

飽和脂肪酸による非晶質アミロイドβ凝集体の細分化

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

1. 緒言

世界的な高齢化に伴い、認知症の一種であるアルツハイマー病(Alzheimer's Disease: AD)の患者数は年々増加している。現在ADの根本的な治療法は確立しておらず、早期の根本的な治療法および予防法の確立が求められている。アミロイド仮説において、アミロイドβ(Aβ)というタンパク質が脳内で凝集し蓄積することで神経細胞が損傷を受け、脳が委縮しADを発症すると考えられている。本研究では、脳に蓄積したAβの凝集を小さくして脳から脳関門を越えて排出することでADの根本的な治療法に活用できると考え、Aβ凝集体を細分化する物質の探索を行う。

Aβはアミロイド前駆体タンパク質(amyloid precursor protein: APP)からβセクターゼとγセクターゼの2種類の酵素によって切断されて産生される。酵素の切断位置の違いにより、アミノ酸残基が40個のAβ₄₀や、アミノ酸残基が42個のAβ₄₂が産生される。体内で産生されるAβではAβ₄₀が約90%を占め、約10%がAβ₄₂とされているが、Aβ₄₂はAβ₄₀よりも疎水性アミノ酸残基を二つ多く持つことから、疎水性がより強く凝集しやすいため毒性が強い。Aβ₄₂はAD発症の要因とされているが、AD患者の脳において病的に産生されるものではなく、健康な人の脳内でも産生されている。通常は産生されても分解して脳外へと排出されるが、産生と分解のバランスが崩れることで凝集が始まり脳内に蓄積していく。

Aβ₄₂の凝集は水系の体内で、モノマーからオリゴマーへと変化し、ランダムに凝集した非晶質の凝集体や、規則性のあるβシート構造を持つ線維状凝集体へと凝集が進む。この時に、非晶質凝集体に進む凝集経路をoff-pathway、線維状凝集体へと進む凝集経路をon-pathwayという。線維状凝集体は規則正しい構造を持つことから凝集すると溶解が困難であるため、非晶質の凝集体よりも脳からの排出が困難である。

現在、脂肪酸のAβ凝集に対する影響が注目されている。脂肪酸は、長鎖炭化水素の片方の端にカルボキシ基を持つ一価のカルボン酸である。炭素間の結合に二重結合を持たない飽和脂肪酸と、二重結合を持つ不飽和脂肪

酸に分類される。不飽和脂肪酸の中でも、炭素間の二重結合を1つ持つものを一価不飽和脂肪酸、2つ以上持つものを多価不飽和脂肪酸と呼ぶ。多価不飽和脂肪酸がAβ₄₂の凝集を抑制するという報告があり¹⁾、脂肪酸はAβ₄₂の疎水性領域と相互作用することで凝集を抑制すると考えられている。また、脂肪酸の添加によりAβ₄₂がon-pathwayへ凝集が促進されることが示唆された²⁾。

近年の研究において、ビフィズス菌の一種である*Bifidobacterium breve* MCC1274株(MCC1274株)を10日間摂取したADモデルマウスの認知機能障害が改善したという報告がある³⁾。本研究室での実験において、MCC1274株の培養上清を添加したAβ₄₂凝集体が細分化されることが示唆された。MCC1274株培養上清には、飽和脂肪酸やアミノ酸が多く含まれている。

これまでの原子間力顕微鏡での観察により、飽和脂肪酸が非晶質のAβ₄₂凝集体をon-pathwayに導き細分化することが示唆された。本実験では飽和脂肪酸として、ラウリン酸(C12)、ミスチン酸(C14)、パルミチン酸(C16)、ステアリン酸(C18)を用い、飽和脂肪酸存在下におけるAβ₄₂凝集体の形状変化を経時的に評価した。

2. 実験方法

2-1 可溶性非晶質Aβ₄₂凝集体の作製

Aβ₄₂は水溶液中での凝集性が高く、溶解が困難であることから、有機溶媒である1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolを用いてAβ₄₂を溶解させ凍結乾燥した後、ジメチルスルホキシドで溶解した。このようにして緩衝液に可溶性非晶質のAβ₄₂凝集体を作成し、Aβ₄₂凝集体として実験に用いた。

2-2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISAは抗原抗体反応を利用し、試料溶液に含まれる目的物質を酵素反応を用いて検出する方法である。本実験では、抗原として各試料溶液に懸濁したAβ₄₂凝集体をプレートに固定

