

非晶質アミロイドβ凝集体の形成過程の評価

日大生産工(院) ○CUI JING 日大生産工 吉宗一晃

1. 緒論

認知症の過半数を占めるアルツハイマー病は脳内に蓄積されるアミロイドβ(Aβ)凝集体によって引き起こされると考えられている。本研究ではAβの非晶質凝集体を簡便に検出する方法の開発を目指した。

世界的な高齢化により認知症患者の増加が予測されている。約10年前の2012年では認知症患者数が約460万人、高齢者人口の15%という割合だったものが2025年には5人に1人、高齢者の20%が認知症になると考えられている。認知症の高齢者人数の推移で、2025年5人に1人が認知症になると考えられている。1)認知症患者が増加することにより認知症の中でも最も割合の多いアルツハイマー病患者が増加していくことが予想される。現在アルツハイマー病は病期の進行を食い止める治療手段がまだ実現していない難治の疾患で、予防・治療法の確立は急務である。

Aβは40個程度のアミノ酸からなるタンパク質である。疎水性アミノ酸残基を多く持つため、水系の体内で高い凝集性を示す。Aβはアミロイド前駆体タンパク質から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産生される。アミロイドβ仮説において、アルツハイマー病の原因は脳内のAβ凝集と考えられている。Aβは脳内の神経細胞に凝集・沈着し、脳内の神経細胞を死滅させる。Aβオリゴマーが大きな非晶質Aβ凝集体となる経路をoff-pathwayと呼び、線維状凝集体となる経路をon-pathwayと呼ぶ(図1)。これまでの研究で、非晶質のアミロイドβ凝集体を線維状凝集体とするon-pathway経路に誘導し、その過程で生じる小さなアミロイドβ凝集体を安定化させる方法を*in vitro*系で明らかにした。Aβ線維状凝集体は、比較的安定した構造を持つため蛍光色素チオフラビンT(ThT)に結合することで特徴的な蛍光を発生し、観察・解析することができる²⁾。しかし、非晶質凝集体は、不規則な形状を持っているために、特定の

パターンが得られず、その凝集の評価が非常に困難である。Aβは凝集性が高くすぐに凝集してしまうためAβの凝集を評価することは難しいが、Aβ凝集体の三次元的な構造を認識できるモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法(ELISA)によりAβ凝集体の大きさを評価できる。また、ELISAでは短時間で多くの試料の測定を行えるため、多くの試料をスクリーニングする際に便利である。

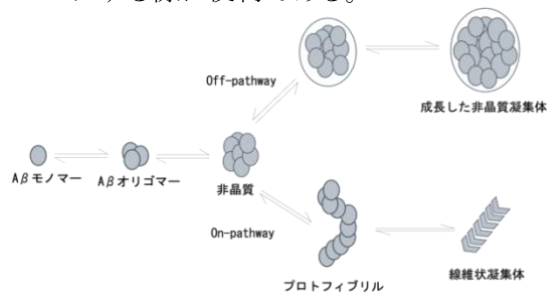


図1 Aβの凝集経路

Aβは凝集しOn-pathwayに進むと線維状凝集体となり、Off-pathwayに進むと非晶質凝集体となる。

本研究ではAβ凝集体と特異的に反応することがわかっているモノクローナル抗体77-3を使用した。³⁾ELISAでは抗原をHRP標識抗体で直接検出する直接ELISAで行った。抗体77-3は非晶質凝集体表面に形成されるエピトープと反応する。過去の論文では有機溶媒フルオロプロパノールでモノマー化したAβの凝集を観察していたが、今回はiso-ペプチドを用いる。

ELISAでの評価で効果を持つ物質による凝集予防・細分化効果は原子間力顕微鏡(AFM)で確認した。AFMでは一度に1つの試料しか測定できず、1つの試料の測定に時間がかかるものの、Aβ凝集体の大きさを確実に確認できる。凝集性の高いAβモノマーの調製は難しいため26-O-アシルイソペプチドAβ(Aβイソペプチド)をAβモノマーとして用いた。このAβイソペプチドはジメチルスルホキシド

