

アデノシン三リン酸によるアミロイドβの線維化抑制

日大生産工(院) ○中村 桃佳 日大生産工 吉宗 一晃

1. 緒言

アルツハイマー病(Alzheimer's Disease : AD)は認知症の一種であり、世界的な高齢化に伴いAD患者数が増加し問題となっている。アミロイド仮説において、アミロイドβ (amyloid β : Aβ)タンパク質が脳内で凝集・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。今年 9月にADの新たな治療薬としてレカネマブが厚生労働省の承認を受け、ADの根本的な治療薬として期待されている。レカネマブは抗体を用いてAβを取り除くことで神経細胞の死滅を防ぎ病気の進行を抑える薬である。すでに壊れてしまった神経細胞を再生させることは難しいため、認知機能障害を発症する前の軽度認知障害などの早期に投与することが重要である。AD進行後の根本的な治療法が確立していない現在、ADの予防が重要となる。本研究ではAβの凝集を防ぎ脳からの排出を促進させることで、Aβの脳への蓄積を防ぎ、ADの根本的な治療や予防への活用を目指す。このため、Aβの凝集を抑制する物質を探索している。

Aβはアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein : APP) からβセクレターゼとγセクレターゼの2種類の酵素によって切断されて生産される。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が生産される。体内で生産される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ち、疎水性がより強く凝集しやすいため毒性が強い。そのため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生産されるものではなく、健康な人の脳内でも生産されている。通常は生産されてもすぐに分解され脳外へと排出されるが、生産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ことでAD発症の原因となる。

水系の体内において、Aβ₄₂はモノマーからオリゴマーへと変化し、無秩序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、一度凝集してしまうと溶解が困難となる。そのため、線維化を抑制することが脳内のAβの蓄積を防ぐために重要となると考えられる。

Aβ₄₂の凝集過程を再現する実験において、水溶液中での凝集性が高いAβ₄₂の脳内で生産された直後のモノマーの状態を維持することは難しい。O-acyl isoAβ₄₂は非凝集性のAβ₄₂であり、使用直前に緩衝液中で中和することによりAβ₄₂モノマーに変換される特徴を持つ。

O-acyl isoAβ₄₂を用いることでAβ₄₂の凝集過程を再現した実験系の確立が可能となる。

酵素免疫測定法(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。Aβ₄₂と特異的に反応する抗体を用いることで、Aβ₄₂を検出する。抗体77-3は、直径50 nmから220 nmの非晶質Aβ₄₂凝集体と特異的に反応する抗体である¹⁾。

原子間力顕微鏡(AFM)は走査顕微鏡の一種であり、探針先端の原子と試料表面の原子の間に働く原子間力により生じる斥力を探知し、試料表面の凹凸を測定する。Aβ₄₂の実際の形状を観察できる。

チオフラビンT (ThT)は蛍光物質であり、βシート構造多く含むアミロイド線維と特異的に結合し発光する物質である。二つの平面部位が単結合により結合した構造を持ち、光励起されてもベンゾチアゾール環とアミノベンゼン環が単結合を軸に回転することで蛍光の発光は抑制される。しかし、アミロイド線維と結合することで、ベンゾチアゾール環とアミノベンゼン環が固定化され、回転が阻害されて蛍光を発する²⁾。

近年の研究においてAD患者でない人に比べAD患者の脳組織のアデノシン三リン酸(ATP)含量が低いことが報告され³⁾、ATPとADの関連性が注目されている。ATPは疎水性のアデノシン部分と親水性のリン酸エステル部分から構成され、水溶液中で疎水性部位を安定化させるハイドロトープして働き、様々なタンパク質と結合することで疎水物質の溶解性や凝集に影響を与えることが分かっている。

本研究では、Aβ₄₂の線維化を抑制し脳内のAβ₄₂の蓄積を防ぐ物質の評価を目的とし、ELISA、AFMおよびThT蛍光測定を用いてATPのAβ線維化抑制の効果を測定した。

2. 実験方法

2-1 Aβ凝集

本実験ではAβ₄₂として、O-acyl isoAβ₄₂を用いた。O-acyl isoAβ₄₂をAβ濃度が88.6 μMとなるようリン酸緩衝生理食塩水(PBS)または10 mMのATP溶液に懸濁した。ATPは水溶液中で酸性を示す為、ATPをPBSに溶解し、水酸化ナトリウムでpH 7.5に調整したものをATP溶液として用いた。この懸濁したAβ₄₂を37 °Cで静置し、ELISAおよびAFMに用いた。

2-2 ELISA

PBSまたはATP溶液に懸濁したAβ₄₂を抗原としてプレートに固定化し、Aβ₄₂と特異的に反応するモノクローナル抗体77-3との反応性を492 nmの吸光度で測定し

た。抗体との反応性の変化から、 $A\beta_{42}$ の表面の形状変化を評価した。

2-3 AFM

$A\beta_{42}$ をPBSまたはATP溶液に懸濁し静置した後、雲母片上に塗布し、減圧乾燥機で30分乾燥させた試料を用いて $A\beta_{42}$ の形状変化を観察した。

