

夢を追い続けて—生物有機化学からアルツハイマー病へ—

中山 仁

Seeking “Etwas Neues”—From Bioorganic Chemistry to Alzheimer’s Disease—

Hitoshi NAKAYAMA

*Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,
5-1 Ohe-Honmachi, Kumamoto City 862-0973, Japan*

(Received May 13, 2008)

Introduction to bioorganic chemistry by Prof. Kanaoka at the entrance of my research works affects greatly throughout the life afterward. Chemical modification studies of enzyme proteins taught me quality of chemical reactions. For example, triethyloxonium fluoroborate ($\text{Et}_3\text{O}^+ \text{BF}_4^-$), a Meerwein reagent, selectively reacted with a particular carboxyl group (Asp-177) in the substrate binding site of trypsin, even though the reaction was performed in aqueous solution. A series of ion channel studies intoxicate me how exciting the science works are. Purification of sodium channel protein from electric eels initiated the collaboration work to reveal total primary structure of the molecule, as an inaugurating work of ion channel molecules. Photoaffinity labeling proved to be an efficient method to elucidate ligand binding sites, such as TTX binding site within the sodium channel and the sites for calcium antagonists in L-type calcium channels. Encounter with CD36 molecule expands our works to more pathobiochemical field. We revealed CD36, a class B scavenger receptor, is related to development of atherosclerosis by phagocytosis of ox-LDL in macrophages and even matured adipocytes. In microglia, however, CD36 plays clearance role of oligomeric β -amyloid peptides in IL-4 activated type-2 microglia, suggesting the activation of type-2 microglia may be useful for developing a new method to treat or prevent from Alzheimer’s disease.

Key words—adipocyte; cluster of differentiation 36 (CD36); microglia; β -amyloid peptide; ion channel; photoaffinity labeling

1. 金岡研究室で学んだこと：「生物有機化学がめざすもの」

1967年に卒業研究生として、北海道大学薬学部の金岡祐一先生が主宰する薬品合成化学講座（以下、金岡研）に配属になり、研究生活がスタートした。金岡研は薬学部への昇格に伴って前年度に開設された新しい研究室であり、金岡教授、米光 幸助教授以下、若々しい町田 實、谷澤和隆の両助手、佐藤英助教務職員を擁して、新興の意気に燃えていた。研究分野は、先生が NIH 留学で体得してこられた今でいう「生物有機化学」であり、生命現象を化学の力で解き明かそうという、新研究室にふさわしいものであった。学部学生にとって生物有機化学

の何たるかを十分に理解できる力はなかったが、後年、先生が日本薬学会賞の受賞講演で示された「分子の成り立ちと学問領域のヒエラルキー」の図を拝見し、なるほど、そういうことなのかと得心した (Fig. 1)。¹⁾「三つ子の魂百まで」ではないが、研究の出発点で受けたこの洗礼は、定年を迎えた今振り返ってみても私の研究の通奏低音として鳴り響いていたことを強く感じる。

大学院修士課程での研究テーマとして与えられたのは「Meerwein 試薬を用いた酵素タンパクの化学修飾」であった。強力なアルキル化剤としてもっぱら有機溶媒中での反応に用いられていた $\text{Et}_3\text{O}^+ \text{BF}_4^-$ 、いわゆる Meerwein 試薬 (MR) を水溶液中での反応に利用しようとのアイデアは、今でこそ奇異ではなくなっているが、当時は大変ユニークなものであった。この課題には既に研究室の浜田博士/米光先生が、水溶液中におけるアミノ酸、ペプチドとの反応性について調べておられた。私のテーマは「こ

熊本大学大学院・医学薬学研究部 (〒862-0973 熊本市大江本町 5-1)

e-mail: jin@gpo.kumamoto-u.ac.jp

本総説は、平成 19 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

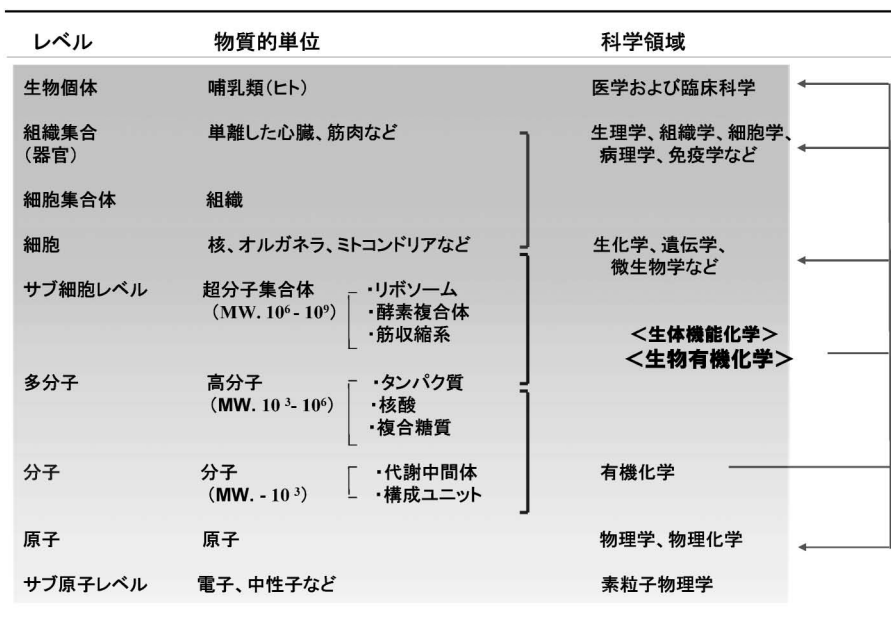


Fig. 1. The Hierarchy of Molecular Organization and Related Sciences (Modified after Ref. 1)

れを酵素タンパクに 응용す、特に、試薬がカチオン性を持つことを利用して、トリプシン（カチオン性アミノ酸を基質とする）の基質認識部位を構成するアミノ酸残基を同定する」ものであった。研究は、自らの手で合成した人工基質や合成阻害剤を用いてトリプシン研究を展開しておられた谷澤先生に手ほどきを受け、合成された競合阻害剤の1つである β -naphthamide (β -NA) を使わせて頂きながら進めた。この研究結果をまとめて BBRC に報告した内容（私の最初の論文²⁾の概略を示した（Fig. 2）。0.2 M の MR を用いた場合、修飾されるカルボキシル基の数は β -NA の有無によって 0.7 個（約 1 個）の差があり、このとき特異的な合成基質 BAEE (Bz-L-Arg-OEt) の分解活性にも正味 50% の差が認められた。したがって、トリプシンの基質特異性を決めるのは確かにカルボキシル基（のちにこれは Asp-177 と同定された）であることを化学修飾法（いわゆる、“Differential labeling” と呼ばれる方法）で示すことができた。

この研究を通して2つのことを学ぶことができた。1つは、水溶液中における「化学反応の質的な差」である。すなわち、化学修飾の対象となる水溶液中のトリプシン濃度はせいぜい 10^{-4} M のオーダーであるのに対して、水の濃度は 55 M である。それでも化学修飾が可能となるためには、トリプシン中の

カルボキシル基の求核性は水のそれよりも、少なくとも $55/1 \times 10^{-4} = 55 \times 10^4$ だけ高くなければならぬ。なるほど、これが反応性の差、すなわち、反応の“quality”というものと納得した。

