

脂質膜と金属イオンによるアミロイド  $\beta$  ペプチドのコンホメーション制御

三浦隆史,\* 依田真由美, 堤 千裕, 村山紀代子, 竹内英夫

**Conformational Regulation of Amyloid  $\beta$ -peptide  
by Lipid Membranes and Metal Ions**Takashi MIURA,\* Mayumi YODA, Chihiro TSUTSUMI,  
Kiyoko MURAYAMA, and Hideo TAKEUCHI  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aoba,  
Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

(Received September 25, 2009)

Conformational transition of monomeric amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ) to a self-associated  $\beta$ -sheet structure is considered to be an initial step in the development of Alzheimer's disease. Several lines of evidence suggest that physiologically abundant lipid membranes and metal ions are involved in this step. We have demonstrated that  $A\beta$  binds to the phosphatidylcholine membrane in the lamellar gel phase but not in the liquid crystalline phase by using fluorescence and circular dichroism spectroscopy. The membrane-bound  $A\beta$  molecule takes  $\alpha$ -helical or  $\beta$ -sheet structure depending on the temperature. Tightly packed phosphatidylcholine membranes appear to serve as a platform for non-electrostatic binding and self-association of  $A\beta$ . We have also examined Zn(II) and Cu(II) binding modes of  $A\beta$  by Raman spectroscopy. The Raman spectra demonstrate that three histidine residues in the N-terminal region of  $A\beta$  provide primary metal binding sites. Zn(II) binds to the  $N_\epsilon$  atom of histidine and the peptide aggregates through intermolecular His-Zn-His bridges. In contrast, Cu(II) ion is chelated by the  $N_\epsilon$  atom of histidine and deprotonated main-chain amide nitrogens to form a soluble complex. Our findings on the conformational regulation of  $A\beta$  may help in better understanding the molecular basis for the development of Alzheimer's disease.

**Key words**—Alzheimer's disease; amyloid  $\beta$ -peptide; lipid membrane; metal ion; Raman spectroscopy; circular dichroism

**1. はじめに**

アルツハイマー病患者の脳にみられる病理学的特徴であるアミロイド斑は、約 40 アミノ酸残基からなるペプチドであるアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) が分子間会合して生じた線維状凝集体 (アミロイド線維) を主な成分とする。<sup>1)</sup> 非会合状態の  $A\beta$  モノマーは無害であるが、線維化した  $A\beta$  は培養細胞に対して毒性を示す。<sup>2)</sup> 構造生物学的な観点からは、アルツハイマー病はタンパク質のコンホメーション変化を契機として引き起こされる「コンホメーション病」と総称される病気の 1 つとして捉えられる。すなわち、 $A\beta$  モノマーの水溶液中における構造は不規則であ

るが、分子間会合して線維となるためには、 $A\beta$  は  $\beta$  シート構造を形成する必要がある。<sup>3)</sup> このため、 $A\beta$  のコンホメーション変化の原因とメカニズムを理解することは、アルツハイマー病の予防法又は根本的な治療法を開発する上で重要である。 $A\beta$  凝集の原因となる可能性が指摘されている生体成分として、脂質膜と金属イオンがあるが、われわれは、それらが  $A\beta$  のコンホメーションに対してどのような影響を与えるかを、主として分光学的手法を用いて調べてきた。本稿では、これらの研究の一端を紹介する。

**2. 脂質膜との相互作用による  $A\beta$  の 2 次構造形成**

細胞膜の外葉には、ガングリオシド、スフィンゴミエリン、及びコレステロールに富む脂質ラフトと呼ばれる膜ドメインが、周囲のグリセロリン脂質に富む膜から分離した状態で存在すると考えられてい

東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

\*e-mail: tmiura@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S22 で発表したものを中心に記述したものである。

る。<sup>4)</sup> 近年,  $A\beta$  が細胞膜の, 特に脂質ラフトに集積して分子間会合することにより, アミロイド線維核(鑄型)を形成する可能性が多くの研究により示されている。<sup>5,6)</sup> クロイツフェルト・ヤコブ病などの原因となるプリオンタンパク質の凝集も細胞膜の脂質ラフト, 又はラフトと類似する脂質組成を持つ膜ドメインであるカベオラで生じると考えられていることから,<sup>7)</sup> 脂質ラフトにはタンパク質の凝集や病原型構造への転移を促す性質があると思われる。

