

- 8) Therapontos, C., Erskine, L., Gardner, E.R., Figg, W.D., & Vargesson, N. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 8573-8578.
- 9) Parman, T., Wiley, M.J., & Wells, P.G. (1999) *Nat. Med.*, 5, 582-585.
- 10) Knobloch, J., Shaughnessy, J.D., Jr., & Ruther, U. (2007) *FASEB. J.*, 21, 1410-1421.
- 11) Sakamoto, S., Kabe, Y., Hatakeyama, M., Yamaguchi, Y., & Handa, H. (2009) *Chem. Rec.*, 9, 66-85.
- 12) Higgins, J.J., Pucilowska, J., Lombardi, R.Q., & Rooney, J.P. (2004) *Neurology*, 63, 1927-1931.
- 13) Lee, J. & Zhou, P. (2007) *Mol. Cell.*, 26, 775-780.
- 14) Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M.P., Walker, J.R., & Hogenesch, J.B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 6062-6067.

伊藤 拓水, 半田 宏

(東京工業大学ソリューション研究機構)

Molecular mechanism of thalidomide teratogenicity
Takumi Ito and Hiroshi Handa (Solutions Research Laboratory, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuda-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan)

脂質膜存在下での膵島アミロイドポリペプチドのアミロイド線維形成と膜破壊

1. はじめに

アミロイド線維（医学用語として“繊維”ではなく“線維”を用いる）は、タンパク質の規則構造をもつ凝集体であり、生体内でのその沈着は、アルツハイマー病、透析アミロイドーシス、クロイツフェルトヤコブ病やウシ海綿状脳症（狂牛病）などのプリオン病、2型糖尿病などの様々な疾患（アミロイド病）と関わっている。アミロイド線維は、線維軸に垂直に並んだβストランドが積み重なって形成されるクロスβシートと呼ばれる特異的な規則構造をとる¹⁾。現在アミロイド線維が形成される詳細な分子機

構は解明されていない。どのようにタンパク質がアミロイド線維を形成し、疾病を引き起こすのか？ 本稿では、2型糖尿病患者に見られるアミロイド線維を例にとり、モデル脂質膜存在下でのその形成過程と膜破壊について解説する。

2. 2型糖尿病とIAPPアミロイド線維

2型糖尿病患者のインスリンを分泌する膵β細胞の近傍に不溶性の沈着物が形成されることが、100年以上前の1900年頃から知られていた。この沈着物の主要成分が37残基のペプチドから形成されたアミロイドであると明らかになったのは1987年で、WestermarckとCooperのグループがそれぞれ独立に行った研究による²⁾。このペプチドは、膵島アミロイドポリペプチド (islet amyloid polypeptide) と呼ばれ、IAPP、または amylin と簡略化される（本稿ではIAPPを用いる）。IAPPは、インスリンと同様にβ細胞内で産生され、同じ応答でインスリンと共に分泌される。IAPPは、様々なプロセス（糖質代謝、インスリン分泌の調節、骨吸収の阻害、胃内容排出の抑制など）に関与していると報告されているが、その生理的役割は解明されていない²⁾。現在、50～90%以上の2型糖尿病患者のβ細胞近傍に、何らかの原因でIAPPのアミロイド線維が形成されると報告されている^{2,3)}。

3. IAPPのアミロイド線維形成

IAPPは、ヒト以外の哺乳類においてもインスリンと共にβ細胞から分泌される。図1に代表的な哺乳類のIAPPのアミノ酸配列を示す³⁾。ヒト、サル、ネコ、イヌのIAPPは、試験管内アミロイド線維を形成する。また、ヒト、サル、ネコは、加齢や肥満によって2型糖尿病を発症する（イヌは1型糖尿病を発症しやすい）。一方、ネズミ（ラットやマウス）などのゲッ歯類は、自然界において2型糖尿病の発症は見られず、これらのIAPPは、通常試験管内でアミロイド線維形成反応を起こさない。IAPPのアミロイド線維形成と糖尿病発症との詳細な因果関係は不明である

	1	10	20	30	37
ヒト	K	CNTATCATQ	RLANFLVH	SSNFGAIL	SSSTNVGSNTY
サル			R.....	T.....	D.....
ネコ			I R.....	L.....	P.....
イヌ			R T.....	L.....	P.....
ネズミ			R.....	L.....	PV.PP.....

