

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300118

研究課題名（和文） 脳領域依存的なアミロイドベータ蛋白質蓄積の分子機構解明

研究課題名（英文） Study on molecular mechanism underlying brain region-specific A $\beta$  deposition

研究代表者

柳澤 勝彦 (YANAGISAWA KATSUHIKO)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・研究所・副所長

研究者番号：10230260

研究成果の概要（和文）：脳内の領域特異的なアミロイドベータ蛋白質(A $\beta$ )蓄積は当該領域の神経細胞膜を形成する脂質分子の構成に依存することが、剖検脳より調製した神経細胞膜の再構成実験により示された。一方、神経細胞膜上において A $\beta$  重合を誘導するガングリオシドと A $\beta$  との分子レベルでの相互作用について、ガングリオシドを組み込んだ小型の人工的脂質膜での蛋白質と糖脂質の結合特異性に関する体系的な NMR 計測が実施可能であることが実証された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that brain region-specific deposition of amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) exclusively depends on the nature of lipid molecules consisting of the neuronal membrane of the given brain region. We also established a system to explore molecular mechanism underlying interaction between A $\beta$  and ganglioside, leading to generation of ganglioside-bound A $\beta$ , an endogenous seed for amyloid in AD brains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイドベータ蛋白質 (A $\beta$ ) の異常な重合体がアルツハイマー病 (AD) 発症の物質的基盤であることは、様々な実験的事実により示されている。脳内で A $\beta$  が重合を開始する分子機構に関して不明であったが、本研究代表者は A $\beta$  は神経細胞膜に発現されるガングリオシドに結合しガングリオシド結合型 A $\beta$  (GA $\beta$ ) となって、これが可溶性 A $\beta$  の重合を「種」として促進するとの仮説をたてた。GA $\beta$  仮説は種々の *in vitro* ならびに *in vivo* の実験により支持されているが、その形成機

序、特に脳領域特異的なアミロイド形成との関連は解明されておらず、AD 発症機序に関する根本的な理解には重要な課題となっていた。

## 2. 研究の目的

(1) 脳領域特異的なアミロイド形成に焦点をあて、GA $\beta$  形成の神経脂質化学的背景を明らかにすること。

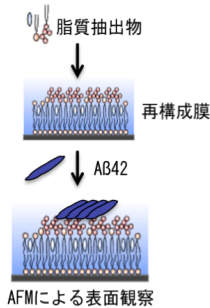
(2) GA $\beta$  形成の分子機序を A $\beta$  とガングリオシドとの相互作用から明らかにすること。

(3) GAB 依存性の AB 重合体の神経生物学的作用を検討すること。

### 3. 研究の方法

(1) 剖検脳の神経生化学的解析: AD 病変の有無を詳細に評価した剖検脳より、アミロイド蓄積好発部位及びアミロイド蓄積回避部位の脳皮質を採取し、シナプトゾームを単離し、神経細胞膜さらにマイクロドメインを調製する。得られた神経細胞膜試料を対象に、液体クロマトグラフィー・質量分析等の神経生化学的解析を実施する。

(2) 原子間力顕微鏡観察: (1)で調製された神経細胞膜試料から脂質を抽出し、原子間力顕微鏡基盤上で再構成し、膜表面構造を解析するとともに、可溶性 AB を作用させ膜上における AB 重合誘導の如何についても観察する。



脂抽出物から再構成脂質二分子膜を調製し、AB と相互作用させた後(20 μM, 15 min)、PBS 中で AFM 観察を行った。

(3) 膜上における AB 構造変化の NMR 解析: AB と ganglioside との分子レベルでの相互作用を AB の構造変化に焦点をあて、ナノディスク等の核磁気共鳴 (NMR) 解析に適した人工脂質膜を構築し、超高磁場 NMR で観察する。