Disaggregation of amorphous amyloid-β aggregates by saturated fatty acids

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

化し、 $A\beta_{42}$ 凝集体と特異的に反応するモノクローナル抗体83-3との反応性を492 nmの吸光度で測定した。抗体83-3は、直径0.05 μm から0.22 μm の非晶質 $A\beta_{42}$ 凝集体と特異的に反応する抗体であり⁴⁾、MCC1274株培養上清の添加により細分化した $A\beta_{42}$ 凝集体と高く反応することが確認された。試料溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体が抗体83-3と高く反応すると、 $A\beta_{42}$ 凝集体が細分化していると予測できる。

2-3 原子間力顕微鏡 (AFM)

$A\beta_{42}$ 凝集体の実際の形状変化を観察するためにAFMを用いた。AFMは探針先端と試料との原子間力を利用し、試料の凹凸を測定する。各試料溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体を雲母片上に塗布し乾燥させた後、AFMにより観察した。

3. 実験結果および考察

3-1 ELISAによる評価

各飽和脂肪酸溶液(0.03 wt/v %)に $A\beta_{42}$ 凝集体を懸濁し、懸濁直後から懸濁後180分までの抗体83-3との反応性をELISAにより測定した(Fig. 1)。

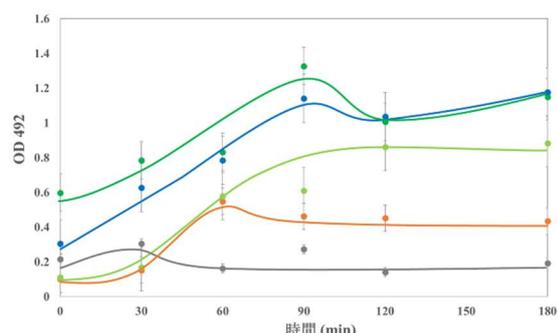


Fig. 1 飽和脂肪酸溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体の抗体83-3との反応性の経時変化 (灰色: PBS、緑色: ラウリン酸、青色: ミリスチン酸、オレンジ色: パルミチン酸、黄緑色: ステアリン酸)

$A\beta_{42}$ 凝集体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁した脂肪酸を添加していない $A\beta_{42}$ 凝集体よりも、飽和脂肪酸溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体は懸濁後の時間が経過することにより抗体83-3との反応性が高くなった。ラウリン酸溶液とミリスチン酸溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体は懸濁後180分までの間、反応性は右肩上がりに上昇した。パルミチン酸溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体は懸濁後60分付近でピークとなりその後低下した。ステアリン酸溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体は懸濁後120分付近で反応性が最大となり、その後の上昇は見られなかった。このこと

から、飽和脂肪酸では炭素数の違いによって $A\beta_{42}$ 凝集体懸濁後の経過時間における形状変化に差があることが示唆された。

3-2 AFMによる観察

各飽和脂肪酸溶液に懸濁後1日静置後の $A\beta_{42}$ 凝集体の形状を、AFMを用いて観察した(Fig. 2)。PBSに懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体の平均直径が368 nm、ラウリン酸に懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体は114 nm、ミリスチン酸は242 nm、パルミチン酸は108nm、ステアリン酸は514 nmであり、ステアリン酸を除く3つの飽和脂肪酸に細分化効果が確認された。

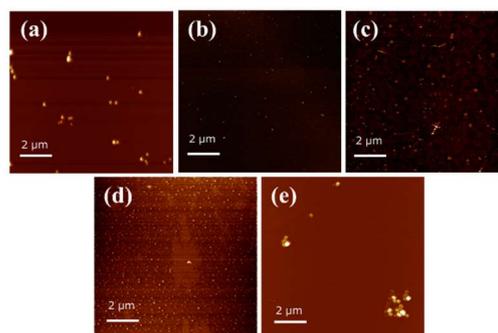


Fig. 2 飽和脂肪酸溶液に懸濁後1日静置後の $A\beta_{42}$ 凝集体のAFMによる観察 ((a)PBS、(b)ラウリン酸、(c)ミリスチン酸、(d)パルミチン酸、(e)ステアリン酸)

4. まとめ

飽和脂肪酸に懸濁した $A\beta_{42}$ 凝集体は、懸濁後静置することにより細分化されることが確認できた。飽和脂肪酸によりon-pathwayへ凝集は導かれるが、線維化する前に非晶質凝集体は一旦細分化され、その後線維状凝集体へと凝集が促進されることが示唆された。今後は、この線維化する前の細分化過程において、 $A\beta_{42}$ 凝集体を線維化させずに細分化した状態を維持できる物質の探索を行い、ADの根本的な治療法への活用を目指す。

5. 参考文献

- 1) Shatshat, A, E. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., **2019**, 663, 34-43.
- 2) Rana, P. *et al.*, Sci. Rep., **2017**, 7, 10370.
- 3) Kobayashi, Y. *et al.*, Sci. Rep., **2017**, 7, 13510.
- 4) Shimizu, T. *et al.*, Global. J. Res. Anal., **2015**, 4, 117-119.