

卵白アルブミン分泌シグナルペプチドを用いた アルツハイマー病予防食品の開発

京都工芸繊維大学分子化学系・教授 田中 直毅

■ 目的

アルツハイマー病の原因は脳内で異常凝集したアミロイド β (A β)蛋白質による神経細胞障害によるものであることが知られている。最近ポリフェノール類に蛋白質異常凝集抑制機能が見出され、将来的に食品によってアルツハイマー病を予防し得ることが示唆された。一方、申請者はこれまで卵白の主成分蛋白質である卵白アルブミンをN末端の分泌シグナルに相当するペプチド acetyl-GSIGAASMEFCFDVFKELKVHH (pN₁₋₂₂) のナノ粒子化は、蛋白質の凝集を抑制する機能を発現することを見出した。本課題ではアルツハイマー病予防食品としての応用展開を視野にいれ、この pN₁₋₂₂ ペプチドのナノ粒子によって A β の凝集および細胞毒性を抑制する研究を行う。

■ 方法

pN₁₋₂₂ は Genscrip 社に化学合成依頼し、A β は細胞毒性を示す A β (1-42) をペプチド研究所から購入した。pN₁₋₂₂ 微粒子は PBS 中 65°C において 1 時間熱処理して調製した。ペプチドの二次構造変化は CD 分光光度計 Jasco J-720 によって観測し、ナノ粒子の表面電荷は日本ルフト社顕微鏡電気泳動式ゼータ電位測定装置 Model502 によって決定した。アニリノナフタレンスルホン酸 (ANS) による微粒子表面の疎水性解析およびチオフラビン T (ThT) による A β の凝集解析は島津製作所蛍光光度計 RF2000 を用いて行った。ナノ微粒子の粒径決定および A β との相互作用観察には JEOL 社電子顕微鏡 JEM-1200EX を用いた。PC12 の培養はコラーゲン Type I ディッシュ上で 10% ウシ胎児血清と 10% 馬血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium を用いて 37°C、5% CO₂ の条件で行った。

■ 結果および考察

65°C の熱処理によって形成される pN₁₋₂₂ の微粒子の粒径 20nm 程度であることが電子顕微鏡観察により判明した。また熱処理にともない pN₁₋₂₂ の二次構造は、粒子形成にともないヘリックス含量が減少することが CD 測定によって判明しており、ランダム構造に近い状態で会合していることがわかった。さらに ANS による表面解析ではナノ粒子は親水性の高い表面を有することが判った。さらに微粒子のゼータ電位は、約 -37mV であり acetyl-GSIGAASME を微粒子表面に配置している可能性が示唆された。

次に pN₁₋₂₂ 微粒子による A β の凝集抑制を ThT 蛍光アッセイによって調査した。A β の凝集は微粒子非存在下、3 時間後に開始されたが、pN₁₋₂₂ 濃度が高くなるにつれて立ち上がり時間が遅くなり、46 μ M (ペプチド濃度) の pN₁₋₂₂ 微粒子共存下では 6 時間となった。このことから pN₁₋₂₂ 微粒子は A β と相互作用して凝集抑制することが示唆された。さらに pN₁₋₂₂ 粒子共存下において凝集した A β を TEM で観察すると、A β の凝集体の周辺に微粒子が存在しており、pN₁₋₂₂ 粒子と A β が直接的に相互作用することが確認できた。

次に pN₁₋₂₂ 粒子の細胞毒性抑制効果を調査するため、A β 共存下における PC12 細胞の生存率に関する MTT アッセイを行った。23 μ M の A β の存在下で培養した PC12 細胞の 24 時間後の生存率は約 60% であるが、46 μ M の pN₁₋₂₂ 微粒子存在下においても同様であった。以上により pN₁₋₂₂ 微粒子は A β の凝集を抑制することはできるが、細胞死を抑制することはできないことが判った。これは A β による細胞毒性の原因とされる微小な凝集体が表面に吸着されないためであると考えられる。今後は pN₁₋₂₂ のアミノ酸配列を改変して疎水性を向上させて、微小な凝集体を粒子表面に結合できる微粒子を設計する。

■ 結語

pN₁₋₂₂ は 65°C の熱処理によって負電荷を有する親水性の 20nm 程度の微粒子を形成した。pN₁₋₂₂ 微粒子は A β と結合した凝集を抑制することが明らかになったが pN₁₋₂₂ 微粒子細胞死を抑制することはできなかった。今後 pN₁₋₂₂ のアミノ酸配列を改変して疎水性の高い微粒子を設計し、A β による細胞毒性の抑制を実現する。