

ガングリオシドクラスターを介したアミロイド β ペプチドの 凝集・毒性発現のメカニズムとその阻害

松崎 勝巳

Ganglioside Cluster-mediated Aggregation and Cytotoxicity of Amyloid β -Peptide: Molecular Mechanism and Inhibition

Katsumi MATSUZAKI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29
Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received September 25, 2009)

The conversion of soluble, nontoxic amyloid β -peptide ($A\beta$) to aggregated, toxic $A\beta$ rich in β -sheet structures by seeded polymerization is considered to be the key step in the development of Alzheimer's disease. Accumulated evidence suggests that lipid rafts (microdomains) in membranes mainly composed of sphingolipids (gangliosides and sphingomyelin) and cholesterol play a pivotal role in this process. Our model membrane studies revealed the following mechanism of $A\beta$ aggregation in membranes. Soluble $A\beta$ with unordered structures specifically binds to raft-like membranes containing a ganglioside cluster, the formation of which is facilitated by cholesterol. The membrane-bound $A\beta$ forms an α -helix-rich structure at lower densities. At higher densities, $A\beta$ undergoes a conformational transition to a β -sheet-rich structure that can serve as a seed for amyloid fibril formation. This model was confirmed at a cellular level using rat pheochromocytoma PC12 cells. Amyloid fibrils formed in lipid rafts were cytotoxic, whereas fibrils formed in solution were almost nontoxic and had different morphologies. Thus, the role of membranes in $A\beta$ fibrillization is not merely the acceleration of $A\beta$ aggregation but the generation of toxic fibrils. Furthermore, nordihydroguaiaretic acid was found to effectively inhibit the ganglioside-induced amyloidogenesis by preventing the binding of $A\beta$ to the membrane.

Key words—Alzheimer's disease; amyloid β -peptide; ganglioside cluster; lipid raft; cytotoxicity

1. はじめに

アルツハイマー病 (AD) は老人性認知症の約半数を占める主要な認知症疾患であり、その発症機序として最も有力なのは β アミロイドカスケード仮説である。¹⁾ これは一回膜貫通タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質から β セクレターゼ、 γ セクレターゼという 2 種類の酵素によって切り出されてくるアミロイド β ペプチド ($A\beta$) 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ものである。 $A\beta$ の主要分子種は $A\beta$ (1-42) (DAEFRHDSGY¹⁰EVHHQKLVFF²⁰AEDVGSNKGK³⁰IIGLMVGGVV⁴⁰IA) とこれより C 末端側が 2 残基少ない $A\beta$ (1-40) である。AD

の病理学的特徴の一つである老人斑の主要構成成分は、アミロイド線維を形成した $A\beta$ である。神経毒性を示す凝集体の正体に関しては、このアミロイド線維のほか、可溶性のオリゴマーが近年注目を集めている。²⁾ AD 発症機構の解明と治療法の開発にとって、 $A\beta$ の凝集メカニズムの解明は極めて重要である。

しかし、生理的な $A\beta$ は自発的な凝集が起こるのに必要な濃度 (数十 μ M) よりはるかに低い 10 nM 以下で存在し、可溶性である。したがって、*in vivo* で凝集が起こるためには、病的状態に特有な凝集メカニズムを考える必要がある。

2. 脂質ラフトを介した $A\beta$ の凝集メカニズム

1995 年に柳澤らは AD 初期病変であるびまん性老人斑と量的相関をもって糖脂質 GM1 ガングリオシドを結合した $A\beta$ が検出されることを見出し、これが核 (seed) となって $A\beta$ の凝集沈着が促進される可能性を指摘した。³⁾ 近年、ガングリオシドは

京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

e-mail: katsumim@pharm.kyoto-u.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。

細胞膜中で、スフィンゴミエリンやコレステロールなどとともに脂質ラフトと呼ばれる脂質ドメインを形成し、情報伝達に重要な役割を果たしていると考えられている。⁴⁾そこでわれわれは、脂質ラフト構成脂質を始めとして、種々の膜脂質とA β との相互作用を検討した。^{5,6)}