2つ目は、「科学研究における先取権とフェア精神」である。この研究を進めているとき、稲上 正教授（Vanderbilt 大）が試薬こそ違え、同じような研究をやっておられることが分かった。負けじと頑張ったが、小差で先を越され、その結果は JBC に掲載されてしまった。非常に残念だったが、その後の日本生化学会で双方の報告が相次いで発表されることになり、固唾を飲んだが、稲上先生はきちんとわれわれの結果も引用された。われわれの BBRC でも、もちろんこの JBC を引用した。研究ではいくつかの研究が同時進行することはその後も経験したが、研究の出発点でこのようにフェアな姿勢に遭遇できたのは大変よい勉強になった。

またこれをきっかけに、タンパク質の化学修飾に



中山 仁

1942 年生。北海道出身。1968 年、北大薬学部卒。1970 年、大学院(修士課程)を修了し北大薬学部・教務職員。1979 年、カリフォルニア工科大へ留学。助手、助教授を経て、1993 年より熊本大学薬学部教授。2005-7 年、同大学附属図書館長を併任。2008 年、定年退職、同大学名誉教授。

Modification of carboxyl groups of trypsin with MR in the presence and absence of β -naphthamide

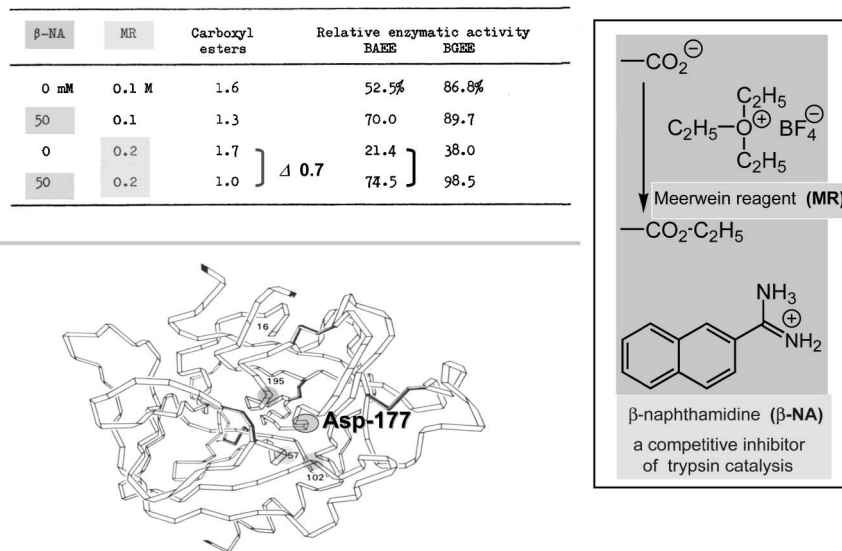


Fig. 2. Modification of Carboxyl Groups of Trypsin by Meerwein Reagent (From Ref. 2)

ついてじっくりと調べる機会を得た。図書室に閉じこもって文献を調べ、反応試薬と反応条件、修飾タンパク質とアミノ酸残基に分けて整理したカードを作成した。これらをまとめて、金岡先生と共著で「蛋白質・核酸・酵素」に総説を書かせていただいた。³⁾ また、隣の生化学教室（石井信一教授主宰）の輪読会にも参加していた経緯から、Means & Feeney 本の翻訳⁴⁾にも加えて頂き、カルボキシル基の修飾の部分を担当した。また少しあとで学会出版センターから刊行された「タンパク質の化学修飾（上・下）」（大野、金岡、崎山、前田・共著）では、光アフィニティラベリングの部分を担当させて頂いた。⁵⁾ この部分は主に Knowles 教授の *Methods in Enzymology* の 1 章を参考にしながら執筆したもののだが、このときに学んだこと、及び畑中保丸博士（現・富山大・薬・教授）を中心に研究室で進められていた有機光化学反応に関する見聞は、あとに同博士の協力の下、光アフィニティラベリング法を受容体やイオンチャネルの研究に展開していく上で大きな礎となった。

また、金岡研ではもう 1 つの柱として、町田博士を中心に生体内のチオール基（SH 基）と反応したときだけ蛍光を発するというユニークなマレイミド型蛍光試薬の開発が展開されていたが、ここで見聞した蛍光化合物の取り扱いと測定法、測定結果の解

研究の概要

- I. 酵素タンパクの化学修飾 (1968 -1976)
- II. 受容体、イオンチャネルの構造と機能 (1977 -1992)
- III. 熊本大学薬学部での研究 (1993 -2008)
 - (1) CD36 との遭遇
 - (2) 脂肪細胞の新しい機能
 - (3) ミクログリア・サブタイプの異なった機能とアルツハイマー病治療応用への可能性

Fig. 3. Brief Chronology of My Research (1968-2008)

析法（蛍光極大波長とマイクロ環境の極性との関係、2 つの蛍光基間のエネルギー移動と距離の関係）などの内容はその後の学位をまとめる上で大いに役立った。昔から芸は身を助けるというが、何がどこで身を助けることになるか分からないと今改めて思う。

その後の研究も含め、私の研究概要を Fig. 3 にまとめた。

2. 受容体、イオンチャネル研究へ

学位取得後、光アフィニティラベリングを受容体研究に活かしたいとの思いから、カリフォルニア工科大学（Caltech）の M. Raftery 教授の下に留学する機会を得た。この留学決定にはちょっとしたエピソード

ソードがある。前述のMRの結果をBBRCに報告した同じ頃、たまたま、同教授も同じ試薬をリゾチームの触媒中心にあるカルボキシル基の修飾に適用した論文をBiochemistryに発表されたのを知っていたので、applicationの手紙にその旨書いたのがすなりとOKして頂いた一因の由。37歳の遅い留学であったが、それなりに期するところはあった。当時、Raferty教授はニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)のタンパク質化学の研究ではパスツール研のChangeux教授と世界を二分する勢いで、数多くの論文を発表され、少なくないグラントを獲得しておられた。しかしテーマを決める際、私は敢えて同研究室ではいまだマイナーであったNa⁺チャンネルの研究を選んだ。その理由は、nAChRのタンパク質化学的研究は既にピークを越しており、Na⁺チャンネル研究のこれからに賭けてみたいという直感からであった。

ご存知のように受容体やイオンチャンネルの含量は少ないので、1970年代後半にタンパク質化学的な研究を行うには(今日の遺伝子工学的技術を活用するにはいまだ至っていなかった)、しかるべき生物材料を必要とした。nAChRの場合はシビレイの発電器官が、Na⁺チャンネルには電気ウナギの発電器官がそれぞれ用いられた。テーマは、それまで部分精製に留まっていた「電気ウナギ発電器官の

Na⁺チャンネルを単離する」ことに決まった。幸い、大学院生の1人がこの分子に対するモノクローナル抗体(Mab)の作製に成功したので、この抗体をimmunoaffinity purificationに活用してチャンネル分子の精製を行った(Fig. 4)。可溶化・部分精製したNa⁺チャンネルとMabの混合物を、Protein A-Sepharose(A)とDEAE-Sephadex(B)のカラムを用いて2段階精製すると、Na⁺チャンネルとMabの1:1複合体が得られた(C)。テトロドトキシン(TTX)結合の比活性(3000 pmol/mg protein)で評価したこの標品の純度は75%に達しており、Mab部分を除けばほぼ純粋なNa⁺チャンネルが得られたことになる。⁶⁾