脂質ラフトは下記の点において, それを取り囲む膜とは異なる性質を持つ。(1) ラフトはスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドを豊富に含むため, 糖鎖に富んでいる。(2) ガングリオシドの糖鎖にはシアル酸が含まれるため, ラフトの膜表面は負電荷に富む。(3) ラフト外の細胞膜は, アシル鎖中にシス型の二重結合を持つグリセロリン脂質を多く含むため, 液晶相(無秩序液体相)であるのに対し, ラフト内は脂質分子のパッキングが密である秩序液体相である。<sup>8)</sup>  $A\beta$  がラフトに集積する原因として, 糖鎖及び膜表面負電荷に注目した研究は行われているが,<sup>9,10)</sup> 膜の相状態がペプチド-脂質膜相互作用に与える影響を調べた例は極めて少ない。そこで, われわれは温度変化により明確な相転移を示すモデル脂質膜を用いて, 種々の相状態の膜に対する  $A\beta$  の結合, 及びそれらの膜が  $A\beta$  の構造に与える影響を円偏光二色性(CD)と蛍光を用いて調べた。<sup>11)</sup>

細胞膜の主要な成分であるホスファチジルコリン(PC)は, 親水性頭部にリン酸基( $-\text{PO}_3^-$ )の負電荷とコリン $[-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]$ の正電荷を1つずつ持つ zwitterion 型のグリセロリン脂質である。PCの脂質二重膜は高温で液晶相( $L_\alpha$ )であり, 温度低下によりリップルゲル相( $P_\beta$ )を経てラメラゲル相( $L_\beta$ )に転移する。相転移温度は炭化水素鎖の長さや二重結合の有無により異なるが, 2本の炭化水素鎖がともに  $\text{C}_{16}$  の長さを持つ直鎖飽和炭化水素である DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, di-C16:0) の場合,  $L_\alpha \rightarrow P_\beta$  転移(主転移:  $T_m$ )は  $41.3 \pm 1.8^\circ\text{C}$ ,  $P_\beta \rightarrow L_\beta$  転移(前転移:  $T_p$ )は  $34.4 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で起こる。<sup>12)</sup> DPPC を用いて調製したリポソーム存在下(脂質濃度 5 mM)における  $A\beta_{1-40}$  (16.7  $\mu\text{M}$ ) の CD スペクトルを Fig. 1 に示す。脂質膜が液晶相である  $46^\circ\text{C}$  では, 198 nm に負のピークを持つ不規則構造の特徴を持つ CD スペ

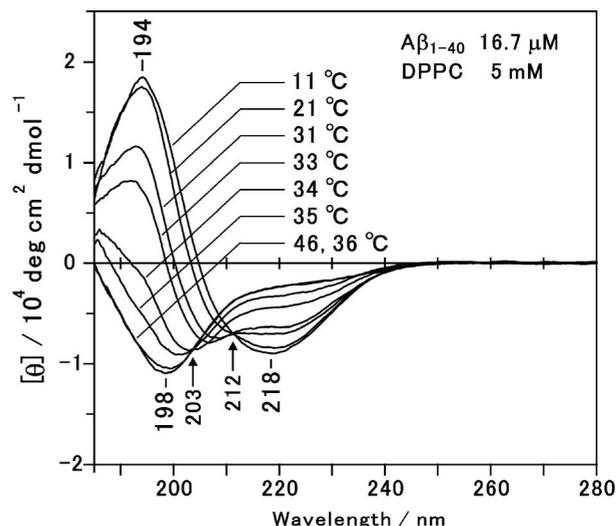


Fig. 1. Temperature Dependence of the CD Spectrum of  $A\beta_{1-40}$  (16.7  $\mu\text{M}$ ) in the Presence of DPPC Liposomes (5 mM in lipid) at pH 7.4 (5 mM sodium phosphate buffer). The arrows at 203 and 212 nm indicate isodichroic points.

クトルが観測された。試料溶液を  $T_m$  より低い  $36^\circ\text{C}$  まで冷却すると, 脂質膜は液晶相からリップルゲル相に転移するが, CD スペクトルはほとんど変化しなかった。しかし,  $35^\circ\text{C}$  から  $33^\circ\text{C}$  に温度低下する間において, CD スペクトルは 207 と 220 nm にダブルミニマムを持つ形状に急激な変化を示した。このことは  $T_p$  を挟む極めて狭い温度範囲で  $A\beta_{1-40}$  が  $\alpha$  ヘリックス構造を形成したことを示す。さらに温度を下げると,  $\beta$  シート構造に特徴的な 218 nm に負, 194 nm に正のピークを持つ CD スペクトルが現れた。脂質膜非存在下の水溶液中で測定した  $A\beta_{1-40}$  の CD スペクトルは, 温度を  $T_p$  以下まで低下させても不規則構造の特徴を持つ形状のまま変化しなかったことから,  $A\beta_{1-40}$  の 2 次構造形成は DPPC 膜との相互作用により誘起されたと考えられる。 $A\beta_{1-40}$  と DPPC 膜の結合を確認するため, 環境に鋭敏であることが知られているチロシン残基(Tyr10)の蛍光強度の温度依存性を調べた。<sup>11)</sup> リポソーム存在下における蛍光強度は,  $35^\circ\text{C}$  よりも高温側ではリポソーム非存在下での強度とほぼ同じであった。しかし,  $35^\circ\text{C}$  よりも低温側ではリポソーム存在下の方が強い蛍光を発するようになり, リポソーム非存在下との差は低温になるほど大きくなったことから,  $A\beta_{1-40}$  は  $T_p$  よりも低い温度で, DPPC 膜と結合することが確認された。

