蛋白質異常凝集抑制機能をもつ卵白ナノ粒子の開発と アルツハイマー病予防食品への応用

京都工芸繊維大学分子化学系・助教 和久 友則

■ 目的

ストレスや老化によって生体内で異常凝集した蛋白質は、細胞死を誘導してアルツハイマー病やパーキンソン病など様々な疾患を引き起こすことが知られている。蛋白質の異常凝集抑制は、これらの疾患に対する治療法を確立する上で有用なアプローチであると期待される。助成者の研究室ではこれまでに、卵白の主成分蛋白質であるオボアルブミン(OVA)由来の断片ペプチドが形成するナノ粒子が蛋白質異常凝集を抑制する機能をもつことを見出した。しかし、このペプチドを卵白から得るためには、①卵白からの OVA の抽出、② OVA の酵素処理、③酵素処理物からの目的ペプチドの単離などの複数工程が必要であり、工業レベルでの実用化は容易ではない。そこで本研究では、これまでに収集している知見を基にして、卵白から簡便な方法で作製することが可能であり、蛋白質異常凝集抑制機能をもつナノ粒子を開発し、アルツハイマー病予防食品へと応用することを目的とする。本年度は、卵白蛋白質のうち含率の高い OVA、リゾチーム(LYZ)、オボトランスフェリン(OTF)の三種類を選択し、これらを主成分とするナノ粒子を作製した。得られたナノ粒子が、アルツハイマー病の原因の一つとされるアミロイド β ペプチド(A β (1-42))の線維化にどのような影響を与えるかについて検討した。

■ 方法

ポリエチレングリコールメチルエーテル(mPEG, Mw=2,000)とクロロトリアジンとの反応から mPEG の末端水酸基にクロロトリアジン基を導入した PEG 誘導体を合成した。次に、この PEG 誘導体と卵白蛋白質との反応により PEG 化卵白蛋白質を合成した。PEG 化卵白蛋白質のジクロロメタン (DCM)溶液にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH7.4)を加え、超音波処理を行うことでエマルションを 得た。このエマルションより DCM を留去した後、純水で透析することでナノ粒子を得た。調製した 卵白蛋白質ナノ粒子が A β (1-42)の線維形成に与える影響を、チオフラビン T(ThT) 蛍光アッセイに よって定量的に評価した。

■ 結果および考察

卵白の主成分である三種類の蛋白質 (LYZ、OVA、OTF)の PEG 修飾体を合成した。得られた PEG 化卵白単蛋白質を SDS-PAGE により解析したところ PEG 修飾による分子量の増加が確認された。また、蛋白質一分子当たりの PEG 導入量は、それぞれ 9 分子 (LYZ)、18 分子 (OVA)、5 分子 (OTF)であることがプロトン核磁気共鳴スペクトル測定より明らかになった。 PEG 化卵白蛋白質を含む有機溶媒と水との 0/W エマルションから、有機溶媒を留去することで PEG 化卵白蛋白質を主成分とするナノ粒子を作製した。いずれの蛋白質ナノ粒子も、粒子径はおよそ 100nm であり負に帯電した表面をもつことが透過型電子顕微鏡観察および ξ -電位測定よりわかった。さらに、 ξ - ThT 蛍光アッセイより、三種類の蛋白質ナノ粒子は ξ - A ξ (ξ - 100 の線維化を抑制するが、その作用機序は蛋白質の種類により異なることが示唆された。今後、ナノ粒子の種類による作用機序の違いについてより詳細な検討をする。

■ 結語

卵白の主成分である三種類の蛋白質 (LYZ、OVA、OTF)の PEG 修飾体のナノ粒子化に成功した。いずれのナノ粒子もアルツハイマー病の病原蛋白質である $A\beta$ (1-42)の線維化を抑制することがわかった。ナノ粒子の線維化に対する作用機序は、蛋白質の種類により異なることが示唆され、今後この点を明らかにすることが重要である。これらの知見をもとに、 $A\beta$ (1-42)の線維化を抑制するナノ粒子を、卵白そのものから作製する技術を確立するとともに機能性食品へと応用する予定である。