Evaluation of aggregation process of amorphous amyloid β

Jing CUI and Kazuaki YOSHIMUNE

(DMSO)中では凝集せず、中性の水溶液中において半減期約 1 分で凝集性のあるペプチドとなり凝集を開始した。

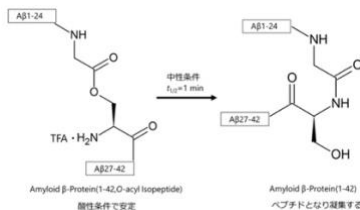


図2 iso-ペプチド

A β イソペプチドは、O-to-Nの分子内アシル化転移反応によって、半減期1分で通常のA β に化学的に変換される。

本研究では迅速で簡便に非晶質凝集体を検出するための方法を検証した。研究ではELISAとAFMを用いてA β 凝集の経時変化を評価する方法を確立した。

2. 実験方法

2-1 A β モノマーの凝集

DMSOで溶解したA β モノマー(4.4mg/ml)をPBSに懸濁し凝集を開始し、37°Cで放置した。形成した凝集体を経時的に分取し、ELISA、ThTおよびAFMでの観察に用いた。

2-2 ELISAによる評価

恒温槽で静置したA β 凝集体試料を96 wellプレートに加え、A β 凝集体に対する抗体77-3を用いたELISAで検出した。

2-3 AFMによる評価

AFMの試料は37°Cで放置したA β 凝集体試料を雲母片に滴下し、減圧乾燥により短時間で乾燥させた。試料はシリカゲルを入れた密閉容器で保存した。

2-4 ThTによる評価

ThTは線維状のA β 凝集体と結合し、445 nm付近の光を吸収し485 nm付近で大きな蛍光を発生し、アミロイド線維化の進行状況をモニタリングした。

3. 実験結果

A β モノマーの凝集を抗体77-3を用いELISAで評価した結果、凝集開始から90分まで吸光度が上昇し、この時間を境に吸光度が低下した(図3)。形成した凝集体をAFMで評価した結果、4日間で線維状凝集体の形成が見られた。(図4)。

抗体が最も反応する時間までは抗体の反応できる大きさのアミロイド β 凝集体が増えてい

て、抗体が最も反応する時間以降では、抗体の反応できる大きさよりも大きいアミロイド β 凝集体が増えて、抗体の反応性が低くなっていると考えられる。存在下A β 凝集体の線維化の評価を行った。その結果、A β のみでは300分付近から蛍光強度が上昇していった

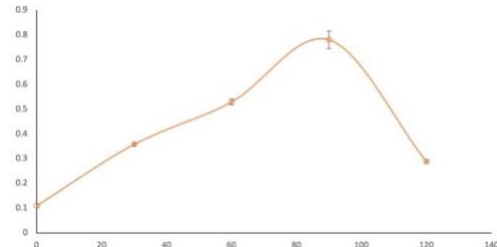


図3 抗体77-3で検出したA β 凝集の経時変化
A β 凝集の経時変化を抗体77-3を用いたELISAで測定した。

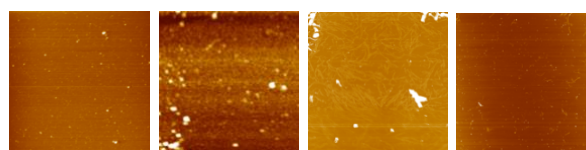


図4 AFMの結果

形成したA β 凝集体をAFMで測定した。左から0分、30分、1日、4日間経過後の結果を示す。

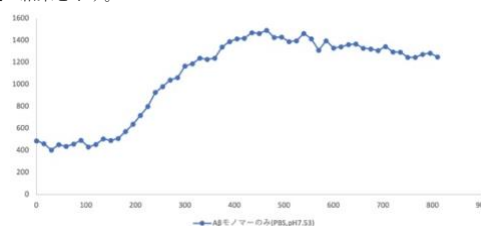


図5 蛍光測定の結果

37°Cにおける100 mM ThTを加えた場合のA β 凝集の経時蛍光変化を測定した。

4. まとめ

A β 凝集の経時変化を抗体77-3を用いたELISAで評価した結果、凝集開始から90分まで吸光度が上昇し、この時間を境に吸光度が低下した(図3)、それでThTの値が上昇してきた。(図5)抗体が最も反応する時間までは抗体の反応できる大きさのアミロイド β 凝集体が増えていて、抗体が最も反応する時間以降では、抗体の反応できる大きさよりも大きいアミロイド β 凝集体が増えて、ThTとの反応性が高くなると考えられる。

参考文献

- 1) 平成29年 高齢社会白書外部サイト 第1章 第2節 3 高齢者の健康・福祉
- 2) Petr, K. *et al.*, *CNS Drugs*, **2017**, *31*, 495-509
- 3) Shimizu, T. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **2012**, *115*, 216-220