

アルツハイマー病における amyloid beta protein(A β)の検出

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 β protein(A β)₁₋₄₂ である。A β ₁₋₄₂ は、A β 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 β ₁₋₄₂ の構造は、毒性の低い線維状のものが集合した凝集体であると考えられている。本研究では、凝集体 A β ₁₋₄₂ を検出することを目的とし、今回、その前段階として、凝集体 A β ₁₋₄₂ を作製し、その毒性をラット胎児海馬神経細胞を用いて検討した。

【実験方法】

1. 凝集体 A β ₁₋₄₂ の作製²⁾

使用した A β ₁₋₄₂ は、ペプチドを修飾すること

により合成した。2.0 μ M の A β ₁₋₄₂ 溶液 250 μ l を調製し、4 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。その後、溶液を 2 倍希釈して 1.0 μ M に調製し、反応促進性を持つ A β ₁₆₋₂₀ を加え、約 9 時間攪拌させた(4 $^{\circ}$ C)。また、対照実験として、A β ₁₆₋₂₀ を加えずに同様に攪拌させた。その後、0.45 μ m のフィルターろ過を行い、10 kDa の透析膜を用いて透析を行った。A β ₁₆₋₂₀ を加えたものと加えていないものの吸光度を確認するために Tht 法により 300 分間測定を行った。分子量を確認するために、超遠心分析器を用いて測定を行った。さらに、タンパク機能解析システム PA800 (ベックマンコールター社)を用いて、分子量を測定した。

2. ラット胎児海馬神経細胞を用いた毒性試験

ラットの胎児脳より海馬部分を取り出し、10 % FCS を含んだ MEM 培地に入れ、メッシュ上で単細胞化し、初代培養を行った。海馬神経細胞に対する毒性の変化を比較するため、その培地に 0.5 μ M 凝集前 A β ₁₋₄₂ および凝集させた A β ₁₋₄₂ をそれぞれ 50 μ l 加え、電子顕微鏡で観察した。³⁾⁴⁾

【結果および考察】

1. 吸光度変化

A β ₁₆₋₂₀ を加えずに攪拌した A β ₁₋₄₂ の方が吸光度が高く、時間経過にしたがって、増加していることがわかる。Tht 法は、線維状 A β ₁₋₄₂ の末端基に反応する蛍光色素であり、凝集体には反応しないことが考えられる。よって、A β ₁₆₋₂₀ を加えない A β ₁₋₄₂ の方が吸光度が増加したと考えられる。

Detection of amyloid beta protein in Alzheimer's disease

Takenori SHIMIZU and Hideki KOHNO

2.超遠心分析

超遠心分析では、まず、沈降速度法で凝集 $A\beta_{1-42}$ の測定を行い、沈降係数を算出した。その結果、沈降係数 $S=1.08825E-13$ を得た。沈降係数と分子量の関係のグラフから分子量は、約 10000 と推定され、ゲル電気泳動で得られた分子量より小さい。これは、未反応の $A\beta_{16-20}$ が残ってしまい、分子量が低下したものと考えられる。また、沈降速度法では分子量は測定できず、今回得られた沈降係数を基に沈降平衡法で分子量の測定を行う予定である。

3.タンパク機能解析システム PA800

キャピラリー電気泳動を行った結果、分子量約 8000 付近にピークが現れた。 $A\beta_{1-42}$ の分子量が約 4500 であることから、 $A\beta_{1-42}$ は凝集し、2量体を形成していることが考えられる。しかし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で得られた分子量と比較すると、キャピラリー電気泳動で得られた分子量のほうが小さいことがわかる。キャピラリー電気泳動でもサンプルの希釈液に SDS 溶液を用いており、この SDS 溶液の影響により測定法によって、分子量のばらつきが生じてしまうものと考えられる。したがって、SDS 溶液が凝集 $A\beta_{1-42}$ にどのような影響を及ぼすのかについての検討をポリアクリルアミドゲル電気泳動とともに行う必要があると考える。

4.ラット胎児海馬神経細胞による $A\beta_{1-42}$ の毒性試験

ラット胎児海馬神経細胞に凝集後 $A\beta_{1-42}$ を加えてから 3 日後の神経細胞は、成長していないことが電子顕微鏡により確認できた。一方、凝集前 $A\beta_{1-42}$ を同様に加えた神経細胞は、成長が促進されていることが確認された。したがって、神経細胞は、 $A\beta_{1-42}$ によって破壊されたということが考えられ、 $A\beta_{1-42}$ の構造の変化を示すものであると考えられる。

【結論】

本研究では、キャピラリー電気泳動、超遠心分析器などを用いて、 $A\beta_{1-42}$ の凝集体が形成され

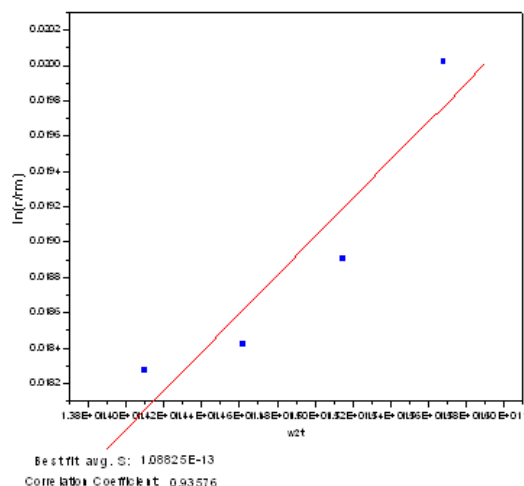


Fig. 1 凝集 $A\beta_{1-42}$ における沈降係数算出

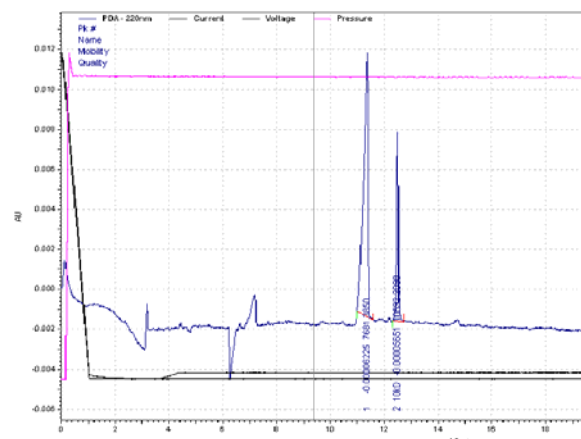


Fig. 2 キャピラリー電気泳動による凝集 $A\beta_{1-42}$ の分子量測定

たことが示唆された。また、Tht 法の結果から、 $A\beta_{16-20}$ を加えないものと吸光度が異なっていたことから、 $A\beta_{1-42}$ は凝集されたのではないかと考えられるが、構造的な変化のデータが不十分なため、更なる検討が必要である。

【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)
- 2) Minako hoshi, et al. PNAS. 100, 6370-6375 (2002)
- 3) Takashima Akihiko, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 7789-7793 (1993)
- 4) Bankar, G. A. Cowan, W. M. Brain Res. 126, 397-425 (1977)