

アルツハイマー病における $A\beta_{1-42}$ の Immunoassay による検出法の研究

日大生産工 (院) ○清水 武則
日大生産工 神野 英毅

【緒言】

現在、わが国の 65 歳以上の老年人口が全人口に占める割合は 16 % であるが、西暦 2050 年には先進国の中では、イタリアとともに 30 % を超えると見込まれている。このように平均寿命が延びたことによる痴呆症患者の増加が懸念され始めている。「痴呆性老人」は厚生省の調査によると、1990 年で約 100 万人、2002 年で 150 万人となっており、2050 年には、400 万人を超える可能性があると予測されている。このようにわが国では、高齢化社会による様々な問題が生じつつあり、今後国家単位での対策が必要とされるであろう¹⁾。

Alzheimer disease (AD) の主要な病理変化は老人斑と神経原線維変化である。老人斑は、発症の早期から認められ、その主要構成成分は Amyloid beta protein ($A\beta$)₁₋₄₂ である。 $A\beta_{1-42}$ は、 $A\beta$ タンパク前駆体から β および γ セクレターゼが働くことにより脳内で生成され、42 のペプチドが会合したタンパクであり、毒性を惹起することが知られている。このタンパクが蓄積することにより脳内の神経細胞が破壊され、AD が発症すると考えられている。AD 患者における $A\beta_{1-42}$ の構造は、毒性の低い線維状のものが集めた凝集体であると考えられている。本研究では、血液中の凝集体 $A\beta_{1-42}$ を Immunoassay を用いて検出することを目的とする。今回は、その前段階として凝集 $A\beta_{1-42}$ を作製し、凝集状態の検討を行った。

【実験方法】

1. 凝集体 $A\beta_{1-42}$ の作製²⁾

使用した $A\beta_{1-42}$ は、ペプチドを修飾することにより合成した。2.0 mg/ml ~ 2 ng/ml の $A\beta_{1-42}$ 溶液 250 μ l を調製し、4°C で 30 分間インキュベートした。その後、それぞれの溶液を 2 倍希釈して 1.0 mg/ml ~ 1 ng/ml に調製し、反応促進性を持つ $A\beta_{16-20}$ をそれぞれ 10 モル過剰加え、約 9 時間攪拌させた (4 °C)。また、 $A\beta_{16-20}$ と $A\beta_{1-42}$ の反応性を調べるため、 $A\beta_{16-20}$ を加えずに同様の実験を行った。凝集後の分子量を確認するため、アクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動を用いて測定を行った。

2. チオフラビン T アッセイ³⁾

$A\beta_{1-42}$ に対する $A\beta_{16-20}$ の関係性を調べるために、チオフラビン T を用いて蛍光強度による線維状の評価を行った。まず、実験 1 と同様に 10 モル過剰の $A\beta_{16-20}$ を加えた $A\beta_{1-42}$ 溶液を調製し、濃度を 0.9 mg/ml ~ 1 pg/ml とした。次に、 $A\beta_{16-20}$ の働きを調べるため、 $A\beta_{16-20}$ を加えない溶液も作製し、同様の濃度で調整を行った。

チオフラビン T の終濃度を 10 μ M とし、マイクロプレートリーダーで測定を行った (37°C、12 hour)。測定は 20 min 毎に行い、励起波長 444 nm、吸収波長 485 nm の条件で行った。

【結果および考察】

1. アクリルアミドゲル電気泳動

実験 1 で作製した 1 mg/ml の凝集 $A\beta_{1-42}$ の分子量をアクリルアミドゲル電気泳動により測定した。その結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1 より 18 kDa 付近と 6.5 kDa 以下の 2 箇所バンドが出ていることが確認できる。単量体 $A\beta_{1-42}$ の分子量が約 4500 Da であることから 18 kDa 付近のバンド

Study on Method for Detecting $A\beta_{1-42}$ by Immunoassay in Alzheimer Disease

Takenori SHIMIZU and Hideki KOHNO

が凝集した $A\beta_{1-42}$ であることが考えられる。また、6.5 kDa 以下に出ているものは未反応の $A\beta_{1-42}$ であり、単量体が残ってしまったものであることが考えられる。

