ISSN 2186-5647

8-2

アミロイドβ42の非晶質凝集体の細分化に対する長鎖脂肪酸ミセルの影響

日大生産工(院)
○曾時萌　日大生産工 吉宗一晃

1. 緒論

アルツハイマー病（AD）は、脳内の病理学的な変化が原因で発症し、認知症の約半数を占めている。この変化の中心には、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。

アミロイド仮説において、ADではAβの分解が不十分になり、蓄積が進行するため、神経細胞にダメージを与える。Aβ42はC末端に疎水性アミノ酸残基（Ile、Ala）を有しているため高い凝集性があり毒性が高いとされている。Aβ42は凝集力が強く、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。不飽和脂肪酸には、炭素鎖の中に二重結合を持つもので、一価不飽和脂肪酸と多価不飽和脂肪酸の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と考えられている[(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)]。

脂肪酸の臨界ミセル濃度（CMC）とは、界面活性剤や脂肪酸などの両親媒性分子が、一定の濃度に達すると、単分子ではなくミセルと呼ばれる集合体を形成し始める最小の濃度を指す。CMCに達すると、分子は水中で自発的に集まり、球状のミセル構造を形成する。そして、超音波処理を行うと、脂肪酸分子は迅速にミセルを形成する。

Aβペプチドの凝集経路には、Aβ42凝集体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。本実験では、炭素数は18の長鎖脂肪酸としての飽和脂肪酸のステアリン酸と不飽和脂肪酸のオレイン酸をAβ42凝集体に添加し、オレイン酸とステアリン酸の異なるCMCに基づいて、非晶質凝集体に対する長鎖脂肪酸濃度の影響を探索する。オレイン酸のCMCは0.03 wt/ｖ%で、ステアリン酸のCMCは0.015 wt/ｖ%である。本実験では、脂肪酸の濃度とミセル化がAβ凝集体の脱凝集効果に及ぼす影響を議論するために、脂肪酸濃度を0.03 wt/v%および0.1 wt/v%に設定した。0.03 wt/v%では、ステアリン酸はCMCを超えてミセルを形成するが、オレイン酸はCMC付近でほとんどミセルを形成しない。一方、0.1 wt/v%では、両脂肪酸ともCMCを超えてミセルを形成する。超音波処理により、脂肪酸分子は迅速にミセル化し、均一な分散が促進された。超音波処理後、Aβ凝集体を添加して脱凝集効果を評価した。

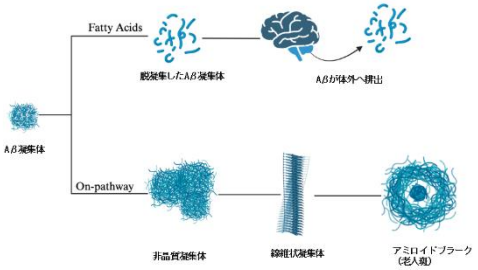

図 1　Aβ の凝集経路

2. 実験方法

2-1 ELISAによる評価

酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）で小型Aβ凝集体の検出を行った。直接 ELISA で、抗原をプレートに直接固定し、酵素標識された一次抗体を使用して試料中の抗原を検出する。操作が簡単で、二次抗体を必要としないため、実験の手順が短縮され、迅速な結果が得られるという利点がある。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、小さい脱凝集した Aβ凝集体の表面と特異的に反

The Effects of Long-chain Fatty Acids on the Amorphous Aggregates of Amyloid-β42

Shimeng ZENG

応するモノクローナル抗体 75-2 を使い、脂肪酸を添加した Aβ42 凝集体の脱凝集効果を調査した。

2-2 AFM による評価

本実験では、Aβ42凝集体の形状変化を観察するために原子間力顕微鏡 (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 Aβ42 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 で観察した。

2-3 超音波処理でミセルを形成

脂肪酸は水に溶けにくいため希釈だけでは溶液中で分離してしまい可溶化 Aβ42 凝集体との複合体形成が安定しない。そこで、ホモジナイザーを使用して超音波処理で脂肪酸溶液を乳化させ、ミセルを形成し、可溶化 Aβ42 凝集体と脂肪酸の複合体形成の安定化を試みた。

