

アミロイドβ凝集体の形状に対する不飽和脂肪酸の効果

日大生産工(院) ○高島 聖史 日大生産工 吉宗 一晃

1. 緒言

世界のアルツハイマー病 (Alzheimer's Disease:AD)患者は2050年には1億3,000万人に達するとの予測もあり対策が急務である。既存のAD治療薬は、症状を緩和する対処療法であるため、根本的な治療法の確立が重要である。

ADの発症機構はまだ明らかになっていないが、有力な説の一つにアミロイドカスケード説がある。この説では、アミロイドβ(Aβ)と呼ばれるペプチドが神経細胞外に蓄積し老人斑を形成する。その後、形成した老人斑により神経細胞死を誘導するという説である。Aβはアミロイド前駆体から2種類の酵素により切り出される。Aβは酵素の切断位置によりアミノ酸残基数が40のAβ₄₀とアミノ酸残基数42のAβ₄₂が生成され、Aβ₄₂は疎水性のアミノ酸残基を2残基多く持つため、Aβ₄₀より凝集しやすく神経細胞に対する毒性が高い。Aβが凝集していく過程では、Aβモノマーからβシートへの構造変化を起し、続いて重合核が形成され、中間体を経て成熟線維が形成される。脳に蓄積する不溶性のAβ線維が神経毒性を発揮すると考えられている。

脳の乾燥重量の約50~60%は脂質であり、脂肪酸は脳内リン脂質の構成脂肪酸として細胞膜に多く含まれている。脂肪酸は、分子の片方の端にカルボキシ基をもつ長い直鎖炭化水素である。脂肪酸には、炭素-炭素間の二重結合が存在することもあり、二重結合をもたないものは飽和脂肪酸、二重結合をもつものを不飽和脂肪酸という。また、不飽和脂肪酸のうち、炭素の二重結合が1つのもを一価不飽和脂肪酸、二つ以上ものは多価不飽和脂肪酸と呼ばれる。脳に多く含まれる多価不飽和脂肪酸(PUFA)は、神経新生、シナプス形成、神経突起伸長など脳機能維持に重要な役割を担っている。

近年、ADモデルマウスを用いた実験で、PUFAの摂取による認知機能改善効果が明らかになっている。脳内PUFAは加齢に伴って減少することが報告されていることから、加齢に

伴うPUFAの減少が神経変性疾患の病態に与える影響が注目されている。

当研究室では、Aβ₄₂凝集体と特異的に反応するモノクローナル抗体を作成し*in vitro*でAβ₄₂凝集体の検出を行っている。作成した抗体はAβ₄₂凝集体表面の立体構造を特異的に認識する。

本実験では、多価不飽和脂肪酸がAβ₄₂凝集体を抑制していると考え、実験試料として多価不飽和脂肪酸であるリノール酸、リノレン酸、一価不飽和脂肪酸としてオレイン酸、飽和脂肪酸としてステアリン酸とそのグリセロールエステルであるモノステアリン、モノオレイン、及びグリセリンとAβ₄₂凝集体との懸濁液を検出し、Aβ₄₂凝集体の形状に影響を与える脂肪酸を探索した。本実験では抗体83-3を使用した。この抗体は、直径0.22 μm以上のAβ₄₂凝集体と特異的に反応し、可溶性Aβ₄₂凝集体と良く反応することが分かっている²⁾。また、原子間力顕微鏡を用い、Aβ₄₂凝集体の形状を推察した。

2. 実験方法

ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

本実験ではAβ₄₂凝集体の検出をELISAによって行った。ELISAは目的の抗原を、特異抗体で捕捉するとともに、抗体に結合した酵素の反応を利用して検出・定量する方法である。測定は492 nmで吸光度を測定した。Aβ₄₂凝集体を各実験試料で懸濁し、Aβ₄₂凝集体に対する抗体83-3との反応性をELISAで調べた。

原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope : AFM)

Aβ₄₂凝集体の形状を解析する手段として、本研究ではAFMを用いた。AFMは、表面形状を解析する走査型顕微鏡の一種である。表面構造が均一状態の雲母片上に、Aβ₄₂凝集体(0.448 mg/mL)をPBSもしくは各実験試料で希釈した溶液10 μLを滴下し、雲母片上で一晚乾燥させ、AFMの観察試料とした。

Effect of unsaturated fatty acid on aggregates of amyloid β

Masafumi TAKASHIMA and Kazuaki YOSHIMUNE

3. 実験結果および考察

3-1 A β ₄₂凝集体に対する脂肪酸の影響

A β ₄₂凝集体に対する脂肪酸の影響を検討するため、PBSで1 mg/mlに希釈したオレイン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸を遠心分離し、その上澄みでA β ₄₂凝集体を懸濁し、抗体83-3を用い、ELISAを行った(Fig.1)。

