

実験は HEPES 緩衝液を用い中性 (pH 7.0)、25°C で行った。

[結果]

1. Aβ (Aβ 1-12, Aβ 1-16, Aβ 1-28, Aβ 1-40, Aβ 1-42) を以下の酸化ストレス (酸化的分子種) で処理した。50 μM の Aβ を含む溶液に当モルの Cu²⁺ または Fe³⁺ を加え、H₂O₂ 非存在下または存在下で反応させた。

Cu²⁺ と H₂O₂ の共存下では Aβ に帰属する主ピークに加え +16Da のピークが現れる。

Cu²⁺ 単独または Fe³⁺ を加えた場合は有意の +16 Da のピークは認められない。

2. Aβ と次亜塩素酸との反応。

Aβ の C 端側に存在する Met35 が次亜塩素酸と特異的に反応することを報告した。Aβ 25-35 または全長 Aβ (Aβ 1-40, Aβ 1-42) では塩素化は検出されず、Met35 の sulfoxide 型が確認された。Aβ 1-12 を 5-10 倍量の次亜塩素酸と反応させると Aβ 1-12 のピークのほか +35 Da、-45 Da のピークがあらわれ一つの塩素が結合するほか、分解反応が併発する事がわかる。Aβ 1-12 の塩素化は生成物を LC / MS 法で解析すると Tyr10 で起こることが明らかとなった (図 1)。

3. Aβ と脂質過酸化物 (advanced glycation end products, HNE, ONE) との反応

Aβ 1-12 を 5-10 倍量の ONE (oxononenal) と反応させると、Aβ 1-12 のピークのほか +118 Da、+136 Da、+154 Da、+276 Da、+292 Da、+308 Da のピークが観測された。これは Aβ 1-12 にそれぞれ一分子 (+154 Da) 又は 2 分子 (+308 Da) の ONE が結合すると考えられる。この反応と同時に脱水やシッフ塩基の形成が起こると推定される。

Aβ 1-40 と ONE の反応でも +118 Da、+136 Da、+154 Da のピークが観測された。HNE、ONE の持つ二重結合に親核的な付加反応が知られており (マイケル反応)、Aβ のアミノ基やイミダゾール基と HNE、ONE との反応が推定できる。

[結論]

Aβ の N 端側に Cu²⁺ に特異的な結合部位の存在が知られている (3N1O)。今回、H₂O₂ 存在下で部位特

25) アミロイドベータペプチド (Aβ) は抗酸化能発現により化学修飾を受ける

研究代表者 中村 正雄

[研究目的]

アルツハイマー病 (AD) は加齢に伴い、脳への老人斑 (SPs) の沈着が特徴である。SPs は主にアミロイドベータペプチド (Aβ) (Aβ 1-42, Aβ 1-40) で構成され、高い濃度の遷移金属 (鉄、銅) および亜鉛を含んでいる。老人斑には酸化ストレスの痕跡が見いだされ、神経変性による AD の発症との関連が指摘されている。本研究では抗酸化物としての Aβ に注目し、様々な酸化ストレスに対してどのように反応し、構造変化するかを明らかにする。

[研究方法]

酸化的分子種との反応による Aβ の構造変化

長さの異なる Aβ (Aβ 1-12, Aβ 1-16, Aβ 1-28, Aβ 1-40, Aβ 1-42) を以下の酸化ストレス (酸化的分子種) で処理し、Aβ の構造変化を MALDI-TOF で検討した。

(a) 遷移金属 (Cu²⁺, Fe³⁺)、(b) 活性酸素種 (水酸ラジカル、次亜塩素酸)、(c) 脂質過酸化反応 (advanced glycation end products, HNE, ONE)

