12　膜を介した毒性型Aβアミロイドの形成・毒性発現機構	松﨑　勝巳

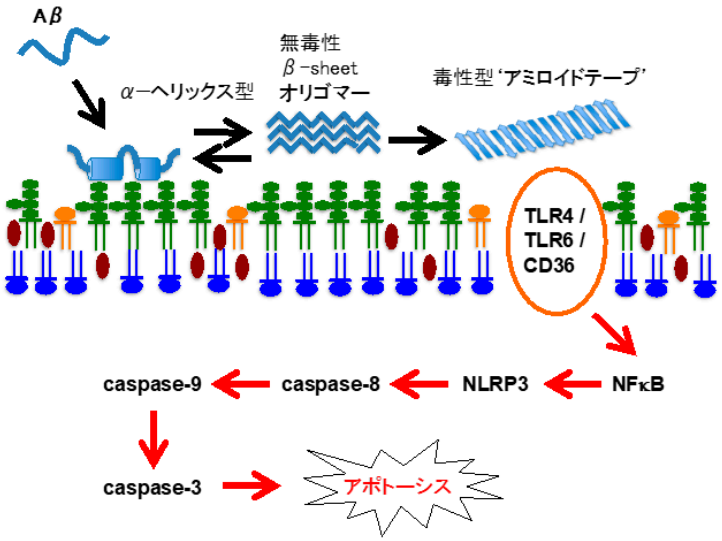
【目的】アルツハイマー病（AD）は老年性認知症の大部分を占める神経変性疾患であり、AD の予防・治療法の開発は喫緊の課題である。AD の発症機序として最も有力なのは「アミロイドβペプチド（Aβ）が，βシート構造に富んだ凝集体を形成し神経細胞に沈着して神経毒性を示す」というβアミロイドカスケード仮説である。しかし、本来可溶性である Aβが、老化に伴い不溶化・沈着するメカニズムは不明である。我々は、神経細胞膜を介したメカニズムに注目し、GM1 クラスターに結合した Aβが、αヘリックスからβシートへと構造変化し、最終的に毒性を有するアミロイド線維を形成する凝集メカニズムの詳細を解明してきた。本研究では、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 Aβ40 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 Aβ42 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が線維を形成するのと同時に 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



12. 膜を介した毒性型Aβアミロイドの形成・毒性発現機構

松﨑　勝巳

京都大学 大学院薬学研究科 薬品機能解析学分野

Key words：アルツハイマー病，アミロイドβペプチド，GM1 ガングリオシド，逆平行βシート，アポトーシス

緒　言

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、老化に伴い不溶化・沈着するメカニズムは不明である。我々は、柳澤らが AD 脳から糖脂質 GM1 ガングリオシドを結合した Aβ（GAβ）を発見したこと［1］に端を発し、神経細胞膜を介したメカニズムに注目し、GM1 クラスターに結合した 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た［2］。さらに水中で形成される線維が低毒性であるのに対し、膜中の GAβを介して形成されるアミロイド線維（膜中線維）は高い毒性を有することを見いだした［3］。また、神経細胞膜上でのAβの凝集を蛍光相関分光法でモニターし、Aβは、約 10 量体からなるオリゴマーを形成した後、線維化することを見いだしている。さらに、膜を介した凝集経路ではオリゴマーではなくアミロイド線維がアポトーシスを引き起こしていることを明らかにした［4］。

そこで本研究では、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

1. 同位体標識 FTIR

Aβ40 の F4、V12、F19、F20、V24、V36 のカルボニル炭素を^{13}C で標識した種々のペプチドを Fmoc 固相合成法にて合成した。Aβ40（50μM）を PBS 中あるいは GM1/cholesterol/sphingomyelin（モル比 1／1／1、［GM1］＝50 μM）リポソームとインキュベートし、水中線維、膜中線維をそれぞれ調製した。非標識ペプチドを用いた線維も同様に調製し、Ge プレート上で FTIR 全反射スペクトルを測定した。