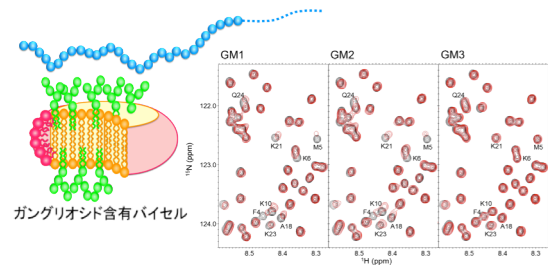
(4) GAB 依存性 AB 重合体の神経細胞毒性の解析: GAB により形成が誘導される AB 重合体、特に可溶性オリゴマーの神経細胞毒性を観察するため、ganglioside 含有リポソーム存在下で AB を重合させ、その毒性を培養神経細胞を対象に評価する。

### 4. 研究成果

(1) アミロイド蓄積好発部とアミロイド蓄積回避部位の間では、脳皮質を構成する神経細胞膜構成脂質分子 (コレステロール、スフィンゴミエリン、セラミドおよび ganglioside) の組成比を解析した結果、ganglioside 等において部位特異的な変化が観察された。解析は平成 25 年 5 月現在継続中である。

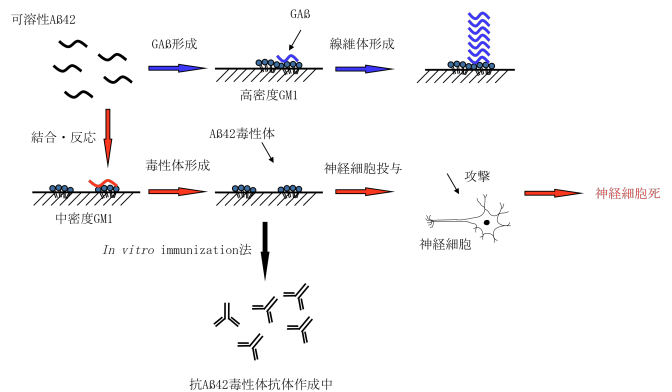
(2) シナプトゾームの脂質成分を用いて二分子膜の再構成を行い、原子間力顕微鏡にて膜の表面構造解析を行ったところ、アミロイド蓄積好発部位脂質による再構成膜で濃度依存的に顕著な AB 重合誘導が観察された。これらの AB 重合誘導は、神経細胞膜の ganglioside ならびに GAB 形成に依存することを示す結果も得られた。

(3) 様々な ganglioside を組み込んだナノディスク等の人工的な小型の脂質膜を利用することにより、AB 等の蛋白質分子と ganglioside 等の糖脂質との結合特異性に関する体系的な NMR 計測が実施可能であることを実証され、両者の相互作用の初期過程を捉えることに成功した。



ganglioside を組み込んだ小型の脂質膜 (バイセル) 上における AB と ganglioside との相互作用に関する NMR 計測

(4) AB のなかでも凝集性が高く、先の本研究代表者による AD 剖検脳の解析において ganglioside との結合が確認された AB42 を対象に、ganglioside との相互作用による神経細胞毒性体の形成を、反応液中の神経細胞毒性活性を培養神経細胞を対象に解析した。さらに、この ganglioside 依存性の神経細胞毒性体の物性を明らかにすることを目的に特異抗体の作製へ展開した。



可溶性のアミロイド β 蛋白 (AB) 42 は、高密度 GM1 ganglioside (GM1) 存在下においては、線維体を形成する。一方、中密度 GM1 では、AB42 は結合もしくは反応することによって神経細胞死を誘導する AB42 毒性体を形成する。現在、この AB42 毒性体に対する抗体を、in vitro immunization 法を用いて作製中である。

以上の結果はヒト脳内におけるアミロイド形成にガングリオシドが関わることにさらなる支持を与えた。また、本研究により、これまで解明されていなかった脳領域特異的なアミロイド形成に当該領域の神経細胞膜脂質が重要な役割を果たすことが明らかにされたことの意義が大きい。本研究成果は、今後のAD発症機序の解明ならびに予防法・治療法の開発に有用な情報を提供したと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計51件)