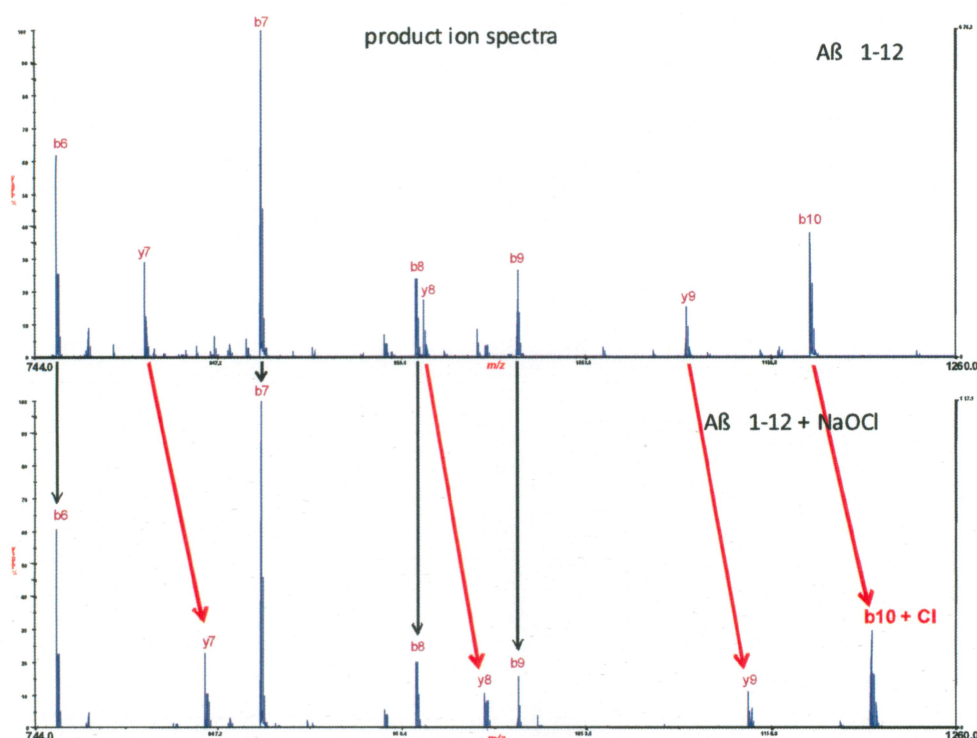


図1 Aβ 1-12 および Aβ 1-12 の塩素化物の MS スペクトル

異的な His の酸化による、酸素原子の導入が観測された。Fe³⁺ では同様の結果を得られず、Cu²⁺ による部位特異的な化学修飾が起こる。Aβ と次亜塩素酸との反応では、Met35 が次亜塩素酸と特異的に反応し sulfoxide 型が確認された。Met35 が存在しない Aβ (Aβ 1-12、Aβ 1-16) では Tyr10 への一塩素化が認められた。Aβ と脂質過酸化物 (HNE, ONE) との反応ではアミノ基または His 残基へのマイケル付加反応が確認された。

以上から、Aβ が種々の活性酸素種と反応し、化学修飾されることが明らかとなった。

[参考文献]

1) Specific reaction of Met 35 in amyloid beta peptide with hypochlorous acid. Nakamura M, Shishido N, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Akutsu H, Hayashi T. *Free Radic Res* 44(7), 734-741 (2010)

2) Intraneuronal amyloid beta accumulation and oxidative damage to nucleic acids in Alzheimer disease. Nunomura A, Tamaoki T, Tanaka K, Motohashi N, Nakamura M, Hayashi T, Yamaguchi H, Shimohama S, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G. *Neurobiol Dis* 37(3), 731-737 (2010)

3) Reexamining Alzheimer's Disease: Evidence for a Protective Role for Amyloid-beta Protein Precursor and Amyloid-beta. Castellani RJ, Lee HG, Siedlak SL, Nunomura A, Hayashi T, Nakamura M, Zhu X, Perry G and Smith MA. *Journal of Alzheimer's Disease*, 18(2), 447-452 (2009)

4) 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), 1493-1505 (2008)