図1 代表的な哺乳類のIAPPのアミノ酸配列

2残基と7残基目のシステインがジスルフィド結合で結ばれ、C末端はアミド化されている。示された哺乳類間でアミノ酸配列はかなり保存されているが、残基18～29間に大きな配列の違いがある。

が、ヒト IAPP がアミロイド凝集体（線維やその形成前のオリゴマーを含む，図 2A-1 参照）を形成することで β 細胞の細胞死が引き起こされ，このことが 2 型糖尿病の進行に関与していることが多くの実験結果から示唆されている^{2,3)}。

通常 *in vitro* 実験において，有機溶媒（ジメチルスルホキシドまたはヘキサフルオロイソプロパノール）に凍結乾燥したヒト IAPP を溶かし，さらに水で希釈した状態をペプチドのモノマー状態として使用している．ヒト IAPP のアミロイド線維形成能は高く，この水希釈状態に塩溶液（例えば 100～150 mM NaCl を含む生理的バッファー）を加えると，数時間のうちに自発的にアミロイド線維を形成する⁴⁾．37 残基のうち，特に 20 から 29 残基がアミロイド凝集核を形成しやすい領域であると報告されている²⁾．ヒト IAPP のアミノ酸配列と比べて，ネズミ（ラットあるいは

マウス）のものには，25，28，29 残基のアミノ酸がプロリンとなっている大きな違いがある（図 1）．これら三つのプロリンがクロス β シート形成を阻害するため，アミロイド線維形成が起こりにくいと説明されている²⁾．

水溶液中でモノマー状態にあるヒト IAPP は，主にランダムコイル状態で存在すると考えられている．また，N 末端側は，塩基性をもつアミノ酸（K1，R11）を含むため，ペプチドは中性条件下でプラス電荷を帯びている．この条件下で塩（100～150 mM NaCl）を含む生理的バッファーを加えると，ヒト IAPP は，自発的に凝集体を形成し，オリゴマー状態を経て，アミロイド線維形成へと進む（図 2A-1）．一方，生体系の多くの病気に見られるアミロイド沈着物には，細胞脂質膜（特にラフト成分）が取り込まれていると報告されている⁵⁾．これは，生体系においては，脂質膜がアミロイド線維形成に重要な役割を果たしている