帰国後、発表されたばかりのこの論文を読まれた故・沼正作教授(京大・医)から電話がかかってきて、Na⁺チャンネルの全一次構造を決める共同研究をやらうとの提案を受けた。われわれが受け持ったタンパクの部分一次配列を決めるためには、前述の精製標品(Mabも混在)よりもさらに精製度を上げる必要があった。S-S結合を切って変性させたのちにSepharose 4Bカラムにかけて、SDS-PAGE上でも均一なNa⁺チャンネルタンパクを得た[Fig. 5(A)]。これを松尾壽之先生(当時、宮崎医大)の研究室に持参し、寒川、南野両博士の協力を得て、トリプシン消化物をHPLCで分離し、その

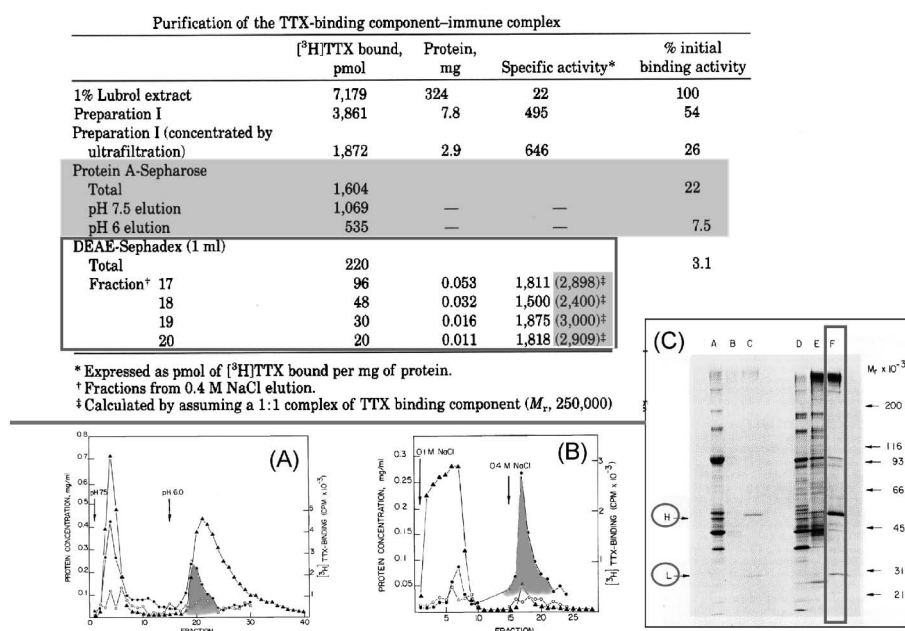


Fig. 4. Immunoaffinity Purification of Sodium Channel from Electric Eels by Its Monoclonal Antibody (From Ref. 6)

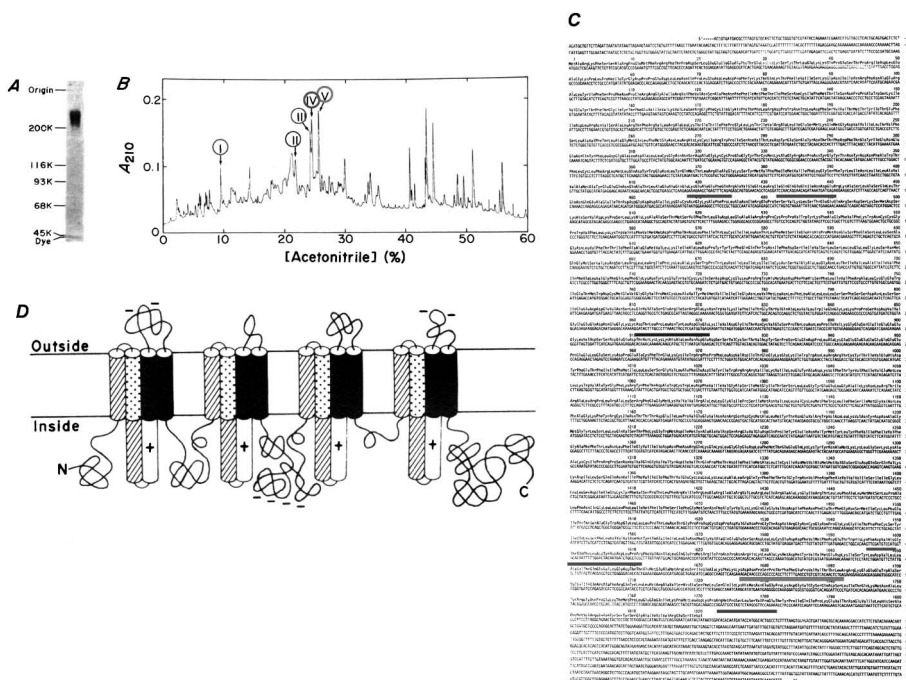


Fig. 5. Determination of Total Primary Structure of Sodium Channel from Electric Eels by Partial Amino Acid Sequence of the Protein followed by cDNA cloning (From Ref. 7)

A: SDS-PAGE of a highly purified sodium channel protein. B: a HPLC profile of peptide fragments of the channel protein after trypsin digestion. Five fractions (I-V) were subjected to the N-terminus sequencing to reveal the sequence of totally six peptide fragments, because the fraction I contained two peptide fragments. C: Nucleotide sequence of the cDNA that encodes the sodium channel protein. All the six peptide sequences were included within the total primary sequence. D: The initial membrane topology model proposed in the paper (Ref. 7).

中の5つのペプチドピーク [Fig. 5(B)] を最新鋭のN末端配列分析計にかけてペプチド断片の一次配列を読み取った。当時、このABIの最新鋭機は日本に3台しかなく、そのうち2台を松尾研で持っておられた。この部分配列の情報を基に、沼研では野田助教授(現・基生研・教授)を中心にcDNAの配列解析が急ピッチで進み、1830残基(当時最長)の一本鎖からなる電気ウナギ発電器官由来のNa⁺チャンネル分子の全一次構造は共同研究開始から1年あまりという短期間で決定した [Fig. 5(C)].⁷⁾ この論文が出たのち、アメリカの2つのグループが同じ課題に取り組んでいたことを聞いた。総勢17名がスクラムを組んだ日本チームに女神は微笑んでくれた。

この成果は、その後続くCa²⁺チャンネルやK⁺チャンネルなど一連の電位依存性イオンチャンネル構造の嚆矢として、また構造生物学のみならず、チャンネル機能との関連から電気生理学や薬理学分野にも大きなインパクトを与えた。例えば、電位依存性を決める構造実体として、特徴あるS4セグメント [Fig. 5(D)では+で示されている] がどのイオンチ

ャネルにも共通に存在するなどの事実である。ただ、最初に提案された膜トポロジーモデル [Fig. 5(D)] では、このS4が細胞質側におかれていた。これはチャンネルが開くとき、電気生理学的には細胞膜の内側から外側に向かって流れるゲート電流が観察されるのだが、それを担う構造部をS4で説明しようと強く意識したためである。なお、その後のモデルでは、このS4(及びS3)は他のセグメント同様に膜の中にあると訂正された。

