

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	山口 貴宏
論文題目	Physicochemical studies on aggregation mechanism of Alzheimer's amyloid β protein (アルツハイマー病アミロイド β タンパク質の凝集機構に関する物理化学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>アルツハイマー病 (AD) は進行性の神経変性疾患であり、脳組織への老人斑の沈着が特徴的に見られる。老人斑の主要構成成分は40もしくは42残基からなるアミロイドβタンパク質 ($A\beta$) の凝集体アミロイド線維である。$A\beta$の凝集はAD発症の極めて重要な過程であると考えられており、その凝集機構の解明はAD発症機構の解明、治療薬開発の上で急務である。アミロイド線維の形成機構として重合核依存性重合モデルが提唱されている。同モデルによると線維形成は凝集核形成過程と線維伸長過程に分けられる。凝集核は可溶性単量体が自己会合し、構造変化を伴い形成されると考えられるが、この過程は非常にエネルギー障壁が高く、反応の律速段階となっている。ひとたび凝集核が形成されると可溶性単量体が次々と凝集核に結合し、速やかな線維の伸長が起こる。凝集核は過渡的にしか存在しないため、その構造、及び形成機構は不明である。また線維伸長も単純な一次反応に基づいたモデルに加え、可逆的な結合—解離の相 (Dock) と不可逆な構造変化の相 (Lock) が存在するというDock-Lockモデルや、線維の断片化、分岐などのsecondary nucleation機構など様々なモデルが提唱されており、$A\beta$の凝集機構の詳細は未だ不明である。本研究では$A\beta$の凝集機構を分子レベルで解明することを目的とし、種々の物理化学的手法による解析を行った。</p> <p>溶液NMRは分子の構造、ダイナミクスの解析に有用であると同時に、磁氣的に異なる状態間で平衡状態にあるとき、シグナル強度がその交換速度に依存することから、わずか数パーセントしか存在しないマイナーな分子種を検出することが可能である。第1章では、$A\beta$凝集の初期段階に生じる構造変化を明らかにするため溶液NMRによる解析を行った。$A\beta$-(1—40)の1H-^{13}C, 1H-^{15}N HSQCスペクトルを測定したところ、そのシグナル強度は温度上昇により減少すること、その減少はD23—A30の領域で著しいこと、シグナル強度は$A\beta$濃度に依存しないことが明らかとなった。これらの結果は$A\beta$-(1—40)は単量体の状態においてD23—A30領域にターンを形成するヘアピン構造とランダムコイル状態との平衡状態にあることを示唆している。</p> <p>第2章では、可溶性単量体の自己会合により形成される凝集核を安定化することにより線維形成が促進されると考え、ジスルフィド架橋$A\beta$-(1—40)ダイマーを作製し、線維形成機構を速度論的に解析した。$A\beta$ダイマーは自発的、かつ速やかにβシートに富んだ凝集体を形成した一方、その凝集体はアミロイド線維とは異なり、細く、短いことが分かった。$A\beta$ダイマー凝集体は野生型$A\beta$-(1—40)の凝集核にはならず、また、還元剤処理により速やかに単量体へと解離することからダイマー凝集体</p>			

は熱力学的に最も安定なものではなく、速度論的にトラップされた状態であることが示された。これらの結果から、会合過程においてA β 分子のフレキシビリティ、並びに会合と解離の速度のバランスが重要であることが明らかとなった。

A β -(1—40)単量体にA β -(1—40) seedを添加すると一次反応に従った伸長が見られる一方、A β -(1—40)単量体にA β -(1—42) seedを加えた場合、シグモイド型の凝集曲線を示す。このことはA β -(1—40)はA β -(1—42) seedと可逆的な結合—解離を繰り返した後、不可逆な構造変化を伴い伸長することを示唆している。第3章ではこの交換過程を利用し、A β -(1—40)とスピンラベルを導入したA β -(1—42) seed間の相互作用について解析を行った。不対電子は高い磁気双極子モーメントを持つためその近傍に存在する原子核スピンのNMRシグナルは著しく減少する。Ala30をCysに置換し、スピンラベル試薬MTSLを導入した変異体A30C-A β -(1—42)-MTSLを作製した。A30C-A β -(1—42)-MTSL seed存在下において、A β -(1—40)のNMRシグナルはC末端領域において顕著に減少した。この結果からA β -(1—40)とA β -(1—42) seedは主にC末端領域間で相互作用していることが明らかになった。

本研究により、A β は単量体の状態においてD23—A30領域にターンを形成するヘアピン構造とランダムコイル状態との平衡状態にあること、会合過程においてA β 分子のフレキシビリティ、並びに結合と解離の速度のバランスが重要であること、A β -(1—40)とA β -(1—42) seedは主にC末端領域間で相互作用していることが示された。凝集初期においてはD23—A30領域のターン形成、伸長過程においてはC末端領域の相互作用が重要な役割を果たしていると考えられる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

A β の凝集はAD発症の極めて重要な過程であると考えられており、その凝集機構の解明はAD発症機構の解明、治療薬開発の上で急務である。本研究ではA β の凝集機構を分子レベルで解明することを目的とし、溶液NMRを中心とした種々の物理化学的手法による解析を行っている。まず、第1章では、A β 凝集の初期段階に生じる構造変化を明らかにするため溶液NMRによる解析を行い、温度上昇によるシグナル強度の減弱のアミノ酸残基依存性からA β -(1—40)は単量体の状態においてD23—A30領域にターンを形成するヘアピン構造とランダムコイル状態との平衡状態にあることを示した。次に、第2章では、可溶性単量体の自己会合により形成される凝集核を安定化することにより線維形成が促進されると考え、2種のジスルフィド架橋A β -(1—40)ダイマーを作製し、線維形成機構を速度論的に解析している。その結果、A β ダイマーは線維形成の凝集核とはならない、速度論的にトラップされた状態にある凝集体を速やかに形成することを見だし、会合過程においてA β 分子のフレキシビリティ、並びに会合と解離の速度のバランスが重要であることを明らかにした。最後に、第3章ではA β -(1—40)とスピンラベルを導入した2種のA β -(1—42) seed間の相互作用について溶液NMRによる解析を行い、A β -(1—40)とA β -(1—42) seedは主にC末端領域間で相互作用していることを解明した。すなわち凝集初期においてはD23—A30領域のターン形成、伸長過程においてはC末端領域の相互作用が重要な役割を果たしていることを見いだした。

上記の成果は、AD発症機構の解明に重要な物理化学的知見を与えるものである。

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24年2月22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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降