

局所的 pH 変動が A $\beta$ <sub>42</sub> 線維形成に与える影響

日大生産工(院) CUI JING 日大生産工 吉宗一晃

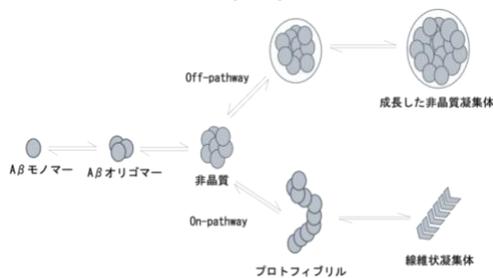
## 1. 緒論

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 $\beta$ (A $\beta$ )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、不均一pH条件下でのA $\beta$ <sub>42</sub>モノマーの凝集変化を調べた。

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。<sup>1)</sup>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。

A $\beta$ 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。A $\beta$ はアミロイド前駆体タンパク質から $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ 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 $\beta$ 仮説において、アルツハイマー病の原因は脳内のA $\beta$ 凝集と考えられている。A $\beta$ 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。A $\beta$ オリゴマーが大きな非晶質A $\beta$ 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)<sup>5)</sup>。これまでの研究で、非晶質のアミロイド $\beta$ 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 $\beta$ 凝集体を安定化させる方法を *in vitro* 系で明らかにした。従来の研究によると、A $\beta$ <sub>42</sub>の凝集は均一系の pH によっても大きく影響を受ける、その上で、不均一系の pH が A $\beta$ <sub>42</sub>の凝集に対する pH の影響を明らかにする必要がある。A $\beta$  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し、観察・解析することができる。原理としては、tht は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ます。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します。つまり、アミロイド線維が形成されると、ThTの蛍光が著しく増加し、Abの繊維化の程度を評価することができる。<sup>2)</sup>

図1 A $\beta$ の凝集経路

A $\beta$ 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

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A $\beta$ の凝集を観察していたが、今回は iso-ペプチドを用いる。凝集性の高いA $\beta$ モノマーの調製は難しいため26-Oアシルイソペプチド A $\beta$ (A $\beta$  イソペプチド)<sup>4)</sup>をA $\beta$ モノマーとして用いた。このA $\beta$ イソペプチドはA $\beta$ の26番目のアミノ酸をアシル化したもので、ジメチルスルホキシド(DMSO)中では凝集せず、中性の水溶液中において半減期約1分で自発的にA $\beta$ モノマーに変換される特徴を持ち、A $\beta$ の凝集過程を再現することができる。

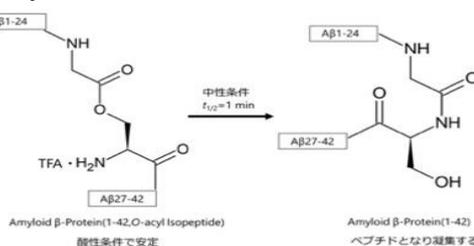


図2 iso-ペプチド

Effect of Local PH Variation on A $\beta$ <sub>42</sub> Fiber Formation

Jing CUI and Kazuaki YOSHIMUNE

A $\beta$ 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 $\beta$ に化学的に変換される。

## 2. 実験方法

### 2-1 A $\beta$ モノマーの凝集

DMSOで溶解したA $\beta$ 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、実験を行った。

### 2-2 ThT による評価

ThT は線維状の A $\beta$  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。

### 2-3 AFM による評価

AFM の試料は 37°C で放置した A $\beta$  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

## 3. 実験結果

均一系pHの条件下でA $\beta$ を凝集させ、ThT存在下で経時的な蛍光変化した結果、pH 6の条件では、約5時間を経過すると蛍光強度が徐々に上昇し、これは線維状構造の形成が進行していることを示唆している。それで、pH 7.4の条件では、蛍光強度にあまり強い変化見られなかった、つまり、A $\beta$ の凝集はpHに強く影響を受けると考える。(図3) AFMによる観察も同じ結果が得られた。それで、不均一系がA $\beta$ の凝集に影響をもたらす可能性を考えて、グルタミンとグルタミンナーゼを利用して部分的塩基性環境を作り、蛍光測定をした。結果を見ると、A $\beta$ のみとグルタミンなどの結果には抑制が見られず、蛍光強度が上昇し、繊維状が形成されたが、グルタミンとグルタミンナーゼが混合されたモノマーは蛍光強度が低く、繊維状が形成されなかった。つまり、部分的pHの変化がA $\beta$ の凝集に影響がえると推測できる (図4)

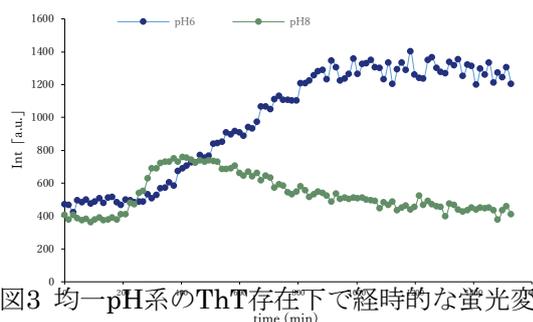


図3 均一pH系のThT存在下で経時的な蛍光変化

100 mM ThT を加えた場合のA $\beta$ 凝集の経時蛍光変化を測定した。

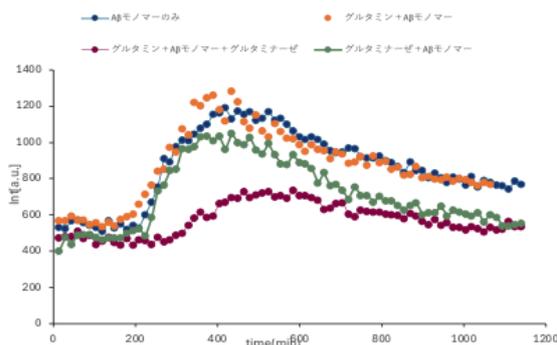


図4 不均一pH系のThT存在下で経時的な蛍光変化  
100 mM ThT を加えた場合のA $\beta$ 凝集の経時蛍光変化を測定した。

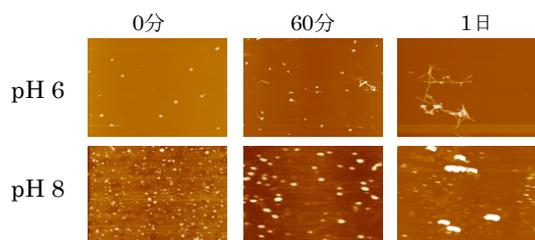


図5 AFMの結果

形成したA $\beta$ 凝集体をAFMで測定した。上からpH6、8左から0分、60分、1日経過後の結果を示す。

## まとめ

A $\beta$ の凝集がpHによって異なる挙動を示すことが確認され、その上で、局所的なpHの変動がA $\beta$ の凝集メカニズムに影響を与える可能性が示唆された。つまり、pHがA $\beta$ の凝集挙動に対する重要な因子であり、特に不均一な環境下ではpH変動が線維形成の抑制につながる可能性があると考えられる。

## 参考文献

- 1) Nichols, E. *et al.*, *Lancet*, **2022**, 7, e105-125
- 2) Petr, K. *et al.*, *CNS Drugs*, **2017**, 31, 495-509
- 3) Shimizu, T. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **2012**, 115, 216-220
- 4) Sohma, Y. *et al.*, *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 5965-5968
- 5) Hardy, J. *et al.*, *Science*, **1992**, 256(5054), 184-185.