同様の検討を DPPC よりもアシル鎖が長い

DSPC (di-C18:0) と短い DMPC (di-C14:0) を用いて行ったところ, DPPC の場合と同様に, それぞれの  $T_p$  (DSPC  $49.1 \pm 2.9^\circ\text{C}$ , DMPC  $13.7 \pm 2.2^\circ\text{C}$ ) よりも低温側で  $A\beta_{1-40}$  が PC 膜と結合し, 2次構造を形成することがわかった.<sup>11)</sup> CD と蛍光により得られた以上の結果から,  $A\beta_{1-40}$  は液晶相又はリップルゲル相の PC 膜には結合しないが, ラメラゲル相の膜とは結合し,  $\alpha$ ヘリックス又は  $\beta$ シート構造を形成することが示された [Fig. 2(A)].

$A\beta_{1-40}$  とラメラゲル相の PC 膜との結合は 150 mM NaCl 添加によって阻害されないことから, 両者間の結合は静電相互作用によるものではないと考えられる.<sup>11)</sup> 結合の主な推進力となっているのはペプチドの疎水性アミノ酸残基と, 例えばコリンのメチル基のような膜表面付近の疎水基との間の相互作用である可能性が高い. ラメラゲル相でなければ  $A\beta_{1-40}$  が結合しない理由は不明であるが, 膜内で脂質分子が密にパッキングされている, 又は, リップルゲル相と比べて膜表面が滑らかである, というラメラゲル相の特徴<sup>13)</sup> が関係するのであろう. 細胞膜はコレステロールを含むため, PC のみのモデル脂

質膜が低温でとるようなゲル相の状態にはならない. しかし, 秩序液体相の状態にあると考えられる脂質ラフトにおいては, 脂質分子は比較的高い流動性を保ちつつも, ラメラゲル相と同様に密にパッキングされていると予想される.<sup>8)</sup> 膜を構成する脂質分子のパッキングがラフト内外で異なることが, 細胞膜に結合した  $A\beta_{1-40}$  がラフトへ集積することの一因である可能性がある.

ラメラゲル相の PC 膜に結合した  $A\beta_{1-40}$  は,  $T_p$  に近い温度では  $\alpha$ ヘリックスを形成するが, さらに低温になると  $\beta$ シートに転移する.  $\alpha$ ヘリックスは単分子で,  $\beta$ シートは複数分子の会合で形成されると考えられるため, もし  $A\beta_{1-40}$  が膜に結合して  $\alpha$ ヘリックスを形成した後も, 温度低下により膜表面のペプチド密度がさらに増加し続けるならば, このことは  $\alpha$ ヘリックス  $\rightarrow$   $\beta$ シート転移の原因となり得る. しかし, 実際には,  $\alpha$ ヘリックス  $\rightarrow$   $\beta$ シート転移が生じる  $33^\circ\text{C}$  から  $11^\circ\text{C}$  までの間のすべてのスペクトルが 212 nm の isodichroic point を通ることから, この転移は 2つの構造間のみで生じていることが判る (Fig. 1). 仮に,  $\alpha$ ヘリックス  $\rightarrow$   $\beta$ シート転移が起こる温度範囲で不規則構造の  $A\beta_{1-40}$  がまだ溶液中に残っており, これが膜と結合して 2次構造を形成するならば, isodichroic point は存在し得ない. したがって, この結果は, 膜表面のペプチド密度が一定であるにもかかわらず, 脂質膜に結合した  $A\beta_{1-40}$  は温度低下により  $\alpha$ ヘリックスから  $\beta$ シートへ転移することを示す. 脂質膜には,  $A\beta_{1-40}$  の分子間会合やコンホメーション変化を引き起こす要因が存在するようである.

$A\beta_{1-40}$  が PC 膜に結合して不規則構造から  $\alpha$ ヘリックスを形成する温度は, アシル鎖長が短くなる順, DSPC > DPPC > DMPC, に低くなることは既に述べたが,  $\alpha$ ヘリックスから  $\beta$ シートへ転移する温度もこの順に低くなる.<sup>11)</sup> これら 3種の PC が  $A\beta_{1-40}$  の構造に与える影響を同じ温度 ( $30^\circ\text{C}$ ), 同じ濃度 (ペプチド  $16.7 \mu\text{M}$ , 脂質 5 mM) で比較すると Fig. 2(B) のようになる.  $A\beta_{1-40}$  はこの温度で液晶相をとる DMPC 膜に対しては結合しないが, ともに  $T_p$  以下となる DPPC 膜と DSPC 膜には結合する. しかし, 膜に結合した  $A\beta_{1-40}$  の構造は DPPC と DSPC で異なり, 前者に対しては  $\alpha$ ヘリックス, 後者に対しては  $\beta$ シート構造をとる.  $30^\circ\text{C}$  におい