膜への結合を容易に検出するため、A β (1-40)のN末端に蛍光色素ジエチルアミノクマリンを結合させたDAC-A β をデザインした。DAC-A β は、水中では弱い蛍光しか発しないが、膜に結合し疎水的な環境に移行すると、蛍光強度がおおよそ10倍に増大する。Figure 1に示すように、DAC-A β は生理的条件下で、ホスファチジルコリン、コレステロール、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリンなどの主要な膜構成リン脂質には結合しないが、脂質ラフト様のGM1/スフィンゴミエリン/コレステロール(2/4/4)リポソーム(脂質小胞)には結合した。興味深いことに、同じGM1を20%含む膜でも、残り80%がホスファチジルコリンである場合、結合性は消失した。このことは、GM1がある存在状態にある場合のみA β を結合できることを示している。蛍光ラベルGM1のエキシマー形成を利用した実験から、A β はGM1のクラスターを認識していることを明らかにした。このクラスター形成

はコレステロールにより促進された。また、A β はGM1以外の糖脂質にも結合し、結合性は糖鎖が大きいほど強くなることがわかった。^{6,7)}

ガングリオシドクラスターに結合したA β は、結合量が少ないとき、 α ヘリックスに富んだ構造をとるが、結合量の増大に伴い、 β シート構造に転移し(Fig. 2)、 β シート構造をとる条件で、アミロイド線維を形成する。^{5,6)}この凝集過程では、可溶性のオリゴマーは検出されなかった。⁸⁾

上記のリポソームを用いて得られた結果が細胞レベルでも当てはまるのかを検証するため、神経モデルであるラット褐色細胞腫PC12細胞を用いた実験系を構築した。^{9,10)}まず、N末端を蛍光色素フルオレセインでラベルしたA β (1-40)をPC12細胞に添加すると、濃度・時間依存的に細胞膜にA β が蓄積する様子が観測できた。膜上のガングリオシドの分布を蛍光標識コレラトキシンBサブユニットで可視化すると、A β はガングリオシドに富んだドメインに蓄積していることが明らかとなった。また、この領域はフルオレセインラベルしたポリオキシエチレンコレステロールでも染色されたことから、コレステロールにも富んでいることがわかった。次に、蛍光標識していないA β の線維形成を可視化するため、アミロイド染色色素をスクリーニングした

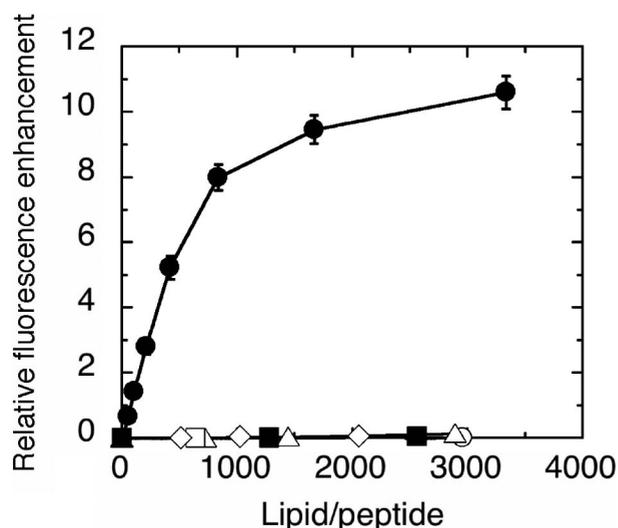


Fig. 1. Binding of DAC-A β to Liposomes of Various Lipid Compositions^{5,6)}

Relative fluorescence enhancement is plotted as a function of the lipid-to-peptide molar ratio. Lipids: ●, GM1/sphingomyelin/cholesterol (2/4/4); ○, GM1/phosphatidylcholine (2/8), △, sphingomyelin; □, phosphatidylcholine; ■, phosphatidylcholine/cholesterol (2/1); ◇, phosphatidylserine.

