

長鎖脂肪酸によるアミロイドβの凝集制御

日大生産工(院) ○曾時萌 日大生産工 吉宗一晃

1. 緒論

認知症の約半数を占めているアルツハイマー病 (AD) の病理学的な変化には、アミロイドβ (Aβ) というタンパク質が主成分である老人斑の形成がある。アミロイド仮説によれば、Aβの異常な蓄積が正常な脳の神経細胞を損傷し、脳の収縮を引き起こす。

Aβは約40個のアミノ酸からなるタンパク質であり、凝集性が高く神経細胞毒性を示す。アミロイド仮説において、ADではAβの分解や排出が不十分になり、蓄積が進行するため、神経細胞にダメージを与えられている。Aβには主にAβ₄₀とAβ₄₂があり、Aβ₄₀は40番目のアミノ酸残基Valで終わり、Aβ₄₂は42番目のアミノ酸残基Alaで終わる。Aβ₄₂はC末端に疎水性アミノ酸残基を2つ多く持つため凝集力が強く、ADの初期から優位に蓄積する。Aβを可溶化・小型化し脳から排出することで、ADを治療できる可能性がある。

脂肪酸とは、炭素数が4以上の直鎖状のカルボン酸で、炭素鎖の末端にはカルボキシル基が存在する。脂肪酸には、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の2つの種類がある。一般的に炭素数が6個以下のものを短鎖脂肪酸、7~10個のものを中鎖脂肪酸、12個以上のものを長鎖脂肪酸と言う。近年の先行研究において、不飽和脂肪酸は疎水性物質なので、特にAβの疎水性アミノ酸残基が多い領域に結合し、疎水性相互作用によりAβ凝集体を細分化する効果がある⁽¹⁾。そして、脂肪酸の濃度によりAβの凝集経路が変化することも報告されている⁽²⁾。

Aβモノマーがオリゴマーの状態を経て非晶質の凝集体あるいは線維状の凝集体になることが分かっている。Aβの凝集経路には、Aβオリゴマーが大きな非晶質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)。線維状凝集体は結晶性の高い凝集体であり、一度脳内に沈着してしまうと脳内での分解や脳内からの排出が困難になる。本研究はAβモノマーからの凝集体の形成過程において、Aβ凝集体の形成を

抑制してADを予防することを目的とする。炭素数が18の長鎖脂肪酸としてのステアリン酸とオレイン酸を利用して、長鎖脂肪酸のAβ凝集抑制効果を探る。ステアリン酸とオレイン酸どちらも長鎖脂肪酸であるが、それぞれ飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸であり、Aβに対する長鎖脂肪酸の抑制効果を探るために、これらの効果を比較する。

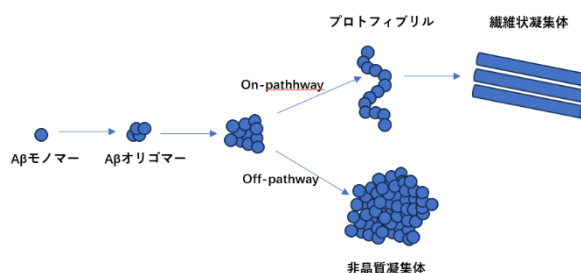


図1. Aβの凝集経路

2. 実験方法

2-1 Aβモノマー

凝集性の高いAβモノマーの調製は難しいため26-O-acyl iso Aβ₄₂をAβとして用いた。26-O-acyl iso Aβ₄₂はジメチルスルホキシド (DMSO) では凝集しないが、中性水溶液では約1分の半減期で凝集可能なペプチドとなり、凝集を開始する。

2-2 ELISAによる評価

直接ELISA法で小型Aβ凝集体の検出を行った。直接ELISAは、プレート上に抗原固定し、試料中のターゲット抗原を検出するために、特定の酵素標識抗体を使用することで機能する。測定する抗原の存在量を定量的に測定することができる。本実験では、Aβ凝集体を抗原として、50 nm から 220 nm の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を使い、Aβモノマーの凝集抑制効果を調査した。

2-3 ThTによる評価

チオフラビンT (ThT) はアミロイド線維の検出に用いられるアミロイド特異的蛍光色素である。本実験では、ThTを用いてアミロイド

Suppression of amyloid β aggregation by long chain fatty acids

Shimeng ZENG and Kazuaki YOSHIMUNE

線維形成反応の線維化形成効果と経時変化を観察した。

2-4 AFM による評価

本実験では、 $A\beta_{42}$ 凝集体の形状変化を観察するためにAFMを使用した。AFMの試料は、スライドガラスに雲母板を貼り付け、観察する試料を数 μL 滴加し、可溶性 $A\beta_{42}$ 凝集体の凝集を防ぐために室温で30分間乾燥させて調製した。調製した試料は、AFMで観察し、得られた画像の平均直径はImageJ解析ソフトを使用して解析した。

