

|             |                                                                                                                                                                                  |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | おか だ たく ま<br>岡 田 琢 磨                                                                                                                                                             |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (薬 学)                                                                                                                                                                        |
| 学 位 記 番 号   | 薬 博 第 636 号                                                                                                                                                                      |
| 学位授与の日付     | 平 成 20 年 3 月 24 日                                                                                                                                                                |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                                                          |
| 研 究 科 ・ 専 攻 | 薬 学 研 究 科 創 薬 科 学 専 攻                                                                                                                                                            |
| 学 位 論 文 題 目 | Formation of toxic fibrils of Alzheimer's amyloid $\beta$ -proteins mediated by GM1 ganglioside and its inhibition<br>(アルツハイマー病アミロイド $\beta$ 蛋白質の GM1 ガングリオシドを介した毒性型線維形成およびその阻害) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 松 崎 勝 巳 教 授 半 田 哲 郎 教 授 加 藤 博 章                                                                                                                                     |

### 論 文 内 容 の 要 旨

アルツハイマー病 (AD) では、アミロイド  $\beta$  蛋白質 ( $A\beta$ ) の線維状凝集体を主成分とする老人斑の脳への沈着が見られ、この  $A\beta$  線維の神経細胞毒性を AD の原因と考える「アミロイドカスケード仮説」が支持されてきた。近年、AD の進行と  $A\beta$  線維蓄積量に強い相関が見られないことや、老人斑とは異なる部位に  $A\beta$  オリゴマー凝集体の沈着が報告されていることなどから、AD の原因となる  $A\beta$  凝集体について議論が分かれており、その解明が急務である。 $A\beta$  は、生理的には低濃度で存在し自発的な凝集が起こるとは考え難く、*in vivo* で  $A\beta$  の凝集が起こるためには、病態特有の凝集機構が働いていると考えられる。1995 年柳澤らは、びまん性老人斑と量的相関をもって神経細胞膜成分 GM1 ガングリオシド (GM1) と結合した  $A\beta$  が検出されることを見だし、これが核 (seed) としての役割を果たし、 $A\beta$  の凝集・沈着を促す可能性を報告した。本研究では、GM1 を介して形成される毒性を有する  $A\beta$  凝集体が AD の一因ではないかと考え、その単離・同定および形成阻害に関して検討した。

GM1 は、脳内で生体膜の構成成分として、或いは、生体膜から遊離して脳脊髄液中でミセルを形成して存在している。第 1 編では、それぞれの存在状態の GM1 を介した毒性型  $A\beta$  凝集体の形成とその単離・同定について検討した。生体膜中の GM1 は、コレステロールなどと、脂質ラフトを形成していると考えられている。これまでの研究から、GM1 は脂質ラフト様膜中でコレステロール依存的にクラスターを形成し、 $A\beta$ -(1-40) との結合能を獲得することが明らかになっている。第 1 章では、この GM1 クラスターを介した毒性型  $A\beta$  凝集体の形成とその単離・同定について検討を行った。単量体・ランダム構造で自己凝集の起こらない濃度の  $A\beta$ -(1-40) を、脂質ラフト様膜と混合しインキュベートした。ラグタイムの後、 $A\beta$ -(1-40) の凝集が始まり、毒性型  $A\beta$ -(1-40) 凝集体が形成された。その本体は、不溶性で  $\beta$  シート構造に富んだアミロイド線維であった。毒性型線維形成後も、二次構造変化・線維間での側方凝集が観察されたが、毒性は保持された。この結果から、 $A\beta$  が GM1 クラスターを含有する膜と結合すると、これが凝集核となって、毒性型  $A\beta$ -(1-40) 線維の形成が起こることが明らかになった。

