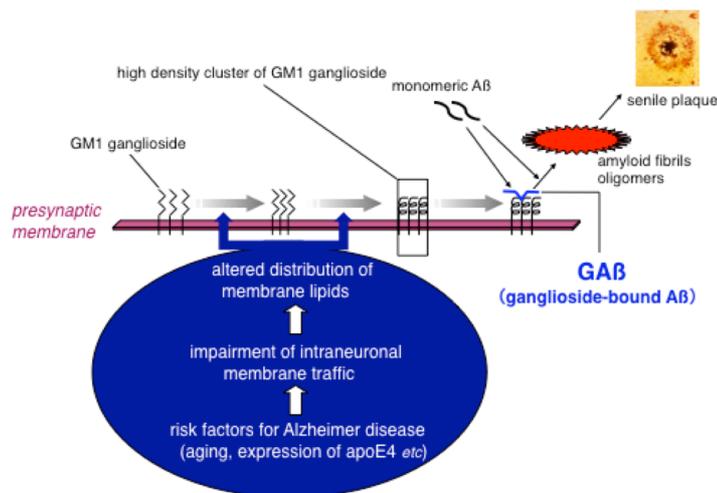


アルツハイマー病におけるアミロイド形成機序の解明 (25-19)

主任研究者 柳澤 勝彦 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター長

研究要旨

アミロイドβ蛋白質 (Aβ) の重合によるアミロイド形成は、アルツハイマー病 (AD) の起点で生じる異常事象である。従ってAβ重合の分子機序を解明し、それを抑止する手法を開発することは、ADの根本的な予防ならびに治療への確かな路程といえる。柳澤らは、脳内においてAβは神経細胞膜上でガングリオシドに結合し、特異なガングリオシド結合型Aβ (ganglioside-bound Aβ, GAB) が形成され、これがアミロイド形成の内因性seedとして働くことを示してきた (下図参照)。本研究はGABに焦点をあて、GAB形成の背景にある神経細胞膜脂質組成の変化、GABの超分子構造、ガングリオシド依存性アミロイド線維の毒性発現機序等を、NMR、質量分析、原子間力顕微鏡等を用いて解析する。同時に、GABを標的とするアミロイド形成阻害薬の開発研究を実施する。



主任研究者

柳澤 勝彦 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター長

分担研究者

加藤 晃一 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授
松崎 勝巳 京都大学大学院 薬学研究科 教授
鈴木 明身 東海大学 糖鎖科学研究所 所長
松原 輝彦 慶應義塾大学理工学部 講師

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) において神経細胞傷害を誘導するアミロイド β 蛋白質 (A β) 重合体の形成機構を解明し、それを抑止する手法の開発により、AD の本質的な予防法ならびに治療法 (先制治療法) を確立することを目的とする。

《必要性》アルツハイマー病患者数は我が国で 200 万人、世界で 3200 万人を超えたと推定され、今後さらなる増加が懸念されている。本疾患病態生理への理解は深まってはいるものの、依然、分子病理学的発症機序の詳細は不明であり、根治的な治療薬 (疾患修飾薬) の開発では不成功が相次いでいる。このような状況において、AD 発症機構を分子レベルで解明し、その理解に基づく先制治療法を確立することは喫緊の課題である。

《特色・独創的な点》本研究は、主任研究者の柳澤がヒト脳内で見出したアミロイド形成の内因性の「種」であるガングリオシド結合型 A β (GAB) に焦点をあて研究を進めるものであり、際立った特色と高い独創性を有している。

B. 研究方法

(柳澤) 新規のアルツハイマー病病態モデルの作製をめざして、ショウジョウバエの神経系にヒト A β の産生ならびにガングリオシドの発現を誘導する種々の遺伝子導入を行う。また GAB 結合性低分子化合物の探索を低分子化合物ライブラリーを対象に進める。

(加藤) 線維伸長の末端に現れる特異構造を保持しつつ線維伸長を抑止する実験系を設計・作出し、立体構造解析を実施する。

(松崎) ラフト膜での A β 凝集過程を分子動力学シミュレーションする。また、毒性型アミロイド線維の構造をケミカルクロスリンクにより推定する。神経細胞に A β を添加し、凝集に伴う膜流動性変化と細胞死の関係を調べる。また、マイクロアレイを用い、タンパク質発現プロファイル変化を網羅的に調べる。