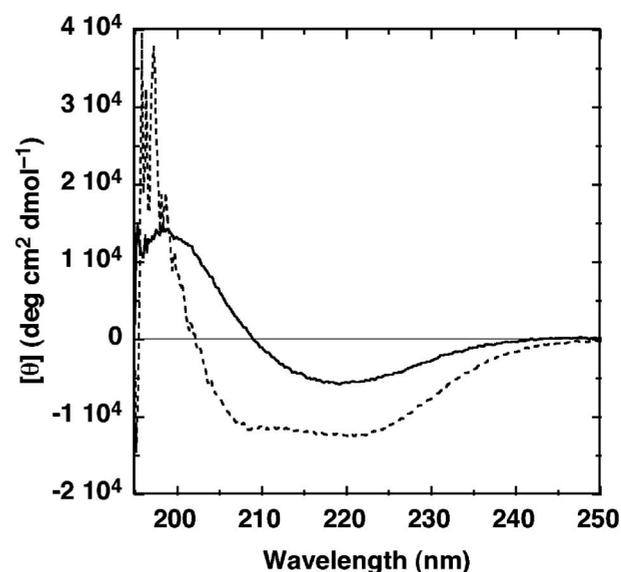


Fig. 2. Secondary Structures of A β (1-40)⁵⁾

Circular dichroism spectra of the peptide were measured in the presence of GM1/sphingomyelin/cholesterol (4/3/3) liposomes at GM1-to-A β ratios of 40 (dotted line) and 10 (solid line). The former spectrum with double minima around 208 nm and 222 nm is typical of an α -helix, whereas the latter with a minimum around 218 nm is characteristic of a β -sheet.

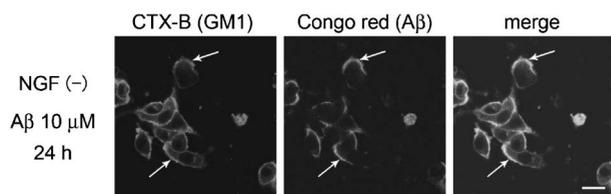


Fig. 3. Amyloid Formation by $A\beta(1-42)$ on PC12 cell membranes¹⁰⁾

PC12 cells were incubated with $10\ \mu\text{M}$ $A\beta(1-42)$ at 37°C for 24 h, and stained with Alexa Fluor 647-conjugated cholera toxin subunit B (gangliosides) and Congo red (amyloids). The arrows indicate ganglioside-rich domains, on which $A\beta$ selectively accumulated.

ところ、コンゴレッドが好適であることを見出した。Figure 3 に示すように、 $A\beta(1-42)$ はガングリオシドに富んだラフト様ドメインに選択的に蓄積してアミロイドを形成することが明らかとなり、リポソーム実験の結果を裏付けた。ラフト様ドメインは、 $A\beta$ のみならず、human islet amyloid peptide (Amylin) のアミロイド形成も促進することを見出した。¹¹⁾

3. 脂質ラフトで形成されたアミロイド線維の性質

最近、アミロイド線維の調製方法によって線維の構造や毒性が異なるという polymorphism の問題がにわかにクローズアップされてきている。¹²⁾ 果たして、脂質ラフトで形成されたアミロイド線維は、水中で形成されたものと同様であろうか？ われわれは、GM1 クラスターを含むリポソーム共存下に形成された $A\beta(1-40)$ のアミロイド線維と水中で形成された線維の性質を比較検討した (Fig. 4).⁸⁾ 線維の形態を電子顕微鏡で比較してみると、ラフト中線維が太い傾向にあった。また、細胞毒性に関しては、 $25\ \mu\text{M}$ で水中線維はほとんど示さなかったのに対し、ラフト中線維は約半数の細胞を死滅させる毒性を有した。線維表面の疎水性の疎水性を蛍光色素 8-anilino-naphthalene-sulfonate (ANS) の結合性で評価したところ、ラフト中線維の方がより疎水性であることがわかった。また、この高い疎水性のため、細胞への親和性も高かった。こうした性質の差異が、細胞毒性と関連すると考えられる。毒性を示す線維は、GM1 クラスターを含むリポソームのみならず、GM1 ミセル共存下でも形成される。¹³⁾ 現在、脂質ラフト中線維と水中線維の構造の違いを詳細に検討している。

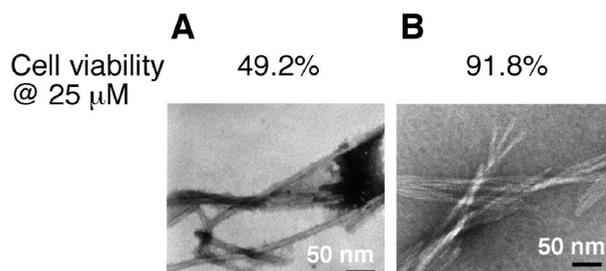


Fig. 4. Negative-stain Transmission Electron Micrographs of $A\beta(1-40)$ Fibrils Formed in GM1/Sphingomyelin/Cholesterol (2/4/4) Liposomes (A) and Aqueous Solution (B)⁸⁾

