

|             |                                                                                                                          |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | むら 村 上 かみ 一 かず ま 馬                                                                                                       |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (農 学)                                                                                                                |
| 学 位 記 番 号   | 農 博 第 1613 号                                                                                                             |
| 学位授与の日付     | 平 成 19 年 3 月 23 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 | 農 学 研 究 科 食 品 生 物 科 学 専 攻                                                                                                |
| 学 位 論 文 題 目 | Mechanism of Neurotoxicity of A $\beta$ 42 Peptide in Alzheimer's Disease<br>(アルツハイマー病における A $\beta$ 42 ペプチドの神経細胞毒性発現機構) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 大 東 肇 教 授 吉 川 正 明 教 授 永 尾 雅 哉                                                                               |

### 論 文 内 容 の 要 旨

アルツハイマー病は、神経変性疾患の一種であり、類似の疾患としてパーキンソン病やプリオン病などが知られている。現時点で有効な治療法はほとんどなく、本疾患の発症機構の解明、および、根本的な治療法と予防法の確立が社会的に強く望まれている。アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド  $\beta$  (A $\beta$ ) ペプチドには、主として40残基および42残基からなる A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 が存在し、これらは凝集することによって神経細胞毒性を示す。これまで、A $\beta$  の凝集や神経細胞毒性に関する研究のほとんどは合成の容易な A $\beta$ 40 に関するものであった。しかしながら、A $\beta$ 40 の凝集能および神経細胞毒性は A $\beta$ 42 と比べてはるかに低いこと、また遺伝性の家族性アルツハイマー病において A $\beta$ 42 の過剰産生が認められることから、A $\beta$ 42 が本疾患の発症において重要な役割を果たすものと考えられている。本論文では、A $\beta$ 42 の高純度合成法を確立し、有機化学的手法を駆使して凝集ならびに神経細胞毒性発現機構を分子レベルで解析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 $\beta$  が凝集することによって神経細胞に酸化ストレスを与えるとするアミロイド仮説と A $\beta$  凝集体の構造解析、ならびに A $\beta$  のラジカル化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ている。

第2章では、野生型 A $\beta$ 42 および遺伝性アルツハイマー病に見られる A $\beta$ 42 変異体5種を高純度かつ高収率で化学合成し、これらの凝集能および神経細胞毒性を調べた結果について述べている。A $\beta$ 42 の化学合成は、ポリエチレングリコールをスパーサーとしたポリスチレン樹脂を固相担体とし、Carpino によって開発された強力な活性化剤である HATU を用いた Fmoc 法を連続フロー型合成機において行うとともに、塩基性条件下で HPLC 精製することによって達成している。各種 A $\beta$ 42 変異体の凝集ならびに毒性試験の結果に基づき、22番目のグルタミン酸残基 (Glu-22) 付近におけるターン構造を特徴とする A $\beta$ 42 の新しい凝集体モデルを提示している。

第3章では、第2章で提唱した A $\beta$ 42 の新しい凝集体モデルにおいて、A $\beta$ 42 のラジカル化に重要な役割を果たしている10番目のチロシン残基 (Tyr-10) および35番目のメチオニン残基 (Met-35) が接近していることが推定されたことから、これらの側鎖間距離をスピンラベル剤を用いた電子スピン共鳴法によって解析した結果を述べている。対照として毒性の低い A $\beta$ 40 についても同様に解析することによって、A $\beta$ 42 における Tyr-10 と Met-35 の残基間距離が 15 Å 以下であり、A $\beta$ 40 に比べて 15~20 Å ほど接近している可能性を指摘している。