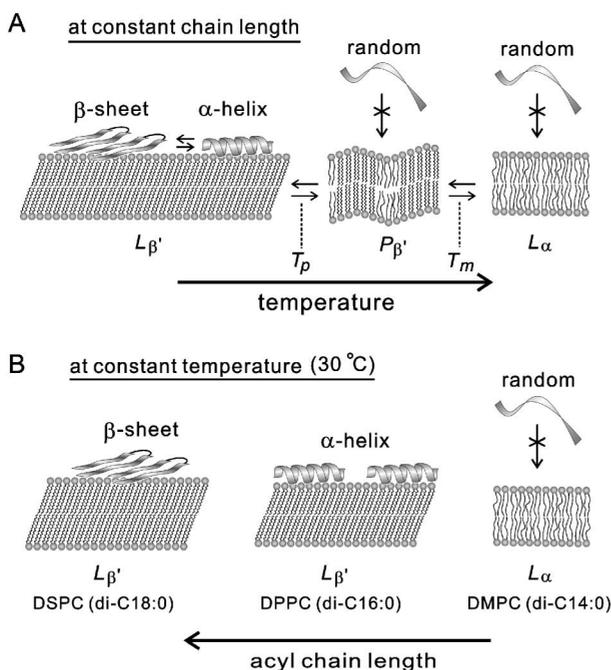


Fig. 2. Relationship between the Phases of PC Membranes and the Secondary Structure of  $A\beta_{1-40}$

(A) Temperature dependence of the secondary structure of  $A\beta_{1-40}$  in the presence of PC liposomes at a constant acyl chain length. (B) Chain-length dependence of the secondary structure of  $A\beta_{1-40}$  in the presence of PC liposomes at a constant temperature of  $30^\circ\text{C}$ .

て、DPPC膜とDSPC膜は同じラメラゲル相をとるが、これらの膜の状態にはなんらかの違いがあると考えられる。 $T_p$ 以下でラメラゲル相になったPC膜は、さらに冷却されると、より密なパッキングを持つ膜に段階的に変化し、最終的には結晶に近いパッキングを持つサブゲル相と呼ばれる状態に移る。<sup>12)</sup> 同じ温度でも、鎖長が異なれば $T_p$ との温度差が異なるため、膜のパッキング状態はわずかながら異なると予想される。 $A\beta_{1-40}$ が $\alpha$ ヘリックスを形成するか、又は分子間合して $\beta$ シートを形成するかは、アルツハイマー病発症の有無を決定付けるかもしれない重要なポイントである。脂質膜のパッキング状態のわずかな違いが、この分岐点において方向を決める1つの要素となっている可能性がある。

### 3. 金属イオンによる $A\beta$ 凝集の促進及び阻害メカニズム

Al(III), Fe(III), Zn(II)などの金属イオンが $A\beta$ の凝集を促進することは、以前から知られていた。<sup>14,15)</sup> 特に、Zn(II)は脳内の生理的条件に近い濃度でも $A\beta$ を凝集させる可能性がある。<sup>16)</sup> Cu(II)も脳内に比較的高濃度に存在し、かつ $A\beta$ に対して強い凝集能を持つ金属である。しかし、Zn(II)が弱酸性からアルカリ性までの広いpH範囲で凝集能を持つのにに対し、Cu(II)の効果はpH 6付近に限られる。<sup>17)</sup>

比較的高い親水性を持つ $A\beta$ のN末端側領域には3個のヒスチジン残基(His6, 13, 14)が存在する。ヒスチジン側鎖のイミダゾール基には2個の窒素原子 $N_\pi$ と $N_\tau$ のいずれか一方のみが水素付加された2種の互変異性体が存在する。このため、イミダゾール基が金属イオンと結合する際、2個の窒素原子それぞれが配位子となる可能性がある(Fig. 3)。われわれは、様々なヒスチジン-金属錯体のラマンスペクトルを測定し、ヒスチジンの金属結合部位のマーカースとして有用なラマンバンドを見出している。<sup>18,19)</sup> Zn(II)とCu(II)による $A\beta$ 凝集促進のメカニズム、及び凝集能のpH依存性が金属により異なる理由を明らかにするため、 $A\beta$ とZn(II)及びCu(II)との結合様式をラマン分光法により調べた。<sup>20)</sup>

$A\beta$ のN末端側親水性領域に相当する $A\beta_{1-16}$ の514.5 nm励起ラマンスペクトルをFig. 4に示す。金属イオン非存在下のペプチド水溶液のスペクトル