また、AD 患者では、傷害を受けた神経細胞膜から放出された GM1 の影響で、脳脊髄液中の遊離 GM1 濃度の上昇が見られると報告されている。第 2 章では、遊離型 GM1 の濃度上昇と関連した毒性型  $A\beta$  形成について検討を行った。 $A\beta$ -(1-40) と GM1 とを混合し、インキュベートしたところ、 $A\beta$ -(1-40) は、ラグタイムの後、 $\alpha$  ヘリックスを含む中間体を経て、 $\beta$  シート構造で不溶性のアミロイド線維を形成し、このアミロイド線維が神経細胞毒性を示した。一方、GM1 が低濃度の場合、線維形成は大きく抑制され、線維形成は GM1 濃度に依存していることが明らかになった。以上より、AD 患者では、脳脊髄液の GM1 濃度が上昇することで、さらに毒性型  $A\beta$ -(1-40) の形成が促され、AD の進行に繋がるという悪循環が起こる可能性が示唆された。

一方、脂質ラフト様膜を介して形成された  $A\beta$ -(1-40) 線維および遊離型の GM1 を介して形成された  $A\beta$ -(1-40) 線

維と比較して、GM1非存在下水中で形成されたA $\beta$ -(1-40) アミロイド線維は、遥かに弱い毒性しか示さず、また、細い線維で構成されているという形態的な相違が観察された。このことから、A $\beta$ -(1-40) 線維のpolymorphismの存在が明らかになった。水中で形成されたA $\beta$ -(1-40) 線維は、表面疎水性が低く、細胞への結合性が低いため、毒性が弱いと考えられた。

以上から、脂質ラフト様膜中および遊離型のGM1を介して形成されたA $\beta$ -(1-40) 線維が、毒性を示しADの進行に重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、A $\beta$ -(1-40) におけるpolymorphismの存在が、ADの進行とA $\beta$ 蓄積量との相関が弱いことの原因のひとつである可能性が示された。

第2編では、AD発症に重要な役割を果たすと言われているA $\beta$ -(1-42) について、膜との相互作用に関してA $\beta$ -(1-40) と比較を行った。まずA $\beta$ の膜への結合における脂質選択性を調べた。N末端を蛍光色素ラベルしたA $\beta$ を用いて、脂質膜との結合実験を行ったところ、A $\beta$ -(1-42) はGM1クラスターと特異的に結合し、A $\beta$ -(1-40) と同様の脂質選択性を示すことが分かった。また、A $\beta$ -(1-42) は、A $\beta$ -(1-40) と同様に、脂質ラフト様膜存在下、A $\beta$ /GM1モル比の増加に依存して、 $\alpha$ ヘリックス構造から $\beta$ シート構造へと変化した。分化PC12細胞を用いた結合・凝集実験から、A $\beta$ -(1-42) はA $\beta$ -(1-40) と比較して高い結合性が見られ、インキュベート時間に依存した線維の形成・毒性発現が観察され、A $\beta$ -(1-42) は膜上でも水中と同様A $\beta$ -(1-40) より速やかに凝集核形成が起こることが分かった。

第3編では、膜を介した凝集の中間体と考えられる、 $\alpha$ ヘリックスを含む構造のA $\beta$ をデザイン・合成し、その性質について解析を行った。まず、A30C,G37C-A $\beta$ -(1-42) を合成し、1,6-bismaleimidohehexaneを用いて分子内架橋した(hA $\beta$ )。hA $\beta$ は、野生型および非架橋型アナログが膜上で $\beta$ シート構造を示す条件でも、部分的に $\alpha$ ヘリックス構造を示した。また、細胞膜上での凝集・毒性実験では、hA $\beta$ 自体が凝集性・毒性を示さないだけでなく、hA $\beta$ が野生型の凝集および毒性発現を阻害することが明らかとなった。

