

生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

アルツハイマー病における β -Amyloid タンパク ($A\beta$) の凝集体の作製

日大生産工 神野 英毅

本研究は、第一グループの生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループの 1-1. 生命体の構成における重要プロセスである DNA-RNA 情報による発現タンパク質の健常時あるいは疾患時の差の究明を目的とした研究である。平成 19 年度までは、アルツハイマー病因子 ApoE4 の検出を目的とし、DNA の定量方法の検討を行った。平成 20 年度は、アルツハイマー病における Amyloid beta protein₁₋₄₂ をターゲットとし、その定量を行うため検出方法の検討を行った。本年度は、昨年度のデータより使用した抗体の力値の問題が考えられたため、あらたに抗体の作製を目的とし $A\beta$ の凝集体の作製とその確認を行ったので報告する。

1. 緒言

日本は、男女の平均年齢が 82.1 歳という世界的な長寿先進国であり、科学および医療の進歩から今後もこの数字が伸びることは必至である。しかし、平均寿命の増加に比例して痴呆病患者(アルツハイマー病も含む)も年々増加しているため、早急に解決すべき問題となっている。このようなアルツハイマー病の顕著な特徴としては、神経細胞の脱落、 β -Amyloid Protein ($A\beta$) の凝集、沈着による老人斑、 τ Protein (タウタンパク) の過剰リン酸化による神経原線維変化の 3 つが挙げられる。これらの特徴は $A\beta$ の沈着、神経細胞の脱落、神経原線維変化の順で現れることから、最近では $A\beta$ を主原因としたアミロイドカスケード説に基づいて様々な研究が進められている。この説は、Amyloid Precursor Protein から β -および γ -セクレターゼによって切り出された $A\beta$ が、凝集し、脳内に沈着することで脳表面への老人斑が現れ、神経細胞

が死滅するというものである¹⁾。現在、日本においてアルツハイマー病に使用されている薬剤は Aricept (塩酸ドネペジル) のみであり、治験中のものは、Memantin (塩酸メマンチン) などが 4 種類存在する。しかし、これらの治療薬は、 $A\beta$ 產生に直接的なものではなく①Aricept を代表とする $A\beta$ に関係せず認知を改善するもの ② γ -セクレターゼの產生を抑制し、 $A\beta$ の產生を阻害するセクレターゼ阻害剤 ③抗体を投与し、自己免疫によって $A\beta$ を除去するワクチンの 3 種類に大別される。①②においては根本的な改善に結びつかず、副作用も多いことから③のワクチン治療が最も人体に負担が少なく、根本的な治療に適していると考えられるが、進行を遅らせることしか出来ていない。この現状において、アルツハイマー病の早期発見は治療における重要な要素の一つである。しかし、診断においても大掛かりな検査を行う必要や苦痛を伴うなど問題がある。これらのことから、治療薬および臨床診断薬として応用が可能な、凝集 $A\beta$ のみに反応するモノクロナール抗体の作製を目指し、毒性の有する $A\beta$ の凝集体の作製を検討した。

2. 実験方法

2-1. 凝集 $A\beta_{1-42}$ の作製

マイクロチューブに $A\beta_{1-42}$ を 500 μg 入れ、超純水を 250 μl 加えて 30 分間 4°C で静置した。その後ダルベッコ PBS を 250 μl 加え、さらに反応促進性があるとされている $A\beta_{16-20}$ を 10 mol 過剰 (724 μg) 加え、24 時間様々な温度 (-80, -20, 4, 37°C) で静置した ($A\beta_{(1-42+16-20)}$)。また、並行して、 $A\beta_{16-20}$ を加えず同様の操作を行ったもの調製した ($A\beta_{(1-42)}$)。

2-2. 分子量測定

Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)、キャビラリー電気泳動 (PA-800, Beckman coulter)、解析用超遠心分析 (ProteomeLab XL-1, Beckman coulter) を用いて作製した凝集 A β を分子量の解析を行った。

2-3. 形状変化の確認

分子間力顕微鏡 (JSPM-5200, JEOL) と Thioflavin T (ThT) を用いた蛍光強度変化による A β タンパクの形状変化の確認を行った。