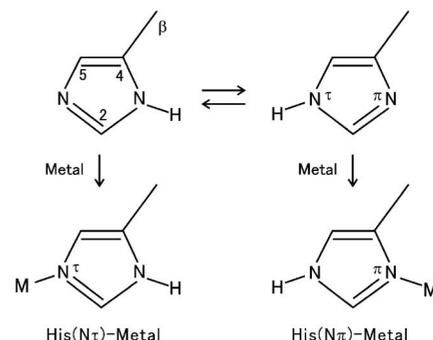


Fig. 3. Structures of  $N_\pi$ - and  $N_\tau$ -protonated Tautomeric Forms of the Histidyl Imidazole Ring

Either the  $N_\pi$  or  $N_\tau$  atom of histidine can act as the ligand for metal ions (M).

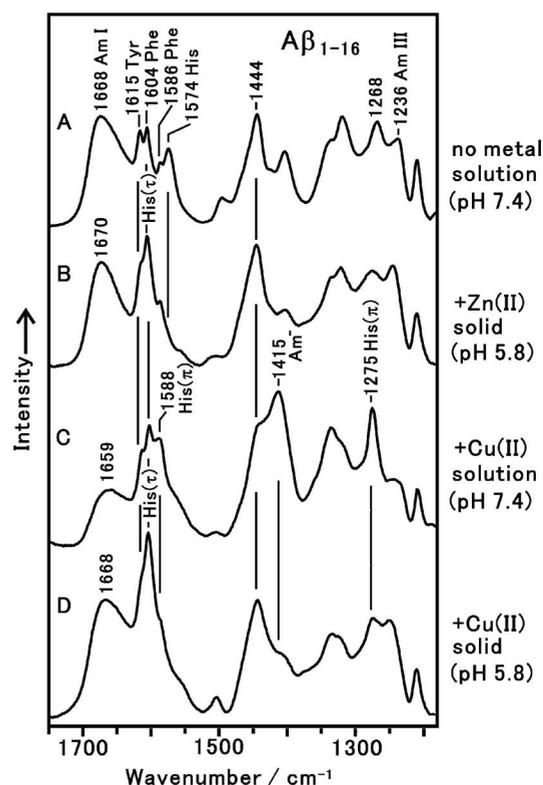


Fig. 4. 514.5-nm Excited Raman Spectra of Metal-free and Metal-bound  $A\beta_{1-16}$

(A) Metal-free  $A\beta_{1-16}$  in  $H_2O$  solution (pH 7.4). (B) Zn(II)- $A\beta_{1-16}$  aggregates precipitated from a mixture solution at  $R=4$ , pH 5.8. (C) Cu(II)- $A\beta_{1-16}$  in solution at  $R=4$ , pH 7.4. (D) Cu(II)- $A\beta_{1-16}$  aggregates precipitated from a mixture solution at  $R=4$ , pH 5.8. The assignments of Raman bands are denoted as follows: His, metal-free histidine; His( $\tau$ ), histidine bound to metal via  $N_\tau$ ; His( $\pi$ ), histidine bound to metal via  $N_\pi$ ; Am I, amide I; Am III, amide III; Am $^-$ , deprotonated amide bound to metal. The Raman intensities of the spectra are normalized by using the 1444  $cm^{-1}$  C-H bend band as an internal intensity reference.

[Fig. 4(A)]に観測される $1574\text{ cm}^{-1}$ バンドはヒスチジンの $C_4=C_5$ 伸縮振動に帰属される。<sup>21)</sup> このバンドは、イミダゾールの $N_\pi$ に金属が結合すると

$1580 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$  に,  $N_{\tau}$  に結合すると  $1600 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$  にそれぞれ現れることが知られている.<sup>18,19)</sup> ペプチドに対する金属イオンのモル比 ( $R$ ) が 4 となるように  $Zn(II)$  を  $A\beta_{1-16}$  水溶液に添加すると,  $A\beta_{1-16}$  は凝集した. 凝集固体のスペクトル [Fig. 4(B)] には  $1574 \text{ cm}^{-1}$  バンドは観測されず, 代わりに本来フェニルアラニンのバンドが存在する  $1604 \text{ cm}^{-1}$  付近に顕著な強度増大がみられる. このスペクトル変化から, 凝集固体中において  $Zn(II)$  はヒスチジンの  $N_{\tau}$  原子に結合していることがわかる. この結合は,  $Zn(II)$  が  $A\beta_{1-16}$  に対して顕著な凝集能を持つ  $pH > 5.8$  の広い  $pH$  範囲で保たれていた. 以上の結果から,  $Zn(II)$  はヒスチジン側鎖を介して, ペプチド分子間に  $His(N_{\tau})-Zn(II)-His(N_{\tau})$  架橋を形成し,  $A\beta$  の凝集を促進すると考えられる [Fig. 5(A)].