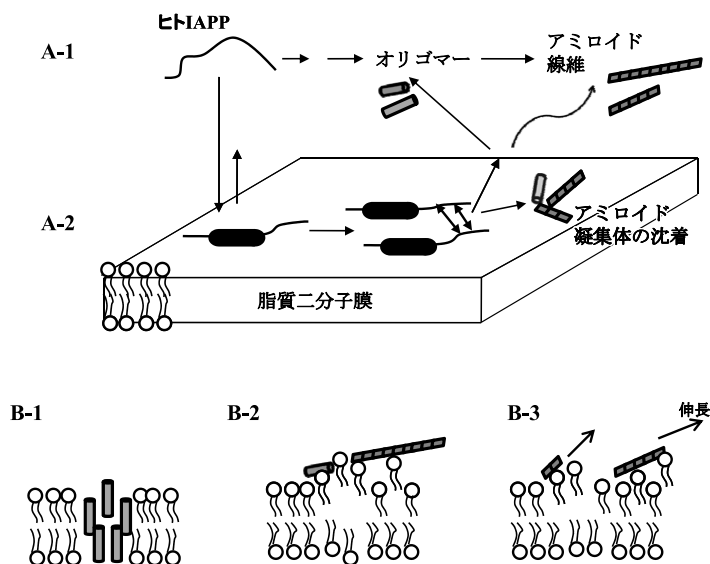


図 2

(A) 溶液中 (A-1) と脂質膜存在下 (A-2) でのヒト IAPP のアミロイド線維形成．(A-1) モノマー状態にあるペプチドが凝集しオリゴマーを形成，成熟したアミロイド線維となる．(A-2) ペプチドは膜に吸着し，膜内でヘリックス構造を形成する（残基 9～22，黒の円筒として表示）．残基 23 から 29 の領域は，膜上で伸びた状態にあり，この領域からアミロイド核が形成され（ $\leftrightarrow$ で表示），オリゴマー，線維へと伸長する（文献 2，6 参照）．形成されたオリゴマー，線維は，脂質膜から離れる，あるいは膜上または膜近傍で沈着すると考えられる．(B) ヒト IAPP による脂質膜破壊機構．(B-1) チャネル状の孔形成．オリゴマー状態にあるペプチドがサブユニットを形成し，これがいくつか集合して膜に孔を形成する．(B-2) 界面活性剤様の膜破壊．オリゴマー状態あるいは線維状態にあるアミロイドが，界面活性剤様の作用で膜構造を破壊する．(B-3) アミロイド線維伸長による膜破壊．脂質膜上に吸着したモノマーが核形成後，線維伸長する．このとき膜成分が伸長する線維に取り込まれる．

ことを示すものである。では、生体系において脂質膜はアミロイド線維形成にどのような役割を果たしているか？

Langen らは^{2,6)}、脂質ベシクル存在下でヒト IAPP のアミロイド線維形成を研究した (図 2A-2)。彼らのモデルによると、脂質膜が存在する場合、ヒト IAPP は、主に静電的相互作用によって、膜 (特に負電荷をもつ膜) へ結合し、次に、ペプチドの 9~22 残基が、膜内で α ヘリックス構造を形成する。このときアミロイド凝集核を形成しやすい 23~29 残基は、構造化されていない伸びた状態をとる。ペプチドの脂質膜上での固定化、局所濃度の増加、低誘電環境などの効果によって、23~29 残基を含む領域からアミロイド核が形成され、これがトリガーとなってオリゴマー構造そしてアミロイド線維形成へと進むと考えられている (図 2A-2)。ラット IAPP も同様に膜存在下で α ヘリックス構造をとるが、三つのプロリン残基を含むため、ヒト IAPP のようなアミロイド線維形成は起こらない。in vitro の研究において、ヒト IAPP のアミロイド線維形成は、脂質膜存在下で促進されると一般に報告されているが、これはペプチドの膜への結合によってアミロイド核形成が起こりやすくなるためと考えられている。

4. ヒト IAPP の細胞毒性と脂質膜破壊機構

in vitro の実験において、ヒト IAPP はアミロイド凝集体を形成することで β 細胞に対して毒性を示す⁷⁾。また、ヒト IAPP を発現する遺伝子組換えラット (transgenic rat) は、糖尿病の兆候 (高血糖症) を示しやすいと報告されている^{3,8)}。この兆候は、ラット体内でヒトのアミノ酸配列をもつ IAPP がアミロイド凝集体を形成することによって、 β 細胞死 (細胞数の減少) を引き起こし、その結果、十分なインシュリンの分泌が起こらなくなるのが主な理由と考えられている。多くの実験結果では、成熟したアミロイド線維よりも線維形成途中にあるオリゴマー状態がより強い細胞毒性を示す⁹⁾。アルツハイマー病関連のアミロイド β ペプチドについても、オリゴマー状態の強い細胞毒性が報告されている。最近、このオリゴマー状態に特異的なコンフォメーションを認識する抗体が作られた¹⁰⁾。この抗体は、IAPP やアミロイド β ペプチドを含め、他の多くのアミロイド性タンパク質から形成された細胞毒性を示すオリゴマー状態に対しても特異的な認識を示す。この結果は、これらのアミロイド性オリゴマー状態が共通の構造的特徴をもち、更に共通の細胞毒性機構が存在することを示唆する。