チャンネル分子の膜トポロジーを明らかにする方法として、その部位のペプチド配列を認識する抗ペプチド抗体を用いて免疫組織学的にこれを証明する方法がある。われわれは、野々村禎昭先生(東大・医、現・微化研・理事長)が自ら試料調製と電顕観察をされるという特段のご協力を得て、チャンネルのC末端は細胞質側にあり、この部分の配置は上記のモデルと合致することを明らかにした。^{8,9)}

もう1つの例として、Na⁺チャンネルの薬理学からも重要なフグ毒・テトロドトキシン(TTX)の結合部位について少しだけふれたい。TTXを細胞膜の外側から加えても特異的にNa⁺チャンネルだけ

をブロックすることから、その結合部位はチャンネル分子の細胞膜外側にあると考えられてきた。われわれは光アフィニティラベル法によってこれを検証すべく取り組んだが、TTX 誘導体合成の収率の低さや光反応基の選択^{10,11)} 光ラベルされたペプチドの同定法などで困難を極めた。しかし畑中博士の協力もあって、沼らによる点変異実験の結果¹²⁾と相前後して、ドメインⅢとⅣの細胞外ループにラベル部位を同定できた (Fig. 6).¹³⁾ 日本では縄文時代からフグを食してきたが、明治になってフグ毒の本体は TTX であることが田原良順先生によって明らかにされた。また樋橋敏夫教授による Na⁺ チャンネル特異的ブロッカーとしての TTX の薬理的確立に加え、その複雑な化学構造は津田恭介先生、平田義正先生、Woodward 教授の 3 グループによって 1964 年の IUPAC で同時に発表されるなど、TTX と日本人研究者のつながりは深い。Na⁺ チャンネル上の TTX 結合部位もまた日本人研究者の手でなし遂げられたのである。

さて、Na⁺ チャンネルについて L 型 Ca²⁺ チャンネルの全一次構造も沼研から発表された。このチャンネルは循環器疾患の効果的な治療薬である Ca 拮抗薬の標的分子である。薬学に身を置く者として、この結合部位を明らかにすることに取り組んだ。まず最

初に、最も代表的な Ca 拮抗薬であるジヒドロピリジン (DHP) 類から始めた。Na チャンネルで苦労した経験を活かし、光反応基も 1,1,1-trifluoromethyl phenyldiazirine など適切なものを選択し、同定法も予想されるチャンネルの特定部分のいくつかに対してあらかじめペプチド抗体を作製しておき、その反応性で判定した。その結果、研究はスムーズに進展した。チャンネル分子と DHP 型試薬は 1 : 1 で結合しているにも係らず、得られたラベル部位はドメインⅢとⅣの 2 ヲ所であり、そのどちらもが S5-S6 セグメントにまたがる部分であった [Fig. 7(A)].¹⁴⁾ 一見不思議なこの結果は、Fig. 7(B) で示すように、平面構造では離れているこれらの部位が立体構造上では近接して存在すると考えるとよく説明できることが初めて分かった。実際、解析が進んでいる Ca²⁺ チャンネルの立体構造研究でも、これを支持する結果が得られてきている。¹⁵⁾ ついで、臨床的にも優れた日本発の Ca 拮抗薬 diltiazem (ベンゾチアゼピン型) の結合部位はドメインⅣの S5-S6 セグメントであり、^{16,17)} また新規の開発を目指した semotiadil ではドメインⅣの S6 セグメントのみであることも明らかにした。¹⁸⁾

欧米のグループが明らかにしたフェニルアルキルアミン型薬物を除いた 3 つの薬物の結合部位をわれ

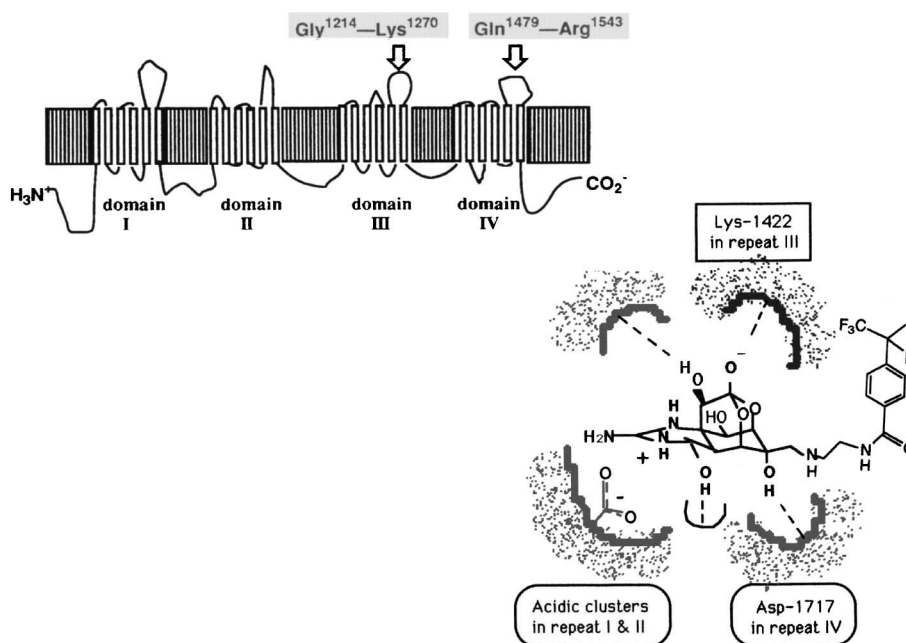


Fig. 6. TTX Binding Sites within Sodium Channel

A: Two regions of connection loop between S5 and S6 in the domain III and IV were identified by photoaffinity labeling method. B: A model of TTX binding sites of the photosensitive TTX derivative depicted by the results of photoaffinity labeling study (Ref. 10,11) and site-directed mutagenesis by Terlau *et al.* (Ref. 12)

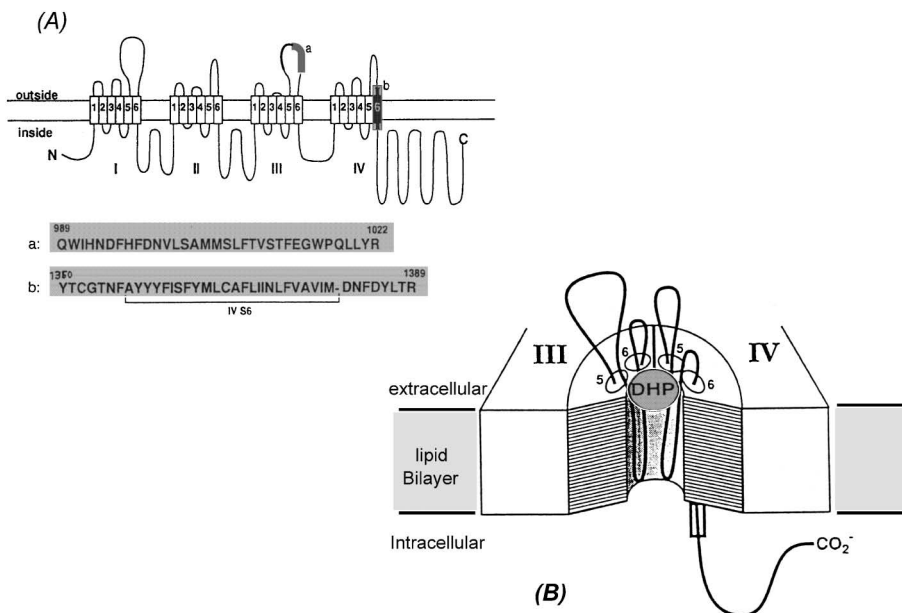


Fig. 7. DHP Binding Sites Identified by Photoaffinity Labeling within L-type Calcium Channel (From Ref. 14)