一方,  $pH 7.4$  で  $Zn(II)$  の場合と同じ  $R=4$  となるように  $Cu(II)$  を  $A\beta_{1-16}$  水溶液に添加しても, 凝集は生じなかった.  $Cu(II)-A\beta_{1-16}$  混合溶液のラマンスペクトルには  $1574 \text{ cm}^{-1}$  バンドが観測されないが,  $1588 \text{ cm}^{-1}$  に新たなバンドが現れている [Fig. 4(C)]. このことから,  $Cu(II)$  は  $A\beta_{1-16}$  に結合しているが, ヒスチジンの  $N_{\tau}$  原子ではなく,  $N_{\pi}$  原子を結合部位としていることがわかる. このスペクトルに観測される強く鋭い  $1275 \text{ cm}^{-1}$  バンドも金属- $N_{\pi}$  配位のマーカーとなるヒスチジンのバンド

である.<sup>18)</sup> 可溶性  $Cu(II)-A\beta_{1-16}$  複合体のスペクトルは, ヒスチジンのバンド以外にも不溶性  $Zn(II)-A\beta_{1-16}$  複合体とは異なる特徴を示す. 例えば,  $1660 \text{ cm}^{-1}$  付近のアミド I バンドは  $Cu(II)$  との複合体形成により顕著に強度減少する一方で,  $1415 \text{ cm}^{-1}$  に新たなバンドが現れている. アミド基の窒素原子からプロトンが脱離して  $Cu(II)$  に置き換わると, 主として  $C=O$  の伸縮振動であるアミド I バンドは観測されなくなり, 代わりに  $O=C-N^{-}$  対称伸縮振動が  $1415 \text{ cm}^{-1}$  付近に現れることが知られている.<sup>22)</sup> したがって,  $A\beta_{1-16}$  の一部の主鎖アミド基は, 脱プロトン化して  $Cu(II)$  と結合すると考えられる. ヒスチジン側鎖のイミダゾール基と近傍の主鎖アミド基の窒素原子が金属イオンを取り囲むようにしてキレート配位する場合, ヒスチジンの配位子が  $N_{\pi}$  原子であれば,  $Cu(II)$  が好む平面四角形の配位構造をとることが可能である [His( $N_{\pi}$ )/amide( $N^{-}$ )-Cu(II) 配位, Fig. 5(B)].  $Cu(II)$  も  $A\beta$  のヒスチジンと結合するが,  $Zn(II)$  のように分子間架橋を形成するのではなく, 主鎖アミド基とともに分子内キレートを形成するため, ペプチドの凝集を引き起こさないと考えられる.  $Cu(II)$  がアミド基に結合する際に, ペプチド鎖間の  $\beta$  シート形成に必須であるアミド基の水素原子が脱離してしまうことも, His( $N_{\pi}$ )/amide( $N^{-}$ )-Cu(II) 配位が  $A\beta$  を凝集させない理由であろう.

$Cu(II)-A\beta_{1-16}$  複合体は  $pH > 7$  では可溶であるが,  $pH 6$  付近で不溶化し, 沈殿した.  $pH 6.6$  で凝集固体化した  $Cu(II)-A\beta_{1-16}$  複合体のラマンスペクトルを Fig. 4(D) に示す.  $pH 7.4$  の可溶性  $Cu(II)-A\beta_{1-16}$  複合体のスペクトル [Fig. 4(C)] と比較すると, 脱プロトン化アミドの  $1415 \text{ cm}^{-1}$  バンドの強度が減少し, アミド I バンドが強度増大していることから,  $pH$  の低下によって  $Cu(II)$  結合部位のアミド基窒素にプロトンが付加され,  $Cu(II)$  がアミド窒素から脱離したことがわかる. また, ヒスチジンの  $1588 \text{ cm}^{-1}$  バンドが消失し,  $1604 \text{ cm}^{-1}$  バンドが強度増大することから,  $Cu(II)$  の結合部位が  $N_{\pi}$  から  $N_{\tau}$  に移ったことがわかる. 以上の結果から,  $pH 6$  付近では主鎖アミド基は関与せず, ヒスチジンのみが配位子となるため,  $Cu(II)$  も  $Zn(II)$  と同様に His( $N_{\tau}$ )-Cu(II)-His( $N_{\tau}$ ) 架橋を形成して, ペプチドの凝集を促進することがわかった.