3. 実験結果と考察

長鎖脂肪酸ステアリン酸とオレイン酸の $A\beta$ 凝集抑制効果をThT蛍光試料で評価した。線維化の効果がより顕著である場合、また、ThTによる吸光度が高いほど、脂肪酸が $A\beta$ に非晶質凝集体の凝集抑制効果を持たないことが示唆される。ステアリン酸とオレイン酸を、それぞれ0.1 wt/v%、0.03 wt/v%、0.01 wt/v%の濃度で評価した(図2)。

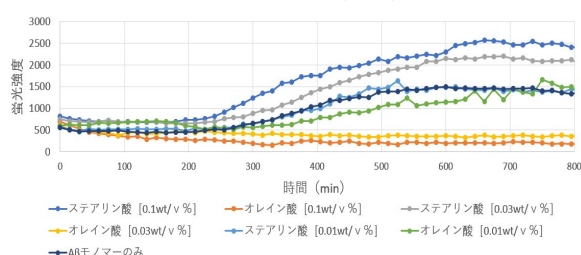


図2. ThTで測定された吸光度の変化

ステアリン酸存在下における $A\beta$ モノマー試料の吸光度は、時間の経過と共に増加する傾向があった(図2)。一方、オレイン酸存在下における $A\beta$ モノマー試料の吸光度は、時間の経過と共に減少する傾向があり、脂肪酸を添加しない $A\beta$ モノマーのみの試料の吸光度よりも低かった。ステアリン酸の繊維化効果はより顕著であり、これは凝集抑制効果も低いことを示している。一方、オレイン酸は $A\beta$ に対する凝集抑制効果が大きいことがわかった。

次に、ELISAにより、ステアリン酸とオレイン酸の凝集抑制効果を調査した(図3)。

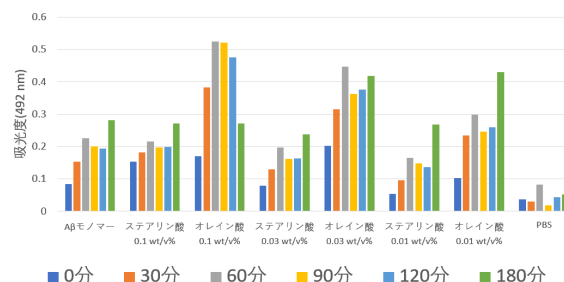


図3. ステアリン酸とオレイン酸の $A\beta$ モノマーの凝集抑制への効果

脂肪酸を含まない $A\beta$ モノマーと比較して、オレイン酸を添加した $A\beta$ モノマーは、一定時間経過後の抗体との反応性が高い一方、ステアリン酸では有意な変化が見られなかった。したがって、オレイン酸には $A\beta$ 凝集を抑制する効果があることがわかった。

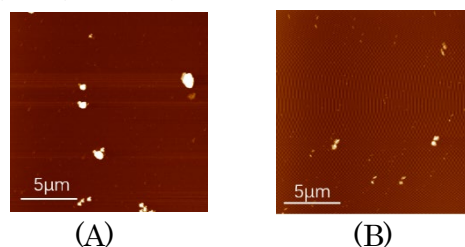


図4. 脂肪酸存在下で形成された $A\beta$ 凝集体
また、(A)ステアリン酸及び(B)オレイン酸存在下で $A\beta$ モノマーを凝集させ、その形状をAFMで観察した(図4)。ステアリン酸存在下で $A\beta$ モノマーを30分放置(37°C)して形成される凝集体(A)の大きさは、オレイン酸存在下で $A\beta$ モノマーを1日で放置(37°C)して形成される凝集体(B)の大きさより更に大きかった。

4. まとめ

不飽和脂肪酸および長鎖脂肪酸としてのオレイン酸は、 $A\beta$ モノマーに対する凝集抑制効果を有することがわかった。飽和脂肪酸で長鎖脂肪酸であるステアリン酸は、 $A\beta$ モノマーに対して有意な凝集抑制効果を示さなかった。アルツハイマー病の治療法の開発に向けて、抑制効果がある物質の研究が進められている。

参考文献

- (1) Shatshat, A, E. *et al.* Archi. Biochem. Biophys., 2019, 663, 34-43.
- (2) Rana, P. *et al.*, Sci. Rep., 2017, 10370, 7.