
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。