

12 膜を介した毒性型Aβアミロイドの形成・毒性発現機構	松崎 勝巳
-------------------------------------	--------------

【目的】アルツハイマー病 (AD) は老年性認知症の大部分を占める神経変性疾患であり、AD の予防・治療法の開発は喫緊の課題である。AD の発症機序として最も有力なのは「アミロイドβペプチド (Aβ) が、βシート構造に富んだ凝集体を形成し神経細胞に沈着して神経毒性を示す」というβアミロイドカスケード仮説である。しかし、本来可溶性であるAβが、老化に伴い不溶性・沈着するメカニズムは不明である。我々は、神経細胞膜を介したメカニズムに注目し、GM1 クラスタに結合したAβが、αヘリックスからβシートへと構造変化し、最終的に毒性を有するアミロイド線維を形成する凝集メカニズムの詳細を解明してきた。本研究では、膜中線維の構造と膜中線維によって誘起されるアポトーシスの分子メカニズムを解明することによって、膜を介した毒性型Aβアミロイドの形成・毒性発現機構の全容を明らかにすることを目的とした。

【方法】膜中線維の構造は、同位体標識 FTIR、AFM、TEM、クロスリンク、固体 NMR にて推定した。毒性発現機構は、SH-SY5Y 細胞 (caspase-8、caspase-9 ノックダウン細胞を含む) を用い、各種 caspase の活性化、NFκB の細胞内局在観察により検討した。

【結果】同位体標識線維と非標識線維の FTIR 差スペクトルから、膜中線維はほぼ全長に渡って逆平行βシート構造をとっていると考えられた。このことはTEM 観察の結果とも符合した。AFM 測定から、膜中線維の高さ (0.6±0.1 nm) は著しく低かった。G9 と A30 をシステインに置換した 2 種の Aβ 40 を用いてクロスリンク実験を行ったところ、G9 C-Aβ ホモダイマー、A30 C-Aβ ホモダイマーに加えて、両者のヘテロダイマーが検出されたことから、膜中線維は1層のβシート構造からなるテープ状であり、in-register 平行βシート構造の途中でβストランドが反転し、2残基ずれた逆平行βシート構造を形成していると推定された。固体 NMR の結果も、この構造を支持した。

Caspase-8 や caspase-9 の阻害剤が Aβ 42 投与による caspase-3 活性化を抑制したことから、アポトーシスにこれらのカスパーゼの関与が示唆された。ノックダウン細胞を用いた実験から、caspase-9 は caspase-8 の下流で活性化していることが明らかになった。抗 TLR4 抗体、抗 TLR6 抗体、NLRP3 阻害剤を投与したところ、Aβ 投与による caspase-3 の活性化は顕著に抑制されたことから、TLR4-TLR6-CD36 複合体、NLRP3 インフラマソームを介するシグナル経路がいずれも Aβ 投与によるアポトーシスに関与していることが示唆された。また、Aβ が線維を形成すると同時に NFκB が核移行するのを確認した。以上の結果から、膜中線維の毒性発現機構として、TLR4-TLR6-CD36 複合体の活性化→NFκB の核移行→NLRP3 の活性化→caspase-8 の活性化→caspase-9 の活性化→caspase-3 の活性化→アポトーシスがメインルートであると考えられた。

膜を介した毒性型Aβアミロイドの形成・毒性発現機構

