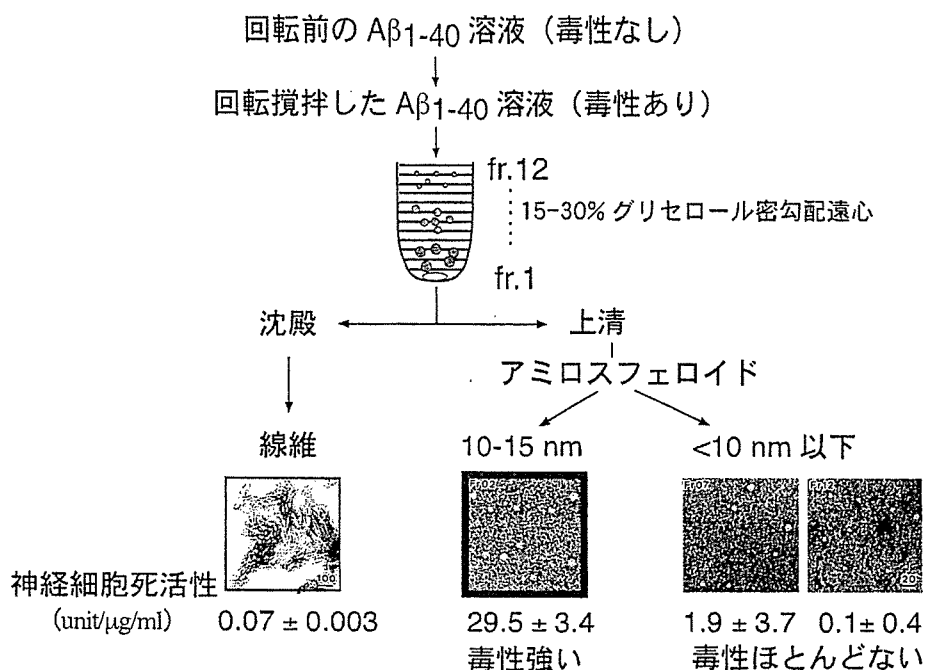


図3 アミロスフェロイドの精製 (文献6)

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<sup>6)</sup>。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)<sup>18, 19)</sup> を予め大過剰に Aβ<sub>1-40</sub> 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<sup>6)</sup>。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

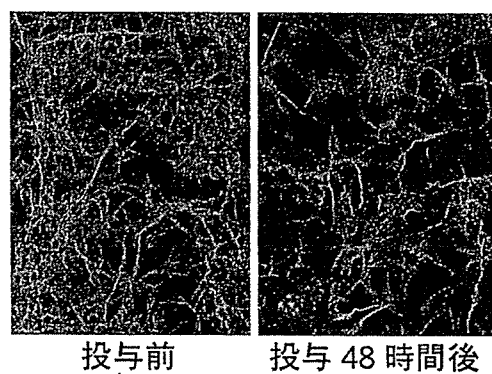


写真2 初代培養細胞に対するアミロスフェロイド毒性の検証

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)<sup>5, 6)</sup>。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

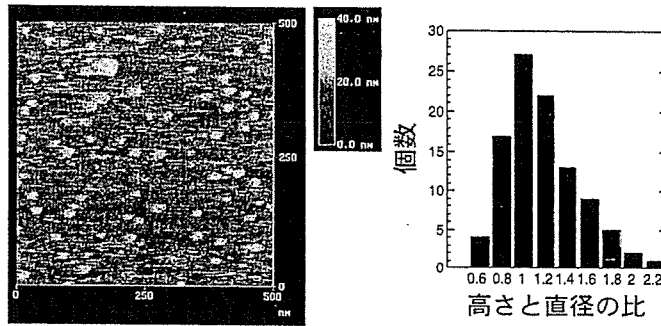
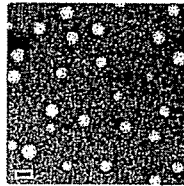


図4 溶液中におけるアミロスフェロイドの原子間力顕微鏡観察画像 (文献6)

### Aβ<sub>1-42</sub> 由来のアミロスフェロイド



	Aβ <sub>1-42</sub> 由来	Aβ <sub>1-40</sub> 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)

写真3 Aβ<sub>1-42</sub> 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)<sup>6)</sup>。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Aβ<sub>1-40</sub>と、それにIleとAlaが付いたAβ<sub>1-42</sub>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Aβ<sub>1-42</sub>であった。

筆者らは、Aβ<sub>1-42</sub>がAβ<sub>1-40</sub>と同様に直径10~15nmのアミロスフェロイドを形成するが、Aβ<sub>1-42</sub>

はAβ<sub>1-40</sub>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)<sup>6)</sup>。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<sup>6, 20)</sup>。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<sub>50</sub>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<sup>6)</sup>。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