4. 低分子化合物による脂質ラフトでのアミロイド形成阻害

$A\beta$ の凝集阻害は、AD の治療薬開発にとって重要な戦略である。¹⁴⁾ われわれは、水中でのアミロイド形成阻害が報告されている代表的な化合物 8 種 (ノルジヒドロゲアヤレチン酸、リファンピシン、ケルセチン、タンニン酸、ルチン、テトラサイクリン、インドメタシン、アスピリン) について、GM1 クラスターを含むリポソーム共存下・非共存下における $A\beta$ のアミロイド形成阻害能力を比較したところ、両者はかならずしも相関せず、水中とラフト中で形成される線維は異なるという上記の結果を支持した。¹⁵⁾ ラフト中での線維形成に対し最も強い阻害効果を示したノルジヒドロゲアヤレチン酸について、阻害メカニズムを検討したところ、 $A\beta$ の膜結合を阻害することが明らかとなった。ノルジヒドロゲアヤレチン酸の NMR スペクトルが $A\beta$ の共存によって変化したことから、両者の間に直接的な相互作用があると考えられる。本化合物を $A\beta(1-42)$ と等モル共存させると、 $A\beta$ の PC12 細胞への蓄積及び毒性はほぼ完全に阻害された (Fig. 5)。

5. おわりに

β アミロイドカスケード仮説に基づき、 $A\beta$ アミロイドの形成機構や構造、アミロイド形成阻害剤などについて、おびただしい数の報告がなされてきた。しかし、これらの大部分は水中で形成された線維に関するものである。一方、われわれはガングリオシド結合型 $A\beta$ の AD 患者脳からの発見に基づき、³⁾ 生体膜中の脂質ラフトにおいて、ガングリオシドクラスターを介して $A\beta$ アミロイドの形成が起こるとの独自の理論を展開してきた (Fig. 6)。すなわち、健康な状態では、ガングリオシドはクラス

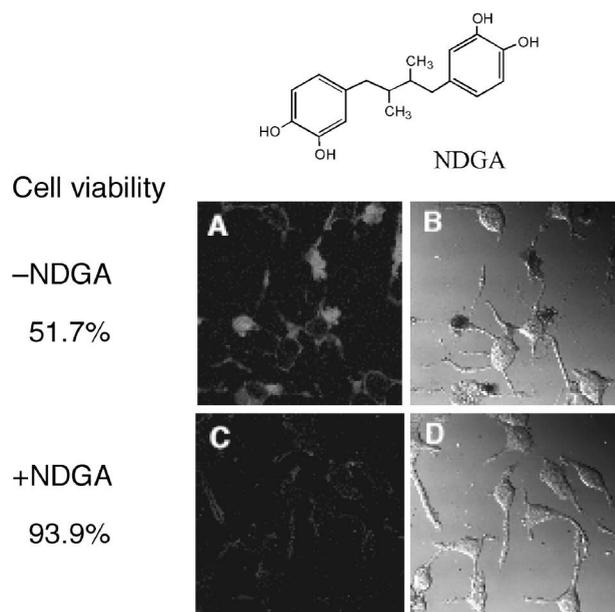


Fig. 5. Inhibitory Effect of Nordihydroguaiaretic Acid (NDGA) on Amyloidogenesis by $A\beta(1-42)$ ¹⁵⁾

PC12 cells differentiated with nerve growth factor were incubated with $10\ \mu\text{M}$ $A\beta(1-42)$ at 37°C for 24 h in the absence (A and B) or the presence (C and D) of equimolar NDGA. Amyloids were stained with Congo red (A and C). Corresponding differential interference images (B and D) are also shown.

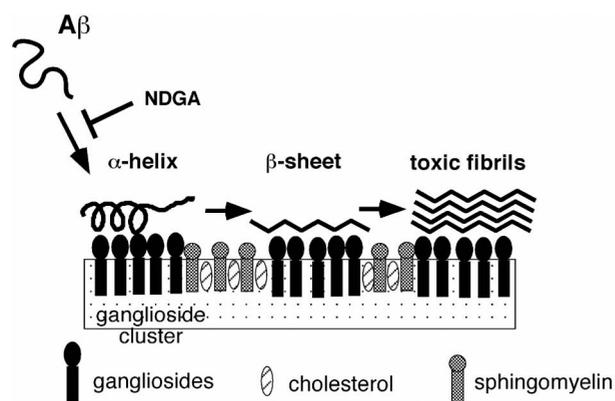


Fig. 6. Summary of $A\beta$ Aggregation Induced by Ganglioside Clusters

$A\beta$ is essentially soluble, and takes an unordered structure in solution. Once ganglioside clusters are generated, $A\beta$ binds to the clusters, forming an α -helix-rich structure at lower protein-to-ganglioside ratios, whereas the protein changed its conformation to a β -sheet at higher ratios. The β -sheet form facilitates the aggregation (fibrillization) of $A\beta$, leading to cytotoxicity. NDGA can effectively inhibit the fibrillogenesis by preventing the peptide from binding to the cluster through a direct $A\beta$ -NDGA interaction.

ターを形成しておらず、したがって $A\beta$ は膜と相互作用せず可溶性を保っている。一方、病的な状態ではガングリオシドはクラスターを形成し、これを認識して $A\beta$ が膜（恐らくシナプス膜）に結合する。最近、柳澤らは、late endocytic dysfunction によつ

てこのクラスター形成が起こると報告している。¹⁶⁾ 膜に結合した $A\beta$ は α ヘリックスから β シートへと構造変化し、アミロイド線維を形成する。このアミロイド線維は、水中で形成された線維とは構造的に異なり、細胞毒性を有する。脂質ラフトを介したアミロイド線維形成は、低分子化合物で阻害することができる。

以上のように、ADの発症には膜におけるペプチド-脂質間の複雑な物理化学的相互作用がかかわっていると推定される。この一連のカスケードをもとに、ADの有効な予防・治療法が開発されることを願ってやまない。

REFERENCES

- Selkoe D. J., *Physiol. Rev.*, **81**, 741-766 (2001).
- Haass C., Selkoe D. J., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 101-112 (2007).
- Yanagisawa K., Odaka A., Suzuki N., Ihara Y., *Nat. Med.*, **1**, 1062-1066 (1995).
- Rajendran L., Simons K., *J. Cell Sci.*, **118**, 1099-1102 (2005).
- Kakio A., Nishimoto S., Yanagisawa K., Kozutsumi Y., Matsuzaki K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 24985-24990 (2001).
- Kakio A., Nishimoto S., Yanagisawa K., Kozutsumi Y., Matsuzaki K., *Biochemistry*, **41**, 7385-7390 (2002).
- Ikeda K., Matsuzaki K., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **370**, 525-529 (2008).
- Okada T., Ikeda K., Wakabayashi M., Ogawa M., Matsuzaki K., *J. Mol. Biol.*, **382**, 1066-1074 (2008).
- Wakabayashi M., Okada T., Kozutsumi Y., Matsuzaki K., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 1019-1023 (2005).
- Wakabayashi M., Matsuzaki K., *J. Mol. Biol.*, **371**, 924-933 (2007).
- Wakabayashi M., Matsuzaki K., *FEBS Lett.*, **583**, 2854-2858 (2009).
- Petkova A. T., Leapman R. D., Guo Z., Yau W. M., Mattson M. P., Tycko R., *Science*, **307**, 262-265 (2005).
- Okada T., Wakabayashi M., Ikeda K., Matsuzaki K., *J. Mol. Biol.*, **371**, 481-489 (2007).
- Yamin G., Ono K., Inayathullah M., Teplow D. B., *Curr. Pharm. Des.*, **14**, 3231-3246

-
- (2008).
- 15) Matsuzaki K., Noguch T., Wakabayashi M., Ikeda K., Okada T., Ohashi Y., Hoshino M., Naiki H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 122–130 (2007).
- 16) Yuyama K., Yanagisawa K., *J. Neurochem.*, **109**, 1250–1260 (2009).