

アミロイド β の非晶質および線維状凝集体の形成に対する低濃度界面活性剤の効果

日大生産工(院) ○金理英 小堀光一 柴崎友理 中村桃佳 吉宗 一晃

1. 緒言

認知症は、脳の病気や障害などの様々な原因によって、記憶力や判断力など脳の様々な認知機能が低下し、日常生活に支障が出てくる状態を指す。認知症には様々な原因疾患があるが、過半数をアルツハイマー型認知症(Alzheimer's Disease :AD)が占める。

ADは脳の神経が変性して神経細胞が減少し、脳の一部萎縮していく不可逆性の脳疾患である。近年、医療技術の向上により平均寿命が伸びたことでADの患者数が増加し、2050年には世界のADの患者数が1億3000万人に達する予測もある。現在、ADの治療法は未確立で、対処療法として症状の改善や進行を抑える目的で薬物療法などが行われている。

ADの発症機構はまだ明らかになっていないが、アミロイド仮説が有力な原因の1説とされている。脳内で作られるタンパク質の一種で37~49アミノ酸残基からなるポリペプチドであるアミロイド β 蛋白(amyloid β -protein : A β)が異常凝集して脳内の神経細胞に蓄積し、老人斑を形成する。その後、タウ蛋白質のリン酸化が神経原線維化を誘発する。この老人斑や神経原線維化が神経細胞の機能障害を誘発し、細胞死に至らしめるという一連の流れがアミロイド仮説で提唱されている。

A β は前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質(amyloid precursor protein :APP)から β セクレター、 γ セクレターゼという2種類の酵素によって切り出されたもので、A β はアミノ酸残基が40のA β_{40} とアミノ酸残基数42のA β_{42} の2種類のA β 分子が主要分子として存在する。A β_{42} は、疎水性のアミノ酸残基を2残基多く持ったためA β_{40} と比べて凝集しやすく神経細胞に対して毒性が高い。

A β モノマーは β シートへの構造変換を起こして重合核が形成され、更にプロトファイブリル、さらには成熟線維(A β fibrils : fA β)が形成される。このようにしてA β モノマーが線維状のA β 凝集体へと変化する。

脳に蓄積する不溶性のA β 線維が神経毒性を発揮すると考えられている。

不規則な配列である非晶質のA β 凝集体がオリゴマーを経て線維状になる過程をon-pathway、オリゴマーを経て凝集体になる過程をoff-pathwayと呼ぶ。

当研究室の先行研究より、界面活性剤がA β_{42} 凝集体を細分化することに寄与していることが明らかになった。界面活性剤は、界面に作用して性質を変化させる水溶液の物質の総称で、1つの分子の中に親水性と親油性の2つの性質を持つ。長い疎水性炭素鎖(尾部)の末端に極性基(頭部)を含有しており、水中で独自の性質を示す。本研究で用いたトリトンX-100は水に溶解した際にイオン化しない親水基を持つ非イオン性の界面活性剤である。脂質部分にオクチルフェノール、疎水部分に平均9.5個のポリオキシエチレンを含有する構造を有する。疎水部分にベンゼン環を含んでいることから可溶化力に優れる。先行研究より、界面活性剤がA β_{42} 凝集体をon-pathwayに導くと考え、本実験では界面活性剤の濃度がA β_{42} 凝集体の形状に影響について、酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay :ELISA)、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope : AFM)を用いて探索及び推察した。

2. 実験方法

2-1 ELISAによる評価

ELISAは試料溶液中の目的の抗原を特異抗体で捕捉するとともに、酵素抗体反応を利用して検出・定量する方法である。

本実験で抗原として使用する可溶性A β_{42} 凝集体を以下のように作製した。A β_{42} 凝集体粉末0.550 mgに1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-ブロパノールを1100 μ L加え溶解後、1.5 mLチューブ2本に分注した。それぞれのチューブにパラフィルムをして4℃で16時間放置した後、37℃で3時間放置し完全に乾くまで減圧乾燥した。この操作をもう一度繰り返し、乾燥後各

Effect of surfactant of low concentrations on formation of amorphous and fibril amyloid-aggregates

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

チューブにそれぞれジメチルスルホキシドを550 μ L加え溶解して-80 $^{\circ}$ Cで冷凍保存した。

抗体は、直径0.22 μ mのA β ₄₂凝集体と特異的に反応するモノクローナル抗体(以下、抗体83-3とする)を用いたり。したがって0.22 μ mに近づくほど吸光度の値が高くなり、大きさが大きくなるほど吸光度の値が小さくなる。