われは明らかにしたが、それらをまとめてみると、細胞膜の外側、内側という違いはあるが、いずれもCa²⁺チャネルのドメインⅢあるいはⅣのS5セグメントやS6セグメントに集中しているのが分かる (Fig. 8)。これらの結果は薬理的知見をうまく説明できるものであり、リガンド結合部位を明らかにする上で光アフィニティラベル法が有用であることを改めて示すことができた。特に「DHP結合部位が細胞膜外側のチャネル透過孔近傍である」という成果は、当時の薬理学研究では明確な答えが出ていない内容であった。そのため、班員として加えて頂いた「心電活動」の重点領域では、総括班長の平則夫先生 (東北大・医) から大変お誉め頂いた。

ここで、光ラベル部位同定法の改良について一言だけふれておきたい。上述のように、これまではそのツールとして標的タンパクの部分配列を持つ合成ペプチド (群) に対する抗体 (抗ペプチド抗体) をあらかじめ用意しておき、それらと光ラベル化されたタンパク質のプロテアーゼ消化断片との反応性の有無によってラベル部位を絞り込んでいく方法が主流であった。しかしこれでは手間が掛かり過ぎるだけではなく、どのアミノ酸残基に光ラベルされたかまではほとんどつきとめられない。これを克服する手段として、光ラベル化断片をHPLC又は抗リガンド抗体で濃縮したのち、それを最新の質量分析法 (TOF-MS及びESI-MS/MS) を活用することによ

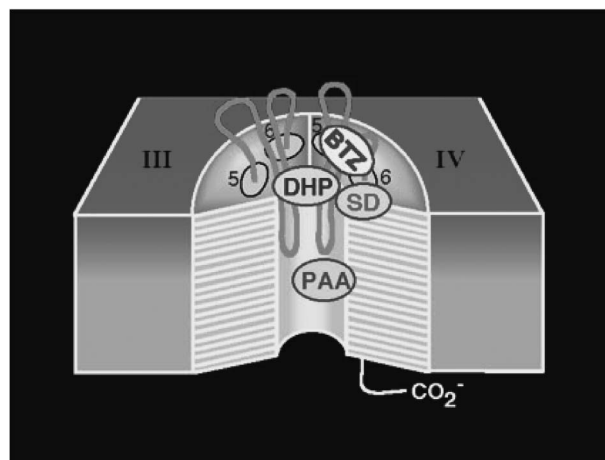


Fig. 8. Schematic Model of Binding Sites of Typical Calcium Antagonists within L-type Calcium Channel, Which were Identified by Photoaffinity Labeling

DHP: dihydropyridines, BTZ: benzothiazepines, PAA: phenylalkylamines, and SD: semotiadil.

って一挙に一次構造中のラベルアミノ酸残基まで同定する方法を、サントリー生有研の石黒正路部長、益田勝吉博士との密なる共同研究によって示すことに成功した。^{19,20)}

3. CD36分子との遭遇：思いがけないきっかけもある

これまで、光アフィニティラベル法の利用として、タンパク質分子中のリガンド (あるいは薬物) 結合部位を同定するという、高い分解能を要するも

のについて述べてきた。光ラベル法のより一般的な用い方は、多成分からなる生物試料の中から標的分子（タンパク質のみならず、核酸や糖質、脂質などの場合もある）に目印を付け、その同定に役立てることであろう。

われわれも、共同研究として心筋の ATP 感受性 K^+ チャネルを同定すべく、そのサブユニットであるスルホニルウレア受容体 (SUR) を釣り上げてくることをもくろんだ。ラベル用リガンドとしてスルホニルウレアの 1 つである glibenclamide (GB) を用い、ブタ心筋の sarcolemma 画分の光ラベル化を行った。80 kDa のラベル化タンパク質を均一にまで精製し、N 末端配列分析を行い 39 残基まで同定することができた。ところが得られたこの配列は、期待していた SUR ではなく、CD36 (血小板、乳腺由来) あるいは脂肪酸トランスポートタンパク質 (脂肪組織由来) と呼ばれる分子であった。後にクローニングされた心筋の SUR は GB に対する親和性が弱い (μM オーダー) ことから、われわれの実験では親和性の高い CD36 が釣り上がってきたと解釈された。

さて、CD36 はマクロファージ ($M\phi$) ではクラス B に属するスカベンジャー受容体として、脂質代謝や糖代謝において重要な役割を果たしているこ

とが分かりつつあった。そこでわれわれは、この分野の研究を精力的に進めておられた熊本大・医の堀内正公教授、宮崎 章講師 (現・昭和大・医・教授) に協力をお願いした。大学院生の大神信孝君 (現・中部大・講師) が頑張って実験し、 $M\phi$ の CD36 は糖化タンパクの後期生成物 (advanced glycation-end products; AGE) を取込み分解する受容体となっていることを明らかにした。²¹⁾ さらに同じクラス B スカベンジャー受容体に属する SR-B1 は、高密度リポタンパク (HDL) 中のコレステロールエステル (CE) の選択的な引き抜き活性と、細胞内の遊離コレステロール (FC) をアポリポタンパク A1 へ放出する活性を併せ持つが、AGE が共存するとこの活性が著しく阻害されることを見出した (Fig. 9).²²⁾ すなわち、CD36 をはじめとするスカベンジャー受容体の働きが糖尿病や動脈硬化の進展と深く係わっていることを明らかにした。

一方、教室の國安明彦准教授は脂肪細胞の CD36 に注目し、大胆な発想をした。 $M\phi$ の CD36 が酸化低密度リポタンパク (Ox-LDL) を取り込み、分解する活性を持つのであれば、脂肪細胞の CD36 も同じ活性を示しても不思議はないと考えた。これが見事に予想通りの結果となった (Fig. 10).²³⁾ これは一見何でもないことに思われるが、従来、脂肪細胞