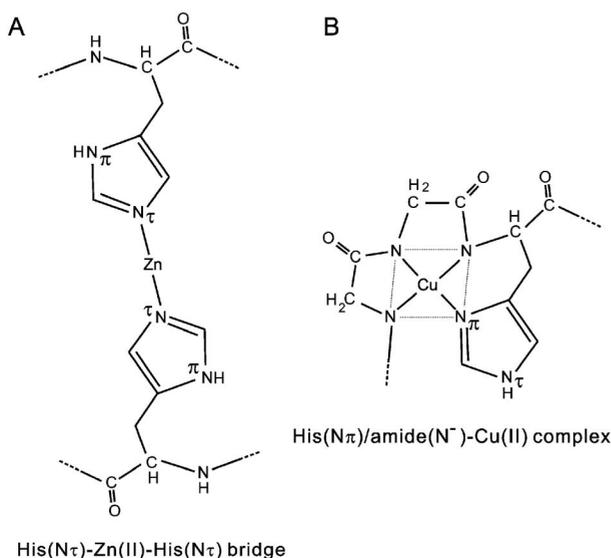


Fig. 5. Structures of (A) His( $N_{\tau}$ )-Zn(II)-His( $N_{\tau}$ ) Bridge and (B) His( $N_{\pi}$ )/Amide( $N^{-}$ )-Cu(II) Complex

以上のように、生理的条件に近い pH 7.4 において、Zn(II)は His ( $N_T$ )-Zn(II)-His ( $N_T$ ) 架橋を形成することにより A $\beta$  の凝集を促進し、Cu(II)は His ( $N_T$ )/amide ( $N^-$ )-Cu(II) 型分子内キレートを形成して A $\beta$  の可溶性を保つ。凝集に対する作用は逆であるが、A $\beta$  との結合に際してヒスチジンを主な配位子とする点は両金属に共通である。そこで、次に、Zn(II)と Cu(II)が共存する場合に、Zn(II)による A $\beta$  の凝集作用を Cu(II)が阻害する可能性を検討した。<sup>23)</sup> ペプチド濃度 2.5  $\mu$ M の A $\beta_{1-40}$  水溶液に 50  $\mu$ M の Zn(II)を添加すると、約 80% のペプチドが凝集するが、Zn(II)よりも低濃度 (10  $\mu$ M) の Cu(II)を共存させただけで、Zn(II)によるペプチドの凝集を、ほぼ完全に阻害できることがわかった。脳内の Zn(II)と Cu(II)の濃度は、他の臓器や血清中と比較して高いことが知られている。<sup>24,25)</sup> すべての人の脳で A $\beta$  の沈着が起こるわけではないのは、Zn(II)による A $\beta$  の凝集が Cu(II)により抑えられているからであるかもしれない。アルツハイマー病患者の脳では、金属イオン類の恒常性に異常がみられるという報告は多く、例えば、患者脳の中で特に強い病変がみられる扁桃核や海馬において、Cu(II)濃度が同年齢の健常者のそれと比較して顕著に低いことがわかっている。<sup>26)</sup> われわれの研究から得られた結果からも、脳における Cu/Zn 比の低下はアルツハイマー病発症の危険因子となる可能性が指摘される。一方、pH 6 付近の弱酸性では、Cu(II)の A $\beta$  凝集に対する作用は、むしろ促進へ転じるため、炎症などによって引き起こされる酸性化も、金属イオンによる A $\beta$  凝集を誘発する可能性がある。

#### 4. おわりに

A $\beta$  モノマーは水溶液中では不規則構造であるが、脂質膜に結合すると  $\alpha$  ヘリックスを形成する。ある条件下において、A $\beta$  は脂質膜に結合したまま分子間会合し、 $\alpha$  ヘリックスから  $\beta$  シート構造に転移する。アルツハイマー病発症の開始プロセスと考えられる後者の構造転移が、どのような因子によって促進されるのかを明らかにすることは、病因を解明する上で重要である。既にいくつかの研究により指摘されているように、脂質膜は膜表面に捕獲したペプチドに分子間会合の場を提供することにより、 $\beta$  シート構造への転移を促進する。ペプチド/脂質比が低いときに  $\alpha$  ヘリックス、高いときに  $\beta$

シートを A $\beta$  が形成することは、膜表面のペプチド密度がペプチドのコンホメーションを制御することを示す。<sup>6)</sup> これと同様の結果は、線維形成能と細胞毒性を持つ点で A $\beta$  と類似するペプチドであるプリオンタンパク質のフラグメント PrP106-126 についても得られている。<sup>27)</sup> 一方、本稿で紹介したように、膜内における脂質分子のパッキング状態は、ペプチド密度非依存的にペプチドの 2 次構造に影響を及ぼす。細胞膜の中で比較的高いパッキング状態を持つと予想されるラフト領域は、従来から指摘されていたように A $\beta$  に対して高い親和性を示すだけでなく、A $\beta$  の  $\beta$  シート構造形成に適した環境を備えている可能性がある。脂質膜のパッキング状態がどのようなメカニズムでペプチドのコンホメーションに影響を及ぼすのか、今後、さらに検討する必要があるだろう。

