

低濃度非イオン界面活性剤が与えるアミロイドβ凝集への影響

日大生産工(院) ○金理英 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、その原因の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タンパク (amyloid β-protein : Aβ)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。

Aβ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セクレターゼ、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、Aβはアミノ酸残基が40のAβ₄₀とアミノ酸残基数42のAβ₄₂の2種類のAβ分子が主要分子として存在する。Aβ₄₂は、疎水性のアミノ酸残基を2残基多く持つためAβ₄₀と比べて凝集しやすく神経細胞に対して毒性が高い。Aβ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 (Aβ fibrils : fAβ) が形成される。このようにしてAβモノマーが線維状のAβ凝集体へと変化する。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。

不規則な配列である非晶質のAβ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。

繊維状の凝集体は、一度脳内に沈着してしまうと脳内での分解や排出が困難になる。したがって、アミロイド仮説においてADを予防・治療するにはAβをAβ凝集抑制物質で大きく凝集させないことや、Aβ凝集体を小型化し、脳内から排出することが必要である。そのため、Aβ凝集体の形状変化に寄与するような物質を探索している。

当研究室の先行研究より、界面活性剤がAβ₄₂の非晶質凝集体の形態に影響を与え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。本研究では、ポリソルベート 20(Tween20)、ポリソルベート 40(Tween40)、ポリソルベート 60(Tween60)、ポリソルベート 80(Tween80)の4つの非イオン性の界面活性剤を用いた。ポリソルベート類は、ソルビタン脂肪酸エステルにエチレンオキシドが約20分子縮合した構造を持つ。

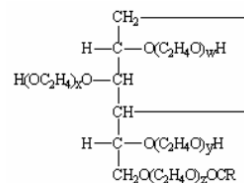


Fig. 1 ポリソルベート類の構造
W+X+Y+Z=約20

RCO-は、Tween20ではラウリン酸、Tween40ではパルミチン酸、Tween60ではステアリン酸、Tween80ではオレイン酸を持つ。

当研究室の先行研究より、界面活性剤がAβ₄₂凝集体をon-pathwayに導くと考えられている。本実験では界面活性剤の濃度がAβ₄₂凝集体の形状に影響について、酵素免疫測定法 (ELISA) 及び、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope : AFM)を用いて探索及び推察した。ELISAは、Aβ凝集体の大きさを評価するために用い、短時間で多くの試料の測定を行えるた

Effect of nonionic surfactant at low concentration
on the aggregation of amyloid β

Riyeong KIM and Kazuaki YOSHIMUNE

め、多くの試料をスクリーニングする際に便利である。

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。AFMでは1度に1つの試料しか測定できず、また測定に時間がかかるがA β の大きさを確実に確認することが可能である。

本報告では、ELISA及びAFMを用いた測定結果について報告する。

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化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-プロパノールを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°Cで16時間放置した後、37°C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°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¹⁾。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

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. 実験結果及び考察

3-1 ELISAを用いた評価

AFMとの結果の関連性の調査のため、A β 凝集体を300ppm tween80が含まれたPBSで1,2,3日放置した溶液を用いてELISAを行った(Fig.2)。

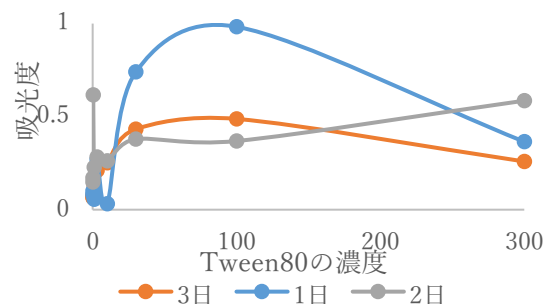


Fig. 1 A β_{42} 凝集体に対するTween80の影響

ELISAより、1日放置では吸光度が高く、2日以降放置すると低くなるのが分かった。

3-2 AFMを用いた評価

非イオン性界面活性剤によるA β_{42} 凝集体の形状への影響を調べるために、AFMを用いて調査した。

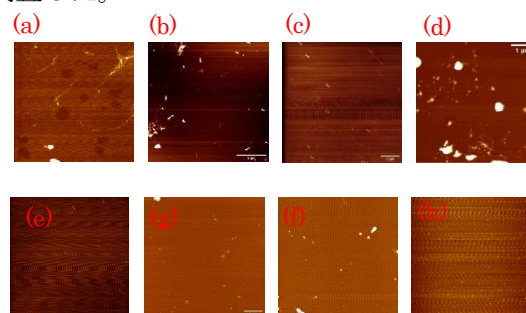


Fig. 3 A β_{42} 凝集体の形状の観察

A β 凝集体を300ppm tween80が含まれたPBSで(a)2,(b)3日、A β 凝集体を300ppm tween60が含まれたPBSで(c)2,(d)3日、A β 凝集体を300ppm tween40が含まれたPBSで(e)2,(f)3日、A β 凝集体をPBSで(g)2,(h)3日放置した。

4. 考察・まとめ

Tween60を加えたAFM画像よりA β_{42} 凝集体に界面活性剤を加えると、A β_{42} 凝集体が一度細分化されその後線維化に導く on-pathwayへ導かれると予想される。

また、ELISAとAFMの結果に関連性があるかは不明瞭である。

今後も更に界面活性剤がA β_{42} 凝集体に与える影響について検討し将来的にはADの治療や予防に貢献したい。

5. 参考文献

- 1) Sudipta, B. *et al.* PROTEINS, **2016**, 84(9), 1213-1223.
- 2) Sandra, R. *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications, **2012**, 420(1), 136-140.