

深刻になっている。その代表的な疾病としてアルツハイマー病 (AD) があり、加齢と共にアミロイドペプチド (A $\beta$ ) が不溶性の老人斑となることが特徴である。老人斑は主に A $\beta$  からなりこれに高い濃度の遷移金属 (銅、鉄) 及び亜鉛が含まれている。また酸化ストレスの痕跡が認められる。AD の治療として、全長 A $\beta$  を用いたワクチン療法が注目された。しかしながら、それらの一連の研究から得られた結果は、老人斑は除去されたが AD の進行は防げなかったというものである。したがって、AD の A $\beta$  仮説 (毒性説) は再検討の必要に迫られている。我々は *in vivo* の系で、遷移金属 (銅、鉄) の触媒する活性酸素 (ROS) 生成が A $\beta$  で抑制され、A $\beta$  が抗酸化作用を示すことを明らかにした。本研究ではさらに脳で起こる酸化ストレスとして、活性化されたミクログリアが生成する次亜塩素酸 (HOCl) およびクロロアミン (taurinechloramine) と A $\beta$  との反応を検討した。これを神経細胞レベルに適用し、A $\beta$  の本来の働きを明らかにする。

#### [研究方法]

A $\beta$  毒性説の根拠である (1) A $\beta$  自身および (2) A $\beta$  と遷移金属 (銅、鉄) が共存したときのラジカル生成能、活性酸素生成能を、それぞれ ESR を用いたスピントラップ法および感度の良い化学発光法で検討した。反応後の A $\beta$  の構造変化は Mass スペクトルで検討した。A $\beta$  は全長 (A $\beta$  1-42, A $\beta$  1-40)、N 端側の親水領域部分 (A $\beta$  1-16, A $\beta$  1-12)、C 端側の疎水領域部分のみ (A $\beta$  25-35) を用いた。全長 A $\beta$  には methionine 残基 (Met35) が存在し、酸化還元反応との関与が推定されている。そのため Met 残基を持たない A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-12 を用いて、HOCl との反応を全長 A $\beta$  と比較した。また taurinechloramine を用いて、HOCl と A $\beta$  との反応と比較検討した。神経細胞はマウス胎児海馬ニューロンから調製し培養液とした。

#### [結果]

100 $\mu$ M の全長 A $\beta$  (A $\beta$  1-42, A $\beta$  1-40) 溶液を 6 - 12 時間 incubation したが反応液に A $\beta$  自身のラジカルは ESR で検出されず、また  $\sim$  $\mu$ M 程度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成も確認されなかった。A $\beta$  自身の神経毒性発現を支持する、A $\beta$  自身のラジカルおよび活性酸素の生成を追試したが再現されなかった。

### 9) アルツハイマー病における A $\beta$ (アミロイドペプチド) 仮説の検証

研究代表者 中村 正雄

#### [研究目的]

高齢化社会の到来で、神経変性に伴う疾病の増加が

次にAβの抗酸化能発現時にAβがどう修飾されるか検討した。Aβと遷移金属(銅、鉄)が共存すると、遷移金属の結合部位が酸化修飾される報告がある。我々は遷移金属(銅、鉄)による酸化ストレス発生をAβが抑制する事を報告した。そこでAβを水酸ラジカル( $Fe^{2+} + H_2O_2$ )及びHOClで処理し、Aβ自身が化学修飾されているかどうかMALDI TOF Massで解析した。Aβ 25-35、Aβ 1-42はそれぞれ1および3当量のHOClとの反応でそれぞれm/z値1076、4527といずれも16 Daの増加を示すピークに変化した。PSD (post source decay) 法によるペプチドの解析からAβのMet35に酸素原子が1つ入り、sulfoxide型に変化したことがわかった。Aβと水酸ラジカルとの反応ではsulfoxide型の生成はHOClにくらべ10%程度の収率であった。Aβ 25-35ではこれに伴い繊維化と神経細胞毒性も抑制された。一方Met残基を持たないAβ 1-16、Aβ 1-12もHOClと速やかに反応し( $\sim 10^6 M^{-1} s^{-1}$ )、44 Daの減少と1つの塩素化を示す生成物を与えた。この構造変化は加えたHOCl量に依存した。TaurinechloramineはHOClと比べ、monochlorodimedoneおよびascorbateに対する反応速度は著しく低い(1/10<sup>4</sup>以下)、Aβ 1-42およびAβ 1-16への反応性を保持し、HOClとの反応と同様の生成物を与えた。Aβの持つMet残基がROSのうちHOClと高い反応性を持つ事が明らかとなった。

#### [考察]

老人斑(SPs)にAβの広範なsulfoxide型が存在し、このほか酸化ストレスの発生も報告されている。またmicrogliaとmyeloperoxidaseが共存していることも報告されている。SPs中のAβのsulfoxide型の生成は、HOClまたはHOCl由来のクロロアミンの関与を推定させる。以上からAβの抗酸化的役割が強く示唆される。

#### [参考文献]

- 1) Three histidine residues of amyloid-β peptide control the redox activity of copper and iron. Nakamura M, Shishido N, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Hayashi Y, Nakayama K and Hayashi T. *Biochemistry*, 46 (44), 12737-12743 (2007)
- 2) Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid-β peptide. Hayashi T, Shishido N, Nakayama K, Nunomura A, Smith MA, Perry G and Nakamura M. *Free Radical Biology & Medicine*, 43 (11), 1552-1559 (2007)
- 3) Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. Moreira PI, Nunomura A, Nakamura M, Takeda A, Shenk JC, Aliev G, Smith MA and Perry G. *Free Radical Biology & Medicine*, 44 (8), 1493-505 (2008)
- 4) Three histidine residues of amyloid beta peptide control the redox activity of transition metals. Nakamura M, Shishido N, Nunomura A, Smith MA, Perry G and Hayashi T. Abstract for Biochemical Society focused meeting (2008 London)