(鈴木) 中性糖脂質の分析のためのサンプル前処理法を確立する。ガングリオシド、スフィンゴミエリンの解析を行い、それらの定量法を検討する。

(松原) 脳から抽出した脂質の単分子膜を作製し、累積して再構成膜を作製した後、脂質膜面の表面形状を AFM により観察して A β 形状の経時変化を画像化する。この実験により A β 重合とガングリオシドのナノスケールでの膜内分布の関係を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究課題の遂行にあたってマウス等のモデル動物を対象とする実験が必要となる場合には、国立長寿医療研究センター動物実験委員会での承認を受け、また同センターが定める動物実験指針に従い、動物愛護に十分留意する。本研究の一部においては、平成 24 年度までにヒト脳より分離精製した神経細胞膜標品を使用するが、これは東京都健康長寿医療センターにおいて、同センターが定める規程に沿って遺族の同意のもとに実施された剖検により得られた脳より調製された試料である。これらの使用にあたっては、研究代表者が所属する国立長寿医療センターにおいて厚生労働省が定めた臨床研究に関する倫理指針のもとに審議される倫理委員会での承認が得られており、また当該分担研究者の所属機関においても、その解析が実施されることに関しての承認が得られている。

C. 研究結果

初年度にあたり、主任研究者ならびに分担研究者それぞれ担当課題に沿って研究を実施した。具体的には、ショウジョウバエに AB 重合誘導能力を有し、最も単純な構造を有する GM3 ガングリオシドを発現させるべく、複数の遺伝子導入を行い、GM3 の存在下で重合誘導を受ける変異型 AB との共発現系個体の作出に向け準備を進めた（柳澤）。AB 重合機構の解明を目指し、その過渡的中間体としての性質を有しているアミロイド線維末端の構造解析に必要なアミロイド線維断片の作製に取り組み、最も小型かつ有力なアミロイド線維断片モデルの作出の準備を整えた（加藤）。AB 重合過程における AB の芳香族アミノ酸の役割を明らかにするため、アミノ酸置換を施した誘導体を合成し、固体 NMR 測定により、GM1 クラスタを介して形成された AB の線維構造の解析に着手した（松崎）。また、AB 重合誘導に関わるガングリオシド分子種を特定をめざし、液体クロマトグラム-質量分析(LC-MS)を用いるガングリオシド分析法を詳細に検討し、ガングリオシドの解析に応用した（鈴木）。さらに、AB 重合誘導の基盤となる細胞膜脂質の特性のより詳細な解析をめざし、マイカ基板上に脂質膜を再構成し、原子間力顕微鏡観察を行うことによって、脂質成分の変化が AB 蓄積に与える影響を評価した（松原）。

D. 考察と結論

本年度は本研究課題実施の初年度であるため、総括的な考察ならびに結論は得られていない。しかしながら、初年度の主任研究者ならびに分担研究者による研究は、当初計画に沿って順調に進められ、本研究班が解明をめざすアミロイド形成の分子機序の解明に重要な知見が今後 2 年間の研究により得られると期待された。本研究班の構成員はいずれも分子レベルでの AB 重合の解析に必要な専門性を有している。従って、本研究班で得られることが期待される成果は、AB 重合を効率良く、また安全に抑止するアルツハイマー病先制治療薬の開発にも寄与するものと期待される。

E. 健康危険情報

特に記載すべき事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hong S., Ostaszewski B.L., Yang T., O'Malley T.T., Jin M., Yanagisawa K., Li S., Bartels T., Selkoe D.J.
Soluble A β Oligomers Are Rapidly Sequestered from Brain ISF In Vivo and Bind GM1 Ganglioside on Cellular Membranes.
Neuron 82, 308–319 (2014)