2-4. 凝集 A β の切り出し精製

凝集 A β を SDS-PAGE にて分離後、ゲルを前処理液 (メタノール:超純水=1:9) にて 5 分間振とうした。超純水で 30 秒間振とうし、洗浄した後、染色液 (イミダゾールおよび SDS 10 ml、超純水 50 ml) 60 ml にて 10-20 分間振とうし、その後超純水で洗浄をした。発色液 (硫酸亜鉛 10 ml、超純水 50 ml) 60 ml にて 1-3 分間振とう、超純水で 2 分間振とうし、洗浄した。超純水を再度 100 ml 加えて 5 分間振とうし、洗浄した。ナイフを用いてゲルから目的のバンドを切り出し、切り出したゲル片を 1.5 ml マイクロチューブに入れ、泳動用緩衝液を 500 μ l 添加して 10 分間振とうし、洗浄した。この洗浄をもう一度繰り返した後、新たに泳動用緩衝液を 100 μ l 加え、円錐棒を用いてゲルをスラリー化した。また、円錐棒を泳動用緩衝液 100 μ l で洗い落とし、1 時間振とうした。次に、スラリーを限外ろ過法にて 13,200 rpm、10 分間遠心ろ過し、目的タンパク質成分を精製した。

3. 結果および考察

3-1. 分子量確認

3-1-1. SDS-PAGE による分子量確認

SDS-PAGE による分子量測定の結果を Fig. 1 に示す。Lane 1-4 が A β ₍₁₋₄₂₎、Lane 5-8 が A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎サンプルである。Lane 1-4 において各温度で調整されたサンプルを比較す

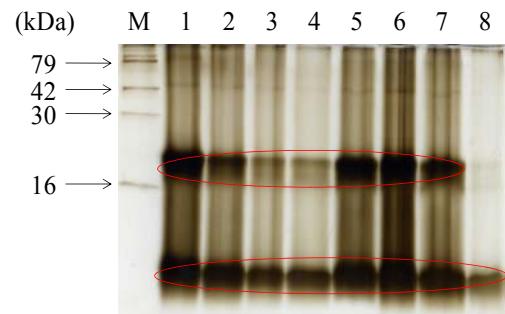


Fig. 1 Analysis of A β by SDS-PAGE

Lane M is molecule weight marker, Lane 1 is A β ₍₁₋₄₂₎ (4°C), Lane 2 is A β ₍₁₋₄₂₎ (-20°C), Lane 3 is A β ₍₁₋₄₂₎ (37°C), Lane 4 is A β ₍₁₋₄₂₎ (-80°C), Lane 5 is A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ (4°C), Lane 6 is A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ (-20°C), Lane 7 is A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ (37°C), Lane 8 is A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ (-80°C).

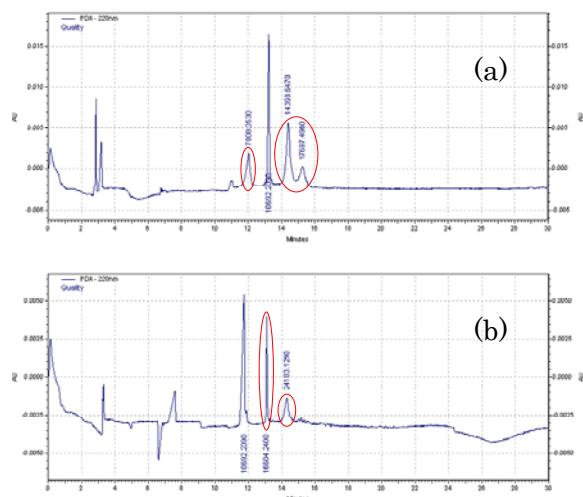


Fig. 2 Analysis of A β (a : A β ₍₁₋₄₂₎ , b : A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎) by capillary electrophoresis

るとそれぞれのバンドの位置は類似することが確認でき、20 kDa 付近とゲルの下部にバンドが検出された。単量体の A β タンパクの分子量は約 4.5 kDa であることから、凝集体が形成されたことが確認された。

次に、A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎サンプルの Lane 5-8 では、Lane 5-7においては 16 kDa より上の部分にバンドが検出されたため、凝集体が形成されていると考えられる。このことから、SDS-PAGE による分子量確認において、A β ₁₆₋₂₀の有無により形成される凝集体は、その分子量に差異はほとんどないことがわかった。また、各温度条件において作製された凝集体の分子量にも、差異は見られなかった。

さらに、ゲルの下部に現れたバンドは、未反応の単量体であると考えられる。なお、保管は-80°Cで凍結保存した。

3-1-2. キャピラリー電気泳動による分子量確認

キャピラリー電気泳動を用いて凝集 A β の分子量を測定した結果を Fig. 2 に示す。グラフの縦軸はピーク面積、横軸は経過時間を表している。Fig. 2 (a) は A β ₍₁₋₄₂₎ の解析結果であり、約 7.8 kDa、約 14.4 kDa、約 17.7 kDa にピークが現れているのがわかる。Fig. 2 (b) は、A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ の結果を示し、約 16.6 kDa と約 24.2 kDa にピーク見られた。以上より各凝集体の調製方法において分子量の異なる凝集体が形成される事がわかった。

