

非晶質 A β 凝集体の細分化とその線維状凝集体形成抑制

日大生産工 (院) ○柴崎 友理, 小堀 光一, 中村 桃佳, 金 理英, 吉宗 一晃

1. 緒言

現在、世界中で高齢化が進みそれに伴い認知症高齢者が急増し、大きな社会問題になっている。世界全体の認知症患者数は 5,740 万人と推定されており、2050 年には約 1 億 5,000 万人となると予測されている。認知症のうち約 6 割を占めるのがアルツハイマー病 (Alzheimer's Disease: AD) である。AD は発症すると記憶障害の症状が見られ、進行に伴い場所や時間、人物などの認識ができなくなる。現在、AD に対する根本的な治療法がなく、早急な治療法確立、予防策が求められている。

AD 発症の原因の中で最も有力とされている仮説がアミロイドカスケード仮説である。アミロイドカスケード仮説ではアミロイド β (A β) の産生及び蓄積が AD の発症に深く関係していると考えられている。AD 患者の脳は脳の萎縮が起こっており、脳内には老人斑と呼ばれる円形の沈着物が現れる。この老人斑の主成分は A β というタンパク質である。A β は A β モノマー、オリゴマー、凝集体と互いに凝集しあうことで大きくなり脳内に蓄積し、老人斑を形成すると考えられている。これにより神経機能障害や細胞死を引き起こし、AD が発症する。

A β はその凝集過程において非晶質の凝集体を形成するオフ経路と線維化を形成するオン経路が存在する。⁽¹⁾ A β は脳内で生産された後、脳の排出機能により速やかに排出される。A β の排出には主に 4 つの排出経路が存在する。輸送体を介した血液への排出、脳内の酵素による A β の分解、ミクログリア等による取り込み、血管周囲の排出経路を介してリンパ管内や脳外の血管内への排出が挙げられる。A β が凝集体の大きさまで凝集すると A β の排出経路を介して排出しにくくなる。このことから凝集体の脳外への排出には A β の細

分化が必要であると考え、本研究では A β 凝集体の細分化の観察を目的としている。

脳内における脂質の割合は白質で約 5 割、灰白質で約 3 割を占め、脳の重要な構成要素である。脂質の構成成分である脂肪酸は脳の機能維持に欠かせない物質である。脂肪酸とは長鎖炭化水素の一価のカルボン酸である。脂肪酸は二重結合の有無で不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸に分類される。不飽和脂肪酸はさらに二重結合が一つある場合は一価不飽和脂肪酸、2 つ以上は多価不飽和脂肪酸に分類される。このうち多価不飽和脂肪酸は AD に有益な効果を発揮することが報告されている。近年の研究において不飽和脂肪酸が A β 凝集体に結合することにより細分化させ、脳からの排出を促進させる可能性が示唆されている。不飽和脂肪酸は特に A β の疎水性アミノ酸残基が多い領域に結合し、A β 凝集体を細分化させていることが報告されている。⁽²⁾

本研究では、不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸を用いて脂肪酸に対する A β 凝集体への細分化効果を分子的に評価した。評価方法として原子間力顕微鏡 (AFM) と Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) を用いた。ELISA では A β 凝集体と特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた。本実験では比較的小さい凝集体と反応する抗体 83-3 を使用した。⁽³⁾ 脂肪酸は多価不飽和脂肪酸である α リノレン酸、 γ リノレン酸、ピノレン酸、リノール酸、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸、飽和脂肪酸であるステアリン酸を実験試料として使用した。これらの脂肪酸と A β 凝集体を懸濁し、A β 凝集体の形状に影響を与える脂肪酸を調査した。

2. 実験方法

2-1 ELISA による評価

本実験では ELISA を用いて A β 凝集体を検

Fragmentation of amorphous amyloid β aggregates and inhibition of the fibril formation

Yuri SHIBAZAKI, Kouichi KOBORI, Momoka NAKAMURA, Riyong KIM and Kazuaki YOSHIMUNE

出した。ELISA は目的タンパク質をそれに対する抗体と抗原抗体反応により結合させ、更に抗体に結合させた酵素と基質液との反応を利用して検出し定量する。本実験では A β 凝集体と特異的に反応する抗体 83-3 を使用した。この抗体を用いて試料溶液を懸濁した凝集体と抗体との反応性を調査した。