図 2A-2 で示されたように脂質膜の存在は、ヒト IAPP

のアミロイド核、オリゴマー形成を促進する。脂質膜は毒性を獲得したアミロイド性オリゴマーの標的となり、膜構造が破壊される²⁾。どのように脂質膜が破壊されるのか？ヒト IAPP による脂質膜破壊作用に関して、主に三つの機構が提案されている (図 2B)。一つめの機構は、脂質膜にチャンネル状の孔を形成するもので、その結果 Na, K, Ca, Cl イオン透過の選択性を著しく低下させる (図 2B-1)。Lansbury らは¹¹⁾、イオンの膜透過性がアミロイド線維形成の初期で増加し、成熟した線維が形成され始めると透過性が減少することから、チャンネル状の孔は、線維形成前のオリゴマー状態によって形成されると結論した。ヒト IAPP のこのオリゴマー状態の正確な構造は明らかではないが、光散乱測定の結果は、20 から 40 のモノマーから形成されることを示唆する。Quist らの原子間力顕微鏡による観察は、オリゴマー構造が一つのサブユニットを形成し、チャンネル状の孔は五つのサブユニットから構成されていることを示唆する (図 2B-1)¹²⁾。

二つめの機構として、界面活性剤様の膜破壊作用が Green らによって報告されている¹³⁾。彼らは、ヒト IAPP アミロイド凝集体が脂質二分子膜上にチャンネル状の孔ではなく欠陥を形成し、この欠陥が脂質膜表面上を広がっていく現象を見出した。Triton X-100 のような界面活性剤による膜破壊と類似の機構で二分子膜から脂質が消失されると考えている (図 2B-2)。

三つめの機構として、伸長するアミロイド線維への脂質膜成分の取り込みがあげられる (図 2B-3)。最近 Engel らは¹⁴⁾、脂質ベシクル上でヒト IAPP アミロイド線維伸長を観察し、伸長する線維によってベシクルの曲率に変化する、あるいは、脂質成分の一部が線維構造内に取り込まれ、膜構造が破壊される現象を報告した。生体内で形成されるアミロイド沈着物には、脂質膜成分が取り込まれているので、アミロイド形成時での脂質の取り込みは、生体系におけるアミロイド形成に共通の特徴のようである⁵⁾。

以上、in vitro 系でのヒト IAPP による三つの脂質膜破壊機構を述べたが、これらの機構は、実験条件の違い (脂質組成、バッファー種、IAPP の調製方法など) によって、試験管内で起こりうるようである^{2,11,13,14)}。このことは、ヒト IAPP の凝集体は、溶液条件によってオリゴマーから線維状態へとその凝集体の形やサイズを変え、脂質膜と多様な相互作用を示すことを示す。

5. IAPP アミロイド線維と脂質ベシクルとの会合反応

多くの実験結果は、アミロイド形成初期の段階にあるオ

リグマー状態が最も強い細胞毒性を有し、これに対して成熟したアミロイド線維は比較的不活性であることを示す⁹⁾。成熟した凝集体であるアミロイド線維と比べて、線維形成途中のオリグマー状態は、膜と相互作用する表面積が大きく、また、凝集体の構造そのものが剛直ではないため (flexible)、より強い細胞膜との親和性を示し、結果として成熟した線維より強い細胞毒性を発揮すると考えられる。

成熟したアミロイド線維の脂質膜に対する親和性はどの程度であろうか？ 最近、著者らは、溶液の濁度測定から IAPP アミロイド線維と脂質ベシクルが会合反応を起こすことを見出した¹⁵⁾。図 3A は、一定濃度のホスファチジルコリン (PC) ベシクル溶液 (3 mg/ml) に、濃度の異なる IAPP アミロイド線維溶液 (0 から 30 $\mu\text{g/ml}$) を混合させ、濁度変化の時間依存性を測定した結果である。アミロイド線維の濃度に比例して溶液濁度が上昇することがわかる (図 3B)。剛体モデルを用い会合反応をシミュレーションした結果、アミロイド線維の周りに PC ベシクルが結合し、会合体を形成することで実験データが説明されることがわかった (図 3C)。PC 成分にスフィンゴミエリンや負電荷をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセ

ロールを混ぜて同様の実験を行ったところ、脂質成分に応じて会合速度が変化し、特に負電荷をもつホスファチジルセリンを含むと会合が促進されることがわかった¹⁵⁾。図 3 は、PC 成分の脂質膜とヒト IAPP アミロイド線維の間には会合を引き起こす十分な親和性があることを明確に示す結果である。生体系において 2 型糖尿病患者の β 細胞は、形成されたアミロイド線維に配向しゆがんだ形状をとるという報告もある。このことはアミロイド線維と脂質二分子膜の間に会合体を促進する相互作用があることを示唆するもので、図 3 の結果はそれを支持するものである。図 3 で示された会合体を促進する相互作用が、アミロイド凝集体による細胞毒性とどのように関連しているかは、今後の研究課題である。

6. お わ り に

モデル脂質膜存在下でのヒト IAPP のアミロイド線維形成と脂質膜破壊について簡単に紹介した。図 2B で示されたように、ヒト IAPP アミロイド凝集体と脂質膜との相互作用は、実験条件の違いなどによって多様な側面を示す。また、図 3 で示されたようにアミロイド線維と PC ベシクルの間には会合反応が起こり、会合後の膜物性 (流動性な

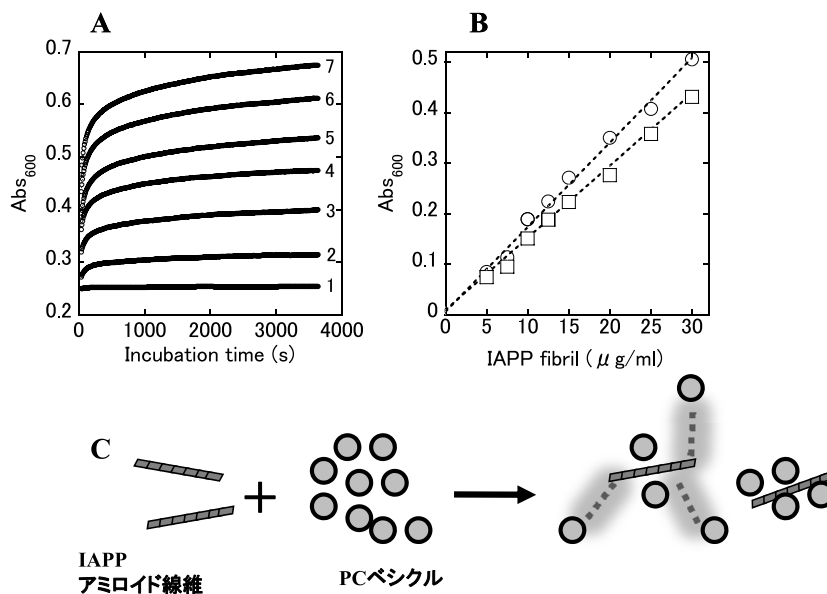


図 3 ヒト IAPP アミロイド線維と PC ベシクルの会合反応 (25 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.2)

(A) PC ベシクル (直径 100 nm, 3 mg/ml) に濃度の異なるアミロイド線維を混合し、溶液の濁度変化 (600 nm での吸光度) を時間の関数として測定した。線維濃度 ($\mu\text{g/ml}$) は、1:0, 2:5, 3:10, 4:15, 5:20, 6:25, 7:30。(B) アミロイド線維濃度に対する 1 時間後 (□) と 24 時間後 (○) の溶液の濁度 (PC ベシクル単独での濁度が差し引かれている)。 (C) 会合反応の模式図。PC ベシクルがアミロイド線維に結合することで溶液全体の濁度が上昇する。

ど), ベシクルの形態変化や破壊などに関する研究例は限られている。したがって, モデル膜を用いた研究例だけをみても, ヒト IAPP のアミロイド凝集体と脂質膜との相互作用に関して, 実験条件に依存する面や, 未解明な領域があり, その全体像を十分に説明できるモデル構築には至っていないというのが現状であると思う。アミロイド凝集そのものが過渡的に形成され, その形やサイズが実験条件の違いにより大きく変わることや, アミロイド凝集の構造情報を高解像度で得ることが困難であることがその理由としてあげられる。また, 先に記述したように多くのアミロイド形成ペプチドの細胞毒性に関して, 共通の毒性機構が示唆されている¹⁰⁾。これについても, 脂質膜との相互作用という観点から, アミロイドという凝集体の本質は理解されていない。