3-1-3. 超遠心分析による分子量確認

作製した凝集 A β の分子量を超遠心分析を用いて測定した結果を Fig. 3 に示す。沈降平衡法にて 40,000 rpm で測定を行った。グラフの縦軸は吸光度、横軸はセルの中心からの半径を表している。

Fig. 3 (a) (A β ₍₁₋₄₂₎) では最低分子量は 8538、最高分子量は 14345 であり、全体の分子量平均は 11374 となった。また、Fig. 3 (b) (A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎) では最低分子量が 15490、最高分子量が 27310 であり、全体の分子量平均が 21057 であった。この結果からも、それぞれ凝集体が作製でき、A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎の凝集体の方が大きい事が確認できた。

3-2. 形状変化の確認

3-2-1. Thioflavin T(ThT)を用いた蛍光強度変化による A β タンパクの形状変化の確認

ThT 法を用いて凝集体の形状の変化を測定した。これらの結果を Fig. 4 に示す。A β ₍₁₋₄₂₎ では、時間の経過と共に蛍光強度が増加し、一方、A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ では時間の経過と共に蛍光強度が減少した。ThT はアミロイド線維に結合して発光する性質を持っている。したがって、A β ₍₁₋₄₂₎ は線維状に凝集し、A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ は線維状以外の形状をしていると考えられる。

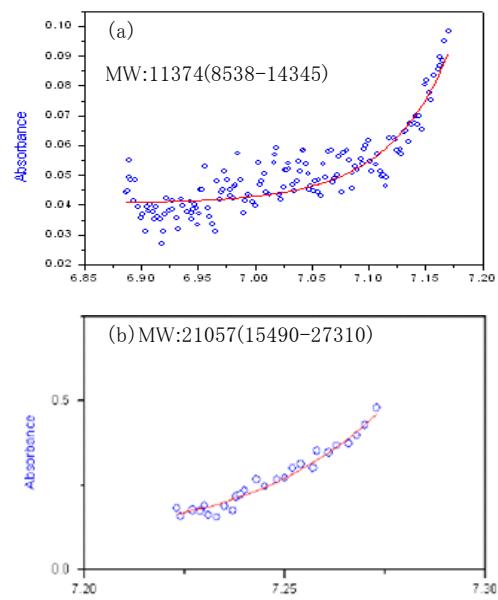


Fig. 3 Analysis of A β (a : A β ₍₁₋₄₂₎ , b : A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎) by ultracentrifugation (40,000 rpm)

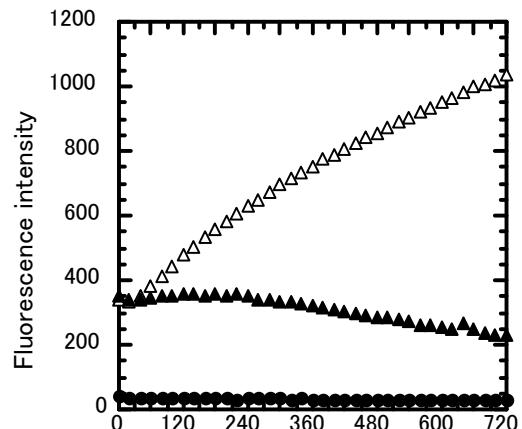


Fig. 4 Fluorescence intensity of A β (●: Negative control, △: A β ₍₁₋₄₂₎, ▲: A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎) with ThT

3-2-2. 原子間力顕微鏡を用いた画像測定による形状確認

ThT 法の結果より、A β ₍₁₋₄₂₎ と A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ に構造の相違が確認できた。よって AFM を用いて凝集体の表面形状の測定を行った。AFM による画像測定を行った結果、A β ₍₁₋₄₂₎ は Fig. 4 (a)、A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ は Fig. 4 (b) のような結果が得られた。また、凝集前の A β タンパクの測定画像を Fig. 4 (c) に示す。

これらの結果から、A β ₍₁₋₄₂₊₁₆₋₂₀₎ では球状と

思われる凝集体が確認でき、 $\text{A}\beta_{(1-42)}$ では一部ではあるが線維状と思われる画像が確認できた。Fig. 4 (c) に示した凝集前の画像と比較しても、大きさが違うことからそれぞれ異なる凝集状態を形成していると考えられる。