2-4 ThT蛍光測定

ThTの蛍光強度を測定することで、 $A\beta_{42}$ の線維化の程度を定量した。本実験ではPBSまたはATP溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ に100 μ MのThT溶液を添加し、励起波長445 nm、蛍光波長485 nmで蛍光測定を行った。

3. 実験結果および考察

3-1 ELISAによる評価

PBSに懸濁した $A\beta_{42}$ とATP溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ の抗体77-3との反応性の変化をELISAにより比較した(Fig.1)。ATP添加による $A\beta_{42}$ の抗体77-3との反応性の有意な差は見られなかった。これより、ATPは抗体77-3が認識するエピトープにはほとんど影響を与えないことが示唆された。

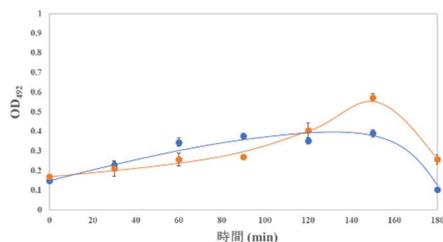


Fig. 1. ELISAを用いた評価による $A\beta_{42}$ 凝集に対するATPの効果 (青:PBS、オレンジ:ATP)

3-2 AFMによる観察

ATP溶液に $A\beta_{42}$ を懸濁し、 $A\beta_{42}$ の形状変化をAFMにより経時的に観察した。

PBSに懸濁した $A\beta_{42}$ (Fig 2)では懸濁後30分に非晶質凝集体の形成が見られ、24時間経過後には線維状凝集体の形成が確認された。懸濁4日後には線維状凝集体の形成とともに非晶質凝集体の凝集が見られた。一方、ATP溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ (Fig 3)は、懸濁4日後まで非晶質への凝集が見られ、線維状の凝集体の形成は確認されなかった。このことから、ATPの添加により、 $A\beta_{42}$ の線維状凝集体の形成が抑制されることが示唆された。

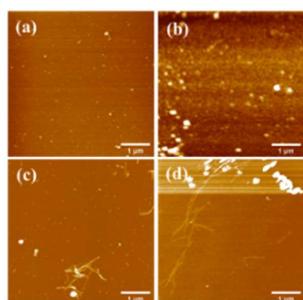


Fig. 2. $A\beta_{42}$ 凝集のAFM画像 (a)懸濁直後、(b)30分後、(c)24時間後、(d)4日後)

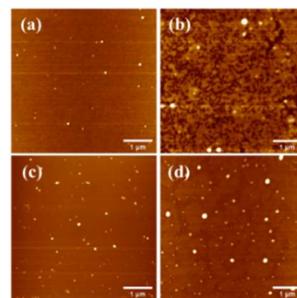


Fig. 3 ATP溶液中での $A\beta_{42}$ 凝集のAFM画像 (a)懸濁直後、(b)30分後、(c)24時間後、(d)4日後)

3-3 ThT蛍光測定による評価

$A\beta_{42}$ 線維化の程度を確認するために、ATP溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ のThT蛍光測定を行った(Fig.4)。

$A\beta_{42}$ をPBSに懸濁したATPを添加していない $A\beta_{42}$ は時間経過につれて蛍光強度の上昇が見られた。一方、ATP溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ は測定開始200分後まではPBSに懸濁した $A\beta_{42}$ に比べ強い蛍光が見られたが、それ以降の蛍光の上昇は抑制されることが確認された。この結果から、PBSに懸濁した $A\beta_{42}$ では、凝集開始200分までに線維状凝集体の核となる凝集が形成され、核形成後に線維形成が急激に進んだと考えられる。ATPを添加することにより、線維の核の形成が阻害され、非晶質凝集体の形成が優先されて線維化が抑制されたと推測する。このことから、AFMでの観察と同様に、ATPの添加により $A\beta_{42}$ の線維化が抑制されることが示唆された。

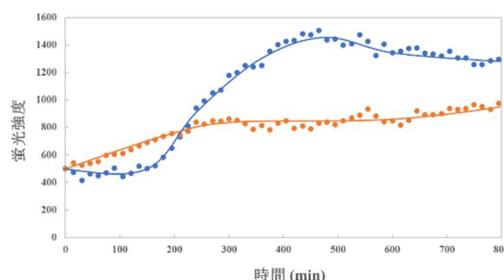


Fig. 4 ATP溶液に懸濁した $A\beta_{42}$ のThT蛍光測定 (青:PBS、オレンジ:ATP)

4. まとめ

AFMによる観察およびThT蛍光測定による結果から、ATPの添加により $A\beta_{42}$ の線維化が抑制されることが示唆された。ATPのハイドロトープ効果により $A\beta_{42}$ の線維状凝集体の核の形成が阻害され、線維化が抑制されると推測する。脳内ATPの低下が $A\beta_{42}$ の線維化及び蓄積に関与していることが考えられる。

5. 参考文献

- 1) Shimizu, T. *et al.*, *Glob. J. Res. Anal.*, **2015**, *4*, 117-119.
- 2) Biancalana, M. *et al.*, *BBA.*, **2010**, *1804*, 1405-1412.
- 3) Sims, NR. *et al.*, *J. Neurochem.*, **1983**, *41(5)*, 1329-1334.