2. 線維の形状観察

マイカ上に載せた線維の形状を AFM で観察し、線維の高さを計測した。線維を uranyl acetate でネガティブ染色し、TEM で観察して、線維の幅を見積もった。

3. クロスリンク

固相合成した G9C-Aβ40 および A30C-Aβ40 を等量混合し、5 mM dithiothreitol 存在下で線維を調製した。遠心・洗浄によって dithiothreitol を除去した後、50℃で 24 時間空気酸化し、SS 結合を形成させた。酸化線維を 1% trifluoroacetic acid を含む dimethyl sulfoxide／水（95／5）に溶解し、逆相 HPLC・MALDI-TOF-MS で分析した。

4. 固体 NMR

3 種の二重同位体標識ペプチド（[^{15}N]L17, [1-^{13}C]A21-, [^{15}N]V18, [1-^{13}C]A21-, [^{15}N]F19, [1-^{13}C]A21- Aβ40）を固相合成し、水中線維、膜中線維を調製した。^{15}N –^{13}C 間の距離を REDOR 測定により見積もった。

5. 細胞実験

Aβ42 はユビキチン融合体として大腸菌発現系により発現させ、酵素切断し、精製した。

SH-SY5Y 細胞は 96 well ガラスボトムディッシュに播種（9,000 cells/well）し、37℃、5% CO_2にて 24 時間インキュベートして細胞を接着させた。ノックダウン細胞は *Casp8* または *Casp9* に特異的な short hairpin RNA（shRNA）発現系を用いて樹立した（shCasp8 細胞、shCasp9 細胞）。

Caspase の活性化は、活性型 caspase-3 蛍光基質（Cell-Event Caspase-3/7 Green Detection Reagent）およびウェスタンブロットにて検出した。NFκB の細胞内局在は、RelA-GFP を transient に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

結果および考察

1. 膜中線維の構造

同位体標識線維と非標識線維の FTIR 差スペクトルを測定した。F20 の例を図 1 に示す。膜中線維では 1,625 cm^{-1} 付近に大きな負のピークと 1,697 cm^{-1}付近に小さな負のピークを示したことから、F20 は逆平行βシート構造をとっていることが示唆された。一方、水中線維では、後者のピークは観測されなかったことから、平行βシート構造をとっていると結論された。同様の結果は他の位置を同位体標識した場合でも観察されたことから、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。

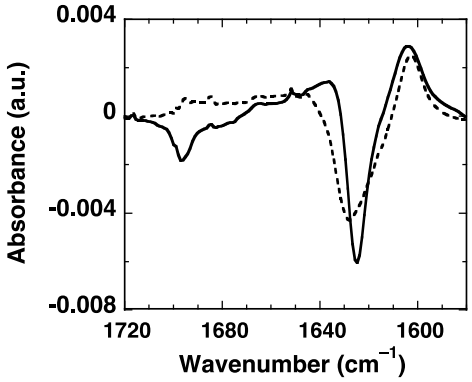


図 1. FTIR 差スペクトルの例

F20 のカルボニル炭素を^{13}C で標識した Aβ40 で調製した線維と非標識 Aβ40 で調製した線維とのアミド I 領域の FTIR 差スペクトル。実線：膜中線維、破線：水中線維。

TEM 観察の結果から、膜中線維の幅（11.6±1.8 nm）は水中線維（7.8±1.7 nm）と比べて広かった。前者は、膜中線維がほぼ全長に渡って逆平行βシート構造をとっているという上記の結果と符合した。AFM 測定から、水中線維の高さ（7.1±1.7 nm）は幅とほぼ同じであったのに対し、膜中線維の高さ（0.6±0.1 nm）は著しく低く、膜中線維が 1 層のβシート構造からなるテープ状であると考えられた。