3-3. 切り出し精製

未反応の単量体を除去するため、切り出し精製を行い、SDS-PAGEを行った結果、20 kDa 付近のみにバンドが現れていることが確認でき、16 kDa 以下のバンドが現れていないことから、精製できたといえる。

4. 結論

SDS-PAGEの結果、 $\text{A}\beta_{(1-42)}$ 、 $\text{A}\beta_{(1-42+16-20)}$ 共に凝集体と思われるバンドが 20 kDa 付近と 16 kDa 以下に確認できた。さらに、切り出し精製により 20 kDa のタンパクのみに精製できた。キャピラリーエレクターメトリと超遠心分析の結果においても凝集体の分子量を測定し $\text{A}\beta_{(1-42)}$ より $\text{A}\beta_{(1-42+16-20)}$ の凝集体の方が大きいことがわかった。

ThT 法における形状確認では、 $\text{A}\beta_{16-20}$ の有無によって蛍光強度の変化に違いが生じた。さらに、AFM 画像においても凝集前の形状と比較し変化がみられ、 $\text{A}\beta_{(1-42)}$ では線維状に、 $\text{A}\beta_{(1-42+16-20)}$ では球状に形成していることが確認できた。

結果、 $\text{A}\beta_{16-20}$ の有無により形状の異なる凝集体を作製できることがわかった。

参考文献

- 1) Huafeng Wei et al., *Eur J Phar*, **392**, 117-123(2000)
- 2) Minako hoshi, Michio Sato, Shinichiro Matsumoto, Akihiko Noguchi, Kaori Yasutake, Natsuo Yoshida, and Kazuki Sato, *PNAS*, **100**, 6370-6375 (2002)
- 3) Tjernberg, L. O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A. R., Thyberg, J., Terenius, L. and Nordstedt, C., *J.Biol. Chem.*, **271**, 8545-8548 (1996)
- 4) Shiming Lin, Chih-Kung Lee, Yu-Ming Wang, Long-Sun Huang, Yin-Hang Lin,

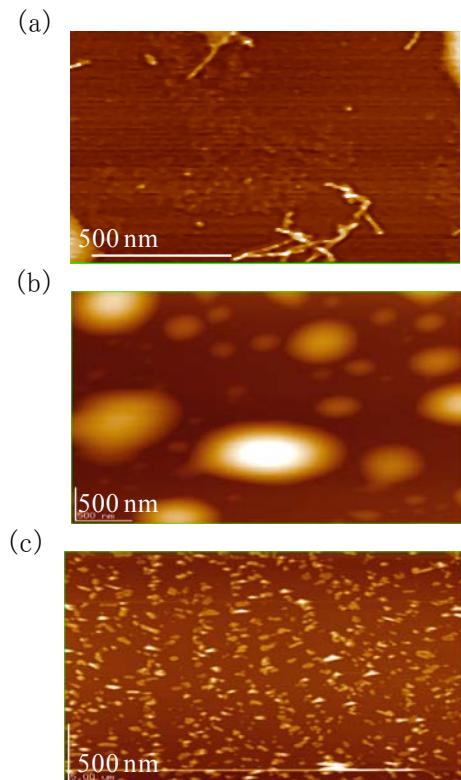


Fig. 4 Image of $\text{A}\beta$ (a: $\text{A}\beta_{(1-42)}$, b: $\text{A}\beta_{(1-42+16-20)}$, c: $\text{A}\beta_{(1-42)}$) by AFM

Shih-Yuan Lee, Bor-Ching Sheu, Su-Ming Hsu, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 323-327 (2006)

- 5) Takashima Akihiko, Kaori Noguchi, Kazuki Sato, Toshimitsu Hoshino, and Kazutomo Imahoshi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7789-7793 (1993)
- 6) Bankar, G. A. Cowan, W. M. *Brain Res.*, **126**, 397-425 (1977)
- 7) Muriel Arimon, Ismael Díez-Pérez, Marcelo J. Kogan, Núria Durany, Ernest Giralt, Fausto Sanz, and Xavier Fernández-Busquets, *The FASEB Journal*, 1-4(2005)
- 8) Yuji Yoshiike, De-Hua Chui, Takumi Akagi, Nobuo Tanaka, and Akihiko Takashima, *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 23648-23649(2003)
- 9) R. Deane, R. D. Bell, A. Sagare and B. V. Zlokovic, *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets*, **8**, 16-17(2009)