

アミロイドβ凝集体に形成されるエピトープのpH依存性

日大生産工(院) ○XU JIAYI 日大生産工 吉宗 一晃

1. 緒論

現在、日本における65歳以上の認知症患者数は約700万人と推定されており、2030年には約800万人を超えると予測されている¹⁾。認知症の過半数を占めるアルツハイマー病(AD)の発症要因の一つとして、アミロイドβ(Aβ)の脳内における凝集が考えられている。しかし、現時点ではADに対する根本的な治療薬は存在せず、有効な治療法も限られている。そのため、治療法開発の手がかりとなるAβ凝集体の性質を理解することが重要である。Aβ凝集体は様々な形態があり、我々はこれらの凝集体に特異的に形成されるエピトープに特異的に結合する抗体を報告している。本研究では、異なるpHの条件下で凝集させたAβのエピトープを酵素免疫吸着測定法(ELISA)で評価し、pHによるAβの凝集経路への影響を評価する。

Aβは約40個のアミノ酸からなるペプチドで、疎水性残基を多く含むことから、水中で高い凝集性を示す。Aβはアミロイド前駆体タンパク質(APP)がβセクレターゼとγセクレターゼによって切断されて生成される²⁾。アミロイド仮説によれば、アルツハイマー型認知症(AD)の発症には、脳内でのAβの凝集が関与していると考えられている。Aβは神経細胞に蓄積し、これにより神経細胞の死滅や脳萎縮を引き起こす。Aβが、モノマーからオリゴマーを経て大きな非晶質凝集体となる経路をoff-pathway、線維状凝集体を形成する経路をon-pathway³⁾と呼ぶ(図1)。

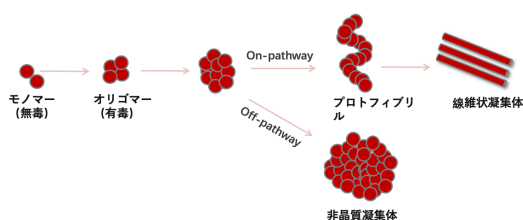


図1. Aβの凝集経路

Aβの凝集過程は、線維状凝集体やオリゴマーなど多様な形態を経て進行することが知られており、この過程はpHの影響を受けることが示唆されている。pH条件が異なると、これらの凝集中間体の生成や経路の選択性が変化

し、最終的な凝集体の構造や性質にも影響を与える可能性がある。そのため、本研究では、Aβの凝集に対するpHの影響を明らかにすることを目的とし、異なるpH条件下での凝集体形成やエピトープの変化を評価した。異なるpH条件下でAβ凝集体に形成されるエピトープの反応性は、Aβペプチドの電荷状態や分子間相互作用がpHに依存するため変化する。例えば、pH6ではAβの等電点付近にあたり、分子全体の電荷がほぼ中和されるため、静電反発が弱まり疎水性残基間の相互作用が促進され、モノマーからオリゴマー、さらにプロトフィブリルや線維状凝集体への形成が進行しやすくなる。pH7.0やpH7.4では、分子はわずかに負電荷を帯び、静電反発が増すことで凝集の進行がやや抑制される。一方、pH8では負電荷がさらに増加するため、凝集速度や中間体形成はより抑制されやすい。このように、pHはAβ凝集経路の選択性や中間体の安定性に大きく影響することから、抗体31-2を用いたpH依存性解析は凝集過程の微視的理解に重要である。そのため、AβモノマーはpH6.0、7.0、7.4、8.0という異なるpH条件の緩衝液に希釈して凝集を開始させた。希釈後の溶液は37°Cで静置し、pHによる凝集経路の違いを比較評価した。

本研究では、Aβ凝集体に特異的に結合することが知られているモノクローナル抗体31-2を用いた⁴⁾。抗体31-2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ことが報告されており、本研究ではこの抗体を用いてAβ凝集過程における中間体や凝集体の形成動態を詳細に解析する。測定には、抗原をHRP標識抗体で直接検出する直接ELISAを使用した。一方、凝集性の高いAβモノマーの調製は困難であるため、本研究では代替としてO-acetyl iso Aβ₄₂を用いた。このイソペプチドは、O-Nアシル転移反応により水溶性のイソペプチドから天然型Aβ₁₋₄₂へと変換されることが報告されており、ジメチルスルホキシド(DMSO)中では

安定で凝集せず、中性の水溶液中に移すと自己組織化が進行し、凝集が開始されることが知られている⁵⁾。これにより、A β 凝集の初期過程を評価することが可能となった。

