

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19591352
 研究課題名（和文）脳内にあるアルツハイマー病アミロイドβ以外のアミロイドβ様ペプチド群の性質
 研究課題名（英文）Characterization of Abeta-like peptide other in brains of Alzheimer disease
 研究代表者
 大河内 正康（MASAYASU OKOCHI）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：90335357

研究成果の概要：

我々は生理的に脳内に存在するアルツハイマー病Aβと同じ仕組みで放出されたAβ様ペプチドの凝集性などの性質を検討し、Aβとの異同を論じた。その結果、(i) Nβ、APL1βペプチドなどのAβ様ペプチド群がoligomerを形成するが、(ii) fibril形成しない。また、(iii) Aβ様ペプチド群はAβのoligomerやfibril形成を修飾せず、(iv) 老人斑などへの集積性が小さく不溶性分画に含まれない。面白いことに、病原性Aβ42の比較的産生を増大させるプレセニリンの変異やγセクレターゼ修飾薬の添加はAβ様ペプチドのC末端にも同じように影響した。Aβを産生する生体内の仕組みはアルツハイマー病を起因するだけではなく、広く細胞の活動を支える役割があり、Notchシグナルのような機能が今後明らかになっていくと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

研究費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：(1)アルツハイマー病(2)アミロイドβ蛋白(3)Notch1(4)APLP1(5)老人斑(6)不溶性蛋白
 (7)サロゲートマーカー

1. 研究開始当初の背景

膜内蛋白分解は RIP シグナル伝達や膜蛋白の代謝に必須のプロセスであるが、近年こ

れが脂溶性環境下での複雑な加水分解機構であることが明らかになってきた。我々はアルツハイマー病の病理過程に A β 42 ペプチドが関与しその産生がこの膜内蛋白分解で起こることが予想されたため以前からこの特殊な膜内蛋白分解についてそのメカニズムを明らかにする研究を行ってきた (Okochi JBC 2000, Okochi EMBO J 2002, Lammich JBC 2002, Okochi JBC 2006, Fukumori Biochemistry 2006)。なかでも A β 42 が産生される γ 42 切断が起こる仕組みについて検討することがアルツハイマー病診断薬治療薬開発の視点で重要である (Okochi EMBO J 2002, Lammich JBC 2002, Okochi JBC 2006)。我々はプレセニンによる膜内蛋白分解が dual-cleavage メカニズムによって起こることを示した (Okochi EMBO J 2002, Lammich JBC 2002)。さらにこの dual-cleavage メカニズムの働きで Notch signaling に際し Notch 由来の N β ペプチドが分泌されていることを示しその分子種を正確に同定し、様々な A β 様の細胞外ペプチドが RIP signaling に関連して放出している可能性を提示した (Okochi JBC 2006)。また、dual-cleavage の各々の切断の性質が微妙に異なることを発見した (Fukumori Biochemistry 2006)。

実際我々は脳脊髄液の中に N β 以外のいくつかの A β 様ペプチドを見出した。面白いことに、これらの中には β -secretase と γ -secretase の組み合わせにより産生される一群のことが明らかになった。さらに γ -secretase による切断は多様性がありその集合体としての切断の正確さは基質の種類によらず共通して変化することを報告した (Okochi EMBO J 2002, Okochi JBC 2006)。

2. 研究の目的

つまり我々は生理的条件下で脳内にアルツハイマー病 A β と同じ仕組みで放出された A β 様ペプチドが少なくともいくつか存在することを明らかにした。このような N-hydrophilic-C-hydrophobic ペプチドの凝集性などの性質を検討することで、これらのペプチド群とアルツハイマー病 A β との異同を論じる必要があると考えた。

3. 研究の方法

(1) N β 、APL1 β ペプチドなどの A β 様ペプチド群が A β のように oligomer を形成するのか。形成するならばその大きさは如何ほどか。

(2) A β 様ペプチド群が形成した oligomer は protofibril や fibril に成長するか。成長するならばその速度と程度は A β と比較して如

何ほどか。

(3) A β 様ペプチドは C 端の長さの異なるいくつかの分子種が存在し、A β 40 と A β 42 のような関係にあるが、果たしてこの長さの違いは oligomer 形成や、その protofibril や fibril への成長に関連するかどうか。

(4) N β 、APL1 β ペプチドなどの A β 様ペプチド群は A β の oligomer/fibril 形成を阻害したり促進したりする効果があるか。あるとすればその効果は各ペプチドで如何ほどか。

(5) A β の場合長さの長い集積性の高い A β 42 がシードとなりそのアミロイドコアへの蓄積後に A β 40 が集積することが分かっているが、N β 、APL1 β ペプチドなどの A β 様ペプチド群でこのような現象は認められるか。また、A β 様ペプチドはコアに集積するのか A β 40 のように後から集積するのか。

