

(論文内容の要旨)

アルツハイマー病 (AD) は、認知症の主要な原因の一つであり、発症メカニズムの解明ならびに根本的治療法の確立が急務の課題となっている。本疾患の原因物質であるアミロイド β タンパク ($A\beta$) は、アミロイド前駆体タンパク質の膜貫通部分が切断されることにより産生され、分子間で β -シートを形成して凝集し、神経細胞毒性を示す。C 末端の切断部位の相違により、 $A\beta$ には主として 40 と 42 残基の分子種が存在し、それぞれ $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ と呼ばれる。これらのうち、 $A\beta_{42}$ は凝集能および毒性が特に高いことから、 $A\beta_{42}$ の立体構造と毒性との関係の解明が強く望まれている。しかしながら、 $A\beta_{42}$ は不溶性かつ非結晶性であるため、溶液 NMR や X 線結晶構造解析などの高分解能構造解析法を適用できない。本論文では、非晶質固体の構造解析に適用可能な固体 NMR と化学合成によって、 $A\beta_{42}$ 凝集体中の毒性をもたらす立体構造を同定した結果がとりまとめられている。その主な内容は以下の通りである。

第 1 章では、 $A\beta$ の凝集が AD の原因であるとするアミロイド仮説と、 $A\beta$ によって引き起こされる酸化ストレス、 $A\beta$ 凝集体の構造解析に関するこれまでの研究を概説し、本研究の目的および意義について述べた。

第 2 章では、遺伝性の家族性 AD の変異が集中している $A\beta_{42}$ の中央部分の立体構造と毒性との関係を解析した。まず、系統的プロリン置換と固体 NMR による立体構造解析から、 $A\beta_{42}$ 凝集体には 22、23 番目付近と 25、26 番目付近にそれぞれターンを有する 2 種類のコンホマーが存在することを明らかにした。同時に、凝集能および毒性が高い E22K- $A\beta_{42}$ (Italian 変異型) が、Lys-22 と Asp-23 の側鎖間の静電的相互作用により、本部位においてターンを形成しやすいことを指摘した。次に、本知見に基づいて各コンホマーの配座固定アナログを合成し、これらの活性を評価することにより、22、23 番目付近にターンを有するコンホマーが「毒性コンホマー」であり、AD 発症において重要な役割を果たすことを明らかにした。一方、25、26 番目付近にターンを有するものは、「非毒性コンホマー」であった。さらに、電子スピン共鳴を用いて各

配座固定アナログのラジカル産生能を評価した結果、22、23 番目付近におけるターン形成により、ラジカル産生に深く関わっている Tyr-10 と Met-35 が空間的に接近して相互作用し、毒性を示す分子種である Met-35 の硫黄ラジカルカチオンが効率的に産生される可能性を指摘した。

第 3 章では、A β 42 の凝集ならびに毒性発現に深く関わっている C 末端領域の構造を、固体 NMR により解析した。A β 42 凝集体における Met-35 と Ala-42 の空間距離を固体 NMR により解析した結果、これらの残基が空間的に近接しており、毒性を示す分子種である Met-35 の硫黄ラジカルカチオンが C 末端のカルボキシルアニオンにより静電的に安定化される位置にあることを明らかにした。本反応により電荷が消失した C 末端の分子内逆平行 β -シートが疎水性の核となり、A β 42 の凝集の引き金となる可能性を指摘した。

第 4 章では、A β 42 の凝集における毒性コンホマーの役割を調べる目的で、Lys-22 と Asp-23 の静電的相互作用により毒性コンホマーをとりやすい E22K-A β 42 凝集体の分子間 β -シート構造を、固体 NMR を用いて解析した。系統的プロリン置換実験から β -シート領域に含まれていることが明らかになっている Ala-21 の α 炭素のみを ^{13}C で標識したペプチドと、カルボニル炭素のみを ^{13}C で標識したペプチドを等量混合した凝集体を調製し、分子間双極子-双極子相互作用のみを選択的に解析した。同様の解析を Ala-30 においても行ない、Ala-21 と Ala-30 の両方の位置において、分子間平行 β -シートを形成していることを証明した。また、分子間シグナルの強度から、22、23 番目付近にターンを有する凝集の速い毒性コンホマーが会合して核となり、25、26 番目付近にターンを有する非毒性コンホマーが分子間平行 β -シートを形成して伸長する可能性を指摘した。

最後に、第 5 章で本論文の研究の要約ならびに結論を述べた。

(論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病 (AD) は、40 および 42 残基のアミロイド β タンパク ($A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$) の脳内における異常沈着を特徴とする。 $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ に比べて凝集能および神経細胞毒性はるかに高いことから、 $A\beta_{42}$ の立体構造と毒性の関係の解明が強く望まれている。しかしながら、 $A\beta_{42}$ は不溶性かつ非結晶性であるため、溶液 NMR や X 線結晶構造解析などの高分解能構造解析法を適用できない。本論文では、非晶質固体の構造解析に適用可能な固体 NMR と化学合成を駆使して、 $A\beta_{42}$ 凝集体の立体構造を解析し、その細胞毒性発現機構を論じた。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 最近、固体 NMR などにより $A\beta$ 凝集体の立体構造が複数提示されているが、そのほとんどが 25、26 番目付近にターン構造を有するものであり、毒性との関係も不明であった。本論文では、固体 NMR による解析と配座固定アナログの合成により、 $A\beta_{42}$ 凝集体中に、25、26 番目付近にターンを有する「非毒性コンホマー」と 22、23 番目付近にターンを有する「毒性コンホマー」の 2 種類が存在することを初めて明らかにした。さらに毒性の原因が、22、23 番目付近でのターン形成により空間的に接近する Tyr-10 と Met-35 の相互作用であることを、電子スピン共鳴を用いた研究により指摘した。

2. 一般に硫黄ラジカルカチオンの寿命は、細胞内で毒性を発現するには短すぎることから、 $A\beta_{42}$ では何らかの機構で安定化されている可能性が指摘されていた。固体 NMR を用いた解析により、 $A\beta_{42}$ 凝集体において、38、39 番目付近にターンを有する分子内逆平行 β -シートの存在を初めて確認し、Met-35 の硫黄ラジカルカチオンが、C 末端カルボキシルアニオンにより安定化され、長期的な酸化ストレスを示す証拠を得た。これは、 $A\beta_{42}$ が $A\beta_{40}$ よりも凝集能および毒性が高い原因の一つが、C 末端の立体構造の違いに起因することを示唆する興味深い知見である。

3. これまで、分子間 β -シート構造の解析には、特殊な固体 NMR 技術が必要であった。本論文では、安定同位体標識する部位を工夫することにより、

固体 NMR を用いて分子間平行 β -シート構造を簡便かつ正確に証明するプロトコールを考案した。本法を用いて、E22K-A β 42 (Italian 変異型) 凝集体が分子間平行 β -シートを形成していることを初めて証明した。さらに、毒性コンホマーが会合して核となり、非毒性コンホマーが分子間平行 β -シートを介して伸長するという凝集モデルは、A β 42 凝集体に存在する複数のコンホマーの分子間配置に初めて言及したものである。

以上のように本論文は、A β 42 凝集体の立体構造を精密に解析し、その立体構造と毒性との関係を明らかにすることにより、A β 42 の神経細胞毒性発現機構に新知見を加えたものであり、生物有機化学、ペプチド化学、および医薬品化学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 21 年 1 月 22 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。