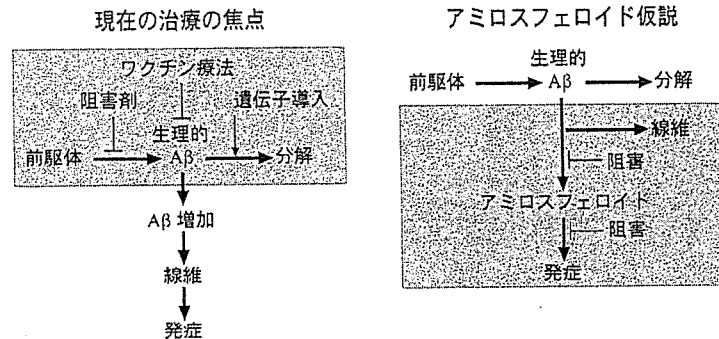


図5 現在の治療の焦点（左図）とアミロイド仮説による展望（右図）

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<sup>2, 3)</sup>、アミ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<sup>21)</sup>。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<sup>22)</sup>、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<sup>23~25)</sup>。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<sup>24)</sup>。

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<sup>26)</sup>。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 $\beta$  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 $\beta$  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」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。

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 $\beta$  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。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 $\beta$  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)





別刷

# Cognition and Dementia

---

Vol. **3** No. **4**

---

2004. 10

メヂカルビュー社

# 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(Aβ)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Aβが、老人の脳で神経毒性をもつに至る物理化学的機構はいまだ謎である。われわれは、Aβ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Aβ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Aβ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



## 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(Aβ)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<sup>1)</sup>。しかしながら、若年時から恒常的に生産されているAβ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いまだ謎である。もし、Aβ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、Aβ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Aβ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、Aβ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Aβ凝集体「アミロスフェロイド」を同定した(図1)<sup>2)</sup>。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。

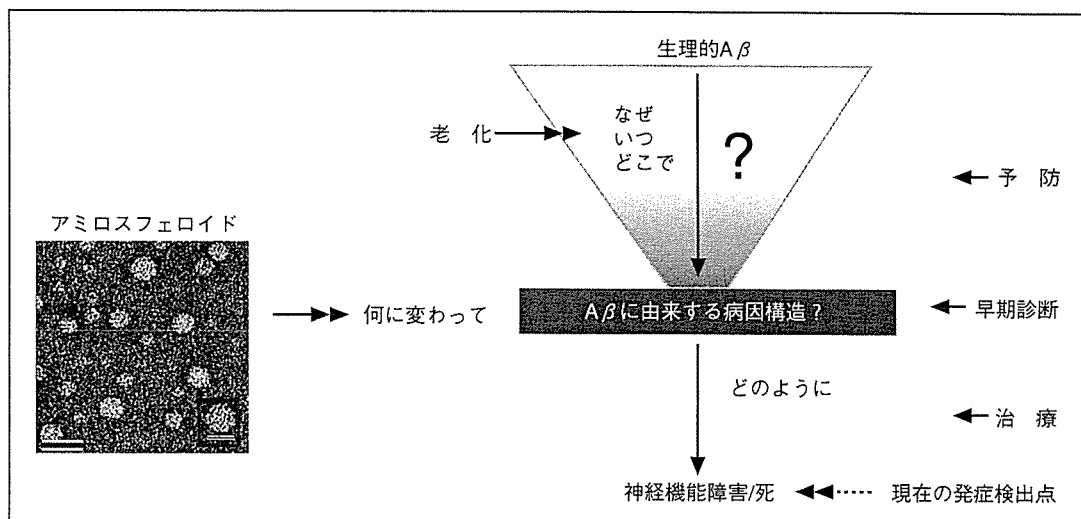


図1 アルツハイマー病発症に残された4W1H  
 生理的Aβではマスクされていた毒性構造が、老化に伴い会合するAβに切り替わり、「特定の構造」をとることで顕在化し、神経細胞死を引き起こす。線維などには毒性がなく、一種の生体防御反応である可能性も考えられる。インセットはアミロスフェロイドの電子顕微鏡観察像。スケールは左が20nm、右が10nm。



## 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<sup>3)</sup>(たとえばAβ<sub>1-40</sub>であれば10<sup>40</sup>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<sup>4)</sup>。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プライミングなど、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<sup>5)</sup>、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<sup>6)</sup>。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Aβ<sub>1-42</sub>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Aβ<sub>1-42</sub>分解酵素であることが示され<sup>7)</sup>、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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>、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<sup>10)</sup>、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 $\beta$ ; TPKI / GSK-3 $\beta$ ) 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<sup>11)</sup>、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<sup>2)12)</sup>。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 $\beta$  シート阻害ペプチド<sup>13)14)</sup>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  $\mu$ 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 2 B)<sup>2)12)</sup>。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