

(論文内容の要旨)

アルツハイマー病の発症において、40-42 残基からなるアミロイド β タンパク質(A β)の凝集およびアミロイド線維形成は重要な過程であると考えられている。

近年、アルツハイマー病のみならず、多くのアミロイド性疾患において、脂質膜がアミロイド線維形成に重要な役割を担っていることが示唆されている。1995年、柳澤らは、アルツハイマー病患者脳から、神経細胞膜に豊富に含まれる糖脂質 GM1 ガングリオシド(GM1)に結合した A β を発見した。これまでの研究から、GM1 はコレステロール量依存的に密集したクラスターを形成しており、GM1 クラスターを認識して結合した A β が凝集核となってさらなる A β の凝集・沈着を促進していることが報告されている。さらに、GM1 クラスターを介して形成されたアミロイド線維は、水中で形成された線維よりも、神経モデル細胞に対して強い毒性を発揮することが明らかとなっている。しかし、A β と GM1 クラスターの結合の駆動力、GM1 クラスターを介する A β 凝集の分子メカニズムおよび形成されたアミロイド線維構造はいまだ不明である。そこで本研究では、物理化学的見地から、A β と GM1 クラスターの結合・凝集促進のメカニズム、アミロイド線維の多形および線維形成阻害について研究を行った。

第一章では、N 末端を蛍光色素ラベルした A β -(1-40)を用いて、脂質膜との結合性について評価した。A β は酸性条件下では正電荷をもつため負電荷を持つ膜と結合し、アルカリ性条件下では負電荷をもつため正電荷を持つ膜と結合したが、A β が電気的中性となる pH においては結合が見られなかった。したがって、A β はこれらの脂質と静電的相互作用を介して結合しており、脂質のアシル鎖との疎水性相互作用は結合に大きく寄与していないことが明らかとなった。一方、電気的中性条件においても、A β は GM1 を含め様々な糖脂質に糖鎖残基数依存的に結合することが示され、A β と糖脂質の結合は静電相互作用よりも、糖鎖との水素結合あるいは疎水性相互作用が重要であることが示唆された。

第二章では、GM1 を介した A β の凝集機構について検討した。GM1 クラスターを含む脂質膜共存下において、膜中の A β 密度の増大により、 β シート構造が形成された。しかし、凝集反応にラグタイムが存在することから、この β シート構造が凝集核ではなく、さらに構造変化あるいは会合反応を要することが示唆された。

第三章では、GM1 クラスターを介して形成された線維と、水中凝集で形成された線維の構造的特徴について比較を行った。フーリエ変換赤外吸収スペクトル(FTIR)測定をしたところ、膜中で形成された A β -(1-40)線維のスペクトルは、 β シート構造に特徴的な 1625 cm^{-1} に強いピークを示した。この値は水中で形成された線維で観測された 1629 cm^{-1} に比べて

低波数シフトしており、水素結合がより強いことを示唆している。さらに詳細に構造を調べるため、部位特異的同位体ラベル A β を用いて FTIR スペクトル測定を行った。水中凝集線維では、L17 および L34 のカルボニル炭素を ^{13}C でそれぞれラベルしたサンプルで、 ^{13}C - ^{13}C カップリングに由来する β シートバンドの波数シフト($32\text{--}35\text{ cm}^{-1}$)が観測された。これは、L17、L34 を含む領域では A β が分子間 in-register parallel β シート構造を形成していることを示唆しており、Tycko らによる固体 NMR を用いて得られた構造を支持している。一方、膜中凝集線維では、L17、L34 および G37 ラベル体では ^{13}C - ^{12}C カップリングに由来する波数シフト($18\text{--}23\text{ cm}^{-1}$)と intensity borrowing が観測され、この領域で out-of-register parallel β シートあるいは antiparallel β シートを形成している可能性が示され、脂質膜との相互作用によって異なる分子構造を有するアミロイド線維が形成されることが明らかとなった。