- ① T. Yamaguchi, T. Uno, Y. Uekusa, M. Yagi-Utsumi, and K. Kato,  
Ganglioside-embedding small bicelles for probing membrane-landing processes of intrinsically disordered proteins.  
Chem. Commun., 査読有, 2013,  
49:1235-1237, DOI:10.1039/c2cc38016a
- ② Teruhiko Matsubara, Kazutoshi Iijima, Naoki Yamamoto, Katsuhiko Yanagisawa, and Toshinori Sato,  
Density of GM1 in Nanoclusters Is a Critical Factor in the Formation of a Spherical Assembly of Amyloid  $\beta$ -Protein on Synaptic Plasma Membranes.  
Langmuir, 査読有, 2013, 29(7):2258-2264,  
DOI:10.1021/la3038999
- ③ Keilani S., Lun Y., Stevens A.C., Williams H.N., Sjoberg E.R., Khanna R., Valenzano K.J., Checler F., Buxbaum J.D., Yanagisawa K., Lockhart D.J., Wustman B.A. and Gandy S.,  
Lysosomal dysfunction in a mouse model of Sandhoff disease leads to accumulation of ganglioside-bound A $\beta$ .  
J Neurosci, 査読有, 2012, 32:5223-5236,  
DOI:10.1523/JNEUROSCI.4860-11.2012
- ④ Oikawa N., Goto M., Ikeda K., Taguchi R. and Yanagisawa K. The  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT increases the levels of gangliosides at neuritic terminals of differentiating PC12 cells.  
Neurosci Lett., 査読有, 2012, 525: 49-53,  
DOI:10.1016/j.neulet.2012.07.027.
- ⑤ Saito Y, Inoue T, Zhu G, Kimura N, Okada M, Nishimura M, Kimura N, Murayama S, Kaneko S, Shigemoto R, Imoto K, Suzuki T.,  
Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and Abeta generation in Alzheimer's disease. Mol Neurodegener, 査読有, 2012, 7:50, DOI:10.1186/1750-1326-7-50.
- ⑥ Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraiishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S.,  
 $\alpha$ -Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/ parkinsonism demntia complex in the Kii Peninsula, Japan.  
J Neuropath Exp Neurol., 査読有, 2012, 71(7): 625-30.  
DOI: 10.1097/NEN.0b013e31825b9680.
- ⑦ Teruhiko Matsubara, Ai Onishi, and Toshinori Sato, Carbohydrate recognition by pentadecapeptide ligands for a series of sialylated oligosaccharides, Bioorg. Med. Chem., 査読有, 2012, 20(21): 6452-6458,  
DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.025
- ⑧ Yagi-Utsumi M. et al.  
(Yanagisawa K., Kato K.)  
Spectroscopic characterization of intermolecular interaction of amyloid  $\beta$  promoted on GM1 micelles.  
Int J Alzheimers Dis., 査読有, 2011,  
Article ID 925073,  
DOI:10.4061/2011/925073
- ⑨ Yanagisawa K.,  
Pathological significance of ganglioside clusters in Alzheimer's disease.,  
J Neurochem., 査読有, 2011, 116:806-812,  
DOI:10.1111/j.1471-4159.2010.07006.x
- ⑩ Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham K.J, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T.,  
SOD1 (Copper/Zinc Superoxide Dismutase) deficiency drives amyloid  $\beta$  protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer's disease., J Biol Chem. 査読有, 2011, 286:44557-44568,  
DOI:10.1074/jbc.M111.279208
- ⑪ Matsuzaki K, Kato K, Yanagisawa K,  
A $\beta$  polymerization through interaction with membrane gangliosides.  
Biochim Biophys Acta, 査読有, 2010,  
1801(8):868-877,  
DOI: 10.1016/j.bbaliip.2010.01.008.

- ⑫ Shishido T, (Murayama S) et al.  
 $\alpha$ -Synuclein accumulation in skin  
nerve fibers revealed by skin biopsy in  
pure autonomic failure. , Neurology,  
査読有,2010,74(7):608-610,  
DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181cfff6d5.