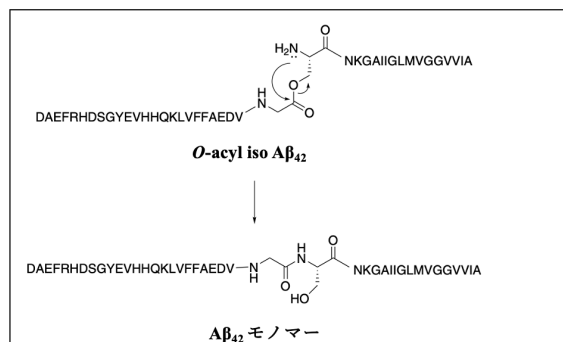


図2. 実験に用いたA β ₁₋₄₂モノマーO-acyl iso A β ₄₂は凝集しないが、水溶液中でA β ₄₂モノマーになり凝集を始める。

2. 実験方法

2-1 A β モノマー

O-acyl iso A β ₄₂をマイクロチューブに入れ、500 μ LのDMSOを加えて溶解し、4 $^{\circ}$ Cで保存した。本実験では、DMSOで保存したO-acyl iso A β ₄₂をPBSで中和することで、自発的にA β ₄₂モノマーに変換させた。

2-3 直接ELISAによる評価

直接ELISAは試料溶液に含まれる目的の抗原を特異抗体と結合させ、酵素反応を利用して吸光度を測定することにより数値化する方法である。本実験では、37 $^{\circ}$ Cの恒温槽で静置したA β 凝集体試料を96 wellプレートに加え、固相化したA β 凝集体にHRP標識抗体31-2を直接反応させ、酵素反応によって得られた吸光度を測定することで、抗体の結合量を定量的に評価した。(図3)

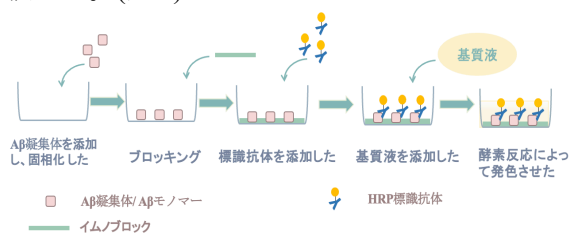


図3. 直接ELISA

3. 結果と考察

本研究ではpH 6.0、7.0、7.4、8.0の条件下でA β 凝集体の形成過程を評価し、抗体31-2を用いてエピトープの変化や中間体の安定性に及ぼす影響を解析することを目的とした。実験の結果、抗体31-2によるELISA値はpH 6で最

も低く、pH 8.0で最も高かった。低pH条件下では、A β ₄₂が線維状凝集体を迅速に形成し、凝集が進むことで抗原エピトープが埋もれ、抗体31-2との結合が困難となったため反応性は低下したと考えられる。一方、高pH条件では線維形成が抑制され、非晶質凝集体が優勢となる傾向があり、抗体31-2はこれら線維形成前の凝集体と特異的に反応できるため、反応しやすいと考えた。これらの結果は、抗体31-2が線維状凝集体よりも非晶質凝集体に高い親和性を持つことを示唆しており、pH条件によるA β ₄₂の凝集状態変化が抗体結合能に直接影響することが明らかとなった。また、中性～弱アルカリ性条件下での結合活性が最も高いことから、抗体31-2を用いた解析や診断実験においては、pHの最適化が重要であることが示された。

4. まとめ

本研究では、アルツハイマー病の発症に関与するとされるA β 凝集体の性質を理解することを目的に、異なるpH条件下での凝集過程を解析した。A β はモノマーからオリゴマーを経て非晶質凝集体(off-pathway)や線維状凝集体(on-pathway)を形成することが知られており、凝集過程や中間体の安定性はpHに依存する。そこで、本研究ではA β モノマーとしてO-acyl iso A β ₄₂を使用し、凝集体に特異的に結合するモノクローナル抗体31-2を用い、pH 6.0、7.0、7.4、8.0の条件下で凝集を開始した。希釈後の溶液は37 $^{\circ}$ Cで静置し、凝集過程におけるエピトープの変化や凝集体形成の動態を評価した。また、直接ELISAを用いて抗体31-2を定量的に解析することで、アミロイド β 凝集体に形成されるエピトープのpH依存性を明らかにする手法を確立した。本研究により、pH依存性に基づくA β 凝集体の形成機構の理解が深まり、アルツハイマー病治療戦略への応用に向けた基盤情報を提供することが期待される。

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) Selkoe, J.D. *et al.* Science, **2002**, 297, 353-356.
- 3) Kuramochi, M. *et al.* Sci. Rep., **2024**, 14, 8134
- 4) Shimizu, T. *et al.*, J. Biosci. Bioeng, **2012**, 115, 216-220
- 5) Sohma, Y. T. *et al.*, Tetrahedron Letters, **2004**, 45, 5965-5968.