アミロイド線維形成阻害は、アルツハイマー病の予防・治療における創薬ターゲットとなりうる。第四章では、ナノゲルによる A β のアミロイド線維形成阻害について検討した。ナノゲルは直鎖状多糖 pullulan にコレステロール分子を共有結合によって付加した高分子からなり、コレステロールを架橋点として自己会合し、内部に水分子を含んだゲル状のナノ粒子を形成する。これまでにナノゲルは、変性タンパク質の refolding を促進する分子シャペロン様作用を有することが報告されている。ナノゲルと A β -(1-42)を混合したところ、ナノゲルは A β と複合体を形成し、濃度依存的に A β の凝集を抑制することが示された。また、複合体形成によって神経モデル細胞に対する毒性も軽減することが明らかとなった。

以上、本研究により、A β と脂質膜の相互作用および膜を介したアミロイド線維形成に関するより詳細なメカニズムが明らかとなった。また、多糖からなる高分子複合体が A β の凝集および毒性発現の阻害に有効であることが示された。これらの結果は、アルツハイマー病発症のメカニズム解明および疾病治療において有用な知見を与えると考えられる。

論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病の発症において、40-42 残基からなるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$)の凝集およびアミロイド線維形成は重要な過程であると考えられている。これまでの研究から、神経細胞膜に豊富に含まれる糖脂質 GM1 はコレステロール量依存的に密集したクラスターを形成しており、GM1 クラスターを認識して結合した $A\beta$ が凝集核となってさらなる $A\beta$ の凝集・沈着を促進していることが報告されている。さらに、GM1 クラスターを介して形成されたアミロイド線維は、水中で形成された線維よりも、神経モデル細胞に対して強い毒性を発揮することが明らかとなっている。しかし、 $A\beta$ と GM1 クラスターの結合の駆動力、GM1 クラスターを介する $A\beta$ 凝集の分子メカニズムおよび形成されたアミロイド線維構造はいまだ不明である。本研究は、物理化学的見地から、 $A\beta$ と GM1 クラスターの結合・凝集促進のメカニズム、アミロイド線維の多形および線維形成阻害について研究を行っている。

第一章では、N 末端を蛍光色素ラベルした $A\beta$ -(1-40)を用いて、脂質膜との結合性について評価している。 $A\beta$ と膜との結合において、脂質のアシル鎖との疎水性相互作用は結合に大きく寄与していないこと、 $A\beta$ と糖脂質の結合は静電相互作用よりも、糖鎖との水素結合あるいは疎水性相互作用が重要であることを明らかにした。

第二章では、GM1 を介した $A\beta$ の凝集機構について検討し、GM1 クラスターを含む脂質膜共存下において、膜中の $A\beta$ 密度の増大により β シート構造が形成されたが、凝集反応にラグタイムが存在することから、この β シート構造が凝集核ではなく、さらに構造変化あるいは会合反応を要することを明らかにした。

第三章では、GM1 クラスターを介して形成された線維と、水中凝集で形成された線維の構造的特徴について比較を行っている。フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定から、膜中で形成された $A\beta$ -(1-40)線維では、 β シート構造の水素結合が水中線維に比べてより強いことを見いだした。さらに、部位特異的同位体ラベル $A\beta$ を用いて、水中凝集線維では、L17、L34 を含む領域では $A\beta$ が分子間 in-register parallel β シート構造を形成していること、膜中凝集線維では、L17、L34 および G37 で out-of-register parallel β シートあるいは antiparallel β シートを形成している可能性が示し、脂質膜との相互作用によって異なる分子構造を有するアミロイド線維が形成されることを明らかにした。

第四章では、ナノゲルによる $A\beta$ のアミロイド線維形成阻害について検討し、ナノゲルが $A\beta$ と複合体を形成し、濃度依存的に $A\beta$ の凝集を抑制すること、複合体形成によって神経モデル細胞に対する毒性も軽減することを明らかにした。

以上、本研究により、 $A\beta$ と脂質膜の相互作用および膜を介したアミロイド線維形成に関するより詳細なメカニズムが明らかとなった。また、多糖からなる高分子複合体が $A\beta$ の凝集および毒性発現の阻害に有効であることが示された。これらの結果は、アルツハイマー病発症のメカニズム解明および疾病治療において有用な知見を与えると考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成21年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。