[学会発表] (計 76 件)

- ① Koichi Kato,  
Conformational dynamics and interactions  
of oligosaccharides in physiological and  
pathological contexts., Fifth Korea-Japan  
Seminars on Biomolecular Sciences:  
Experiments and Simulations  
(invited talk).,High1 Resort, Korea,  
March,25,2013
- ② Yanagisawa K.,  
Role of lipids in the development of  
Alzheimer pathology (invited talk).  
International Conference on Alzheimer's  
Disease. Tianjin, China. September 18,  
2012
- ③ Nakamoto F, Takao M, Ikemura M,  
Hayashi T, Ito S, Maeda D, Saito Y,  
Takahashi Y, Hasegawa M, Fukayama M,  
Tsuji S, Murayama S,  
FUS-immunopositive Inclusions and  
Compound Pick Bodies in Two Cases of  
Frontotemporal Lobar Degeneration with  
Motor Neuron Disease (FTLDMND).  
The 8th International Conference on  
Frontotemporal Dementias.,Manchester, UK.,  
September 5-7,2012
- ④ Koichi Kato.,  
Structural views of carbohydrate-protein  
interaction systems as potential therapeutic  
targets (invited talk).  
The 26th International Carbohydrate  
Symposium (ICS2012). Madrid, Spain,  
July 26, 2012
- ⑤ Morimoto S, Kokubo Y, Hasegawa M,  
Kuzuhara S, Murayama S,  
immunohistochemical Study and Western  
Blotting of Tauopathy in ALS/Parkinson  
Dementia Complex (PDC), Kii, Japan.  
88th Annual Meeting of the American  
Association of Neuropathologists.,Chicago,  
USA. , June 21-24,2012
- ⑥ Koichi Kato,  
A systematic approach for structural  
glycoproteomics(招待講演).  
The 23rd Annual Meeting of the Korean

Society for Molecular and Cellular  
Biology, Seoul, Korea, October, 7, 2011

- ⑦ Yanagisawa K.  
Ganglioside-induced conformational change  
of amyloid  $\beta$ -protein as an initial step in the  
process of Alzheimer disease (招待講演).  
The 31st Naito Conference on Glycan  
-Expression and Regulation. [II]: Metabolites,  
Stress Response, Microdomains, and Beyond,  
シヤトーレーゼガトーキングダムサッポロ,  
北海道, 2011年9月15日
- ⑧ Murayama S, Saito Y, Takao M,  
Hatsuta H, Shimizu J, Kihira T, Kokubo  
Y, Akiyama H, Suzuki, Hasegawa M.  
Japanese Consortium for Research in motor  
Neuron Disease and Frontotemporal  
Dementia. 87th Annual Meeting of the  
American Association of Neuropathologists,  
Seattle, USA. , June 23-26,2011
- ⑨ Murayama S, et al.  
Establishment of Japanese brain bank  
network for neuroscience research.  
XVIth International Congress of  
Neuropathology, Salzburg, Austria,  
September, 10-15,2010
- ⑩ Kato K.  
NMR characterization of the interactions  
between amyloid  $\beta$  and gangliosidic  
micelles. Max Planck Institute for  
Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany,  
July, 12, 2010
- [図書] (計 4 件)
- ① Yanagisawa K.,  
Amyloid, arises on the membranes and  
acts on the membranes. In: Amyloids:  
Composition, Function and Pathology  
137-150, 2012 (edited by Irene P.  
Halcheck and Nancy R. Vernon: published  
by Nova Science Publishers, Inc.)
- ② Koichi Kato,  
Springer Science+Business Media (New  
York), Structural glycomic approaches to  
molecular recognition events on cell  
surfaces.  
Biochemical Roles of Eukaryotic Cell  
Surface Macromolecules: 2011 ISCSM  
Proceedings (Advances in Experimental  
Medicine and Biology), P. R. Sudhakaran  
and A. Surolija ed., 2012,15-32

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳澤 勝彦 (YANAGISAWA KATSUHIKO)  
独立行政法人国立長寿医療研究センター・  
研究所・副所長  
研究者番号：10230260

### (2) 研究分担者

加藤 晃一 (KATO KOICHI)  
大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ  
エンスセンター・教授  
研究者番号：20211849

村山 繁雄 (MURAYAMA SHIGEO)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セン  
ター (東京都健康長寿医療センター研究  
所)・老年病理学研究チーム・神経病理学(ブ  
レインバンク)・部長  
研究者番号：50183653

松原 輝彦 (MATSUBARA TERUHIKO)  
慶應義塾大学・理工学部・講師  
研究者番号：10325251

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)  
立命館大学・薬学部・助教  
研究者番号：90393157

### (3) 連携研究者

なし