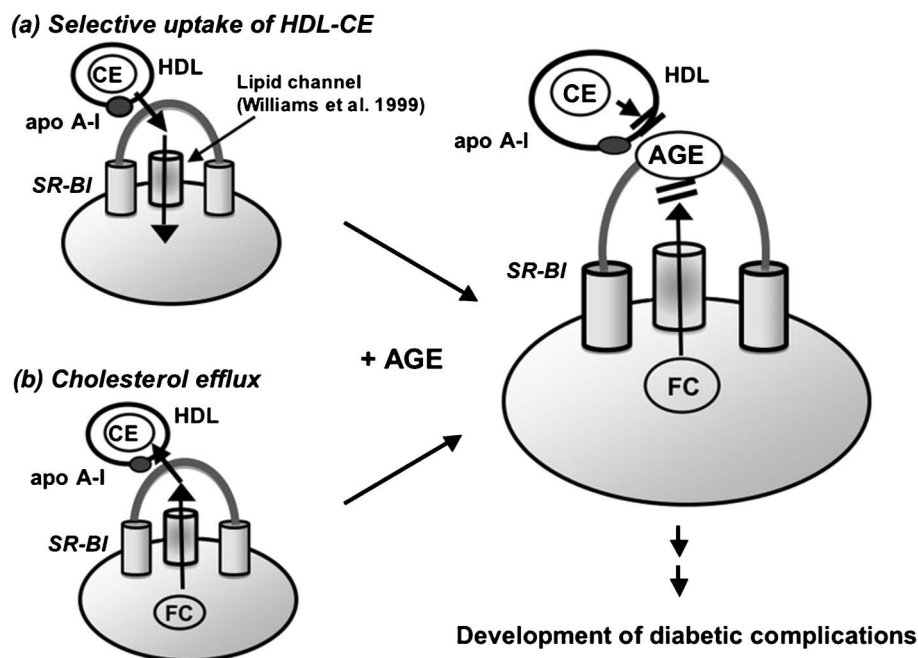


Fig. 9. AGE-BSA Inhibits SR-BI-mediated Bi-directional Cholesterol Flux in Macrophage (From Ref. 22)

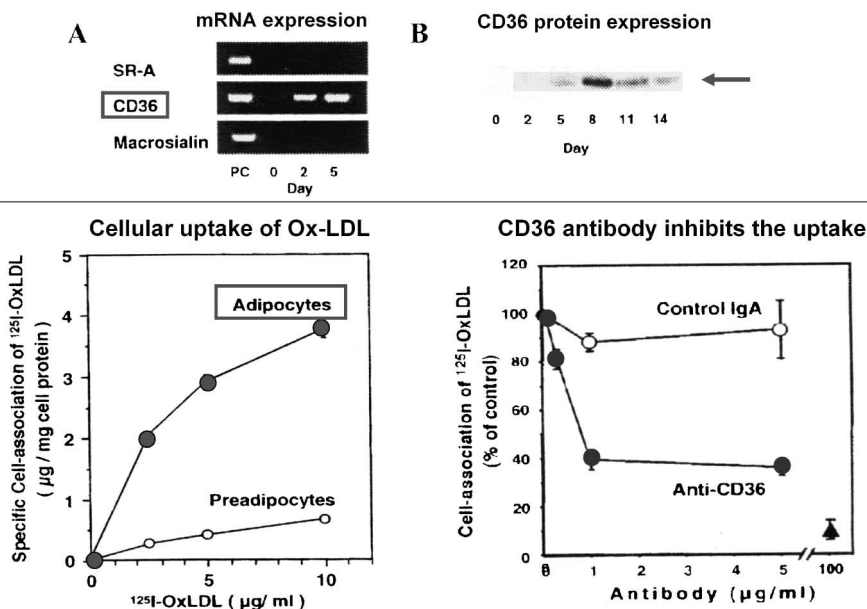


Fig. 10. Matured Adipocytes Phagocytose Ox-LDL Mediated by CD36 (From Ref. 23)

の CD36 は長鎖脂肪酸の取り込み分子 (fatty acid transporter; FAT) として機能して分子であり, 取り込まれた長鎖脂肪酸はグルコーストランスポーター (GLUT4) を介して別途取り込まれたグルコースと反応して, 蓄積エネルギー源としてのトリグリセリド (TG) 生成に使われるとの考え方, すなわち, 「CD36 は脂肪細胞ではもっぱら生体内エネルギー蓄積細胞としての機能を担うだけである」とする考えに修正を求めた点に大きな意義がある. ここで見い出された新たな機能によって, スカベンジャー機能で処理できない量の酸化 LDL (Ox-LDL) が存在する状態 (動脈硬化前期) では, 脂肪細胞もまた病態進展にスイッチを入れてしまう訳で, この知見は病態生理学的にも示唆に富んでいる. 彼のグループは AGE もまた, 脂肪細胞の CD36 で取り込まれることも見い出し,²⁴⁾ 糖尿病の進行が動脈硬化発症と関連することも報告した. さらにこの研究を推し進め, 脂肪細胞 CD36 が Ox-LDL を取り込んだのちのイベントとして, resistin や PAI-1 などのアディポサイトカイン類の産生・放出レベルが大きく変動していることも見い出している.^{25,26)} メタボリックシンドロームにおける脂肪細胞と M ϕ の相互作用がホットなトピックになっている現在, さらに研究の展開が待たれるところである.

4. ミクログリアの CD36 : アルツハイマー病研究へのアプローチ

誤解を恐れずにいえば, ミクログリア (mG) は中枢における M ϕ といえよう. 末梢における CD36 の機能は, 上述のように M ϕ や脂肪細胞でみてきたが, mG ではどんな機能を担っているだろうか?

mG の研究を始めるに当たって, その中枢における役割がどのようにとらえられてきたかを調べてみた. そのほとんどが, 外因的あるいは内因的を問わず中枢になんらかの異変が起きたときに mG は動員され, 活性化された mG は TNF α や IL-1, IL-6 及び NO などの, いわゆる炎症性サイトカイン類やメディエーターを放出して, この異変をカブくで排除する, という考え方であった. しかし当時, mG にもこのような神経傷害的な作用だけではなく, 神経保護的な働きもあるとの見解も出始めていた (例えば, 高坂らの総説²⁷⁾ を参照). 一方で, 澤田 誠教授 (現・名大・環境医学研) らは, mG の 1 型, 2 型と呼ぶ細胞株を樹立し, これらに発現する細胞マーカーや神経細胞との共培養実験から, 1 型が神経傷害的な従来型の mG で, 2 型が神経保護的な mG ではないかと提唱していた. この mG の 2 つのサブタイプの機能に関するわれわれのさらなる展開については後述することにする.

われわれの mG 研究は, 高坂新一博士 (国立神経セ・所長) が p53 欠損マウスから樹立された細

胞株 MG5 を恵与頂き、これを用いて炎症刺激に対する細胞応答を調べることからスタートした。この研究では熊本大・医の森 正敬先生（現・名誉教授、崇城大・薬・教授）と後藤知己講師、親泊政一博士（現・徳島大・ゲノム機能セ・教授）のご指導を頂き、大学院生の川原浩一君（現・熊本大・薬・助教）が力を発揮してくれた。LPS/IFN γ による炎症刺激を加えると、MG5 細胞には核の断片化や caspase 3 の放出など典型的なアポトーシスが惹起されるが、この時 Bip やこれに遅れて CHOP 分子の発現が認められた。すなわち、小胞体ストレス（ER ストレス）機構によるアポトーシスであることをきれいに示すことができた（Fig. 11）。²⁸⁾ MG5 細胞には p53 が欠損していることからその関与を考えずに明快な結論を導くことができた。なお、森、親泊らは糖尿病をはじめとする種々の疾患にもこの ER ストレスが深く関与することを明らかにしたが、mG においても同様の機構が働くことを示した点でも意義深い。

さて、われわれは mG のサブタイプ 1, 2 型では機能に違いがあると考えていることを前述したが、その内容を *in vitro* と *in vivo* の実験を通して得た 3 つの結果を紹介したい。*In vitro* 実験系では、ラット新生仔脳由来の mixed glial culture を澤田らの方法で分離した 1 型及び 2 型 mG の初代培養細胞を用いた。一方、*in vivo* 実験系はラット又はマウスの脳内に被験物質を微量注入して調べた。