Zn(II)と Cu(II)は脳内に比較的豊富に存在する金属イオンであるが、前者はペプチド分子間に架橋を形成することにより A $\beta$  の凝集を促進し、後者は A $\beta$  と可溶性複合体を形成する。したがって、なんらかの原因で、これらの金属イオンの濃度が正常な範囲から外れることは、アルツハイマー病の発症につながる可能性がある。現在、金属キレート剤等を投与することにより脳内の金属イオンを制御し、アルツハイマー病を治療しようとする試みがいくつかのグループにより進められており、この中から有効な治療薬が見つけれられる可能性もある。<sup>28)</sup> しかし、金属イオンは多過ぎれば毒性を示す一方で、生体にとって必須の要素でもあるため、対症療法的な制御には様々な困難が伴うと予想される。本来、生体は金属イオンのホメオスタシスに係わる、厳密な制御機構を備えている。アルツハイマー病の根本的な予防策を講じるためには、金属イオンの生体内輸送及び濃度調節メカニズムの早期解明が望まれる。

#### REFERENCES

- 1) Selkoe D. J., Abraham C. R., Podlisny M. B., Duffy L. K., *J. Neurochem.*, **146**, 1820-1834 (1986).
- 2) Selkoe D. J., *Physiol. Rev.*, **81**, 741-766 (2001).
- 3) Kirschner D. A., Abraham C., Selkoe D. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 503-507 (1986).

- 4) Brown D. A., London E., *J. Biol. Chem.*, **275**, 17221–17224 (2000).
- 5) Yanagisawa K., Odaka A., Suzuki N., Ihara Y., *Nat. Med.*, **1**, 1062–1066 (1995).
- 6) Kakio A., Nishimoto S. I., Yanagisawa K., Kozutsumi Y., Matsuzaki K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 24985–24990 (2001).
- 7) Taraboulos A., Scott M., Semenov A., Avraham D., Laszlo L., Prusiner, S. B., *J. Cell Biol.*, **129**, 121–132 (1995).
- 8) Brown D. A., London E., *J. Membr. Biol.*, **164**, 103–114 (1998).
- 9) Terzi E., Hölzemann G., Seelig J., *Biochemistry*, **36**, 14845–14852 (1997).
- 10) Matsuzaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1935–1942 (2007).
- 11) Yoda M., Miura T., Takeuchi H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **376**, 56–59 (2008).
- 12) Koynova R., Caffrey M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1376**, 91–145 (1998).
- 13) Huang C., Li S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1422**, 273–307 (1999).
- 14) Kawahara M., Muramoto K., Kobayashi K., Mori H., Kuroda Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 531–535 (1994).
- 15) Mantyh P. W., Ghilardi J. R., Rogers S., DeMaster E., Allen C. J., Stimson E. R., Maggio J. E., *J. Neurochem.*, **61**, 1171–1174 (1993).
- 16) Bush A. I., Pettingell W. H., Paradis M. D., Tanzi, R. E., *J. Biol. Chem.*, **269**, 12152–12158 (1994).
- 17) Atwood C. S., Moir R. D., Huang X., Scarpa R. C., Bacarra N. M., Romano D. M., Harshorn M. A., Tanzi R. E., Bush A. I., *J. Biol. Chem.*, **273**, 12817–12826 (1998).
- 18) Miura T., Satoh T., Hori-i A., Takeuchi H., *J. Raman Spectrosc.*, **29**, 41–47 (1998).
- 19) Miura T., Satoh T., Takeuchi H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1384**, 171–179 (1998).
- 20) Miura T., Suzuki K., Kohata N., Takeuchi H., *Biochemistry*, **39**, 7024–7031 (2000).
- 21) Ashikawa I., Itoh K., *Biopolymers*, **18**, 1859–1876 (1979).
- 22) Tasumi M., “Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Molecules,” ed. by Theophanides T. M., D. Reidel Publishing Co., Dordrecht, 1979, pp. 225–240.
- 23) Suzuki K., Miura T., Takeuchi H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 991–996 (2001).
- 24) Frederickson C. J., Klitenick M. A., Manton W. I., Kirkpatrick J. B., *Brain Res.*, **273**, 335–339 (1983).
- 25) Waggoner D. J., Drisaldi B., Bartnikas T. B., Casareno R. L. B., Prohaska J. R., Gitlin J. D., Harris D. A., *J. Biol. Chem.*, **275**, 7455–7458 (2000).
- 26) Deibel M. A., Ehmann W. D., Markesbery W. R., *J. Neurol. Sci.*, **143**, 137–142 (1996).
- 27) Miura T., Yoda M., Takaku N., Hirose T., Takeuchi H., *Biochemistry*, **46**, 11589–11597 (2007).
- 28) Biran Y., Masters C. L., Barnham K. J., Bush A. I., Adlard P. A., *J. Cell. Mol. Med.*, **13**, 61–86 (2009).