3. 実験結果と考察

AFMで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%の濃度で評価した。

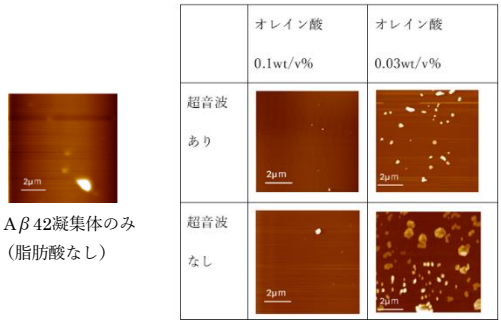

図 3　オレイン酸を添加したAβ42凝集体

オレイン酸存在下37℃で1日放置したAβ42凝集体に対する異なる濃度の影響を示した（図2）。オレイン酸の濃度が0.1 wt/v%を超えると、CMCを上回るため、超音波処理の有無にかかわらず脱凝集が確認された。一方、0.03 wt/v%ではオレイン酸のCMC付近でミセルを形成しにくい、脱凝集が難しいが、超音波処理によってわずかな効果が認められた。これにより、ミセル形成と超音波処理がオレイン酸の脱凝集効果を高める重要な要因であることが示唆された。

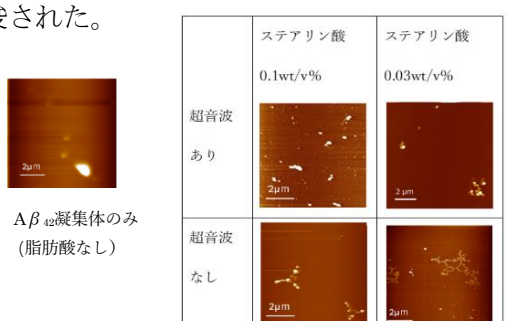

図 4 オレイン酸を添加したAβ42凝集体

ステアリン酸を0.1 wt/v %や0.03 wt/v %添加した場合、Aβは非晶質または線維状の凝集体を形成した。これらの結果は、ステアリン酸がAβ42凝集体の分解に対して大きな効果を持たないことを示唆している（図3）。

次に、ELISAにより、ステアリン酸とオレイン酸の脱凝集効果を調査した(図4, 図5)。

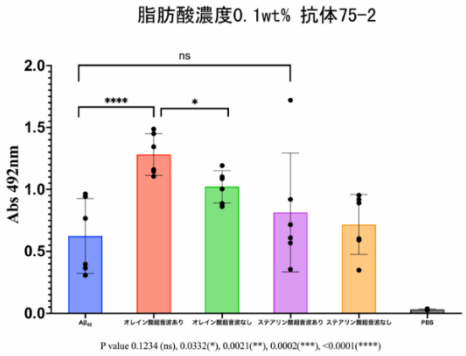

図 5　脂肪酸 (0.1wt/v%) がAβ42凝集体に対する脱凝集効果

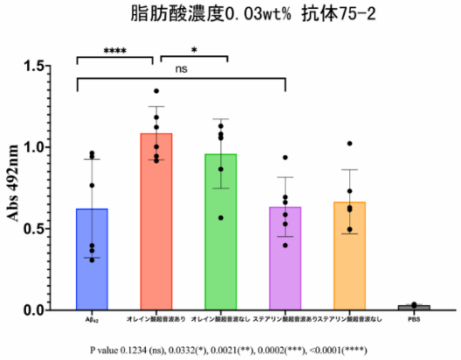

図 2 脂肪酸 (0.03 wt/v%) がAβ42凝集体に対する脱凝集効果

オレイン酸がAβ42凝集体の脱凝集に対して最も効果的であり、特に超音波処理を行うことでその効果が最大限に引き出されることがわかる。

ステアリン酸は炭素鎖が一重結合で安定した直線構造を持つ一方、オレイン酸は二重結合を含み、分子に柔軟性を与える。このため、飽和脂肪酸であるステアリン酸はAβ脱凝集に対する効果が低い可能性があるが、不飽和脂肪酸であるオレイン酸は二重結合を介してタンパク質構造に干渉し、分解を促進する。また、ミセル形成により脂肪酸の水溶性が向上し、Aβ凝集体との結合が強化され、分解が促進されることが示唆される。

参考文献

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