第 1 の成果は、2 型には反応せず、1 型 mG とのみ反応するモノクローナル抗体 KM9F5 を開発したことである。抗原としての mG の調製は、上記の澤田らの方法を用いた。Figure 12 に示す通り、抗

Iba1 抗体が mG 全般を染めるのに対し、KM9F5 は mG の一部（1 型）としか反応しない。また、KM9F5 は M ϕ と全く反応しない点でも抗 Iba1 抗体とは異なっており、1 型 mG に特異性の高い抗体であることが分かる（特許出願中）。

第 2 の成果は、LPS/IFN ϕ 処理したときの 1 型と 2 型の応答の違いである。培養 mG を用いた *in vitro* の系では、炎症性の TNF α 及び iNOS の発現レベルは 1 型が圧倒的に高いのに対し、2 型ではわずかであった。この結果が *in vivo* にも反映されているか否かを、adult rat 脳の方に LPS/IFN ϕ を微量注入して調べた。この解析でも、上述した抗 Iba1 抗体とわれわれが開発した KM9F5 との併用が効果を発揮した。すなわち、iNOS の産生は約 1 日で最大となるが、産生のほとんどが 1 型 mG に限られていることが確認できた（Fig. 13）。

第 3 の成果は、アルツハイマー病（AD）の発症原因の 1 つとみなされているオリゴマー状の β アミロイドペプチド（o-A β ）が、活性化ミクログリアによってクリアランスという興味深い知見である。M ϕ に発現する CD36 などのスカベンジャー受容体（SR）が Ox-LDL や AGE を貪食することは前述したが、川原浩一君と「mG にも SR が発現しているのであれば mG が A β を貪食するはずで、mG の神経保護的な作用は 2 型 mG によるものではないか」という仮説を立て、調べてもらったところ、「本当に o-A β を取り込みますよ。しかも IL-4 で刺激した 2 型の方が活性はずっと強いです！」という嬉しい結果が得られた。さらに貪食・分解活性を担う分子群も分かってきた。²⁹⁾ 次のステップは、このユニークな o-A β のクリアランス機構が *in vivo* でも

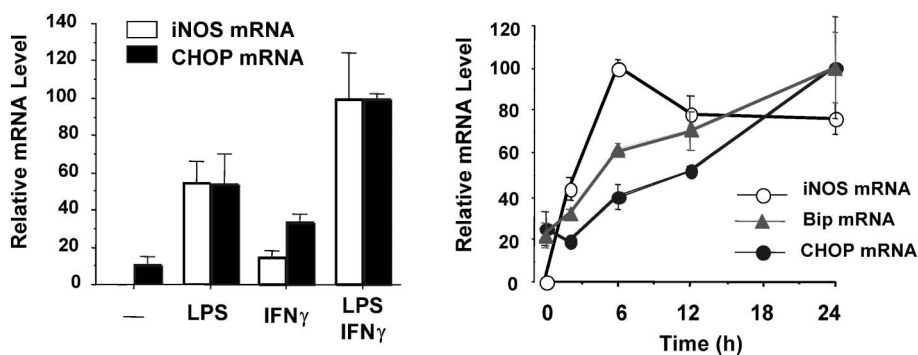


Fig. 11. LPS/IFN γ -induced Apoptosis in MG5 Microglia Was Involved in Enhanced Expression of mRNA for iNOS and CHOP (From Ref. 24)

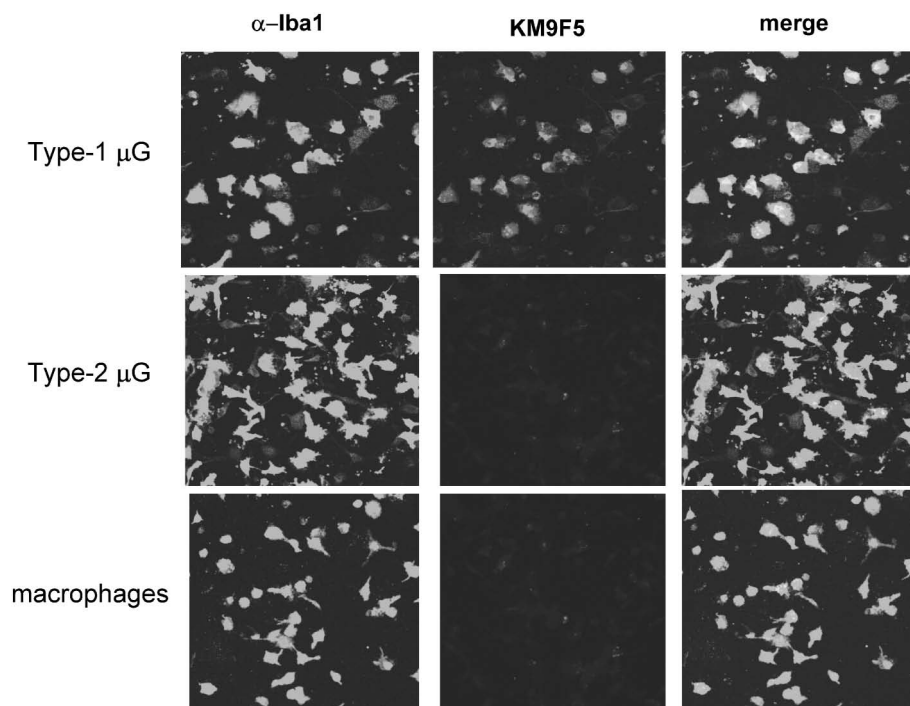


Fig. 12. Development of a Unique Monoclonal Antibody That Selectively Recognizes Type-1 Microglia

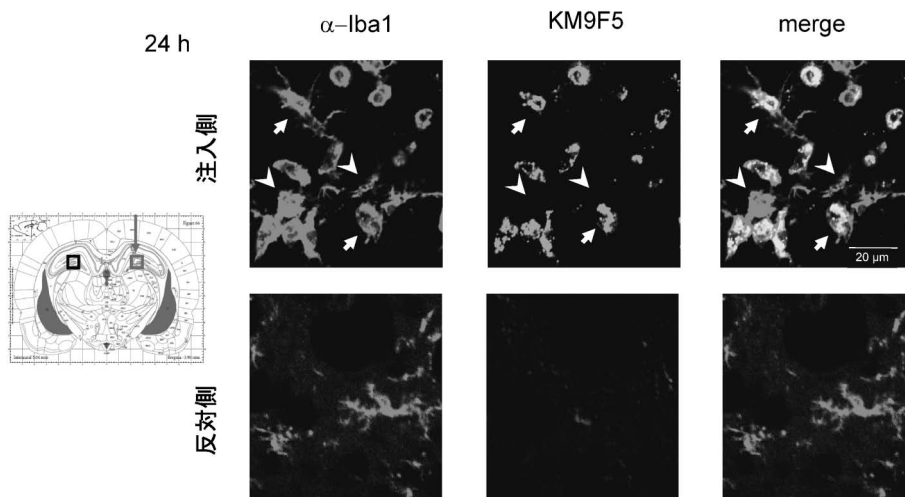


Fig. 13. LPS/IFN γ Selectively Activates Type-1 Microglia at the Ipsi-lateral Side of Adult Rat Brain