- 2) Oikawa N., Hatsuta H., Murayama S., Suzuki A., Yanagisawa K.
Influence of APOE Genotype and the Presence of Alzheimer's Pathology on Synaptic Membrane Lipids of Human Brains.
J Neurosci Res. 92, 641-650 (2014)
 - 3) Yagi-Utsumi M., Kuniyama T., Nakamura T., Uekusa Y., Makabe K., Kuwajima K. and Kato K.
NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid β as a model ligand. FEBS Lett. 587, 1605-1609 (2013)
 - 4) Hoshino T., Mahmood M.I., Mori K., Matsuzaki K.
Binding and aggregation mechanism of amyloid β -peptides onto the GM1 ganglioside-containing lipid membrane.
J. Phys. Chem. B. 117, 8085-8094 (2013)
 - 5) Ito E., Waki H., Miseki K., Shimada T., Sato T., Kakehi K., Suzuki M., and Suzuki A.
Structural characterization of neutral glycosphingolipids using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with a repeated high-speed polarity and MSn switching system.
Glycoconj. J. 30, 881-888 (2013)
2. 学会発表
- 1) 柳澤勝彦
アルツハイマー病発症におけるガングリオシドの役割.
第 32 回日本糖質学会年会, 「ワークショップ “脳・神経・筋疾患と糖鎖”」
2013 年 8 月 6 日, 大阪
 - 2) 山崎泰豊, 小又尉広, 鈴木枝里子, 林永美, 柳澤勝彦, 津田玲生
ショウジョウバエを用いたアルツハイマー病治療薬の定量的評価系.
第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸
 - 3) Yagi-Utsumi M., Kato K.
NMR approaches for characterizing interactions between GroEL and intrinsically disordered proteins.
8th Asian Biophysics Association Symposium (ABA Jeju 2013)
2013 年 5 月 26 日 (Jeju)
 - 4) Kato K.
NMR characterization of dynamic conformational ensembles of oligosaccharides and intermolecular interactions in glycolipid clusters.
5th Asia-Pacific NMR Symposium 2013 2013 年 10 月 28 日 (Brisbane)

- 5) 加藤晃一
NMR を用いた生体分子のダイナミクスの解析.
大阪市立大学分子ナノ情報解析センターユーザーズミーティング
2013 年 4 月 16 日 (大阪)
- 6) 加藤晃一
生命分子のダイナミクスと自己組織化.
国際高等研究所研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」第 1 回研究会 2013 年 4 月 21 日 (奈良)
- 7) 加藤晃一
糖鎖が担うタンパク質社会の秩序維持.
市民公開講座 (第 99 回分子科学フォーラム) 2013 年 9 月 20 日 (岡崎市)
- 8) Matsuzaki K.
GM1 Cluster Mediated-Aggregation of Alzheimer's Amyloid β Protein. Biophysical Society Membrane Protein Folding Meeting, May 19-22, Seoul, South Korea
- 9) 松崎勝巳
脂質環境によるペプチド・タンパク質の構造制御.
第 13 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「化学的手法による蛋白質・ペプチドの立体構造制御」、2013 年 6 月 12 日~14 日、鳥取
- 10) 松崎勝巳
ガングリオシドクラスターを介したアルツハイマーアミロイド β タンパク質のフォーメーションと凝集.
第 51 回日本生物物理学会年会シンポジウム「アミロイド線維形成における膜界面の役割」、2013 年 10 月 28 日~30 日、京都
- 11) 松崎勝巳
ガングリオシドクラスターを介した毒性型アミロイド β ペプチド凝集体形成.
生命分子機能研究会セミナー2014、2014 年 3 月 14 日、長浜
- 12) Suzuki A.
Ganglioside analysis by LC-MS.
The 5th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology Conference.
Oct. 14-18, 2013, Khon Kaen, Tai
- 13) 鈴木明身
Targeted glycolipidomics が可能にする新展開.
第 11 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウムランチョンセミナー
2013 年 10 月 25-26 日、仙台

- 14) 松原輝彦、福田竜統、小島昂大、山本直樹、柳澤勝彦、佐藤智典
アミロイドβ凝集を誘起する糖脂質ナノクラスターの構造モデルの構築.
第62回高分子討論会、金沢大学、2013年9月12日
- 15) 松原輝彦、福田竜統、飯島一智、小島昂大、山本直樹、柳澤勝彦、佐藤智典
脂質組成モデルによるガングリオシドナノクラスターの構築とアミロイドβ凝集.
第7回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学、2013年9月27日
- 16) 西原昌哉、福田竜統、松原輝彦、佐藤智典
原子間力顕微鏡を用いたGM1含有平面膜上でのアミロイドβの凝集形態の観察.
日本化学会第94春季年会、名古屋大学、2014年3月27日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし