

氏名（本籍） ^{すず}鈴 ^き木 ^き紀 ^よ代 ^こ子

学位の種類 博士（薬学）

学位記番号 薬博第 326 号

学位授与年月日 平成 15 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 創薬化学専攻

学位論文題目

アミロイドβペプチドの分子間会合における金属イオンの配位様式
と役割

論文審査委員 (主査) 教授 竹内 英夫

教授 井戸 達雄

教授 根東 義則

論文内容要旨

アルツハイマー病 (AD) は、加齢に伴いアミロイド β (A β) (Fig. 1) が分子間会合し、不溶性のアミロイドとなることで引き起こされると考えられている。アミロイド形成の原因については不明な点が多いが、Zn(II), Cu(II)およびFe(III)がAD患者のアミロイドに高濃度で蓄積されていることなど、金属イオンがA β の分子間会合を引き起こす因子であることを示す知見は多い。本研究ではAD発症の分子メカニズムの解明を目的として、A β 凝集における金属イオンの役割を主に分光学的手法を用いて研究した。

1 10 20 30 40 42
DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA

Fig. 1 A β のアミノ酸配列

まず、凝集体形成に対するZn(II)濃度の効果を中性条件下で調べた。A β_{1-40} はZn(II)が2等量以上になると顕著に凝集した。Zn(II)-A β_{1-40} 複合体の凝集固体のラマンスペクトルから、ペプチドがアミロイドに特徴的な β シート構造をとること、およびヒスチジン (His) 側鎖が金属配位子であることが判った。Hisのイミダゾール側鎖はC β に近いN ϵ と遠いN δ の2個の窒素原子をもつが、C α =C β 伸縮振動の波数から、Zn(II)ではN δ 原子のみが配位子となることがわかった。A β_{1-40} は、タンパク質やペプチドの中で、金属配位子として利用されることが多いヒスチジンを3残基含み、これらは全てN末端に近い領域に存在する (Fig. 1)。その他の金属配位子となる可能性があるチロシン、グルタミン酸、アスパラギン酸などのアミノ酸残基もN末端側に集中している。そこで、アミロイド形成過程の中で、特に金属によるペプチド分子の会合過程の解明に焦点を絞るため、A β の主な金属配位部位と想定されるN末端側16残基に対応するペプチド (A β_{1-16}) を用いて、Zn(II)-A β 複合体のより詳しい構造解析を行った。

A β_{1-16} の場合も、Zn(II)による凝集は顕著であり、ラマンスペクトルの解析から、A β_{1-40} と同様にHisのN δ 原子が金属配位部位であることがわかった。次に、Zn(II)存在下における、A β_{1-16} の凝集能と金属配位部位のpH依存性を調べた。金属非存在下では、どのpHにおいてもA β_{1-16} の凝集は起こらなかった (Fig. 2)。しかし、Zn(II)が存在すると、A β_{1-16} はpH 5以下の比較的強い酸性条件下では凝集しないが、弱酸性からアルカリ性の広いpH範囲では顕著に凝集した (Fig. 2)。凝集が生じないpHでは、His側鎖の窒素原子がプロトン化され、Zn(II)-His(N δ)結合が形成されないことがラマンスペクトルにより確認された。一方、pH 5以上ではZn(II)-His(N δ)結合が安定に形成されるため、A β_{1-16} の凝集が促進されることがわかった。従って、Zn(II)による凝集の原因はZn(II)が異なるA β 分子のN δ 原子に同時に結合し、分子間架橋 [His(N δ)-Zn(II)-His(N δ)] を形成することによると考えられる (Fig. 3)。

Cu(II)の中性条件下におけるA β_{1-40} 凝集能はZn(II)と比較して非常に弱く、4等量のCu(II)が存在してもA β_{1-40} は凝集しなかった。可溶性Cu(II)-A β_{1-40} 複合体のラマンスペクトルから、HisのN δ 原子とペプチド主鎖のアミド基の窒素原子が配位子となっていることがわかった。他のペプチドにおいても、Cu(II)が同一分子内の脱プロトン化したアミド窒素とHis(N δ)を配位子とし、平面四角形型キレート形成する場合

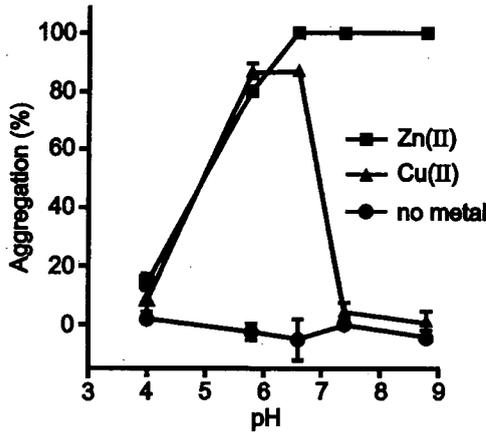


Fig. 2 Zn(II), Cu(II)のAβ₁₋₁₆に対する凝集能のpH依存性

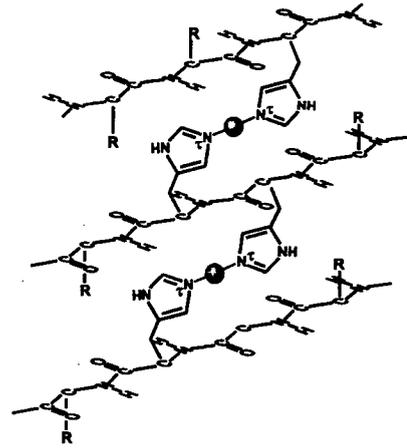


Fig. 3 不溶性金属-Aβ複合体の構造

があることが知られている。おそらく、可溶性Cu(II)-Aβ₁₋₄₀複合体もこれに類似する構造[His(N_x)/Amide(N)-Cu(II)キレート]を取っていると考えられる (Fig. 4)。

次に、Cu(II)存在下における、Aβ₁₋₁₆の凝集能と金属配位部位のpH依存性を調べた。Cu(II)はpH6付近の弱酸性条件ではAβ₁₋₁₆を顕著に凝集させた (Fig. 2)。ラマンスペクトルの解析から、凝集したCu(II)-Aβ₁₋₁₆複合体においては、可溶性複合体で形成されていたCu(II)とアミド窒素原子間の結合が消失し、Hisの金属結合部位がN_x原子からN_r原子に変化していることがわかった。このpH領域では、アミド基がプロトン化され、His側鎖のみがCu(II)に配位可能なため、Zn(II)の場合と同様に、Cu(II)が異なる分子のN_r原子に同時に結合し分子間架橋 [His(N_r)-Cu(II)-His(N_r)] を形成すると考えられる (Fig. 3)。これに対して、中性、アルカリ性条件下では、アミド窒素のCu(II)への配位により、Cu(II)-His(N_x)結合が分子間架橋に優先するため、Aβのアミロイド化が誘起されないと思われる。また、Amide Iバンドが低波数シフトすることから、可溶性Cu(II)-Aβ₁₋₁₆複合体ではペプチドのβシート含量が減っていることもわかった。

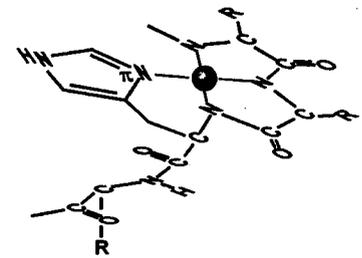


Fig. 4 可溶性Cu(II)-Aβ複合体の構造

Fe(III)もAβを顕著に凝集させた。Fe(III)により凝集したAβ₁₋₁₆のラマンスペクトルは、金属非存在下のAβ₁₋₁₆のラマンスペクトルと全く異なっている。凝集固体のラマンスペクトルの中で、フェノール酸素が脱プロトン化しFe(III)に配位したチロシネートのラマンバンドは非常に強く観測されるが、その他のラマンバンドはとても弱い。チロシネートバンドの強度増大は、π軌道(フェノレート)からd軌道(金属)への電荷移動遷移との共鳴効果による。従って、Fe(III)はHisではなく、チロシン残基 (Tyr10) のフェノール酸素に結合することによりAβ₁₋₁₆を凝集させることがわかった。Aβ₁₋₁₆に関しても同様の結果が得られた。

Zn(II)とCu(II)は、中性付近ではAβの凝集に対して異なる作用を示すが、共にAβのHisを主な配位子とする。そこで、Cu(II)がZn(II)によるAβ凝集を競合的に阻害する可能性についても検討を行った。一定量のZn(II)存在下におけるAβ₁₋₁₆凝集に対するCu(II)濃度依存性をFig. 5に示す。十分にAβ₁₋₁₆を凝集させ

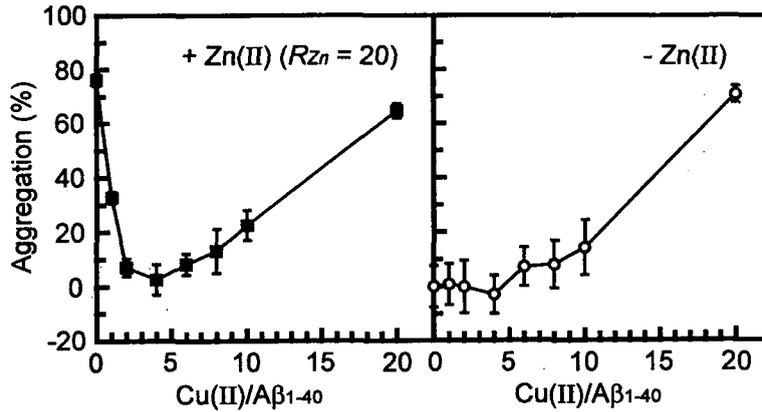


Fig. 5 Zn(II)が誘起するAβ₁₋₄₀分子間会合のCu(II)による阻害効果

る濃度のZn(II)が存在しても、Cu(II)が共存するとAβ₁₋₁₆の可溶性状態が保持されることが明らかとなった。Aβ₁₋₁₆においても、Cu(II)がZn(II)によるAβ凝集を阻害した。Zn(II), Cu(II)共存下の可溶性金属-Aβ₁₋₁₆複合体のラマンスペクトルから、HisのN_ε原子とペプチド主鎖のアミド基の窒素原子が金属配位部位となっていることがわかった。従って、Zn(II)存在下でさえもAβの高い溶解性が維持される理由は、この複合体が分子内でHis(N_ε)/Amide(N)-Cu(II)キレートを形成していることによると考えられる。Zn(II)よりも低い濃度で、Cu(II)のAβ凝集阻害効果が十分現れることは、His(N_ε)/Amide(N)-Cu(II)分子内キレートがHis(N_ε)-Zn(II)-His(N_ε)分子間架橋に優先して形成されることを示している。Cu(II)はヒスチジンに対してZn(II)よりも親和性が高く、さらにその周囲のアミド基の窒素原子にも結合しやすいために、His(N_ε)/Amide(N)-Cu(II)分子内キレートがHis(N_ε)-Zn(II)-His(N_ε)分子間架橋に優先して形成されると考えられる。また、ラマンスペクトルの解析から、Zn(II)がHis(N_ε)/Amide(N)-Cu(II)キレートを破壊せずにCu(II)-N_ε配位したHisのN_ε原子に結合することもわかった。

以上の結果から、金属の種類やpHによって、配位子や配位の様式が様々に変化することが判った。さらに、それらの配位様式がAβの凝集に異なる影響を及ぼすことも明らかとなった。即ち、生理的なpH環境下では、Zn(II)はHis(N_ε)を、Fe(III)はTyrのフェノール酸素を介する分子間架橋によりAβの会合を促進するが、Cu(II)はアミド基の窒素原子に配位することができるという特徴により、分子間会合の原因となるHis(N_ε)を介する架橋の形成を妨げる。しかし、炎症などにより脳内pHがわずかに酸性側に傾くと、Cu(II)はアミド基に結合できなくなり、Zn(II), Fe(III)と共にAβのアミロイド形成促進因子となると考えられる。以上、本研究により、ADの発症だけでなく、抑制の面においても金属イオンおよびその配位様式が重要な役割を演じている可能性が示された。

審査結果の要旨

アルツハイマー病は、アミロイド β ペプチド ($A\beta$) が分子間会合し、不溶性のアミロイドを形成することが一因で発症すると考えられている。 $A\beta$ のアミロイド形成機構については不明な点が多いが、 $Zn(II)$ 、 $Cu(II)$ 、 $Fe(III)$ などの金属イオンが $A\beta$ の分子間会合を引き起こす因子であることを示す知見も多い。本論文では、 $A\beta$ の金属配位様式と凝集量を種々の条件下で精査し、金属配位様式と凝集の間には密接な関連があることを明らかにした。

40アミノ酸残基からなる $A\beta_{1-40}$ および親水性残基が集中しているN末端側の16アミノ酸残基からなる $A\beta_{1-16}$ を用いて、 $Zn(II)$ への配位様式と凝集量との関係を調べた結果、弱酸性からアルカリ性の広いpH範囲で β シート構造をとり顕著に凝集すること、および、 $Zn(II)$ はHis側鎖の N_{τ} 原子に結合することを見出し、凝集の原因は $Zn(II)$ が異なる $A\beta$ 分子の N_{τ} 原子に同時に結合し、分子間架橋 [$His(N_{\tau})-Zn(II)-His(N_{\tau})$] を形成するためであるとのモデルを提唱した。

$Cu(II)$ は、中性条件下、 $A\beta$ を凝集させないこと、また、溶液中に存在する可溶性複合体中では、Hisの N_{τ} 原子とペプチド主鎖のアミド基の窒素原子が $Cu(II)$ に対する配位子となっていることを見出した。すなわち、個々の $A\beta$ 分子が $Cu(II)$ にキレート配位する場合には凝集が生じないことを明らかにした。一方、pH 6付近の弱酸性条件下では顕著な凝集が生じ、凝集体中では、 $Zn(II)$ の場合と同様に、His側鎖の N_{τ} 原子が $Cu(II)$ に対する配位子となっていた。すなわち、 $Cu(II)$ による凝集の場合も、金属イオンを介した分子間会合が凝集の原因であると推察した。

$Zn(II)$ と $Cu(II)$ は、中性付近では $A\beta$ の凝集に対して異なる作用を示すが、共にHisを主な配位子とする。そこで、 $Cu(II)$ が $Zn(II)$ による $A\beta$ 凝集を競合的に阻害する可能性について検討した結果、 $Zn(II)$ が存在しても、 $Cu(II)$ が共存すると $A\beta$ の可溶性状態が保持されることを明らかにした。

$Fe(III)$ も $A\beta$ を顕著に凝集させるが、その原因は、His側鎖ではなくTyr側鎖の $Fe(III)$ への配位によるものであることが示された。すなわち、 $Tyr(O^-)-Fe(III)-Tyr(O^-)$ 型の分子間架橋が凝集の原因であることを強く示唆する結果を得た。

以上のように、本論文では、 $A\beta$ の金属配位様式は、金属の種類やpHによって様々に変化すること、また、金属配位様式が $A\beta$ の凝集と密接な関連を有することを初めて明らかにした。本論文で得られた知見は、アルツハイマー病の予防と治療に関する基礎的研究成果として高く評価されるものである。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として合格と認める。