起こることを示さねばならない。ADモデル動物は、比較的早期にA β の蓄積が始まるAPP23マウスがよいとの情報を得て、その開発者M. Staufenbiel博士(Novartis Pharma, Basel)に恵与頂いた。*In vivo*ではIL-4に加えてIL-13も合わせて脳の一方側に微量注入し、その効果をモリス水迷路及び脳切片の抗A β 抗体による染色度の減少で評価した。マウスの供与を受ける際、統計的に意味のあるデー

タとするには $n > 15$ としなければと言われていたので、それだけ手間ヒマがかかる実験であった。幸い、多くの大学院生諸君が頑張ってくれたおかげで、意味のあるデータが得られている(投稿準備中)。この成果を今後新しいAD治療法へと結び付けるためには、このmGによるクリアランス能を誘導できる低分子化合物を探す必要がある。われわれの仕事に興味を持って下さる先生方のご協力を得

て、現在このような化合物がみつかりつつある。この段階で私は定年を迎え時間切れとなったが、川原君をはじめ若い諸君らも頑張ってくれている。さらなる進展を楽しみにしたい。

謝辞 研究の出発点から今日まで、「研究とは何ぞや」を教えて頂いた恩師・金岡祐一名誉教授に深く感謝いたします。筆者の研究は多くの方々との共同研究の集成であり、本文中に引用できなかった次の方々に記して深く感謝の意を表します：前田浩名誉教授，崎山文夫名誉教授，小田切優樹教授，赤池孝章教授，A. Schwartz 教授，W. A. Catterall 教授，H. Glossmann 教授，J. Striessnig 教授，内藤一秋博士，矢花秀雄博士，芝野俊郎博士，平岡昌和名誉教授，川野誠子准教授，大泉 康名誉教授，大倉正道准教授，瀬山一正名誉教授，山岡 薫教授，木下英司准教授，高濱和夫教授，白崎哲哉准教授，竹屋元裕教授，村田和義博士，永井竜児博士，澤田 誠教授，玉巻伸章教授，野原稔弘名誉教授，今村順茂准教授，故・後藤正文教授。また，赴任した熊本大学薬学部において協力を惜しまれなかった中山守雄助教授（現・長崎大・教授）と原田久美子博士に深く感謝したい。北海道大学・薬学部（薬品合成化学講座，生体機能化学講座）及び熊本大学・薬学部（放射薬品学研究室，生体機能化学研究室），熊本大学大学院・医学薬学研究部（細胞機能分子解析学分野）の研究室に在籍され，研究に尽力頂いた多くの方々に改めてお礼申し上げる。最後に，執筆の機会を与えて頂いた本誌編集委員長・宮田直樹教授に感謝します。

REFERENCES

- 1) Kanaoka Y., *Yakugaku Zasshi*, **100**, 973–993 (1980).
- 2) Nakayama H., Tanizawa K., Kanaoka K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 537–541 (1970).
- 3) Kanaoka Y., Nakayama H., *Tanpakushitsu Kakusan Koso (Protein Nucleic Acid Enzyme)*, **16**, 403–410 (1971).
- 4) Ishii S. (translated in Japanese by Ishii S., Kasai K., Nakayama H., Nakata H.), “Chemical Modification of Proteins: Principles and Applications,” eds. by Means G. E., Feeney R. E., Hirokawa-Shoten, Tokyo (1973).
- 5) Nakayama H., Kanaoka Y., Chap. 4, “Photoaffinity Labeling,” in “Chemical Modification of Proteins (2)” eds. by Ohno M., Kanaoka Y., Sakiyama F., Maeda H., Gakkai-Shuppan Center, Tokyo (1981).
- 6) Nakayama H., Withy R. M., Raftery M. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 7575–7578 (1982).
- 7) Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanaoka Y., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Raftery M.A., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S., *Nature*, **312**, 121–127 (1984).
- 8) Nakayama H., Nakayama K., Nonomura Y., Kangawa K., Matsuo H., Kanaoka Y., *Pept. Chem.*, **1987**, 795–797 (1988).
- 9) Nakayama H., Nakayama K., Nonomura Y., Kobayashi M., Kangawa K., Matsuo H., Kanaoka Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1145**, 134–140 (1993).
- 10) Nakayama H., Yoshida E., Kanaoka Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2684–2689 (1986).
- 11) Yoshida E., Nakayama H., Hatanaka Y., Kanaoka Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 982–987 (1990).
- 12) Terlau H., Heinemann S. H., Stuehmer W., Putsch M., Conti F., Imoto K., Numa S., *FEBS Lett.*, **293**, 93–96 (1991).
- 13) Nakayama H., Hatanaka Y., Yoshida E., Oka K., Takanohashi M., Amano Y., Kanaoka Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 900–907 (1992).
- 14) Nakayama H., Taki M., Striessnig J., Glossmann H., Catterall W.A., Kanaoka Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 7575–7578 (1982).
- 15) Murata K., Odahara N., Kuniyasu A., Sato Y., Nakayama H., Nagayama K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 284–291 (2001).
- 16) Watanabe T., Kalasz H., Yabana H., Kuniyasu A., Naito K., Nakayama H., Schwartz A., Vaghy P. L., *FEBS Lett.*, **334**, 261–264 (1993).
- 17) Motoike H. K., Bodi I., Nakayama H., Schwartz A., Varadi G., *J. Biol. Chem.*, **274**, 9404–9420 (1999).

- 18) Kuniyasu A., Itagaki K., Shibano T., Iino M., Kraft G., Schwartz A., Nakayama H., *J. Biol. Chem.*, **273**, 4635–4641 (1998).
- 19) Kawahara K., Kuniyasu A., Masuda K., Ishiguro M., Nakayama H., *Biochem. J.*, **363**, 223–232 (2002).
- 20) Masuda K., Kawahara K., Kuniyasu A., Ishiguro M., Nakayama H., *Mass Spectrom.*, **53**, 18–24 (2005).
- 21) Ohgami N., Nagai R., Ikemoto M., Arai H., Kuniyasu A., Horiuchi S., Nakayama H., *J. Biol. Chem.*, **276**, 3195–3203 (2001).
- 22) Ohgami N., Nagai R., Miyazaki A., Ikemoto M., Arai H., Horiuchi S., Nakayama H., *J. Biol. Chem.*, **276**, 13348–13355 (2001).
- 23) Kuniyasu A., Hayashi S., Nakayama H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**, 319–323 (2002).
- 24) Kuniyasu A., Ohgami N., Hayashi S., Miyazaki A., Horiuchi S., Nakayama H., *FEBS Lett.*, **537**, 85–90 (2003).
- 25) Tokunaga M., *Master's dissertation* (Kumamoto University) (2007).
- 26) Kuniyasu A., Tokunaga M., Yamamoto T., Shudo T., Kai H., Nakayama H. (in preparation).
- 27) Nakajima K., Kohsaka S., “Response of Microglia in Brain injury,” in *Neuroglia*, 2nd ed., eds. by Kettenmann H., Ransom R.S., Oxford University Press, Oxford, 2005, pp. 443–453.
- 28) Kawahara K., Oyadomari S., Gotoh T., Nakayama H., Mori M., *FEBS Lett.*, **506**, 135–139 (2001).
- 28) Shimizu E., Kawahara K., Kajizono M., Sawada M., Nakayama H., *J. Immunol.* (in press).