2. チオフラビン T アッセイによる凝集状態の観察

$A\beta_{1-42}$ の線維状とオリゴマーの比較検討を行うためにチオフラビン T アッセイにより蛍光度変化を観察した。凝集反応開始時に $A\beta_{16-20}$ を添加しない場合と添加した場合のそれぞれの蛍光度変化をマイクロプレートリーダーを用いて観察した。その結果を Fig.2、Fig.3 にそれぞれ示す。Fig.2 の $A\beta_{16-20}$ を添加しない場合では、90 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で蛍光度の上昇が見られた。これは、線維状で凝集が行われていることを示している。これに対し、10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではほとんど蛍光度が変化していないことがわかる。したがって、10 $\mu\text{g/ml}$ ~90 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で線維状の伸長反応が行われることが考えられる。

一方、 $A\beta_{16-20}$ を添加した場合には、すべての濃度において時間経過とともに蛍光度が低下していることが確認できる。これは、 $A\beta_{1-42}$ の構造変化が $A\beta_{16-20}$ によって行われたことを示しており、オリゴマー状の凝集体を形成していることが考えられる。

【結論】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびチオフラビン T アッセイの結果から、 $A\beta_{16-20}$ を添加することによりオリゴマー状態の凝集体が作製されたということが考えられる。また、 $A\beta_{16-20}$ を加えない場合でも、ある濃度以上になってしまうと線維状の伸長反応が見られ、自己凝集が起こってしまうということが明らかとなった。今後、毒性との関連を評価しつつ、さらに、凝集 $A\beta_{1-42}$ の分離、精製を行い、抗体作製へと進める予定である。

【参考文献】

1) 涌谷 陽介ら, アルツハイマー病の疫学, 脳の科学, 21-26 (2000)

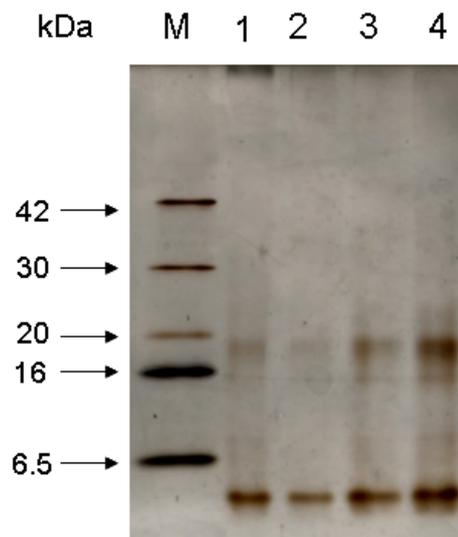


Fig. 1 $A\beta_{1-42}$ 凝集後の SDS-PAGE 結果

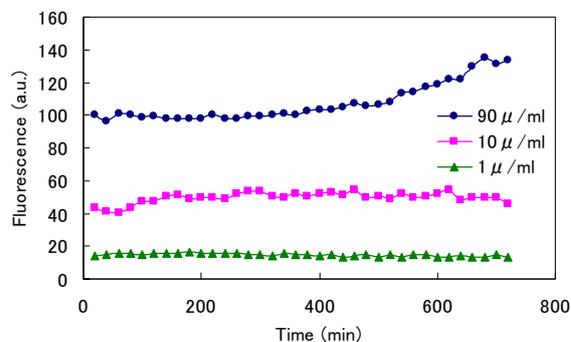


Fig. 2 ThT アッセイにおける $A\beta_{1-42}$ 蛍光度変化 ($A\beta_{16-20}$ 添加)

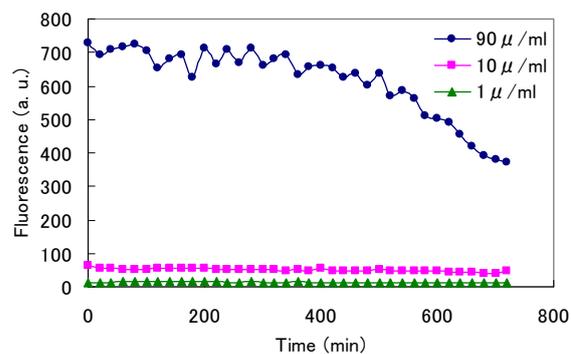


Fig. 3 ThT アッセイにおける $A\beta_{1-42}$ の蛍光度変化 ($A\beta_{16-20}$ 無添加)

2) Minako Hoshi, et al. *PNAS*. 100, 6370-6375 (2002)

3) Yuji Yoshiike, et al. *J. Biol. Chem.* 278, 23648-23655 (2003)