Aβ40 が逆平行βシート構造をとるとき、2 残基ずれていると隣接するβストランド間で、E11–K28、K16–D23 間の静電相互作用と F19–F20 間のπ–π相互作用により安定化が起こる。そこで、この配置をとったときに隣接する G9 と A30 をシステインに置換した 2 種の Aβ40 を用いてクロスリンク実験を行った。水中線維では、G9C-Aβ40 同士と A30C-Aβ40 同士で SS 結合を形成した 2 種のホモダイマーが形成された。これは、水中線維が in-register 平行βシート構造をもつという先行研究の結果［5］と一致した。一方、膜中線維では、これらホモダイマーに加え、G9C-Aβ40 と A30C-Aβ40 間でクロスリンクしたヘテロダイマーが全ダイマーの 18%観測された。

以上の結果から、図 2 に示すような線維構造を推定した。固体 NMR の結果も、この構造を支持した。こうした構造が形成される理由は、以下のように考えられる。水中では疎水性残基を水と接触させないように構造形成する必要が

あるのに対し、GM1 の糖鎖クラスター中ではそのような必要がなく、ほぼ全長が伸びた in-register 平行βシート構造を形成しうる。しかし、水中と比べ周りの極性が低いため、隣接する荷電アミノ酸間の静電反発が大きくなる。これを緩和するため、βストランドの反転が起こる。



図 2. 膜中線維構造の模式図
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シート構造を形成する。

2. 膜中線維によるアポトーシス誘導の分子機構

図 3 に示すように、caspase-3 蛍光基質実験において、caspase-8 や caspase-9 の阻害剤が線維形成条件である 5μM Aβ42 投与 24 時間後の caspase-3 活性化を抑制したことから、これらのカスパーゼの関与が示唆された。ウェスタンブロットによっても、24 時間後、48 時間後において、caspase-8、caspase-9、caspase-3 の切断が見られ、アポトーシス経路の活性化を確認した。次に、shCasp8 および shCasp9 に Aβ42 を投与しウェスタンブロットを行ったところ、いずれにおいても、Aβ投与 24 時間後に caspase-3 の活性化が見られなかったことから、caspase-8、caspase-9 の両者が膜上 Aβ線維によるアポトーシスに関与することが確かめられた。shCasp8 細胞においては、Aβ投与による caspase-9 の活性化が大幅に減少していた一方で、shCasp9 細胞においては、Aβ投与による caspase-8 の活性化はほとんど影響を受けなかったことから、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。