(6) 脳内でのこれらのペプチドの局在を検討する。老人斑に蓄積しているか検討する。

これらの実験結果を基に (1) A β 様ペプチド自身の集積・蓄積性および (2) A β 様ペプチドの A β の集積・蓄積への効果について判断する。このような効果のいずれかが明らかになった時は A β 様ペプチドのアルツハイマー病修飾効果について細胞レベルで生化学的検討を加える。また、上記のいずれの効果も A β 様ペプチドに認められない場合は γ セクレターゼ活性の指標になるか細胞レベルで生化学的検討を加える。

4. 研究成果

(1) N β 、APL1 β ペプチドなどの A β 様ペプチド群が A β のように oligomer を形成するのか in vitro で実験し SEC カラムなど生化学的方法で解析した。その結果、これらが A β のように oligomer を形成することを明らかにした。

(2) A β 様ペプチド群が形成した oligomer は protofibril や fibril に成長するか in vitro の凝集実験を行い SEC カラムなど生化学的方法で解析した。その結果これらの A β 様ペプチドは fibril 形成しないことが明らかになった。

(3) A β 様ペプチドの C 端の長さの違いは oligomer 形成や、その protofibril や fibril への成長に関連するかどうか in vitro の凝集実験を行い SEC カラムなど生化学的方法で解析した。しかし上記のようにこれらの A β 様ペプチドは fibril 形成しなかった。

(4) A β 様ペプチド群は A β の oligomer/fibril 形成を阻害したり促進したりする効果があるか生化学的方法で解析した。しかし、A β 様ペプチドによる A β の

oligomer/fibril 形成修飾効果は明らかではなかった。

(5) A β の場合 A β 42 がシードとなりそのアミロイドコアへの蓄積後に A β 40 が集積することが分かっているが、A β 様ペプチド群でこのような現象は認められるか検討した。その結果これらの A β 様ペプチドは集積性の小さいことが明らかになった。

(6) 脳内でのこれらのペプチドが老人斑に蓄積しているか検討したところ、これらのペプチドは老人斑や脳内の不溶性分画に認められなかった。

このような結果を得て A β 様ペプチドの分泌量やその質が γ セクレターゼ活性の指標になるか細胞レベルで生化学的検討を加えた。面白いことに、病原性 A β 42 の比較的産生を増大させるプレセニリンの変異や γ セクレターゼ修飾薬の添加は A β 様ペプチドの C 末端にも同じように影響した。つまり、長さの比較的長い A β 42 の産生が増大している時、A β 様ペプチドの中でも長さの長いものの比較的量が增大している。

このことは、A β 様ペプチドがを用いて病原性 A β 42 の生体内での比較的増大を推測できる可能性を示唆している。

今回の研究で明らかになった事実の中で学術的に興味深いのは、これらの A β 様ペプチドを細胞で産生させたときに、殆ど産生の競合が起きないことである。この事実は細胞の持つ A β 産生能が極めて高いものである可能性を示唆している。A β を産生する生体内の仕組みはアルツハイマー病を起因するだけではなく、広く細胞の活動を支える役割があり、Notch シグナルのような機能が今後どんどん明らかになっていくと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1、Tagami S, Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Yanagida K, Nakayama T, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Processes of beta-Amyloid and Intracellular Cytoplasmic Domain Generation by Presenilin/gamma-Secretase. Neurodegener Dis. 有 5(3-4)2008:160-2.

2、Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Ikuta A, Fukumori A, Matsumoto N, Ishizuka-Katsura Y, Nakayama T, Itoh N, Jiang J, Nishitomi K, Kamino K, Morihara T, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Chiba S, Takeda M Regulation of Notch signaling by

dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. Mol Cell Biol. 有 28(1)2008 165-76.

3、Takeda M, Okochi M, Tagami S, Tanaka T, Kudo T. Biological markers as outcome measures for Alzheimer's disease interventions--real problems and future possibilities. Int Psychogeriatr. 有 19(3) 2007 391-400

4、Jiang, J., Okochi, M., Tagami, S., Nishitomi, K., Yanagida, K., Nakayama, T., Tatsumi, S.-I., Mori, K., Takeda, M.

Macrophage colony stimulating factor is associated with excretion of amyloid- β peptides from cerebrospinal fluid to peripheral blood Psychogeriatrics 有 2008 188-195

5、Okamoto K, Mori Y, Komoda Y, Okamoto T, Okochi M, Takeda M, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. J Virol 有 82 2008 8349-8361

[学会発表] (計 1 件)

1、Okochi, M. Characterization of APLP1-derived Abeta-like peptide in brains of Alzheimer disease patients ICAD2008 2008年7月24日

[図書] (計 2 件)

1、Okochi, M., Tagami, S., Takeda, M. Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision in S3 cleavage of Notch-1. Annual Report of Osaka University Academic Achievement 2007-2008 有 9 2008 94

2、大河内正康、武田雅俊 アルツハイマー病の薬物療法の実際 カレントセラピー 無 26 2008 4, 31-34

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 正康 (OKOCHI MASAYASU)

大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90335357

(2)研究分担者

田上 真次(TAGAMI SHINJI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40362735

武田 雅俊(TAKEDA MASATOSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00179649

(3)連携研究者