本実験では、吸光度の測定波長を492 nmとし、A β ₄₂凝集体と界面活性剤を懸濁し、抗体83-3を用いて反応性をELISAで調査した。

2-2 原子間力顕微鏡による観察

AFMは対象物の表面形状や粗さを観察することができる走査型顕微鏡の一つである。物質の表面に対してカンチレバーの先についた探針を接近させて、探針と物質表面の間に生じる原子間力を利用して計測を行った。

本実験ではAFMをA β ₄₂凝集体の形状を解析する手段として用いた。A β ₄₂凝集体とPBSまたは界面活性剤を混合しPBSで希釈した溶液を雲母片上に10 μ l滴下した。その後雲母片上で1晩乾燥させAFMで観察した。

3. 実験結果

3-1 A β ₄₂凝集体に対するトリトンX-100の影響

A β ₄₂凝集体に対する界面活性剤の影響を検討するため、トリトンX-100とA β ₄₂凝集体を9:1で懸濁し37 $^{\circ}$ Cで24時間放置した。その後PBSで希釈し、この溶液をELISAを行った(Fig.1)。

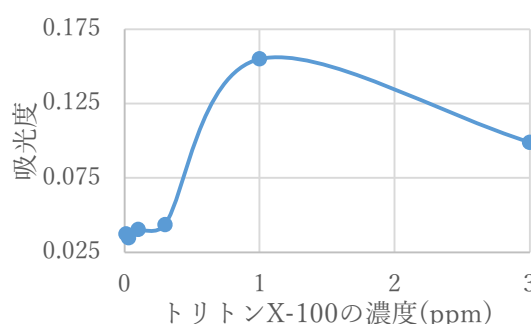


Fig. 1 A β ₄₂凝集体に対するトリトンX-100の影響

ELISAより、トリトンX-100が1 ppmの濃度までは吸光度が上昇し、1ppmより高濃度では吸光度が下降していることが分かった。

3-2 トリトンX-100によるA β ₄₂凝集体の形状への影響

トリトンX-100によるA β ₄₂凝集体の形状への影響を調べるために、AFMを用いて調べた。

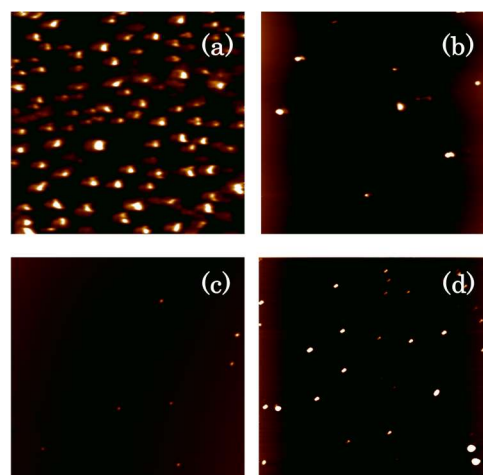


Fig. 2 A β ₄₂凝集体の形状の観察

- (a) PBSで希釈したA β ₄₂凝集体
(b) 0.3 ppm トリトンX-100で希釈したA β ₄₂凝集体
(c) 1 ppm トリトンX-100で希釈したA β ₄₂凝集体
(d) 3 ppm トリトンX-100で希釈したA β ₄₂凝集体

平均直径は、PBSで希釈したA β ₄₂凝集体は1327 nm、0.3 ppm トリトンは1144 nm、1 ppm トリトンは41.6 nm、3 ppm トリトンは583 nmであった。

4. まとめ

本実験の結果より、界面活性剤によってA β ₄₂凝集体の形状が変化していることが示唆された。

ELISAとAFMの結果を比較して、吸光度が上昇した1 ppmまではA β ₄₂凝集体が小さくなりその後、濃度が上昇し吸光度が低下するとA β ₄₂凝集体の大きさも大きくなった。このことより、ELISAの結果によってA β ₄₂凝集体の形状の推察ができるのではないかと考える。界面活性剤がA β ₄₂凝集体を細分化し一時的にオリゴマーにさせ、その後線維化に導く on-pathwayに誘導しているのではないかと考えられる。

今後は更に界面活性剤がA β ₄₂凝集体に与える影響について検討したい。

5. 参考文献

- 1) Y, Shoma, *et al.*, *Tetrahedron letters*, **45**, 5968, (2004)