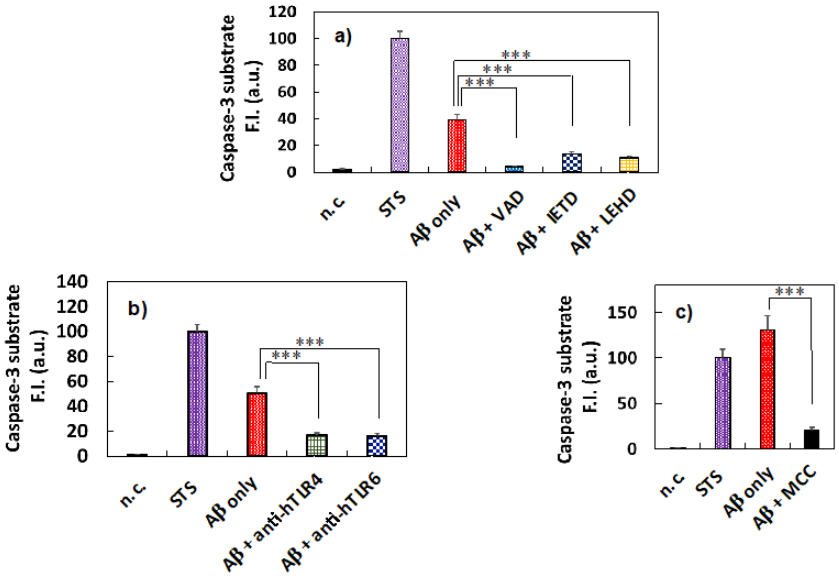


図 3. Aβ42（5μM）投与 24 時間後の caspase-3 活性化に及ぼす各種阻害剤の影響
a）n.c：ネガティブコントロール、STS：スタウロスポリン（2μM、ポジティブコントロール）、VAD：pan-caspase 阻害剤、IETD：caspase-8 阻害剤、LEHD：caspase-9 阻害剤（各 100μM）
b）Anti-hTLR4, 6：抗ヒト TLR4, 6 抗体（5μg/mL）
c）MMC：NLRP3 阻害剤 MMC950（10μM）
*** $p < 0.001$ （two-tailed Student's t test、n = 100）

近年、TLR4–TLR6–CD36 複合体が Aβの受容体となり、sterile inflammation をひきおこすこと［6］や、水中で形成された Aβ凝集体が NLRP3 インフラマソームを活性化し、炎症をひきおこすこと［7］が報告されている。そこで抗 TLR4 抗体、抗 TLR6 抗体、NLRP3 阻害剤である MMC950 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（図 3）、TLR4–TLR6–CD36 複合体、NLRP3 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が線維を形成するのと同時に NFκB が核移行するのを確認した。

アポトーシスの主要経路は、caspase-8 の関与する extrinsic receptor-mediated pathway と caspase-9 の関与する intrinsic mitochondria-mediated pathway に大別され、両経路は BID の活性化により繋がっている［8］。今回の結果から、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→ BID 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る。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜国立大学の内藤晶名誉教授、京都大学大学院薬学研究科ナノバイオ医薬創成科学講座の米原伸客員教授、染田真孝博士、京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学分野の星野大准教授、矢野義明講師である。

文　献

1) Yanagisawa K, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (Aβ): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. Nat Med. 1995 Oct;1(10):1062–6. PMID: 7489364 DOI: 10.1038/nm1095-1062

2) Matsuzaki K. How do membranes initiate Alzheimer's Disease? Formation of toxic amyloid fibrils by the amyloid β-protein on ganglioside clusters. Acc Chem Res. 2014 Aug 19;47(8):2397–404. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25029558 DOI: 10.1021/ar500127z

3) Okada T, Ikeda K, Wakabayashi M, Ogawa M, Matsuzaki K. Formation of toxic Aβ(1–40) fibrils on GM1 ganglioside-containing membranes mimicking lipid rafts: polymorphisms in Aβ(1–40) fibrils. J Mol Biol. 2008 Oct 17;382(4):1066–74. Epub 2008 Jul 30. PMID: 18692507 DOI: 10.1016/j.jmb.2008.07.072

4) Itoh N, Takada E, Okubo K, Yano Y, Hoshino M, Sasaki A, Kinjo M, Matsuzaki K. Not Oligomers but Amyloids are Cytotoxic in the Membrane-Mediated Amyloidogenesis of Amyloid-β Peptides. Chembiochem. 2018 Mar 2;19(5):430–433. Epub 2018 Jan 19. PMID: 29235220 DOI: 10.1002/cbic.201700576

5) Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. A structural model for Alzheimer's β-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24;99(26):16742–7. Epub 2002 Dec 12. PMID: 12481027 DOI: 10.1073/pnas.262663499

6) Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock DT, Moore KJ. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. Nat Immunol. 2010 Feb;11(2):155–61. Epub 2009 Dec 27. PMID: 20037584 DOI: 10.1038/ni.1836

7) Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-β. Nat Immunol. 2008 Aug;9(8):857–65. Epub 2008 Jul 11. PMID: 18604209 DOI: 10.1038/ni.1636

8) Baig S, Seevasant I, Mohamad J, Mukheem A, Huri HZ, Kamarul T. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? Cell Death Dis. 2016 Jan 14;7:e2058. PMID: 26775709 DOI: 10.1038/cddis.2015.275