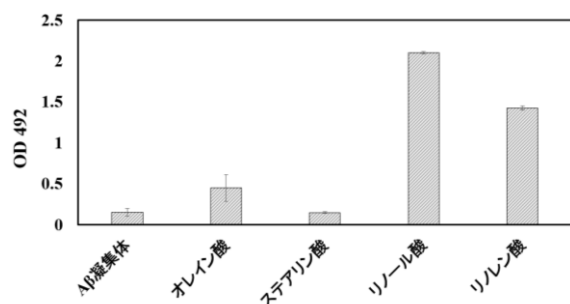


Fig. 1 A β ₄₂凝集体に対する脂肪酸の影響

その結果、不飽和脂肪酸を添加した時、吸光度の値が上昇し、抗体83-3との反応性が向上した。リノール酸を添加した場合、A β ₄₂凝集体のみの吸光度の値よりも約10倍上昇した。このことから、不飽和脂肪酸によってA β ₄₂凝集体の形状が変化していることが示唆された。また、この変化により、A β ₄₂凝集体の表面積を大きくし、抗体との反応性を向上したと考えられる。抗体83-3は、不飽和脂肪酸によって形状が変化したA β ₄₂凝集体が持つエピトープと良く反応することが考えられた。

3-2 A β ₄₂凝集体に対するグリセリン及びグリセロールエステルの影響

次にA β ₄₂凝集体に対するグリセリン及びグリセロールエステルの影響を検討するため、PBSで、1 mg/mlに希釈したモノステアリン、モノオレイン、グリセリンでA β ₄₂凝集体を懸濁し、抗体83-3との反応性を調べた(Fig.2)。

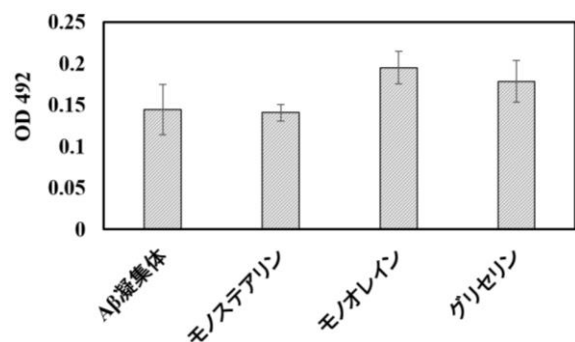


Fig. 2 A β ₄₂凝集体に対するグリセリン及びグリセロールエステルの影響

その結果、モノオレインの添加によって、僅かに吸光度の値の上昇が確認できた。しかし、不飽和脂肪酸を添加した場合と比較すると吸光度の値は低かった。

3-3 リノール酸によるA β ₄₂凝集体の形状への影響

リノール酸によるA β ₄₂凝集体の形状への影響を調べるために、AFMを用い、その形状を調べた。その結果、PBSでA β ₄₂凝集体を希釈すると楕円形の凝集が形成され、リノール酸を添加した場合で、様々な形状のA β ₄₂凝集体が確認された(Fig.3)。

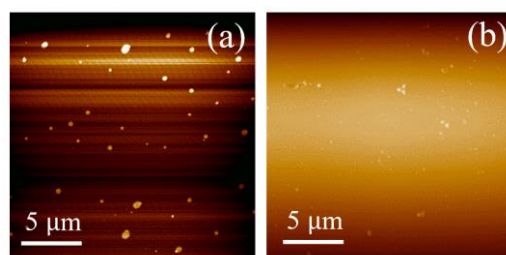


Fig. 3 AFMによるA β ₄₂凝集体の形状の観察

(a)PBSで希釈したA β ₄₂凝集体の形状 (b)リノール酸で希釈したA β ₄₂凝集体の形状

まとめ

今回のELISA及びAFMの結果から、A β ₄₂凝集体と抗体との反応性及び、形状は脂肪酸により影響を受けることが分かった。この効果は、飽和脂肪酸ではあまり確認されず、不飽和脂肪酸によって大きく影響を受けることから、不飽和脂肪酸中の二重結合がA β ₄₂凝集体の形状に影響を与えていることが示唆された。脂肪酸とA β 凝集体との関係では、多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸が不溶性A β 凝集体の形成を阻害するという報告がある³⁾。今回の系においても、不飽和脂肪酸がA β ₄₂凝集体の形状に影響を与え、この変化によって、その溶解度等の性質が変化している可能性が考えられた。今後は、不飽和脂肪酸がA β ₄₂凝集体に与える影響のメカニズムについて検討していく。

参考文献

- 1) M, Hashimoto, *et al.*, *Journal of Nutrition*, **135**, 549-555, (2005)
- 2) Y, Shoma, *et al.*, *Tetrahedron letters*, **45**, 5968, (2004)
- 3) A, Johansson, *et al.*, *FEBS Journal*, **274**, 990-1000, (2007)