

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2009.03) 9巻1号:75～77.

平成19年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題  
アミロイドベータペプチドの修飾とその性質解明

穴戸直美

## 19) アミロイドベータペプチドの修飾とその性質解明

研究代表者 穴戸 直美

### [背景と目的]

アルツハイマー病 (AD) などの神経変性疾患の高齢者が急増し、社会問題になっている。これら神経変性疾患には、老人斑の蓄積や神経原繊維変化が認められる。老人斑や神経原繊維変化には酸化ストレス発生の痕跡が強く認められる。申請者らは遷移金属の触媒する脂質過酸化反応と活性酸素種 (ROS) 生成反応をモデルとし、アミロイドベータペプチド ( $A\beta$ , 図1) 自体は反応を抑制する、すなわち抗酸化作用を示すことを明らかにした<sup>[1,2]</sup>。しかし抗酸化剤は遷移金属の存在で逆に酸化的に働くことがある。 $A\beta$ も抗酸化作用の発現によりそれ自身が酸化修飾される。この修飾された $A\beta$ の性質を明らかにするため、各種の酸化的条件を用いて、 $A\beta$ の修飾箇所の解明ならびに修飾された $A\beta$ の毒性評価を試みた。

### [方法]

① $A\beta$ の特異的修飾： $A\beta$ の毒性発現のモデルとして、扱い易い $A\beta$  25-35が使用されている。これは $A\beta$  1-42の疎水性部分である。一方、 $A\beta$ の親水性部分について、遷移金属に対しては抗酸化的に働く事を確認している。これら $A\beta$ の部分ペプチドを処理した反応生成物について、主に起こるであろう付加反応を、分子量の増加として質量分析 (MALDI-TOF-Mass) で確認した。この反応条件を基に $A\beta$  1-42を同様に処理し、修飾を質量分析で確認した。

② $A\beta$ の毒性測定： $A\beta$ の毒性発現は、単量体の $A\beta$ が oligomer を経て不溶性の沈着物となることで説明される。現在では dimer やより大きな oligomer が細胞内小器官に変性を与えるモデルが報告されている。Aggregationの進行は、それらに取り込まれたチオフラビンTの蛍光強度増大で観測される。Nativeな $A\beta$  1-

DAEFRHDSGY<sup>10</sup>EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLM<sup>35</sup>VGGVVIA<sup>42</sup>

図1  $A\beta$  1-42のアミノ酸配列。N端側が親水性でC端側が疎水性である。

42をコントロールとして、(a) 親水性領域を修飾した Aβ 1-42、(b) 疎水性領域を修飾した Aβ 1-42、の aggregation を、チオフラビン T の取り込み測定から比較した。

[結果]

本研究では Aβ の修飾箇所の解明ならびに修飾された Aβ の毒性評価を試みた。結果を表 1 にまとめて示す。

① Aβ の特異的修飾：Aβ 1-42、Aβ の疎水性部分ペプチド (Aβ 25-35) ならびに Aβ の親水性部分ペプチド (Aβ 1-12、Aβ 1-16、Aβ 1-28) をそれぞれ各種条件で処理した反応生成物について、修飾の有無を質量分析 (MALDI-TOF-Mass) で確認した。結果、親水性部分の修飾はフェリルミオグロビン (フェリル Mb) によって起こり Tyr10 を介した dimer や trimer を生成すること、一方疎水性部分の修飾はほぼ等モルの次亜塩素酸で起こり特異的な (Met35) 酸化となることを見出した。また修飾部位が不明であるが、第 2 相薬物代謝酵素を誘導することから着目した食品成分のスルフォラファンも Aβ を修飾する事を確認した。

② Aβ の毒性測定：Aβ の毒性発現は、単量体の Aβ が oligomer を経て不溶性の沈着物となることで説明される。Aβ の凝集の進行は、それらに取り込まれたチオフラビン T の蛍光強度増大で観測される。結果、fer-rylMb 処理では Aβ 25-35 では凝集阻害したが Aβ 1-42 には無効、次亜塩素酸処理では Aβ 25-35 を等モルで、Aβ 25-35 も約 2 倍量で凝集阻害した。スルフォラファン処理は凝集を阻害しないか寧ろ促進した。

