

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 μM 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 $\text{A}\beta_{1-42}$ もアミロスフェロイドを形成することを見出したが、 $\text{A}\beta_{1-40}$ 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、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 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²⁾¹⁵⁾。



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

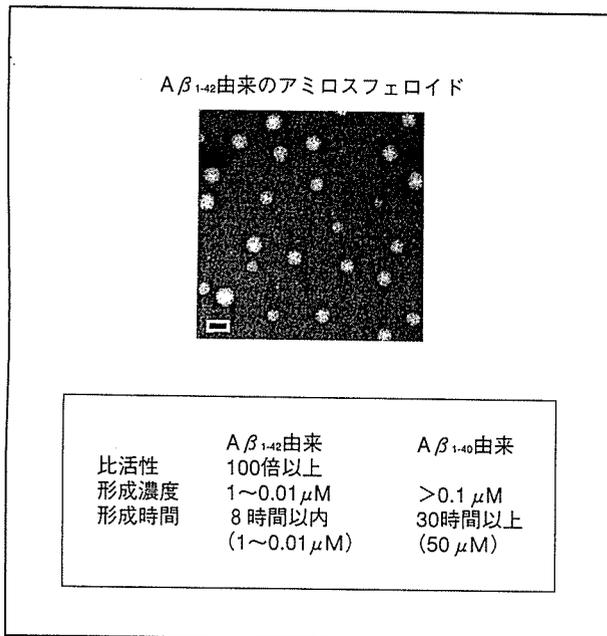


図3 A β_{1-42} はアミロスフェロイド形成能力が高い

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が活性化したのち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 $\beta^{21)$ 」(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会上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。

V 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

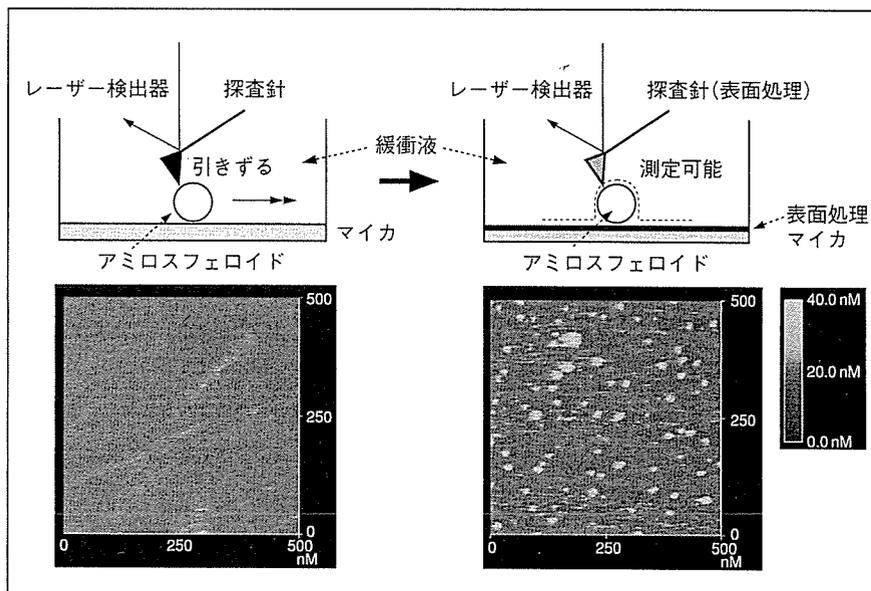


図4 溶液中におけるアミロスフェロイドの原子間力顕微鏡観察画像

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」²⁶⁾ - ²⁸⁾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。



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隙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う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、今後も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 β 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