2-2 AFM による観察

A β 凝集体の形状評価には AFM を使用した。AFM は探針先端の原子と試料の原子の間に働く原子間力によって試料の凹凸を測定し、画像を検出する。カンチレバーの先端に取り付けた鋭い探針を用いて、試料表面をなぞり、その時のカンチレバーの上下方向へ変位を観測することにより、試料の表面形状を評価する。AFM を用いて、試料溶液を懸濁した凝集体の形状を観察した。

3. 結果

3-1 A β 凝集体に対する不飽和脂肪酸の細分化効果

濃度 0.03 wt/v % の超音波処理によりエマルジョン化した脂肪酸による A β 凝集体に対する効果を ELISA により検出した (Fig. 1)。この結果、不飽和脂肪酸による A β 凝集体と抗体との反応性の向上が確認でき、不飽和脂肪酸が A β 凝集体を細分化している可能性が示唆された。一方、ステアリン酸で懸濁した凝集体では抗体との反応性が確認できなかったことから、不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸で A β と抗体との反応に大きな差があることが示唆された。

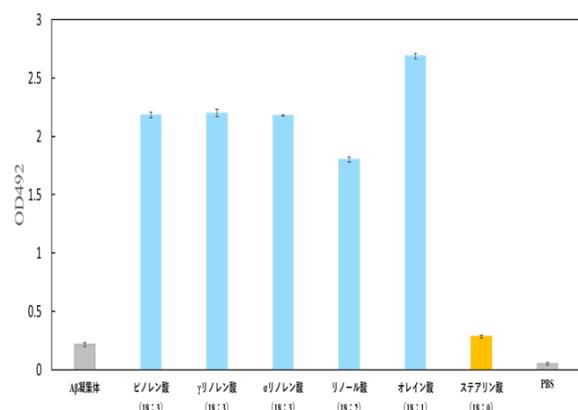


Fig. 1. A β 凝集体に対する不飽和脂肪酸の細分化効果

3-2 脂肪酸による A β 凝集体の形状変化

AFM を用いて、不飽和脂肪酸及び飽和脂肪酸溶液で懸濁した A β 凝集体の形状を確認した (Fig. 2)。その結果、A β 凝集体は平均直径 890 nm に対して不飽和脂肪酸である α リノレン酸で懸濁した凝集体は平均直径 92 nm と凝集体を細分化していることが確認できた。また、飽和脂肪酸であるステアリン酸で懸濁した A β 凝集体は直径 580 nm であり、凝集体のみの大きさと比較して小さくなっていることが確認できた。

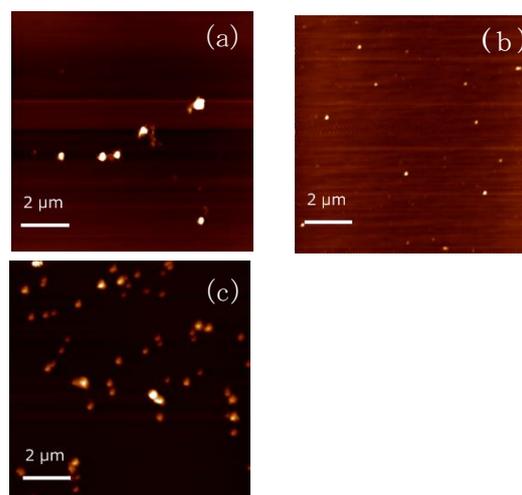


Fig. 2. 脂肪酸による A β 凝集体の形状変化
A β 凝集体 (a) を (b) α リノレン酸もしくは (c) ステアリン酸で懸濁した際の形状

4. まとめ

ELISA と AFM の結果から不飽和脂肪酸の A β 凝集体に対する細分化効果が確認できた。本実験結果から、飽和脂肪酸と比較して不飽和脂肪酸の方が高い細分化効果を有していることが示され、各脂肪酸の溶解性が A β 凝集体の細分化に関係していることが考えられた。

5. 参考文献

- 1) Xi, W. *et al.* Protein Sci, **2019**, *28*, 1973-1981.
- 2) Shatshat, A, E. *et al.* Arch. Biochem. Biophys, **2019**, *663*, 34-43.
- 3) Shimizu, Y. *et al.*, Global J. Res. Anal, **2015**, *4*, 117-119.