表 1 Aβ の修飾とその性質

| 酸化剤               | フェリル Mb                                | 次亜塩素酸                   | スルフォラファン                 |
|-------------------|--|-------------------------|--------------------------|
| 修飾部位              | 親水性部位 <sup>1</sup>                     | 疎水性部位 (Met35)           | 不明 (一級アミノ基と推定)           |
| 構造解析 (MALDI-MS)   | Tyr 含むペプチドで dimer/trimer <sup>2</sup>  | Met 含むペプチドで [分子量+16]ピーク | Aβ 1-42は断片化他は付加          |
| 凝集性の測定 (チオフラビンT法) | Aβ 25-35で阻害 <sup>3</sup><br>Aβ 1-42で微増 | 阻害 <sup>2</sup>         | Aβ 25-35、Aβ 1-42で影響なしか微増 |

<sup>1</sup> Aβ 25-35 単独では疎水性部位も修飾した。

<sup>2</sup> di-Tyr の蛍光生成も確認した。

<sup>3</sup> 光散乱 (Ex. 300 nm, Em. 608 nm) も低下することを確認した。

[考察]

ミオグロビンは過酸化水素存在下でフェリル Mb となりペルオキシダーゼ活性を示すことが知られている。近年脳神経系にニューログロビンというヘモグロビンやミオグロビンと進化的に同種のヘムを持った酸素運搬体が存在することが報告された。また、AD でミクログリアが活性化されミエロペルオキシダーゼ活性が検出されること、またミクログリアと老人斑は局在がオーバーラップしているとの報告がある。繊維化した Aβ によるミクログリアの誘導と異常活性化が疑われ、AD 脳では炎症性の酸化剤 (フェリルニューログロビン、ミエロペルオキシダーゼ系で生成する次亜ハロゲン酸) の生成亢進が予想されるが、後者と Aβ との反応生成物は凝集性が低いことから老人斑形成には寄与しないと考えられる。「フェリルニューログロビン生成→Aβ の oligomer 生成」のスキームでは、症状と老人斑の量との間に相関がないケースを「アミロイド内因説」により説明できる、すなわち「老人斑形成→ミクログリア異常活性化=ミエロペルオキシダーゼ活性誘導→老人斑分解；ミクログリアの活性化不全の場合は老人斑残存」とすると、老人斑の有無に関わらず Aβ は細胞内小器官の機能異常を引き起こすと考えている。今回幾つかの食品成分について、比較的分子量かつ脳脊髄液関門を通過する可能性ありとして着目し、Aβ の分解促進が可能かどうか検討した。結果、第 2 相薬物代謝酵素を誘導することから着目したブロッコリー・芽キャベツ成分のスルフォラファン (分子量 177) とニンニク・タマネギ成分のアリルイソチオシアネート (分子量 99) については、いずれも Aβ と反応すること、また各種ペルオキシダーゼ活性に対する穏やかな阻害を確認したが、Aβ との反応生成物は凝集能を保持したままであり老人斑の直接的な消去活性については望めない。今後は、フェリルニューログロビン生成源 (過酸化水素生成源) を特定し、また親水性部分でクロスリンクした Aβ 1-42 がミエロペルオキシダーゼ系で分解されるか確認する。今回チオフラビン T 法で評価できなかった親水性部分ペプチドの dimer/trimer が毒性を持つ可能性を、培養細胞系を用いて評価することも必要である。

[謝辞]

質量分析は旭川医科大学実験実習機器センター・阿

久津弘明氏に測定および解析上の助言を頂きました、  
深く感謝申し上げます。

[文 献]

- 1) M. Nakamura, N. Shishido, A. Nunomura et al., Three histidine residues of amyloid beta peptide control the redox activity of copper and iron, *Biochemistry*, 46 (44), 12737-12743 (2007)
- 2) T. Hayashi, N. Shishido, K. Nakayama et al., Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid-beta peptide, *Free Radical Biology & Medicine*, 43 (11), 1552-1559 (2007)