AD患者脳内でA $\beta$ -(1-42) よりも多量存在するとされているA $\beta$ -(1-40) は、水中では凝集能・毒性が低く、ADの発症・進行への寄与は低いと考えられてきた。しかし、病態特異的な膜中でのGM1クラスター形成や、遊離型GM1濃度の上昇が引き金となり、毒性のあるA $\beta$ -(1-40) 線維が形成されることが明らかになったことは、AD発症機構を解明する上で意義深い。また、A $\beta$ の膜上凝集および毒性発現の阻害へのアプローチとして、線維形成を進行させないような蛋白質デザインが有効であったことも、AD治療を考える上で大きな役割を果たすと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病(AD)では、アミロイド $\beta$ 蛋白質(A $\beta$ )の線維状凝集体を主成分とする老人斑の脳への沈着が見られ、このA $\beta$ 線維の神経細胞毒性をADの原因と考える「アミロイドカスケード仮説」が支持されてきた。近年、ADの進行とA $\beta$ 線維蓄積量に強い相関が見られないことや、老人斑とは異なる部位にA $\beta$ オリゴマー凝集体の沈着が報告されていることなどから、ADの原因となるA $\beta$ 凝集体について議論が分かれおり、その解明が急務である。本研究では、神経細胞膜成分GM1ガングリオシド(GM1)を介して形成される毒性を有するA $\beta$ 凝集体がADの一因ではないかと考え、その単離・同定および形成阻害に関して検討している。

生体膜中のGM1は、コレステロールなどと、脂質ラフトを形成していると考えられている。これまでの研究から、GM1は脂質ラフト様膜中でコレステロール依存的にクラスターを形成し、A $\beta$ -(1-40) との結合能を獲得することが明らかになっている。まず、このGM1クラスターを介した毒性型A $\beta$ 凝集体の形成とその単離・同定について検討を行い、不溶性で $\beta$ シート構造に富んだアミロイド線維が毒性型A $\beta$ であることを突き止めた。

また、AD患者では、傷害を受けた神経細胞膜から放出されたGM1の影響で、脳脊髄液中の遊離GM1濃度の上昇が見られると報告されている。そこで、遊離型GM1存在下で毒性型A $\beta$ 形成について検討を行った結果、遊離型GM1の濃度上昇と相関して、毒性を持ったアミロイド線維が形成されることが明らかとなった。すなわち、AD患者では、脳脊髄液のGM1濃度が上昇することで、さらに毒性型A $\beta$ -(1-40) の形成が促され、ADの進行に繋がるという悪循環が起こる可能性が示唆された。一方、上記の2種の線維と比べ、GM1非存在下水中で形成されたA $\beta$ -(1-40) アミロイド線維は、遥かに弱い毒性しか示さず、また、細い線維で構成されているという形態的な相違が観察された。このことから、A $\beta$ -(1-40) 線維

の polymorphism の存在が明らかになった。

次に、AD 発症に重要な役割を果たすと言われている  $A\beta$ -(1-42) について、膜との相互作用に関して  $A\beta$ -(1-40) と比較を行った。その結果、脂質選択性や結合性には大きな差はなく、凝集核形成速度において  $A\beta$ -(1-42)  $\gg$   $A\beta$ -(1-40) であることが分かった。

最後に、膜を介した凝集の中間体と考えられる、 $\alpha$ ヘリックスを含む構造の  $A\beta$  (hA $\beta$ ) を A30C,G37C- $A\beta$ -(1-42) を 1,6-bismaleimido-hexane で分子内架橋することにより合成し、その性質について解析を行った。その結果、hA $\beta$  自体が凝集性・毒性を示さないだけでなく、hA $\beta$  が野生型の凝集および毒性発現を阻害することが明らかとなった。

以上のように、これまで水中では凝集能・毒性が低く、AD の発症・進行への寄与は低いと考えられてきた  $A\beta$ -(1-40) が、病態特異的な膜中での GM1 クラスター形成や、遊離型 GM1 濃度の上昇が引き金となり、毒性のある  $A\beta$ -(1-40) 線維が形成されることが明らかになったことは、AD 発症機構を解明する上で意義深い。

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20年2月26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。