最後に, 高齢化社会が急速に進んでいる日本の2型糖尿病患者数は, 約230万人と報告されている(2009年, 厚生労働省発表)。2型糖尿病は, 遺伝的要因も含まれるが, 食べ過ぎ, 運動不足, 肥満といった生活習慣が原因の糖尿病とされている。β細胞からインスリンと共に分泌されるIAPPが不溶性のアミロイドになると, β細胞そのものが減少してしまう。暴飲暴食をさけ, 適度な運動を心がけたいものである。

謝辞

剛体モデルを用いたシミュレーションでは, 筑波大学人間総合科学研究科 D Hall 先生に深謝いたします。

- 1) 李 映昊, 小澤大作, 後藤祐児 (2009) 生化学, 81, 677-687.
- 2) Jayasinghe, S.A. & Langen, R. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 2002-2009.
- 3) Höppener, J.W.M. & Lips, C.J.M. (2006) *Int. J. Biochem. Cell Biology*, 38, 726-736.
- 4) Larson, J.L. & Miranker, A.D. (2004) *J. Mol. Biol.*, 335, 221-231.
- 5) Gellermann, G.P., Appel, T.R., Tannert, A., Radestock, A., Hortschansky, P., Schroeckh, V., Leisner, C., Lütkepohl, T., Shtrasburg, S., Röcken, C., Pras, M., Linke, R.P., Diekmann, S., & Fändrich, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 6297-6302.
- 6) Apostolidou, M., Jayasinghe, S.A., & Langen, R. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 17205-17210.
- 7) Lorenzo, A., Razzaboni, B., Weir, G.C., & Yankner, B.A. (1994) *Nature*, 368, 756-760.
- 8) Gurlo, T., Ryazantsev, S., Huang, C.-j., Yeh, M.W., Reber, H. A., Hines, O.J., O'Brien, T.D., Glabe, C.G., & Butler, P.C. (2010) *Am. J. Pathol.*, 176, 861-869.
- 9) Haataja, L., Gurlo, T., Huang C.J., & Butler, P.C. (2008) *En-*

docr. Rev., 29, 303-316.

- 10) Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., & Glabe, C.G. (2003) *Science*, 300, 486-489.
- 11) Anguiano, M., Nowak, R.J., & Lansbury, Jr. P.T. (2002) *Biochemistry*, 41, 11338-11343.
- 12) Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J., & Lal, R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 10427-10432.
- 13) Green, J.D., Kreplak, L., Goldsby, C., Blatter, X.L., Stolz, M., Cooper, G.S., Seelig, A., Kistler, J., & Aepli, U. (2004) *J. Mol. Biol.*, 342, 877-887.
- 14) Engel, M.F.M., Khemtouri, L., Kleijer, C.C., Meeldijk, H. J.D., Jacobs, J., Verkleij, A.J., de Kruijff, B., Killian, J.A., & Höppener, J.W.M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105, 6033-6038.
- 15) Sasahara, K., Hall, D., & Hamada, D. (2010) *Biochemistry*, 49, 3040-3048.

笹原 健二

(神戸大学大学院医学研究科構造生物学分野)

Amyloid fibril formation of islet amyloid polypeptide in the presence of lipid membrane and membrane disruption

Kenji Sasahara (Division of Structural Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan)

投稿受付: 平成22年7月29日

オートファジーによるミトコンドリア分解機構

はじめに

ミトコンドリアは, 酸化的リン酸化によるエネルギー産生のほか, 脂肪酸β酸化やアポトーシスの制御など, 細胞にとって重要な役割を果たしている。一方, ミトコンドリアは細胞内で最大の活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) 産生器官でもあることから, 自身が産生した ROS により絶えず酸化ストレスに暴露されている。ミトコンドリア内では抗酸化酵素により ROS の影響を軽減し, また傷害を受けたミトコンドリア DNA やタンパク質を修復・分解することで品質管理を行っている。こうした品質維持能力を上回る傷害をミトコンドリアが受けた場合, 細胞はオートファジーを利用して機能不全に陥ったミトコンドリアをまるごと分解していると考えられている。若年性パーキンソン病の原因遺伝子である *PARK2* と *PINK1/PARK6*