第4章では、A $\beta$ 42 のラジカル化を介した神経細胞毒性発現機構について述べている。第3章で得られた知見、ならびに、各種 A $\beta$ 42 変異体のラジカル産生能の評価より、金属イオンとの反応によって Tyr-10 から生じたフェノキシラジカルが、Glu-22 付近でのターン形成を介して Met-35 側鎖に近づくことによって、硫黄原子を効率よくラジカル化することを指摘している。さらに、生成した硫黄原子のカチオンラジカルは、分子内  $\beta$ -シート構造を介して C 末端カルボキシラジカルアニオンで安定化され、平衡反応により一部開裂したカルボキシラジカルが毒性を示すという新しい毒性発現機構を提唱している。また各種 A $\beta$ 42 変異体の凝集能とラジカル産生能との間に高い相関関係が認められたことから、凝集した A $\beta$ 42 は内包され

たラジカルを持続的に放出することにより、長期間にわたって神経細胞毒性を示す可能性を指摘している。本機構は、 $A\beta_{42}$  と  $A\beta_{40}$  との間で著しく異なる凝集能および神経細胞毒性の差を明快に説明できる初めてのものである。

最後に、第 5 章で本研究によって解明された点および結果がまとめられている。

## 論文審査の結果の要旨

40残基および42残基のアミロイド  $\beta$  ( $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ) ペプチドは、凝集することで神経細胞毒性を示すことからアルツハイマー病の原因物質として注目されている。 $A\beta_{42}$  の凝集能および神経細胞毒性は  $A\beta_{40}$  に比べてはるかに高いことから、 $A\beta_{42}$  が本疾患の発症に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、これまで  $A\beta_{42}$  そのものに関する化学的研究はあまり行われていなかった。その理由として、 $A\beta_{42}$  の合成難度が高く、精製も困難である点が挙げられる。本論文では、野生型  $A\beta_{42}$  およびその変異体 5 種を高純度で化学合成し、それらの凝集能、神経細胞毒性、ならびにラジカル産生能を解析した結果と、電子スピン共鳴法を用いて  $A\beta$  の立体構造解析を行った結果がとりまとめられている。本論文の評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. 遺伝性のアルツハイマー病に見られる  $A\beta_4$  の変異体をすべて化学合成し、凝集能および神経細胞毒性を解析した結果、Glu-22 付近におけるターン構造を特徴とする  $A\beta_{42}$  の新しい凝集体モデルを提唱した点は高く評価できる。本モデルにおけるターンの位置が、遺伝性アルツハイマー病に見られる  $A\beta$  配列の変異が集中している部位と一致している点は極めて興味深い。

2.  $A\beta_{42}$  の凝集体モデルにおいて、 $A\beta_{42}$  のラジカル化に重要な役割を果たしている Tyr-10 および Met-35 が接近していることにいち早く着目し、スピンラベル剤を用いた電子スピン共鳴法によって Tyr-10 および Met-35 残基間距離の測定に初めて成功した。 $A\beta_{40}$  についても同様の解析を行うことにより、高い細胞毒性を有する  $A\beta_{42}$  における両残基間の距離が、毒性をほとんど示さない  $A\beta_{40}$  に比べてはるかに小さいことを明らかにした。本結果は、 $A\beta_{42}$  の高い神経細胞毒性の一因と考えられる新しい知見である。

3. 毒性発現に不可欠な Met-35 の硫黄ラジカルカチオンが、主として Glu-22 付近のターンを介して生成すること、また本ラジカルが38番目のグリシン残基 (Gly-38) 付近におけるターンを介した分子内  $\beta$ -シートにより C 末端カルボキシアニオンで安定化され、その結果、長期にわたり神経細胞毒性を示すという  $A\beta_{42}$  の新しい毒性発現機構を提示した。これより、Glu-22 付近および Gly-38 付近におけるターン構造を特徴とする  $A\beta_{42}$  の‘病的’なコンホメーションは  $A\beta$  の毒性本体を反映するものと考えられる。従って、両ターン構造を特異的に認識する抗体および RNA アプタマーは、副作用の低いアルツハイマー病治療薬になることが期待され、新しい治療戦略の一つになる可能性を秘めている。

以上のように本論文は、各種  $A\beta_{42}$  変異体に関する凝集能、神経細胞毒性およびラジカル産生能の解析に基づき、 $A\beta_{42}$  の凝集ならびに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 19 年 2 月 8 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。